

Ф. В. ВАЛЕЕВА, Л. Д. ЗУБАИРОВА, А. А. ТАГИРОВА

Казанская государственная медицинская академия
Казанский государственный медицинский университет
Межрегиональный клинико-диагностический центр

Клинико-диагностическое значение микровезикуляции клеток крови при аномальных маточных кровотечениях

Тагирова Альфия Абдулловна

аспирант кафедры акушерства
и гинекологии №2 КГМА

420126, г. Казань, ул. Адоратского, д.9, кв. 242, тел.: 517-85-70

Проведено изучение микровезикулярного механизма гемостаза в патогенезе аномальных маточных кровотечений (АМК) пубертатного периода для оптимизации диагностики степени тяжести и эффективности лечебных мероприятий. Выявлены разнонаправленные изменения, отражающие гетерогенность патологии: адаптивная реакция в виде повышения системного и локального образования микровезикул при более кратковременной и дезадаптивная при продолжительной кровопотере. Установлена связь тяжести заболевания с изменением процесса микровезикуляции у больных АМК. Отсутствие нормализации уровня микровезикул является прогностически неблагоприятным признаком, свидетельствующим о малой эффективности гормонотерапии.

Ключевые слова: маточные кровотечения, пубертатный период, гемостаз, микровезикулы.

F. V. VALEeva, L. D. ZUBAIROVA, A. A. TAGIROVA

Clinical-diagnostic value microvesiculae blood cells at abnormal uterine bleedings

Studying microvesicular the mechanism of hemostasis in pathogenesis abnormal uterine bleedings (AUB) pubertal the period for optimization of diagnostics of degree of burden and efficiency of medical actions is lead. Are revealed various the changes reflecting heterogeneity of pathology: adaptive reaction in the form of increase of system and local formation microvesiculae at more short-term and desadaptive — at long bleedings. Communication of burden of disease with change of process microvesiculation at patients AUB is established. Absence of normalization of level microvesiculae is prognostic adverse attribute testifying to small efficiency hormoneotherapy.

Keywords: uterine bleedings, pubertal period, hemostasis, microvesiculae.

В пубертатном периоде аномальные маточные кровотечения (АМК), как правило, рассматриваются как связанные с гормональной дисфункцией и изменением структуры эндометрия. Частота их в структуре гинекологической заболеваемости колеблется от 10% до 37,5% [7]. Однако более чем в 50% случаев патогенез заболевания остается невыясненным, что обуславливает невозможность использования унифицированной схемы лечения [8,1]. Известные механизмы маточных кровотечений включают нарушение сократительной активности матки, снижение тонуса маточных артерий вследствие нарушения баланса вазоконстрикторных и вазодилататорных простагландинов, нарушение регенерации эндометрия и патологию тромбообразования, особенно в тромбоцитарно-сосудистом звене, а также в результате активации фибринолитической системы [4,12]. Вне зависимости от механизмов, инициирующих аномальное кровотечение, значимость гемостатических реакций, обеспечивающих тромбообразование на уровне эндометрия, признается единодушно, поскольку их

адекватность предотвращает патологические последствия кровопотери и вторичные органические изменения в эндометрии.

Отсутствие комплексных критериев качества проводимой терапии маточных кровотечений пубертатного периода затрудняет принятие индивидуального решения при выборе тактики ведения данной категории пациенток. При продолжительных и рецидивирующих АМК система гемостаза нередко оказывается недостаточной или исчерпанной, приводя к снижению адаптивных возможностей подросткового организма и обуславливая тем самым малую эффективность проводимой терапии [6].

В последние годы возрос интерес исследователей к изучению различных методов диагностики АМК, позволяющих определять не только патогенез заболевания, но и оценивать степень тяжести процесса и проводить динамический контроль адекватности назначения терапии [3,2]. Доказана роль функционального состояния клеточного звена гемостаза в контроле эффективности методов лечения [2].

В последнее десятилетие был окончательно установлен субклеточный компонент гемостатического процесса — клеточные микровезикулы (М) — носители фосфатидилсерина (ФС) для сборки теназного и протромбиназного комплексов свертывающей системы крови, тканевого фактора. Микровезикулы отделяются при активации и апоптозе эндотелия кровеносных сосудов и клеток крови и способствуют усилению прокоагулянтного эффекта в ходе инициации свертывания крови. Немногочисленные исследования микровезикуляции при гипокоагулемических состояниях свидетельствуют о том, что повышенное содержание микровезикул отражает мобилизацию гемостаза, направленную на активацию тромбообразования и, таким образом, может быть проявлением адаптивных изменений в организме при кровоточивости [10,12,11].

