

P R A C E O R Y G I N A L N E
ginekologia

Analiza wybranych parametrów krzepnięcia krwi u pacjentek operowanych z powodu torbieli endometrialnych

Analysis of blood coagulation factors in patients undergoing surgery due to endometrial cysts

Grabowski Jacek, Markowska Janina, Tomaszewska Kornelia,
Fischer Natalia, Nalewaj Jolanta

Oddział Onkologii Ginekologicznej, Klinika Onkologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu

Streszczenie

Cel pracy: W pracy podjęto próbę oceny wybranych parametrów krzepnięcia krwi u pacjentek operowanych z powodu torbieli endometrialnych. Wydaje się, że u tej grupy pacjentek podczas operacji występuje większe krwawienie (obserwacja subiektywna).

Materiał i metody: Grupę badaną stanowiły pacjentki z endometriozą, które wcześniej nie były leczone z powodu endometriozy, a w wywiadzie nie stwierdzono objawów zaburzeń układu krzepnięcia krwi. Do grupy kontrolnej włączono retrospektywnie pacjentki regularnie miesiączkujące, u których stwierdzono inne łagodne guzy przydatków. Krew pobierano przed operacją i oznaczano stężenie plazminogenu oraz aktywność $\alpha 2$ -antypłazminy, tPA (tkankowy aktywator plazminogenu) i PAI-1 (inhibitor tkankowego aktywatora plazminogenu –1).

Wyniki: U chorych na endometriozę stwierdzono w surowicy krwi nieznacznie wyższe średnie stężenia plazminogenu i $\alpha 2$ -antypłazminy oraz niższe stężenie PAI-1 i mniejszą aktywność tPA w porównaniu z grupą kontrolną, jednak wyniki nie osiągnęły znaczącości statystycznej.

Wnioski: Mimo, że nie wykazano istotnych zaburzeń funkcji układu krzepnięcia krwi w grupie badanej, nie wyklucza to ich istnienia, ponieważ mogą one występować tylko lokalnie, w tkankach zajętych endometriozą. Wymaga to dalszych badań i uwzględnienia innych parametrów układu fibrynolitycznego.

Słowa kluczowe: **endometrioza / endometrioza – krew /
/ aktywatory plazminogenu – krew /
/ inhibitor 1 aktywatora plazminogenu – krew /
/ fibrynogen – krew /**

Adres do korespondencji:

Janina Markowska
Oddział Onkologii Ginekologicznej, Klinika Onkologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu
ul. Łąkowa 1/2 61-878 Poznań,
e-mail: janina.markowska@oncology.am.poznan.pl

Otrzymano: 26.07.2006

Zaakceptowano do druku: 28.03.2007

Abstract

Objectives: The study was undertaken to evaluate selected blood coagulation factors in patients undergoing surgery, due to endometrial cysts and other ovarian benign cysts.

Materials and Methods: Women involved in our study had not received any previous treatment for endometriosis and they had no history of any prior haemostatic disorders. Blood samples were collected before surgery and investigated for plasminogen, α 2-antiplasmin, PAI-1 and tPA activity. As a control group, we have analyzed patients with benign gynecological diseases treated in our Department.

Results: We have noticed higher mean concentration of plasminogen and α 2-antiplasmin and lower mean concentration of PAI-1 and tPA activity in our patients in comparison with control group. Obtained results did not show any statistical significance.

Conclusions: Our analysis of haemostatic factors in blood samples did not show coagulation disorders in patients with endometriosis. Maybe there are only local coagulation disorders in endometrial tissue and its surrounding. In our opinion this problem requires further research and taking into consideration other factors.

