

ПАТОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ ТЕРАПИИ ПРИ АНОМАЛЬНЫХ МАТОЧНЫХ КРОВОТЕЧЕНИЯХ НА ОСНОВЕ ОЦЕНКИ МИКРОВЕЗИКУЛЯЦИИ КЛЕТОК КРОВИ

Альфия Абдулловна Тагирова¹, Ляйли Диляверовна Зубаирова²,
Лилия Мухаметзяновна Тухватуллина¹, Фарид Анварович Абдулхаев³,
Фарида Вадутовна Валеева², Раиса Ивановна Попкова⁴

¹Кафедра акушерства и гинекологии №2 (зав. — доц. О.В. Чечулина) Казанской государственной
медицинской академии, ²кафедра патологической физиологии (зав. — проф. М.М. Миннебаев)

Казанского государственного медицинского университета,

³Межрегиональный клинико-диагностический центр МЗ РТ (главврач — Р.Н. Хайруллин),

⁴Городская детская больница №1 (главврач — К.З. Закиров), г. Казань

e-mail: tagirova2007@mail.ru; zubairovalaily@mail.ru

Реферат

Исследована состоятельность микровезикуляционного механизма гемостаза при аномальных маточных кровотечениях пубертатного периода. Результаты свидетельствуют о циклическом изменении интенсивности микровезикуляции в крови в течение физиологического менструального цикла, достигающей максимального уровня в лютеиновой фазе и на фоне физиологического кровотечения. Уровень микровезикул в маточной крови кратно превышает системный. Разнонаправленные изменения количества микровезикул при аномальном маточном кровотечении являются отражением гетерогенности патологии, в частности адаптивной и дезадаптивной реакций системы гемостаза.

Ключевые слова: аномальное маточное кровотечение, гемостаз, микровезикулы.

Кровоточивость является одной из распространенных проблем гинекологии. Тяжелые менструальные кровотечения нарушают качество жизни здоровых во всех остальных отношениях женщин. Причины и механизмы кровоточивости различны в возрастных группах. Так, в перименопаузе они чаще всего гормональные (до 90%) и органические — миома матки, аденомиоз, полип эндометрия (до 70%), в то время как у девушек и молодых женщин чаще выявляются нарушения гемостаза [13, 20]. Механизмы маточных кровотечений включают расстройства сократительной активности матки, снижение тонуса маточных артерий вследствие изменения баланса вазоконстрикторных и вазодилататорных простагландинов, нарушения регенерации эндометрия и тромбообразования, особенно в тромбоцитарно-сосудистом звене, а также в результате активации фибринолитической системы [6, 19]. В ряде случаев обнаруживаются наследственные коагулопатии — чаще

всего (13%) болезнь фон Виллебранда [16]. Вместе с тем в 50% случаев причины и патогенез маточных кровотечений не находят объяснения. Ввиду многообразия механизмов развития для их обозначения используют термин «аномальные маточные кровотечения» (АМК), под которым подразумеваются любые маточные кровотечения вне менструации или патологическое менструальное кровотечение более 7–8 суток по продолжительности и более 80 мл по объему кровопотери.

Впервые связь между АМК и гемостатическими дефектами была установлена почти 40 лет назад Квиком [21], но ее дальнейшее углубленное изучение последовало лишь 30 лет спустя, и результаты на сегодняшний день не позволяют сформулировать единую концепцию. В одних случаях дисфункция гемостаза в развитии меноррагий отрицается, в других — является первопричиной [1, 4, 5, 8]. Однако вне зависимости от механизмов, инициирующих аномальное кровотечение, значимость гемостатических реакций, обеспечивающих тромбообразование в эндометрии, признается единодушно, поскольку их адекватность предотвращает патологические последствия кровопотери и вторичные органические изменения в эндометрии.