Учитывая, что наиболее часто дисфункция системы гемостаза реализуется в подростковом периоде у девочек с началом менструаций, представляется актуальным определение роли М в патогенезе аномальных маточных кровотечений периода пубертата, а также оценке эффективности лечебных стратегий по результатам исследования динамики количественных и качественных характеристик М.

Целью настоящего исследования явилось изучение состоятельности микровезикуляционного механизма гемостаза в патогенезе аномальных маточных кровотечений пубертатного периода для оптимизации диагностики степени тяжести и эффективности лечебных мероприятий.

Материал и методы. В основу работы положены результаты ретро- и проспективного исследования 147 пациенток с АМК периода пубертата. Изучены данные анамнеза и объективного исследования.

В ходе обследования при ретроспективном анализе выявлены 2 больные с тромбоцитопатией в анамнезе и 2 девочки с гипоталамическим нейроэндокринным синдромом; проспективно обнаружены дефекты системы гемостаза ($n=6$) в виде идиопатической тромбоцитопенической пурпуры, болезни Виллебранда, тромбоцитопатии; синдром поликистозных яичников ($n=2$) и первичный гипотиреоз ($n=2$), что явилось основанием для их исключения из группы собственного исследования.

Проспективную группу составили 47 пациенток с АМК периода пубертата. Средний возраст больных — $14,10 \pm 0,23$ лет. Количество и прокоагулянтный фенотип М в периферической и маточной крови исследовали при поступлении в стационар в момент кровотечения до начала лечения, а также в ходе терапии на фоне негормонального и гормонального (по стандартной гемостатической схеме) методов остановки кровотечения и спустя 1 мес.

Формирование подгрупп осуществлялось по исходной оценке тяжести течения заболевания, контролю эффективности лечебных мероприятий, а также в зависимости от количественных и качественных характеристик микровезикул (М) крови. Подгруппу I составили 23 пациентки (49%) с легким или умеренным течением заболевания и выявленным исходно высоким уровнем М периферической крови, у которых остановка кровотечения произошла на фоне проведения симптоматической терапии 1-м этапом (транексам, дицинон, окситоцин, аскорбиновая кислота, свечи с ибупрофеном); подгруппу II — 17 больных (36,2%) с объективно более тяжелым геморрагическим синдромом и низкими значениями М в периферической крови в момент поступления, гемостаз у которых достигнут приемом низкодозированных монофазных комбинированных оральных контрацептивов (КОК) с содержанием этинилэстрадиола 30 мкг (марвелон, регулон) 2-м этапом лечения; в подгруппу III определены 7 девочек (14,9%) с рецидивирующим течением заболевания и зарегистрированным повышенным экспонированием фосфатидилсерина (ФС) тромбоцитами и М периферической и маточной крови.

Контрольная группа — 10 здоровых девушек-подростков, средний возраст которых составил $14,50 \pm 0,62$ лет; критерием включения являлись нормальная менструальная функция, отсутствие анамнестических, клинических и лабораторных признаков коагуляционных расстройств. Исследовалась периферическая кровь в 1, 5-6, 14-15, 26-27 дни менструального цикла и менструальная кровь в 1-й день месячных.

Микровезикуляция клеток крови исследовалась методом проточной цитометрии на приборе FACS Calibur (Becton Dickinson). Стабилизированная цитратом кровь центрифугировалась 15 минут при 130g для получения обогащенной тромбоцитами плазмы и 1500 g для выделения бесклеточной плазмы, содержащей микровезикулы. Абсолютное количество М в 1 мкл определяли по светорассеиванию за фиксированное время (60 секунд) с использованием программы Cell Quest. Нарушение асимметрии клеточной мембраны оценивалась окрашиванием клеток и микровезикул флуорохромом мероцианином 540 (MC540) (Sigma). Регистрация клеток и М с повышенной интенсивностью флуоресценции выявляет изменения упаковки мембранных фосфолипидов при их перемешивании (scrambling) и совпадает с экспрессией ФС при ее выявлении аннексином V. Регистрацию результатов осуществляли на втором детекторе FL2 цитометра.