Key words: **endometriosis /endometriosis – blood /
/ plasminogen activators – blood /
/ fibrinogen – blood /
/ plasminogen activator inhibitor 1 /**

Wstęp

Endometrioza jest jednym z najczęściej występujących łagodnych schorzeń ginekologicznych. Mimo to niewiele wiadomo na temat jej patogenetyki i etiologii. Endometrioza występuje jedynie u naczelników. Stąd problem braku zwierzęcego modelu doświadczalnego choroby. Jest to choroba łagodna, ale ogniska endometriozy mają zdolność do wzrostu i inwazji otaczających tkanek. Podobnie jak w przypadku wzrostu nowotworowego może dochodzić do miejscowej proteolizy macierzy pozakomórkowej, w której podejrzewa się udział systemu fibrynolitycznego [1].

Obfite, przedłużające się i bolesne miesiączki oraz nieregularne krwawienia z macicy nasuwają podejrzenie endometriozy. Bromboszcz i wsp. [2] postawili hipotezę, że u chorych na endometriozę przyczyną powikłań krwotocznych jest zaburzenie układu hemostatycznego. W grupie 397 kobiet z endometriozą analizowano występowanie powikłań krwotocznych.

Krwotoki stwierdzono u 30% kobiet, głównym odchyleniem w układzie hemostatycznym był wzrost aktywności fibrynolitycznej krwi z towarzyszącym obniżeniem stężenia fibrynogenu.

U pacjentek z endometriozą operowanych na naszym oddziale stwierdzono subiektywnie nadmierne krwawienie w przebiegu operacji, szczególnie podczas przecinania powłoki brzusznej. Rutynowe przedoperacyjne badania krzepnięcia krwi były w granicach normy.

Ogólnie, nadmierne krwawienie może wynikać z dwóch przyczyn: zwiększonych mechanizmów fibrynolitycznych i/lub specyficznych zaburzeń koagulacji. Wiadomo, że tylko ekstremalne zmiany w fibrynolizie, takie jak niedobór PAI-1 (*plasminogen activator inhibitor-1*, inhibitor aktywatora plazminogenu-1) i α 2-antypłazminy oraz znaczne zwiększenie stężenia krążącego t-PA (*plasminogen activator tissue type*, tkankowy aktywator plazminogenu), mogą powodować krwawienie [3].

Cel pracy

Celem badań była analiza porównawcza wybranych parametrów układu krzepnięcia krwi u pacjentek operowanych z powodu torbieli endometrialnych i innych łagodnych guzów jajników.

Materiał i metody

Badaniu poddano 57 pacjentek operowanych z powodu podejrzenia endometriozy. Przedoperacyjnie u pacjentek nie stwierdzono nieprawidłowości w układzie krzepnięcia krwi.

Podział pacjentek na grupę badaną (n=33) i kontrolną (n=24) następował retrospektywnie na podstawie wyniku badania histopatologicznego, potwierdzającego lub wykluczającego endometriozę.

Grupę kontrolną stanowiły pacjentki z innymi łagodnymi guzami przydatków.

Krew pobierano przed operacją, rano na czczo, bez stazy, bezpośrednio do 2 probówek zawierających cytrynian sodu. Następnie krew znajdującą się w jednej z probówek w ciągu 2 minut zakwaszono buforem octanowym i wirowano (2000 obrotów przez 20 min.). Po odwirowaniu oddzielano surowicę od komórek i na każde 150 μ l surowicy dodawano 10 μ l HCl (1 mol/l), potem natychmiast zamrażano surowicę (-70°C). Krew w drugiej probówce natychmiast wirowano w temperaturze 4°C, z prędkością 2000 obrotów przez 10 minut.

Surowicę przelewano do 4 probówek i natychmiast zamrażano (-70°C). Zawartość plazminogenu oraz aktywność α 2-antypłazminy, tPA i PAI-1 mierzono metodą amidolityczną z użyciem substratu chromogenego S-2251.

Badania laboratoryjne wykonano w Klinice Hematologii UM w Poznaniu.

Tabela I. Grupa badana – chore, u których stwierdzono endometriozę.