Наряду с клеточными и плазменными компонентами в гемостазе участвуют субклеточные элементы — микровезикулы, формирующиеся и отделяющиеся в ходе мембранного ремоделирования при активации и апоптозе клеток. Они рассматриваются в качестве важнейших участников стартовых событий активации системы

свертывания крови, поскольку обогащены анионными фосфолипидами, тканевым фактором, адгезивными комплексами, необходимыми для инициации, усиления и распространения коагуляции [3, 12, 17]. Повышение уровня микровезикул в крови обнаруживается при ряде заболеваний, сопровождающихся гиперкоагулемией [11]. Вместе с тем в контексте гемостатических реакций усиление микровезикуляции может быть также проявлением адаптивных изменений в организме при кровоточивости [15].

Наиболее часто дисфункция гемостаза в виде маточных кровотечений различной интенсивности реализуется в подростковом периоде у девочек с началом менструаций, поэтому целью настоящей работы являлось исследование состоятельности микровезикуляционного механизма при аномальных маточных кровотечениях пубертатного периода с динамической оценкой на фоне различных методов терапии.

Основную группу составляли 50 пациенток в возрасте $14,10 \pm 0,23$ года, поступивших в гинекологическое отделение с предварительным диагнозом «маточное кровотечение пубертатного периода» (МКПП). Скрининговая оценка гемостаза включала следующие показатели: время кровотечения, время свертывания, количество тромбоцитов, протромбиновый индекс (ПИ), активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), концентрацию фибриногена по Рутберг, количество растворимых фибрин-мономерных комплексов (РФМК). При наличии клинических или лабораторных показаний индивидуально определяли уровень АДФ, ристомицин- и коллаген-индуцированную агрегацию тромбоцитов, фактор фон Виллебранда.

Исследовали уровень гормонов в крови — ТТГ, ФСГ, ЛГ, эстрадиола, прогестерона, пролактина. При клинических симптомах гиперандрогении дополнительно определяли уровень кортизола, ДЭАС, 17-ОН-прогестерона, тестостерона.

Уровень микровезикул в периферической и маточной крови изучали при поступлении в стационар в момент кровотечения до начала лечения, а также в ходе терапии на фоне негормонального (антифибринолитики, НПВП, утеротоники, ангиопротекторы) и гормонального

(комбинированные оральные контрацептивы — КОК, в частности марвелон, ривевидон, линдинет-20) методов остановки кровотечения.

В контрольную группу вошли 10 здоровых девушек-подростков (средний возраст — $14,50 \pm 0,62$ года) при условии нормальной менструальной функции, отсутствия анамнестических, клинических и лабораторных признаков коагуляционных расстройств. Исследовали периферическую кровь в 1, 5-6, 14-15, 26-27-й дни менструального цикла и менструальную кровь в 1-й день месячных.

Для определения количества микровезикул в пробирки, содержащие 0,1 мл 3,8% профильтрованного стерильного раствора цитрата натрия, набирали 0,9 мл крови (разведение 1:9). Цитратную кровь центрифугировали 15 минут при 1500 g, отделяли бесклеточную плазму, которую разводили раствором Cell Wash (Becton Dickinson, США) в соотношении 1:10 и исследовали методом проточной цитометрии на приборе FACS Calibur (Becton Dickinson). Абсолютное количество микровезикул в 1 мкл определяли по светорассеиванию за фиксированное время (60 с) с использованием программы Cell Quest, с регистрацией количества событий за единицу времени. Дискриминирование микровезикул в отдельной зоне осуществлялось регистрацией прямого малоуглового (FSC) и бокового (SSC) светорассеивания в логарифмическом режиме. Результаты были обработаны с использованием программного пакета MS Excel 2000. Статистическую значимость различий между средними величинами оценивали по t критерию Стьюдента.

Определение уровня микровезикул в периферической и маточной крови в течение нормального менструального цикла выявило следующую динамику (табл.1): высокий уровень в 1-2-й дни менструации, снижение его на 5-6-й день ($p > 0,05$; $n=10$), достигавшее статистической значимости к середине цикла ($p < 0,05$; $n=10$), возрастание к концу лютеиновой фазы ($p < 0,05$; $n=10$). Количество микровезикул в менструальной крови было в среднем в 3 раза больше, чем в периферической крови ($p < 0,01$; $n=8$).