Результаты исследования и их обсуждение. Результаты ретроспективного анализа свидетельствуют о недооценке клиницистами важности диагностического поиска гемостатических дефектов при планировании терапевтических мероприятий этой категории больных. Гематологический анамнез собран лишь в 3,2% случаев, несмотря на наличие меноррагий и первой менструации в виде кровоточивости. Исследованные показатели гемостаза при диагностике АМК в стационаре включали: количество тромбоцитов; время свертывания по Сухареву, по Ли-Уайту; ПТИ; концентрация фибриногена (по Рутберг); АЧТВ (лишь в 6% случаев). Выявленные изменения: тромбоцитопения (2,2%); замедление времени свертывания по Ли-Уайту (1,1%); гипофибриногенемия (2,2%). Это позволяет сделать вывод о необходимости гематологической настороженности при ведении пациенток с кровоточивостью и расширения объема диагностики скрытых дефектов системы гемостаза.

Анализ эффективности методов гемостатической терапии показал наибольшую частоту рецидивирования АМК после применения КОК (рис. 1).

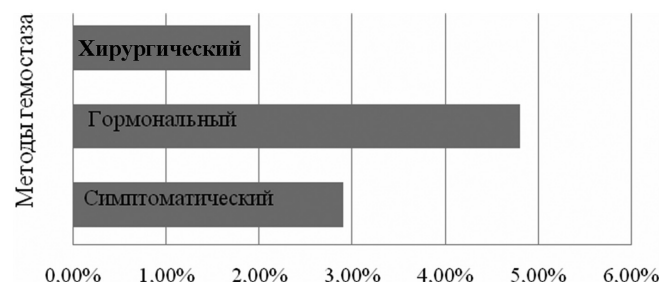
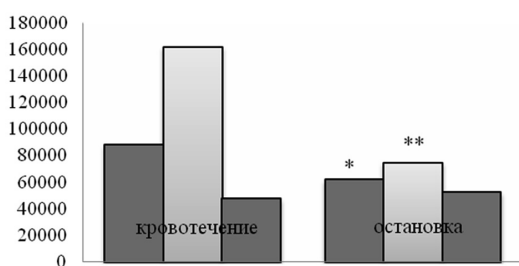


Рисунок 1

Частота рецидивов АМК после разных методов лечения

Определение количества М в периферической и маточной крови в течение нормального менструального цикла в контрольной группе ($n=10$) выявило следующую динамику: в 1-2-й дни — $87830,0 \pm 13495,07$ /мкл, 5-6-й дни — тенденция к снижению ($61943,25 \pm 860,34$ /мкл; $p > 0,05$), достигавшее статистической значимости к середине цикла ($49860,0 \pm 3012,42$ /мкл; $p < 0,05$), возрастание к 26-27 дню цикла ($140065,0 \pm 38802,51$ /мкл; $p < 0,05$). Уровень микровезикул в менструальной жидкости в среднем трехкратно превышал уровень в периферической крови ($248625,0 \pm 31079,57$ /мкл; $p < 0,01$).

Анализ результатов обследования девочек-подростков с АМК показал, что их значения микровезикуляции клеток крови отличаются от аналогичных показателей у здоровых девушек. Выявлен достоверно более высокий уровень М ($146057,75 \pm 14946,87$; $p < 0,05$) в периферической крови пациенток, у которых остановка кровотечения была достигнута негормональными средствами (подгруппа I), и низкий ($47840,45 \pm 8054,60$; $p < 0,001$) — у больных, гемостаз которых произошел на фоне применения КОК (подгруппа II) (рис.2).



* - $p < 0,05$ по сравнению с контролем,
** - $p < 0,01$ по сравнению с уровнем М в I подгруппе

Контроль ■ Симптоматический гемостаз ■ Гормональный гемостаз

Рисунок 2
Количество М в периферической крови у больных АМК

Уровень М в маточной крови у больных I подгруппы был достоверно выше ($905742,78 \pm 246848,27$; $p < 0,001$), чем в контрольной группе, во II подгруппе разница не достигала статистической значимости ($588513,75 \pm 238609,80$; $p > 0,05$).

