
FACULTATEA DE MEDICINĂ

DISCIPLINA OBSTETRICĂ GINECOLOGIE II

B-dul 21 Decembrie, Nr. 55.
Telefon: 0264596893

www.umfcluj.ro



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

**MODIFICĂRI STRUCTURALE ALE
TEGUMENTELOR ȘI MUCOASELOR
ORGANELOR GENITALE LA FEMEIE
ÎN PERIOADA CLIMACTERICĂ**

Doctorand **Radu Florin Mocan (Mocan-Hognogi)**

Conducător de doctorat **Prof. Univ. Dr. Nicolae Costin**

CUPRINS

INTRODUCERE	13
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	15
1. Menopauza	17
1.1 Introducere	17
1.2 Etapele perimenopauzei	18
1.2.1 Premenopauza	18
1.2.2 Menopauza	18
1.2.3 Postmenopauza	18
1.2.4 Senescența	19
1.3 Clasificarea menopauzei	19
1.4 Endocrinologia menopauzei	20
1.4.1 Gonadotropinele	20
1.4.2 Estrogenii	21
1.4.3 Progesteronul (P)	21
1.4.4 Androgenii	22
1.5 Modificările metabolice în menopauză	23
1.6 Aspecte clinice ale menopauzei	24
1.6.1 Introducere	24
1.6.2 Modificările anatomice	25
1.6.3 Tulburările menstruale	26
1.6.4 Modificări de tip psihologic și comportamental	26
1.6.5 Instabilitatea vaso-motorie	27
1.6.6 Modificări atrofice uro-genitale și cutanate	27
1.6.7 Modificări cutanate de tip androgenic	29
1.6.8 Modificări cardiovasculare	29
1.6.9 Osteoporoza	30
1.7 Conduita în menopauză	32

2	Estrogenii	34
3	Terapia de substituție hormonală	36
3.2	Introducere	36
3.3	Beneficiile TSH	36
3.4	Indicațiile TSH	37
3.5	Tipuri de TSH	37
3.5.1	Estrogenii	37
3.5.2	Progesteronul	38
3.5.3	Preparate estroprogestative combinate	38
3.6	Administrarea TSH	39
3.6.1	Administrarea orală	39
3.6.2	Administrarea transdermică	40
3.6.3	Administrarea subcutanată	40
3.6.4	Implantele	40
3.6.5	Administrarea intramusculară	41
3.6.6	Administrarea vaginală	41
3.6.7	Administrarea pulsatilă, pe cale nazală.	42
3.7	Efectele adverse ale TSH	42
3.8	Contraindicațiile TSH	43
	CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	45
1.	Ipoteza de lucru/ obiective	47
2.	Metodologia Generală	49
3.	Studiul 1. Studiul histologic și electronomicoscopic asupra vulvei la femelele de șobolan ovariectomizate, aflate sub tratament estrogenic.	53
3.1	Introducere	53
3.2	Ipoteza de lucru	54
3.3	Material și metode	54
3.3.1	Grupuri	54
3.3.2	Administrarea estrogeniilor	55

3.3.3	Studiul histologic și electronomicroscopic	56
3.3.4	Analiza statistică	57
3.4	Rezultate	57
3.5	Discuții	72
3.6	Concluzii	73
4.	Studiu 2-Reacția epitelului vaginal la administrarea de estrogeni după ovariectomie bilaterală la femelele de șobolan.	75
4.1	Introducere	75
4.2	Ipoteza de lucru	77
4.3	Material și Metode	77
4.3.1	Grupuri	77
4.3.2	Administrarea estrogenilor	78
4.3.3	Studiul histologic și electronomicroscopic	79
4.3.4	Analiza statistică	80
4.4	Rezultate	80
4.5	Concluzii	91
5.	Studiu 3- Rolul terapiei de substituție hormonală în tratarea atrofiei vaginale	93
5.1	Introducere	93
5.2	Ipoteza de lucru	94
5.3	Material și metodă	94
5.3.1	Subiecți	94
5.3.2	Prelevarea de mucoasă vaginală	96
5.3.3	Parametrii studiului	97
5.3.4	Antigenul KI 67	97
5.3.5	Administrarea de Colpotrophine	98
5.3.6	Analiza statistică	98
5.4	Rezultate	99
5.5	Discuții	102
5.6	Concluzii	103

6. Discuții generale	105
7. Concluzii generale	109
8. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	111

Cuvinte cheie: menopauză, estrogeni, terapie de substituție hormonală, atrofie vulvo-vaginală, microscopie optică, microscopie electronică de transmisie.