При исследовании характера микровезикуляции у больных при поступлении

на фоне кровотечения выявлен в среднем более высокий уровень микровезикул, чем в первые дни физиологических месячных у здоровых подростков. Однако разница проявлялась лишь в виде тенденции. Поскольку мы наблюдали значительный разброс индивидуальных параметров, был произведен более детальный анализ, позволивший выделить две группы обследованных.

Уровень основных гормонов не отклонялся от нормы, лишь у 4% пациенток был диагностирован синдром поликистозных яичников (ЛГ/ФСГ > 2,5).

При анализе гемостаза у 12% (6 пациенток) были выявлены нарушения тромбоцитарно-сосудистого звена, причем они распределились по анализируемым группам следующим образом (рис.1). У 6,06%

Таблица 1

Количество микровезикул в крови в динамике менструального цикла

Дни цикла	1-2-й	5-6-й	14-15-й	26-27-й
Уровень микровезикул, мкл (n=10)				
В периферической крови	87830,0±13495,07	61943,25±860,34	49860,0±3012,42*	140065,0±38802,51*
В маточной крови	248625,0±31079,57**			

* p<0,05; ** p<0,01 относительно уровня микровезикул в периферической крови в 1-2-й день менструации.

При таком подходе был обнаружен более высокий уровень микровезикул (p<0,05; n=33) у тех пациенток, у которых остановка кровотечения была достигнута негормональными средствами (традиционная первичная стратегия при АМК), и низкий (p<0,001; n=17) у получивших КОК. Уровень микровезикул в маточной крови у больных 1-й группы был достоверно выше, чем в контрольной группе (p<0,001; n=33), во 2-й группе разница не достигала статистической значимости (p>0,05; n=17).

больных 1-й группы установлена тромбоцитопатия с нарушением АДФ-индуцированной агрегации, у 3,03% – снижение активности фактора фон Виллебранда (32%), во 2-й группе – тромбоцитопатия с нарушением ристомидин- и коллаген-индуцированной агрегации у 11,7% пациенток, у 5,8% – идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура. Результаты скрининга гемостаза: в 1-й группе ускорение АЧТВ (19,5±5,50 с) и/или повышение уровня РКФМ (7,00±1,25 мг%) имели место у 18,18% пациенток, во 2-й группе –

Таблица 2

Количество микровезикул в крови при аномальном маточном кровотечении

Группы обследованных	Контроль (n = 10)	1-я группа (n = 33)	2-я группа (n = 17)
Уровень микровезикул, мкл			
В момент кровотечения			
периферическая кровь	87830,0±13495,07 (1-2-й день цикла)	146057,75±14946,87*	47840,45±8054,60**
маточная кровь	248625,0±31079,57**	905742,78±246848,27***	588513,75±238609,8
После остановки кровотечения			
периферическая кровь	61943,25±860,34 (5-6-й день цикла)	82218,89±14610,44#	83446,67±23447,09

* p<0,05 по сравнению с контролем, ** p<0,01 – с данными периферической крови контрольной группы, *** p<0,001 – контрольной группы в момент кровотечения, # p<0,01 – 1-й группы в момент кровотечения, ## p<0,001 – 1-й группы.

После остановки кровотечения были выявлены снижение количества микровезикул в периферической крови в 1-й группе на фоне негормональной терапии (p<0,001; n=33) и тенденция к их повышению во 2-й группе на фоне КОК (p>0,05; n=17). Полученные результаты приведены в табл. 2.

гипофибриногенемия (1,76±0,58 г/л) и/или снижение протромбинового индекса (62,50±17,50%) – у 17,65%.

При сравнительной оценке клинических критериев выбора метода медикаментозного гемостаза были выявлены различия в длительности кровотечения, тяжести кровопотери по степени анемии



Рис.1 . Состояние гемостаза при АМК.

и выраженности гиперпластических процессов в эндометрии по данным ультразвуковой эхографии.