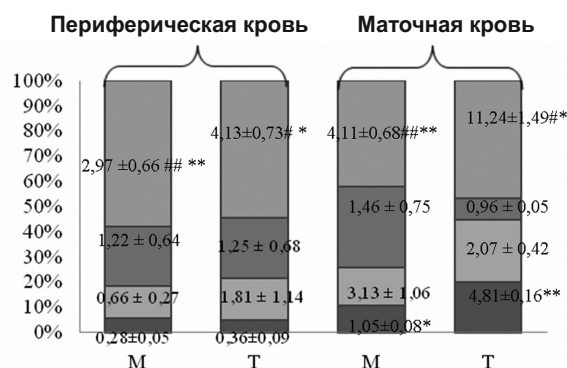
После остановки кровотечения выявлено снижение количества М в периферической крови на фоне негормональной терапии у пациенток I подгруппы ($82218,89 \pm 14610,44$; $p < 0,01$). Важно отметить, что, несмотря на клинически полную остановку кровотечения при использовании КОК, обнаружена лишь тенденция к повышению уровня М во II подгруппе ($83446,67 \pm 23447,09$; $p > 0,05$) (рис.2). И именно у этой категории больных наблюдались повторные АМК.

Значение интенсивности микровезикуляции для эффективной остановки кровотечения нашло подтверждение в выявленной обратной корреляционной связи ($r = -0,2$; $p < 0,05$) длительности кровотечения с уровнем М и прямой взаимозависимости ($r = 0,44$; $p < 0,05$) тяжести анемии (уровня гемоглобина) и количества М. Статистически значимая прямая взаимосвязь уровня М и концентрации фибриногена ($r = 0,8$; $p < 0,01$) при длительном кровотечении у больных II подгруппы может быть отражением потребления компонентов коагуляции. Выявлена положительная прямая корреляция между уровнем М и уровнем гонадотропинов — ЛГ ($r = 0,67$; $p < 0,05$) и ФСГ ($r = 0,65$; $p < 0,05$), что свидетельствует о гормон-зависимой активации клеток. Интересен факт обнаружения обратной статистически значимой взаимосвязи количества М и выраженности гиперпластических изменений эндометрия по результатам эхографии ($r = -0,91$; $p < 0,01$) у больных II подгруппы, что согласуется с данными Федина Е.В., доказавшей, что более чем у половины больных с гиперпластическими процессами имеет место нарушение реакции отторжения эндометрия, обусловленное дисфункцией системы гемостаза [9].

Анализ уровня экспонирования ФС микровезикулами и тромбоцитами показал существенные отличия у больных с рецидивирующими АМК (подгруппа III), как по сравнению со значениями при однократных эпизодах АМК (подгруппы I и II), так и в контрольной группе. У большинства пациенток (78,7%) в общей популяции обследуемых экспрессия ФС на тромбоцитах ($0,28 \pm 0,05\%$) и М ($0,22 \pm 0,06\%$) периферической крови соответствовала уровню здоровых подростков ($0,36 \pm 0,09\%$ и $0,28 \pm 0,05\%$, соответствен-

но, $p < 0,05$; $n = 47$), однако в маточной крови содержание ФС на тромбоцитах ($0,25 \pm 0,22\%$) и М ($0,15 \pm 0,01\%$) явилось достоверно ниже контроля ($4,81 \pm 0,16\%$ и $1,05 \pm 0,11\%$, $p < 0,01$; $n = 47$). Этот факт можно расценивать как патогенетический фактор кровопотери, поскольку такие тромбоциты и М несут более низкий прокоагулянтный потенциал.

В то же время у больных с рецидивирующими АМК (подгруппа III), выявлена достоверно более высокая, по сравнению с контролем и при однократном эпизоде АМК, экспрессия ФС на тромбоцитах и М, и в периферической, и в маточной крови (рис.3).

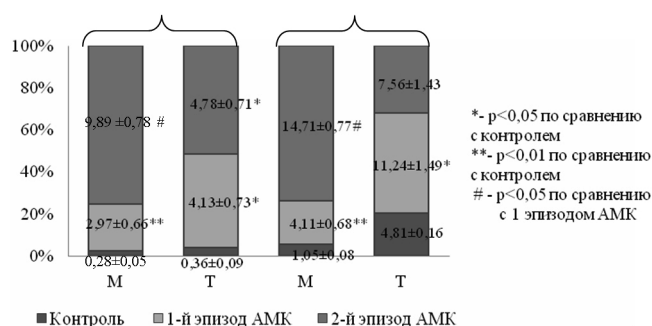


* - $p < 0,05$ по сравнению с контролем
** - $p < 0,01$ по сравнению с контролем
- $p < 0,05$ по сравнению с однократным эпизодом АМК
- $p < 0,01$ по сравнению с однократным эпизодом АМК

Контроль ■ I подгруппа ■ II подгруппа ■ III подгруппа

Рисунок 3
Связывание МС 540 тромбоцитами и М у больных АМК

Анализ фосфолипидного состава тромбоцитов и М при повторном эпизоде кровотечения выявил нарастание экспонирования ФС микровезикулами, как в периферической, так и маточной крови (рис.4), что свидетельствует о персистенции прокоагулянтных частиц, потенциально способных поддерживать внутрисосудистое свертывание крови. Об этом свидетельствуют и выявленные признаки гиперкоагулемии (повышение уровня РКФМ до $6,08 \pm 0,74 \cdot 10^{-2}$ г/л) у пациенток III подгруппы.