INTRODUCERE

Menopauza reprezintă o perioadă evolutivă, de trecere de la faza reproductivă a vieții femeii la vârsta bătrâneții. Mai poate fi definită ca lipsa definitivă a menstruației ce apare în urma reducerii activității ovariene foliculare.

Reducerea funcției ovariene în menopauză conduce la apariția unor modificări importante de tip endocrinologic, biochimic, fiziologic și psihologic.

Impactul și importanța socială a simptomelor din menopauză devine cu atât mai evidentă dacă luăm în considerare că populația lumii se compune dintr-un procent de 5% din femei cu vârsta între 45-54 de ani. Statistic se apreciază că 5% din acestea devin incapabile de lucru din cauza simptomatologiei specifice și alte 20% pot fi capabile de lucru numai condiționat.

Atât la nivel național, european și mondial, justificarea cercetării acestei teme atât de frecventă, poate chiar normală în evoluția vieții femeii, numită “perioada climacterică” sau “menopauza“, se bazează pe faptul că aproape toate studiile arată o creștere accentuată a speranței de viață, ce va duce în mod inevitabil la creșterea numărului femeilor din perioada climacteriului.

Obiectivul general al studiului încearcă să demonstreze faptul că datorită creșterii speranței de viață, numărul femeilor aflate în menopauză va crește, astfel încât tabloul clinic variat al menopauzei împreună cu modificările tegumentelor și mucoaselor organelor genitale datorate reducerii nivelului de estrogenii circulanți, modificări reprezentate de atrofia labilor și vaginului, reducerea pliurilor mucoasei vaginale, diminuarea lubrefierii vaginale, riscul mărit de infecții vaginale, diminuarea vascularizației vulvei și vaginului, diminuarea senzitivității, reducerea volumului sânilor, a tonusului musculo-aponevrotic și capacitatea de stimulare redusă a sânilui vor deveni acuze mai frecvente, mai numeroase, cu un important impact asupra calității vieții.

Acest studiu are scopul de a arăta importanța utilizării terapiei de substituție hormonală asupra acestor simptome ce apar în urma reducerii nivelului estrogenilor circulanți, demonstrând în final atât rolul terapeutic cât și cel preventiv al terapiei de substituție hormonală.

Într-o primă mare etapă a studiului am realizat un model experimental de inducere a stării de anoestrus, de “menopauză”, prin ovariectomie bilaterală la femelele de șobolan, rasa Wistar. Acest model experimental, a cuprins două studii experimentale și a avut obiectivul de-a evidenția

prin examinare histopatologică, microscopie optică și electronmicroscopie modificările structurale și ultrastructurale apărute la nivelul vulvei și vaginului, generate de ovariectomia bilaterală precum și răspunsul acestor țesuturi la administrarea de estrogeni injectabili. Rezultatele au confirmat că ovariectomia a indus în mod cert instalarea modificărilor atrofice la nivelul epitelului vulvar și vaginal, iar utilizarea terapiei estrogenice a determinat revenirea la normalitate a epitelului vulvo-vaginal printr-o hiperplazie la nivelul tuturor straturilor afectate inițial de ovariectomie. Rezultatele au fost confirmate atât prin studiu histopatologic cât și prin studiu electronmicroscopic.

În a doua etapă a studiului, am realizat un studiu clinic, care a urmărit remiterea și reducerea atrofiei vaginale la pacientele aflate la menopauza prin administrarea locală, intravaginală de ovule cu conținut estrogenic. Rezultatele obținute în urma examenului histopatologic au arătat rolul terapeutic al terapiei de substituție hormonală.

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Stadiul actual al cunoașterii, este structurat în 3 capitole principale, Menopauza, Estrogenii și Terapia de Substituție hormonală, capitole care prezintă și discută aspectele fiziologice și patologice asociate menopauzei, principalele caracteristici și funcții ale estrogeniilor, precum și rolul terapiei de substituție hormonală în menopauză, în vederea tratamentului acestor patologii asociate menopauzei, patologii ce determină o importantă scădere a calității vieții la marea majoritate a femeilor aflate în menopauză.