Кровотечение у больных 2-й группы длилось $18,29 \pm 4,38$ сутки, в 1-й группе — $7,58 \pm 0,74$ ($p < 0,05$; $n = 50$). Степень анемизации, оценивавшаяся по уровню

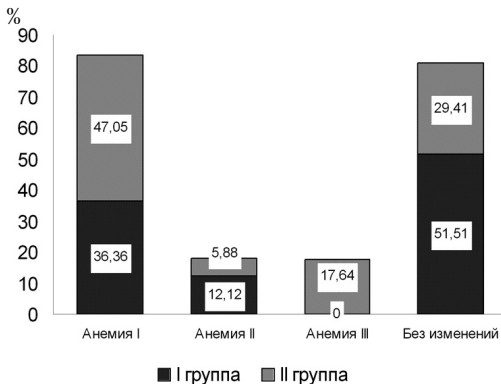


Рис. 2. Степень анемизации у больных АМК

гемоглобина, количеству эритроцитов и гематокриту, была более высокой у больных 2-й группы (рис.2).

Исследование толщины эндометрия на фоне АМК (рис. 3) выявило преобладающие признаки гиперплазии эндометрия (М-ЭХО — 14 мм и более) во 2-й группе

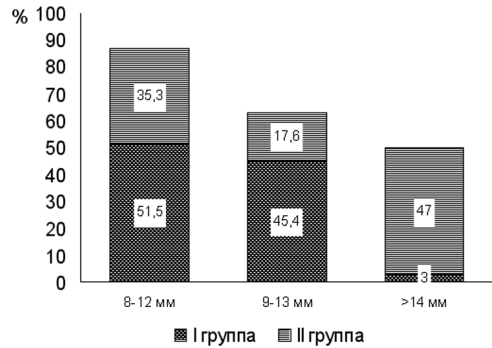


Рис.3. Толщина эндометрия по данным УЗИ при АМК.

(47%). В 1-й группе в 45,4% случаев имела пограничная толщина эндометрия (М-ЭХО — от 9 до 13 мм), а в 50% отсутствовали признаки гиперплазии (М-ЭХО — от 2 до 8 мм).

В основе оценки изменений функционального состояния системы гемостаза при заболеваниях лежат представления об адаптационных и патологических сдвигах. Повышение свертываемости крови при кровопотерях является компонентом адаптационной реакции. Острое кровотечение сопровождается на ранних сроках гипермикровезикуляцией, которая соответствует развитию гиперкоагулемии и свидетельствует о том, что отделение микровезикул — это часть реакции клеток-эффекторов гемостаза, определяющая степень активации системы [3]. При аутоиммунной тромбоцитопении более высокий уровень микровезикул обнаружен у пациентов без геморрагических осложнений, что отражает защитную гемостатическую роль микровезикул [15]. Это продемонстрировано также при гемофилии, где уровень микровезикул выше нормального и может повышаться при развитии острого кровотечения как отражение постоянной мобилизации системы гемостаза без угрозы тромботических осложнений, так как имеется недостаточность образования тромбина.

Состояние системы гемостаза в течение менструального цикла и при его нарушениях на протяжении многих лет привлекает внимание исследователей, однако анализ литературы свидетельствует об отсутствии единодушия в этом вопросе. Так, Е.А. Дикушина указывает, что изменения в системе гемостаза носят циклический характер [2]. М. Feuring отмечает, что функция тромбоцитов изменяется в

течение менструально-овариального цикла вследствие влияния прогестерона и эстрогенов на концентрацию фактора фон Виллебранда [10]. В то же время P.T. Onyundarson et al. существенных изменений фактора фон Виллебранда в различных фазах менструального цикла не обнаружили [18]. В исследовании L. Hahn выявлены низкие значения факторов II, VII, X во время менструации [14].

В регуляции менструальной кровопотери доминируют механизмы локального гемостаза; менструальная кровь обладает особыми свойствами, характеризующими процессы, происходящие в эндометрии. Активность тромбоцитов и формирование гемостатической пробки в эндометрии менее выражены, чем в других тканях. Исследования S.A. Cederholm-Williams показали отсутствие фактора X, протромбина и свободного тромбина в менструальной крови [9]. Эти особенности, а также выявляемое во многих наблюдениях низкое содержание тромбоцитов в менструальной жидкости объясняют потреблением факторов свертывания и элементов крови или присутствием прямого антикоагулянта.