* - $p < 0,05$ по сравнению с контролем
** - $p < 0,01$ по сравнению с контролем
- $p < 0,05$ по сравнению с 1 эпизодом АМК

■ Контроль ■ 1-й эпизод АМК ■ 2-й эпизод АМК

Рисунок 4. Связывание МС540 тромбоцитами и М у больных рецидивирующими АМК

Выявлена прямая корреляционная связь уровня ЛГ и ФСГ со степенью экспонирования ФС микровезикулами ($r = 0,12$ и $r = 0,42$, $p < 0,05$, соответственно) и тромбоцитами ($r = 0,17$ и $r = 0,34$, $p < 0,05$, соответственно), как в периферической, так и в маточной крови у больных III подгруппы (гипогонадотропный тип АМК). Можно полагать, что сдвиги гормонального фона при ановуляторном менструальном цикле являются одним из факторов, оказываю-

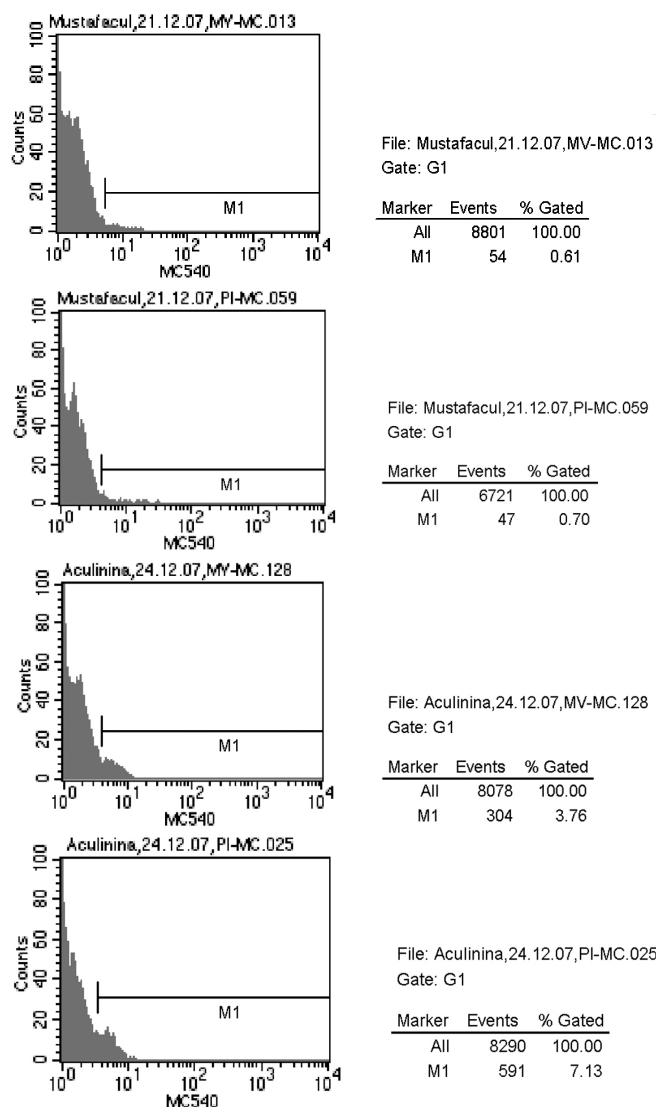


Рисунок 5. Цитофлуорограммы связывания MC 540 тромбоцитами и М периферической крови у больных АМК I (1,2) и III (3,4) подгрупп

щих в данном случае активирующее влияние на тромбоциты, являясь дополнительным индуктором повышенного отделения М на фоне постгеморрагической гиперкоагулемии. По данным В.И. Тимошенского с соавторами (1977), которые провели комплексное исследование взаимосвязи рецидивирующих носовых и маточных кровотечений, рассматривая вопрос о существовании так называемых викарных или конкомитирующих кровотечений, нередко функциональные способности (гипо- и гиперактивность) тромбоцитов частично обусловлены гормональной дисфункцией яичников [13,5].