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

1. Ipoteza de lucru/obiective

Cercetarea propusă în studiul de față a fost orientată și s-a bazat pe 3 direcții principale:

1. Realizarea unui studiu experimental, efectuat pe femele de șobolan, care să pună în evidență modificările atrofice ce apar la nivelul epitelului vulvar în urma ovariectomiei bilaterale, dar și răspunsul acestuia după administrarea de estrogeni injectabili pentru o perioadă de 14 zile.
2. Realizarea unui studiu experimental, efectuat pe femele de șobolan, care să pună în evidență modificările atrofice ce apar la nivelul epitelului vaginal în urma ovariectomiei bilaterale, dar și răspunsul acestuia după administrarea de estrogeni injectabili pentru o perioadă de 14 zile.
3. Realizarea unui studiu clinic, care să arate rolul TSH în tratarea atrofiei vaginale, la femeile aflate în menopauză, prin aplicarea locală, intravaginală a unui preparat estrogenic, Colpotrophine.

Studiile efectuate se încadrează în principal în domeniul cercetării fundamentale, deoarece s-a urmărit dobândirea unor cunoștințe noi, precum și verificarea unor ipoteze, modele conceptuale și a unor teorii în ceea ce privește rolul TSH în tratarea atrofiei vulvo-vaginale ce apare în menopauză.

2. Metodologie generală

Studiul 1 și studiul 2, ambele studii experimentale s-au desfășurat în perioada 15.01.2015-01.03.2015 și au fost realizate utilizând șobolani albi, femele, rasa Wistar, cu o greutate medie de 200 g, în număr de 30, proveniți de la Biobaza Universității de Medicină și Farmacie “Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca.

Au fost realizate următoarele grupuri de studiu:

- *Grup 1* - martor absolut, premenopauză, la care nu s-a practicat nici o intervenție chirurgicală, nici un tratament estrogenic, cuprinde 5 subiecți.
- *Grup 2* - grup operat (ovarietomizat), martor menopauză, nu a primit nici un tratament și cuprinde 5 subiecți.
- *Grup 3* - grup operat (ovarietomizat), care a primit tratament cu Estradiol, un estrogen natural, în doză de 0,2mg/zi/șobolan, pe o perioadă de 14 zile, și cuprinde 6 subiecți.
- *Grup 4* - grup operat (ovarietomizat), care a primit tratament cu Estradurin, un estrogen sintetic, în doză de 0,2 mg/șobolan, o administrare la 7 zile, timp de 14 zile și cuprinde 7 subiecți.
- *Grup 5* - grup operat(ovarietomizat), care a primit tratament cu Sintofolin, un estrogen sintetic, în doză de 0,2mg/zi/șobolan/, timp de 14 zile și cuprinde 7 subiecți.

Din toate loturile s-a prelevat biopsie de la nivel vulvar și vaginal, iar probele prelevate au fost procesate corespunzător atât pentru examenul histopatologic cât și pentru metodologiile tehnicilor de microscopie optică (tehnica secțiunilor semifine) și microscopie electronică de transmisie (TEM).

Studiul 3 s-a desfășurat în perioada 01.05.2016- 01.07.2016, în Clinica de Obstetrică și Ginecologie “Dominic Stanca”, b-dul 21 Decembrie 1989, nr. 53-55, Cluj-Napoca.

Design-ul studiului a fost unul de tip **caz-control**, în studiu fiind înrolate 30 de paciente împărțite în 3 grupuri după cum urmează:

- *Grup 1* : reprezintă lotul martor de femei, aflate în premenopauză, dar care prezintă anumite patologii ginecologice ce necesită un anumit tip de intervenție chirurgicală vaginală pentru rezolvarea patologiei și la care nu s-a administrat preoperator nici un tratament hormonal estrogenic local asupra mucoasei vaginale, cuprinde 10 paciente.
- *Grup 2*: cuprinde paciente aflate la menopauză, instalată normal, indusă chirurgical sau instalată prematur, care prezintă anumite patologii ginecologice ce necesită un anumit tip de intervenție chirurgicală vaginală pentru rezolvarea patologiei, dar la care nu s-a administrat

preoperator nici un tratament hormonal estrogenic local asupra mucoasei vaginale, cuprinde 10 paciente.