Выявленная нами динамика уровня микровезикул в периферической крови при физиологическом цикле отражает изменения гемостатического потенциала, направленные на сохранение гомеостаза при ежемесячной кровопотере. Количество микровезикул повышается перед началом менструации и в ее первые дни и снижается при прекращении менструального кровотечения, а также к середине цикла. Полученные результаты в целом согласуются с данными B. Toth et al., которые обнаружили более низкий уровень тромбоцитарных и эндотелиальных микровезикул в фолликулиновой фазе цикла по сравнению с лютеиновой [22].

Высокий уровень микровезикул в маточной крови является, вероятно, отражением апонекротических процессов в эндометрии и локальной активации клеток-эффекторов гемостаза, необходимой для тромбирования обширной раневой поверхности. Кроме того, образование тромбов в просвете сосудов эндометрия до завершения процесса отторжения способствует самой реакции отторжения во время менструации, а уменьшение числа образующихся тромбов может продлить

реакцию и вызвать более длительное кровотечение [7].

Выявленные высокие значения микровезикуляции в периферической и маточной крови, относительное преобладание лабораторных признаков гиперкоагуляции и, как следствие, менее продолжительное кровотечение с более низкой степенью анемизации у пациенток АМК 1-й группы позволяет рассматривать их как проявивших адаптивный ответ. Низкий уровень микровезикул, относительно более выраженные признаки гипокоагуляции у пациенток 2-й группы характеризуют ограничение адаптивных возможностей системы и выступают таким образом патогенетическим фактором более продолжительного кровотечения и постгеморрагических осложнений в этой группе.

Уровень микровезикул в крови, являясь сенсором прокоагулянтных сдвигов, характеризует адаптивные возможности организма при маточном кровотечении вне зависимости от его причины (дисфункция нейрогуморальной регуляции, локальные нарушения в эндометрии, первичные нарушения гемостаза) и может быть определен как фактор выбора тактики ведения пациенток с АМК. Выявленные дефекты системы гемостаза у обследованных больных свидетельствуют о необходимости проявления гематологической настороженности при дифференциальной диагностике аномальных маточных кровотечений периода пубертата, так как невнимание при интерпретации результатов гемокоагуляционного исследования может иметь серьезные последствия для больной.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о циклическом изменении интенсивности микровезикуляции в крови в течение физиологического менструального цикла, достигающей максимального уровня в лютеиновой фазе и на фоне физиологического кровотечения. Повышенный уровень микровезикул в маточной крови отражает процессы локальной активации гемостаза. Разнонаправленные показатели микровезикуляции, наблюдавшиеся при АМК, являются отражением гетерогенности патологических процессов, в частности адаптивной и дезадаптивной реакций системы гемостаза.

Повышенный системный и локальный уровень микровезикул соответствует адаптивному ответу и нормализуется после остановки кровотечения негормональными средствами, пониженный — дезадаптации с тенденцией к нормализации после остановки кровотечения гормональными средствами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Баркаган З.С. Геморрагические заболевания и синдромы. — М.: Медицина, 1988. — 527 с.
2. Дикушина Е.А. Гемореологические нарушения и их коррекция у больных с ювенильными маточными кровотечениями: Автореф. дисс... канд. мед. наук. — М., 1996. — 28 с.
3. Зубаиров Д. М., Андрушко И. А., Зубаирова Л. Д., Свинтенко Г. Ю. Механизмы острой постгеморрагической гиперкоагуляции // Тромбоз, гемостаз и реология. — 2003. — № 1. — С. 27-31.
4. Мазитов И.М. Свертывающая и фибринолитическая системы крови и эстрогенная насыщенность организма при дисфункциональных маточных кровотечениях: Автореф. дисс.... канд. мед. наук. — Казань, 1967. — 20 с.
5. Саидова Р.А. Роль исследований системы гемостаза в дифференциальной диагностике ювенильных маточных кровотечений: Автореф. дисс... канд. мед. наук. — М., 1989. — 29 с.
6. Саидова Р.А., Макацария А.Д. Избранные лекции по гинекологии. — М.: Трида-Х, 2005. — 62 с.
7. Федина Е.В. Значение исследования системы гемостаза для выбора тактики ведения больных репродуктивного периода с гиперпластическими процессами эндометрия: Автореф. дисс... канд. мед. наук. — М., 2007. — 26 с.
8. Carrieri P., Orefice G. Platelet function in childhood migraine // Cephalgia. — 1985. — Vol.5. — P. 99-101
9. Cederholm-Williams S.A., Rees M.C., Turnbull A.C. Examination of certain coagulation factors in menstrual fluid from women with normal blood loss // Thromb. Haemost. — 1984. — Vol. 52(3). — P. 224-225
10. Feuring M., Christ M., Roell A. Alterations in platelet function during the ovarian cycle // Blood Coagulation & Fibrinolysis. — 2002. — Vol. 13(5). — P. 443-447.
11. Freyssinet J. M. Cellular microparticles: what are they bad or good for? // J. Thromb. Haemost. — 2003. — Vol. 1. — P. 1655-1662.
12. Furie B., Furie B. C. Thrombus formation in vivo // J. Clin. Investig. — 2005. — Vol. 115. — P. 3355-3362.
13. Gaetje R., Scharl A., Kaufmann M. et al. Management