	Plazminogen N=75-140%	α 2-anty- plazmina N=80-120%	PAI-1 N=0,3-3,5 U/ml	Aktywność tPA N=0,44-1,28 IU/ml
Średnia	129,9	73,14	1,88	1,00
SD	39,90	22,08	1,51	0,21
Mediana	138,4	64,3	1,39	0,96
Min.	69,5	42,2	0,13	0,76
Max.	206,6	110,5	4,8	1,48

PAI-1 – inhibitor tkankowego aktywatora plazminogenu-1

tPA – tkankowy aktywator plazminogenu

N – zakres normy

SD – odchylenie standardowe

Tabela II. Grupa kontrolna – chore, u których nie stwierdzono endometriozy.

	Plazminogen N=75-140%	α 2-anty- plazmina N=80-120%	PAI-1 N=0,3-3,5 U/ml	Aktywność tPA N=0,44-1,28 IU/ml
Średnia	122,97	66,1	2,48	1,20
SD	44,24	28,11	2,78	0,51
Mediana	129,7	60,7	1,00	1,05
Min.	64	34,9	0,2	0,69
Max.	190,6	106,4	8,48	2,56

PAI-1 – inhibitor tkankowego aktywatora plazminogenu-1

tPA – tkankowy aktywator plazminogenu

N – zakres normy

SD – odchylenie standardowe

Wyniki

Wyniki przedstawiono w postaci tabel I i II.

Przy opracowywaniu wyników skorzystano z testu t studenta dla zmiennych niezależnych oraz testu Welcha w zależności od wariancji. U chorych na endometriozę stwierdzono w surowicy krwi nieznacznie wyższe średnie stężenia plazminogenu ($p>0,05$) i α 2-antyplazminy ($p>0,05$) oraz niższe stężenie PAI-1 ($p>0,05$) i mniejszą aktywność tPA ($p>0,05$) w porównaniu z grupą kontrolną.

Dyskusja

Otrzewna posiada własną aktywność fibrynolityczną, która jest odpowiedzialna za degradację złogów fibryny powstających po uszkodzeniu. Ta fizjologiczna funkcja pozwala na prawidłową naprawę śródbłonna i w ten sposób zapobiega tworzeniu się zrostów.

Płyn otrzewnowy kobiet cierpiących z powodu endometriozy i zrostów otrzewnowych wykazuje wysoką aktywność fibrynolityczną, co może predysponować do krwawień śródoperacyjnych.

Tkanka endometrioidalna posiada nieprawidłową aktywność proteolityczną spowodowaną brakiem równowagi

między aktywatorami plazminogenu a inhibitorami aktywatorów plazminogenu.

Ekspresja tych czynników jest różna w zależności od typu i rozległości uszkodzeń.

W pracy badaliśmy surowicze stężenia dwóch wybranych aktywatorów (tPA i plazminogenu) oraz dwóch inhibitorów (PAI-1 i α 2-antyplazminy) fibrynolizy. Stężenia w surowicy krwi i czasy półtrwania sugerują, że aktywatory plazminogenu i PAI-1 są najbardziej podatne na regulację i zmiany stężeń wywołane chorobą, a zmierzone w danym momencie stężenia są wykładnikiem syntezy, uwalniania i degradacji. Stężenia PAI-1 i tPA wykazują wyraźne dobowe wahania [3].

U chorych na endometriozę stwierdziliśmy, w surowicy krwi, nieznacznie wyższe średnie stężenia plazminogenu i α 2-antyplazminy oraz niższe stężenie PAI-1 i mniejszą aktywność tPA w porównaniu z grupą kontrolną. Edelstam i wsp. [4] w płynie otrzewnowym kobiet cierpiących z powodu zrostów, endometriozy i zespołu zapalnego miednicy mniejszej (PID) analizowali stężenie specyficznych aktywatorów (u-PA i t-PA) i specyficznych inhibitorów (PAI-1 i PAI-2) fibrynolizy.

W porównaniu z grupą kontrolną stężenia wszystkich aktywatorów i inhibitorów były znacznie wyższe w grupie PID i w grupie operowanych z powodu zrostów. Wzrost aktywatorów plazminogenu może wskazywać, że system fibrynolityczny jest w stałej aktywności w celu zahamowania tworzenia dalszych zrostów.