- **Grup 3:** cuprinde paciente aflate la menopauză, instalată normal, indusă chirurgical sau instalată prematur, care prezintă anumite patologii ginecologice ce necesită un anumit tip de intervenție chirurgicală vaginală pentru rezolvarea patologiei, dar la care s-a administrat preoperator tratament hormonal estrogenic local și anume **Colpotrophine**, ovule aplicate intravaginal pentru o perioadă de 14 zile, cuprinde 10 paciente.

Scopul acestui studiu este identificarea pacientelor, includerea acestora în studiu în cazul îndeplinirii criteriilor de includere și administrarea de Colpotrophine intravaginal pentru o perioadă de 14 zile la grupul 3 de studiu. Etapa finală a studiului este reprezentată de prelevarea biopsiei vaginale la toate pacientele aflate în studiu, din cele 3 grupuri, iar probele prelevate vor fi supuse examenului histopatologic cu scopul de a pune în evidență comparativ modificările structurale ale epiteliului vaginal la pacientele aflate la menopauză, precum și răspunsul acestuia la administrarea de estrogenic topic local pentru o perioadă de 14 zile.

La fiecare probă prelavată de mucoasă vaginală din cele 3 grupuri s-a urmărit determinarea următorilor parametri:

1. **Morfometria**-prin măsurarea grosimii epiteliului vaginal în 3 puncte, cu cuantificarea grosimii acestuia.
2. **Antigenul KI 67-** este un marker al ciclului celular și al proliferării celulare utilizat pentru estimarea coeficientului de proliferare într-o populație celulară. Antigenul Ki67 este un antigen nuclear exprimat în toate fazele ciclului celular mai puțin în faza G0.
3. **Expresia Receptorilor Estrogenici-** de la nivelul epiteliului vaginal.

3. Rezultate

Pe baza rezultatelor histopatologice obținute din cadrul studiilor experimentale, pe baza morfometriei efectuată la nivelul epiteliului vulvar și vaginal se observă prezența evidentă a atrofiei în grupul 2, comparativ cu grupurile 3, 4, 5, tratate cu estrogeni injectabili unde se pune în evidență prezența marcată a hiperplaziei celulare, a unui infiltrat bogat eozinofilic la nivelul corionului.

Rezultatele prezentate prin cele 2 studii și anume studiul secțiunilor semifine asupra epiteliului vulvar și vaginal normal au demonstrat că în grupul 2, ovariectomia a indus modificări alterative multiple și complexe la nivelul fiecărui epiteliu, modificări care au afectat atât din punct de vedere structural cât și funcțional fiecare nivel al acestora. Epiteliul vulvar și vaginal prezintă alterări celulare la fiecare strat, cu celule puține sau lipsa totală a acestora în unele zone. Comparativ cu grupul 2, în grupurile 3, 4, 5, secțiunile semifine obținute ne relevă o hiperplazie a tuturor straturilor celulare ale epiteliului vulvar și vaginal.

Investigațiile ultrastructurale prin microscopie electronică de transmisie confirmă rezultatele studiului structural bazat pe secțiuni semifine la nivelul grupurilor 3, 4, 5 demonstrând că tratamentul cu estrogeni injectabili a indus o protejare și o refacere a structurilor epiteliului vulvar și vaginal, afectate de ovariectomie. Menționăm că în unele zone ale epiteliului, structura acestora nu este complet refăcută. În ambele studii, se remarcă o hiperplazie mai evidentă la nivelul corionului decât la cel al epiteliului.

Pe baza rezultatelor obținute în urma examenului histopatologic și a celor două metode inovative de vizualizare a structurilor putem afirma că toate cele 3 preparate de estrogeni injectabili utilizați au tratat atrofia evidentă indusă prin ovariectomie bilaterală la nivelul epiteliului vulvar și vaginal.

Pe baza rezultatelor obținute din studiul clinic putem afirma că există diferențe semnificativ statistic între cele 3 grupuri de studiu în ceea ce privește morfometria și expresia receptorilor estrogenici de la nivelul epiteliului vaginal. Menționăm că în ceea ce privește expresia antigenului KI 67 diferențele între grupuri sunt minime, probabil datorită tratamentului de scurtă durată. În urma datelor obținute putem afirma că administrarea de Colpotrophine ovule, având doza de 10 mg promestrină, intravaginal a tratat atrofia vaginală.