Таким образом, исследование микровезикуляции клеток крови как маркера прокоагулянтных сдвигов, сопровождающих аномальное маточное кровотечение, выявило разнонаправленные изменения, отражающие гетерогенность патологии. Адаптивная реакция в виде повышения системного и локального образования микровезикул при более кратковременной кровопотере и дезадаптивная — при продолжительной, наряду с установленной корреляционной зависимостью тяжести заболевания с изменением процесса микровезикуляции у больных АМК, имеет высокую диагностическую и прогностическую значимость при выборе тактики их ведения.

Прогностически неблагоприятным признаком, свидетельствующим о малой эффективности гормонотерапии, несмотря на временную остановку кровотечения, является отсутствие нормализации уровня микровезикул, что свидетельствует о снижении функциональной потенции гемостатического ответа и высокой вероятности повторных длительных кровотечений, что требует своевременной замены препарата. Пониженная локальная активация тромбоцитов и образование М с низким экспонированием ФС может рассматриваться как патогенетический фактор геморрагии. Часть пациенток, проявляющая более выраженную системную и локальную реакцию тромбоцитов и устойчивое образование М с повышенным экспонированием фосфатидилсерина, являются группой риска коагулопатии потребления.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АМК аномальное маточное кровотечение
 АЧТВ активированное частичное тромбопластиновое время
 КОК комбинированные оральные контрацептивы
 М микровезикулы
 MC540 мероцианин 540
 ПТИ протромбиновый индекс
 РКФМ растворимые комплексы фибрин-мономеров
 ФС фосфатидилсерин

ЛИТЕРАТУРА

1. Гуркин Ю. А. Гоготадзе И. Н. Гинекология детей и подростков. СПб.: Мед. информ. агентство, 1998.
2. Лободина И. М. Диагностическое применение компьютерной морфометрии тромбоцитов при маточных кровотечениях у подростков. Проблемы репродукции. — 2008; т.14: 3: 43-47
3. Коколина В. Ф. Детская и подростковая гинекология: руководство для врачей. М.: Медпрактика-М, 2006.
4. Саидова Р. А., Макацария А. Д. Избранные лекции по гинекологии: учеб. пособие для студентов мед. вузов. М.: Триада-Х, 2005.
5. Тимошенский В. И., Баркаган З. С., Перфильева Г. Н. О генезе и взаимосвязи рецидивирующих носовых и маточных кровотечений. Вестник отоларинголога, 1977; 2: 78-82
6. Уварова Е. В., Лободина И. М., Веселова Н. М. Клиническое значение применения препарата «Транексам» для остановки маточного кровотечения в пубертатном периоде. Репродуктивное здоровье детей и подростков, 2008;1: 9
7. Уварова Е. В., Веселова Н. М., Лободина И. М. Патомимические нарушения при маточных кровотечениях у подростков. Репродуктивное здоровье детей и подростков, 2006; 5: 55
8. Уилсон П. Гинекологические заболевания: справочник. М.: МЕДпресс-информ, 2002.
9. Федина Е. В. Значение исследования системы гемостаза для выбора тактики ведения больных репродуктивного периода с гиперпластическими процессами эндометрия: автореф. дис. ...канд. мед. наук. М., 2007.
10. Circulating microparticles as a marker of recombinant activated FVIII (NovoSeven) efficacy in patients with FVIII or FIX inhibitors / V. Proulle [et al.] // Thromb Haemost, 2001; Vol. 86(7): 345-347.
11. Horstman L. L. Clinical significance of platelet microparticles in autoimmune thrombocytopenias / L.L. Horstman, M. Arce, Y.S. Ahn // J. Lab. Clin. Med, 1992; Vol. 119(6): 334-345.
12. Interaction of P-selectin and PSGL-1 generates microparticles that correct hemostasis in a mouse model of hemophilia A / I. Hrachovinová [et al.] // Nat. Med., 2003; Vol. 9(8): 1020-1025.
13. Platelet functional defects in women with unexplained menorrhagia / C.S. Philipp [et al.] // J. Thromb. Haemost, 2003; Vol. 1(3): 477-484
14. Preanalytical conditions that affect coagulation testing, including hormonal status and therapy / M. Blombäck [et al.] // Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2007; Vol.5 (4): 855 – 858.