of abnormal uterine bleeding // Zentralbl Gynekol. — 2006. — Vol. 128(4). — P. 196-201.

14. Hahn L., Cederblad G., Rybo G. et al. Blood coagulation, fibrinolysis and plasma proteins in women with normal and with excessive menstrual blood loss // Br. J. Obstet. Gynaecol. — 1976. — Vol. 83(12). — P. 974-980.

15. Horstman L.L., Arce M., Ahn Y.S. Clinical significance of platelet microparticles in autoimmune thrombocytopenias // J. Lab. Clin. Med. — 1992. — Vol. 119. — P. 334-345

16. Lukes A.S., Kadir R.A., Peyvandi F. et al. Disorders of hemostasis and excessive menstrual bleeding: prevalence and clinical impact // Fertil Steril. — 2005. — Vol. 84(5). — P. 1338-44

17. Möller I., Klocke A., Alex M. et al. Intravascular tissue factor initiates coagulation via circulating microvesicles and platelets // FASEB J. — 2003. — Vol. 17. — P. 476-478.

18. Onyindarson P.T., Gudmundsdottir B.R., Arnfinnsdottir A.V. Von Willebrand Factor Does not Vary during Normal Menstrual Cycle // Thromb. Haemost. — 2001. — Vol. 85. — P. 183-184.

19. Philipp C.S., Dille A., Miller C.H. et al. Platelet functional defects in women with unexplained menorrhagia // J. Thromb. Haemost. — 2003. — Vol. 1(3). — P. 477-84.

20. Philipp C.S., Faiz A., Dowling N. et al. Age and the prevalence of bleeding disorders in women with menorrhagia // Obstet Gynecol. — 2005. — Vol. 105(1). — P. 61-66.

21. Quick A.J. Menstruation in hereditary bleeding disorders // Obstet Gynecol. — 1966. — Vol. 28. — P. 37-48.

22. Toth B., Nikolajek K., Rank A. et al. Gender-specific and menstrual cycle dependent differences in circulating microparticles // Platelets. — 2007. — Vol. 18(7). — P. 515-21.

Поступила 02.10.08.

PATHOGENETIC RATIONALE FOR THERAPEUTIC STRATEGIES FOR ABNORMAL UTERINE BLEEDING BASED ON THE ASSESSMENT OF MICROVESICULATION OF BLOOD CELLS

A.A.Tagirova, L.D.Zubairova, L.M.Tuhvatullina,
F.A.Abdulhaev, F.W.Valeeva, R.I. Popokova

Summary

Investigated was the competency of microvesiculation mechanism of hemostasis during abnormal uterine bleedings in the pubertal period. The results indicate cyclic changes of the intensity of microvesiculation in the blood during the physiological menstrual cycle, reaching a peak in the luteal phase and on the background of physiological bleeding. The level of microvesicles in the uterine blood multiply exceeds the systemic. Multidirectional changes of the number of microvesicles during anomalous uterine bleedings reflect heterogeneity of pathology, and in particular of the adaptive and desadaptive reactions of the hemostasis system.