4. Concluzii generale

1. Modificările histologice atrofice de la nivel vulvo-vaginal, reprezintă răspunsul direct la carența estrogenică, fiind cu atât mai evidente cu cât ele survin brusc după ovariectomie bilaterală. Studiile noastre experimentale arată faptul că modificările histopatologice din menopauză după administrarea de estrogeni injectabili, sunt reprezentate de hiperplazia celulară, îngroșarea stratului mucos superficial, prezența infiltratului cu eozinofile și mastocite. Toate cele 3 tipuri de estrogeni utilizați au determinat involuția atrofiei cu inducerea unei hiperplazii vulvare și vaginale.

2. Microscopia optică și Microscopia electronică de transmisie pot să reprezinte metode complementare, complexe de diagnostic, utile în înțelegerea și evaluarea clinica a modificărilor vulvare și vaginale care apar în menopauză, precum și în terapia adjuvantă a acestora.

3. Aceste două metode de diagnostic oferă informații, imagini, date, extrem de complexe, de detaliate, punând în evidență inclusiv ultrastructura celulară, astfel încât rezultatele din aceste studii pot să reprezintă cu siguranță un argument cert în practica clinică a utilizării terapiei de substituție hormonală.

4. Studiul nostru clinic a demonstrat faptul că receptivitatea și reacția epiteliului vaginal este una promptă la administrarea de estrogenii, răspuns demonstrat prin creșterea grosimii, a expresiei receptorilor estrogenici la nivelul epiteliului vaginal, epiteliu afectat anterior de atrofia indusă de menopauză.

FACULTATEA DE MEDICINĂ

DISCIPLINA OBSTETRICĂ GINECOLOGIE II

B-dul 21 Decembrie, Nr. 55.

Telefon: 0264596893

www.umfcluj.ro



UMF

UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

ABSTRACT OF PHD THESIS

STRUCTURAL CHANGES OF THE SKIN AND MUCOSAE OF FEMALE GENITAL ORGANS IN THE CLIMACTERIC PERIOD

PhD candidate **Radu Florin Mocan (Mocan-Hognogi)**

Scientific coordinator **Nicolae Costin, PhD Professor**

TABLE OF CONTENTS

INTRODUCTION	13
STATE OF THE ART	15
1. Menopause	16
1.1. Introduction	16
1.2. Stages of perimenopause	17
1.2.1. Premenopause	17
1.2.2. Menopause	17
1.2.3. Postmenopause	17
1.2.4. Senescence	18
1.3. Classification of menopause	18
1.4. Endocrinology of menopause	19
1.4.1. Gonadotrophins	19
1.4.2. Oestrogens	20
1.4.3. Progesterone (P)	20
1.4.4. Androgens	21
1.2. Metabolic modifications during menopause	23
1.3. Clinical aspects of menopause	24
1.3.1. Introduction	24
1.3.2. Anatomical modifications	24
1.3.3. Menstrual disorders	25
1.3.4. Psychological and behavioural modifications	26
1.3.5. Vasomotor instability	26
1.3.6. Urogenital and cutaneous atrophic modifications	27
1.3.7. Androgenic cutaneous modifications	29
1.3.8. Cardiovascular modifications	29
1.3.9. Osteoporosis	30
1.4. Guidelines during menopause	32

2. Oestrogens	35
3. Hormone Replacement Therapy	37
3.1. Introduction	37
3.2. Role and benefits of HRT	37
3.3. Requirements of HRT	38
3.4. Types of HRT	38
3.4.1. Oestrogens	38
3.4.2. Progesterone	39
3.4.3. Oestro-progestative compounds	39
3.5. Administration of HRT	40
3.5.1. Oral administration	40
3.5.2. Transdermal administration	41
3.5.3. Subcutaneous administration	41
3.5.4. Implants	41
3.5.5. Intramuscular administration	42
3.5.6. Vaginal administration	42
3.5.7. Nasal pulsatile administration	43
3.6. Side-effects of HRT	43
3.7. Contraindications to HRT	44
PERSONAL CONTRIBUTION	45
1. Main hypothesis/ objective	47
2. General methodology	49
3. Study 1. Histological and electronmicroscopic study of the vulva in ovariectomised female rats undergoing oestrogen treatment.	52
3.1. Introduction	52
3.2. Main hypothesis	53
3.3. Material and methods	53
3.3.1. Groups	53
3.3.2. Administration of oestrogens	54

3.3.3.	Histological and electronmicroscopic study	55
3.3.4.	Statistical analysis	56
3.4.	Results	56
3.5.	Discussions	71
3.6.	Conclusions	72
4.	Study 2. Reaction of the vaginal epithelium in administration of oestrogens following bilateral ovariectomy in female rats.	75
4.1.	Introduction	75
4.2.	Main hypothesis	77
4.3.	Material and methods	77
4.3.1.	Groups	77
4.3.2.	Administration of oestrogens	78
4.3.3.	Histological and electronmicroscopic study	79
4.3.4.	Statistical analysis	79
4.4.	Results	80
4.6.	Conclusions	91
5.	Study 3. The role of Hormone Replacement Therapy in treating vaginal atrophy.	93
5.1.	Introduction	93
5.2.	Main hypothesis	94
5.3.	Material and methods	94
5.3.1.	Subjects	94
5.3.2.	Collecting samples of vaginal mucosa	96
5.3.3.	Study parameters	97
5.3.4.	Antigen KI-67	97
5.3.5.	Administration of Colpotrophine	98
5.3.6.	Statistical analysis	98
5.4.	Results	98
5.5.	Discussions	101
5.6.	Conclusions	103

6. General discussions	104
7. General conclusions	107
8. Originality and innovative contributions of the thesis	109

Keywords: **menopause, oestrogens, Hormone Replacement Therapy, vulvovaginal atrophy, optical microscopy, transmission electron microscopy.**

INTRODUCTION

Menopause is an evolutionary phase in the life of a female, marking the passage from the reproductive phase to senescence. It can also be defined as a permanent lack of menstruation, following the reduction in ovarian follicular activity.

The reduction in ovarian functions during menopause leads to several important endocrinological, biochemical, physiological and psychological modifications.

The impact and social importance of menopausal symptoms become increasingly evident if one takes into account the fact that 5% of the world's population is made up of women aged 45-54. Statistically, it is estimated that 5% of them become incapable of working because of the specific symptomology, while another 20% are only capable of limited work.

At the national, European and global levels alike, the justification for researching this quite common topic, in fact a normal one in the course of the life of a female, referred to as "climacteric period" or "menopause", is based on the premise that almost all studies indicate an abrupt increase in life expectancy, which will inevitably lead to a greater number of women experiencing climacterium.

The general objective of this study is to demonstrate the fact that, due to the increase in life expectancy, the number of women experiencing menopause will become greater, as will the modifications of membranes and mucosae of the genitals, following the decrease in the levels of circulating oestrogens, modifications accounting for atrophy of the labia and vagina, the reduction of the vaginal mucosa folds, lower vaginal lubrication, an increased risk of vaginal infections, the diminution of vascularisation of the vulva and vagina, decreased sensitivity, the reduction of the size of breasts, of muscular-aponeurotic tonus, and a lessened stimulation capacity of the breast will become ever more commonly occurring ailments, with a significant impact on quality of life.

This study aims to display the importance of using Hormone Replacement Therapy as a response to such symptoms that develop following the reduction of levels of circulating oestrogens, thus demonstrating not only the therapeutic, but also the precautionary role of Hormone Replacement Therapy.

In the first stage of the study, we developed an experimental model of inducing the anoestrus, or "menopausal" state, through bilateral ovariectomy in Wistar female rats. This experimental model comprised two experimental studies and was aimed at exhibiting, through histopathological examination, optical microscopy and electron microscopy, the structural and

ultrastructural modifications occurring at the level of the vulva and vagina, triggered by bilateral ovariectomy, as well as the response of these tissues to the administration of injectable oestrogens. The results confirm that ovariectomy clearly prompted atrophic modifications at the level of the vulvar and vaginal epithelium, while using oestrogen therapy led to the vulvovaginal epithelium returning to a normal state, through hyperplasia at the level of all strata that had previously been affected by ovariectomy. The results have been confirmed both through a histopathological study and through an electron microscope study.

In the second stage of the research, we conducted a clinical study aimed at remission and the reduction of vaginal atrophy in menopausal patients, through the local, intravaginal administration of ova with an oestrogenic content. The results obtained following the histopathological examination have demonstrated the therapeutic role of Hormone Replacement Therapy.

STATE OF THE ART

The state of this art is structured into 3 main chapters, Menopause, Oestrogens and Hormone Replacement Therapy, which present and discuss the physiological and pathological aspects pertaining to menopause, the main characteristics and functions of oestrogens, as well as the role of Hormone Replacement Therapy during menopause, with the aim of treating such pathologies associated with menopause, triggering a significant decrease in quality of life in the vast majority of menopausal women.

PERSONAL CONTRIBUTION

1. Main hypothesis/objectives

This research has relied on 3 main coordinates:

1. To conduct an experimental study on female rats, which would exhibit the atrophic modifications occurring at the level of the vulvar epithelium, as a result of bilateral ovariectomy, as well as the response of the latter to the administration of injectable oestrogens over a 14-day period.
2. To conduct an experimental study on female rats, which would exhibit the atrophic modifications occurring at the level of the vaginal epithelium, as a result of bilateral ovariectomy, as well as the response of the latter to the administration of injectable oestrogens over a 14-day period.
3. To conduct a clinical study, which would demonstrate the role of HRT in treating vaginal atrophy in menopausal women, through the local, intravaginal application of an oestrogenic compound, Colpotrophine.

The studies conducted chiefly fit into the area of fundamental research, as their purpose has been to acquire new knowledge, as well as to verify several hypotheses, conceptual models and theories regarding the role of HRT in treating vulvovaginal atrophy that occurs during menopause.

2. General methodology

Studies 1 and 2, both experimental, were conducted during the period comprised between 15.01.2015 and 01.03.2015, using 30 white female Wistar rats, with an average weight of 200 g, obtained from the Bio-base of the “Iuliu Hațieganu” University of Medicine and Pharmacy in Cluj-Napoca.

The following study groups were created:

- *Group 1* - absolute witness, premenopausal, with no surgical intervention or oestrogen treatment, comprising 5 subjects.
- *Group 2* - operated group (ovariectomised), menopausal witness, with no treatment, comprising 5 subjects.
- *Group 3* - operated group (ovariectomised), which received Estradiol treatment, a natural oestrogen, in a dosage of 0,2mg/day/rat, over a 14-day period, comprising 6 subjects.
- *Group 4* - operated group (ovariectomised), which received Estradurin treatment, a synthetic oestrogen, in a dosage of 0,2 mg/rat, every 7 days, during 14 days, comprising 7 subjects.
- *Group 5* - operated group (ovariectomised), which received Sintofolin treatment, a synthetic oestrogen, in a dosage of 0,2mg/day/rat, during 14 days, comprising 7 subjects.

Biopsies were taken from all lots, at the vulvar and vaginal levels, and the samples were duly processed, both for pathological examination, and for methodologies of optical microscopy techniques (semi-thin sections technique), and transmission electron microscopy (TEM).

Study 3 was conducted in the period 01.05.2016- 01.07.2016, at the “Dominic Stanca” Obstetrics-gynaecology Clinic, at no. 53-55, 21 Decembrie 1989 Boulevard, in Cluj-Napoca.

The design of the study was case-control, with 30 patients enrolled, who were divided into 3 groups, as follows:

- *Group 1*: witness lot, premenopausal, but exhibiting certain gynaecological pathologies requiring a particular type of vaginal surgery so as to resolve those pathologies, with no local oestrogen treatment of the vaginal mucosa administered pre-surgery, comprising 10 patients.
- *Group 2*: includes patients with naturally-occurring / surgically-induced / prematurely-occurring menopause, exhibiting certain gynaecological pathologies requiring a particular type of vaginal surgery so as to resolve those pathologies, with no local oestrogen treatment of the vaginal mucosa administered pre-surgery, comprising 10 patients.

• *Group 3*: includes patients with naturally-occurring / surgically-induced / prematurely-occurring menopause, exhibiting certain gynaecological pathologies requiring a particular type of vaginal surgery so as to resolve those pathologies, to whom local preoperational oestrogenic hormonal treatment had been administered, i.e. **Colpotrophine**, ova applied intervaginally over a 14-day period, comprising 10 patients.

The purpose of this study is to identify the patients, include them in the study if the inclusion criteria are met, and administer Colpotrophine intervaginally over a 14-day period in study group 3. The final stage of the study is the vaginal biopsy, taken from all the patients who participate in the study, with the samples being subjected to a histopathological examination, in order to comparatively assess the structural modifications of the vaginal epithelium in menopausal patients, as well as its response to the administration of local topical oestrogens over a 14-day period.

The following parameters have been followed in every vaginal mucosa sample from the 3 groups:

1. **Morphometry**- by measuring the thickness of the vaginal epithelium in 3 points, with the quantification of its thickness.
2. **Antigen KI-67**- a marker of cell cycle and cell proliferation, used so as to estimate the proliferation coefficient in a cell population. Antigen Ki-67 is a nuclear antigen expressed in all phases of the cell cycle, with the exception of the G0 phase.
3. **Expression of Oestrogen Receptors**- at the level of the vaginal epithelium.

3. Results

Based on the histopathological results obtained during the experimental studies and the morphometry conducted at the level of the vulvar and vaginal epithelium, the obvious presence of atrophy is noted in group 2, compared to groups 3, 4 and 5, treated with injectable oestrogens, where the evident presence of cell hyperplasia is observed, an infiltration at the level of the chorion which is rich in eosinophils.

The results presented through the 2 studies, i.e. the study of semi-thin sections of normal vulvar and vaginal epithelium, have demonstrated that in group 2, ovariectomy induced multiple and complex alternative modifications in the case of every epithelium, which affected each of its levels both structurally and functionally. The vulvar and vaginal epithelium exhibits cell alterations in each layer, with few cells or a total absence thereof in certain areas. Compared to group 2, in groups 3, 4 and 5, the semi-thin sections obtained reveal hyperplasia in all layers of the vulvar and vaginal epithelium.

Ultrastructural investigations through transmission electron microscopy confirm the results of the structural study based on semi-thin sections in groups 3, 4 and 5, thus proving that injectable oestrogen treatment has prompted the protection and recovery of the structures of the

vulvar and vaginal epithelium affected by ovariectomy. It is to be noted that in certain areas of the epithelium, their structure is not fully repaired. In both studies, one notices more evident hyperplasia at the level of the chorion than at that of the epithelium.

Based on the results obtained following the histopathological examination and the two innovative methods of viewing the structures, it becomes apparent that all 3 injectable oestrogen compounds utilised have treated the evident atrophy induced by bilateral ovariectomy at the level of the vulvar and vaginal epithelium.

Based on the results obtained from the clinical study, we can state that there are statistically significant differences between the 3 study groups with regard to morphometry and the expression of oestrogen receptors at the level of the vaginal epithelium. It is to be mentioned that, when considering the expression of antigen KI-67, the differences between the groups are minimal, probably due to the short-term treatment. The data enable us to assert that the intravaginal administration of Colpotrophine ova, with a 10 mg dose of promestriene, has treated vaginal atrophy.

4. General conclusions

1. Atrophic histological modifications at the vulvovaginal level are the direct consequence of oestrogen shortage, even more obviously when they occur suddenly after bilateral ovariectomy. Our experimental studies show that menopausal histopathological modifications after the administration of injectable oestrogens include cell hyperplasia, thickening of the superficial mucus layer, and the presence of eosinophilia and mastocyte infiltration. All 3 types of oestrogens used have triggered the involution of atrophy, while prompting vulvar and vaginal hyperplasia.

2. Optical microscopy and transmission electron microscopy can be complex, complementary diagnostic measures, useful for the understanding and clinical evaluation of vulvar and vaginal modifications occurring during menopause, as well as in their adjuvant therapy.

3. These two methods of diagnosis provide highly complex and detailed information, images and data, while also exhibiting cell ultrastructure, so that the results of such studies would certainly be irrefutable arguments in the clinical practice of using Hormone Replacement Therapy.

4. Our clinical study has demonstrated that the receptivity and reaction of the vaginal epithelium is prompt, upon the administration of oestrogens, an answer proven by the increase in thickness and in the expression of oestrogen receptors at the level of the vaginal epithelium previously affected by menopause-induced atrophy.