Hellebrekers i wsp [5] stwierdzili, że w grupie pacjentek z endometriozą i zrostami wartości stężeń PAI-1, tPA i plazminogenu w płynie otrzewnowym były znacząco wyższe niż w grupie bez zrostów. Zmiana stężenia tPA i fibrynogenu korelowała z tworzeniem się zrostów. Uznano, że PAI-1 może być potencjalnym markerem identyfikacji pacjentek z ryzykiem tworzenia zrostów.

W innej pracy Bruse i wsp. [6] porównali parametry układu fibrynolitycznego w ognisku endometriozy, *endometrium*, płynie otrzewnowym i osoczu kobiet chorujących na endometriozę i kobiet zdrowych. Stężenia u-PA and PAI-1 w *endometrium* były wyższe u kobiet z endometriozą, niż w grupie kontrolnej, a jeszcze wyższe w ognisku endometriozy. Wysokie stężenia u-PA i PAI-1 w *endometrium* kobiet chorych może ułatwiać implantację komórek endometrialnych, a wysokie stężenia w ognisku endometriozy może warunkować jej inwazyjny wzrost. Zmienna ekspresja kilku komponentów układu fibrynolitycznego w *endometrium* i płynie otrzewnowym u chorych sugeruje istnienie czynnika sprawczego obecnego w zmianach endometrialnych.

U kobiet chorych wykazano zwiększoną aktywność fibrynolityczną w ektopowym *endometrium*, która powoduje, że fragmenty błony śluzowej macicy mają wyższy potencjał degradacji macierzy pozakomórkowej i powodują łatwiejszą implantację. Stwierdzano również zmiany w zakresie czynników fibrynolizy w badaniach *in vitro* [7].

Badano wydzielanie uPA, PAI-1 i rozpuszczalnego uPA przez kultury zrębu *endometrium*, ogniska endometriozy oraz komórek nabłonkowych. Z komórek zrębowych i nabłonkowych z ognisk endometriozy i z tkanki *endometrium* wydzielane były 3 rodzaje antygenów, ale wydzielanie PAI-1 było znacząco wyższe z komórek zrębowych niż z komórek nabłonkowych.

Ponadto wydzielanie PAI-1 było znacząco wyższe z ognisk endometriozy niż z komórek *endometrium*. Wyższe wydzielanie PAI-1 z ognisk endometriozy może mieć znaczenie dla ich inwazyjnego wzrostu.

Jednak nie wszyscy badacze uważają, że endometrioza zaburza funkcję układu fibrynolitycznego. Dunselman i wsp. [8] założyli, że wzrost wewnątrzbrzusznej aktywności fibrynolitycznej jest czynnikiem etiologicznym rozwoju endometriozy.

Następnie badali stężenia plazminogenu, fibrynogenu, α -2-antypłazminy, α 2-makroglobuliny, t-PA i jego inhibitora oraz produktów rozpadu fibryny w płynie otrzewnowym kobiet chorujących na endometriozę oraz kobiet zdrowych. Jednak nie stwierdzili znaczących różnic między badanymi grupami, dlatego uznali, że rola układu fibrynolitycznego w rozwoju endometriozy jest mało prawdopodobna.

Opisywane zmiany w obrębie układu fibrynolitycznego u chorych na endometriozę niejednokrotnie wydają się sprzeczne. Wskazuje to na złożony i nadal niewyjaśniony mechanizm powstawania ognisk endometriozy oraz tworzenia zrostów w przebiegu tej choroby. W literaturze nie znaleziono danych mówiących o tym, że intensywna terapia endometriozy zmniejsza obfitość krwawień z dróg rodnych, chociaż w kilku pracach badano wpływ leczenia endometriozy na aktywność fibrynolityczną [9].

U kobiet z histopatologicznie potwierdzoną endometriozą, leczonych przez 6 miesięcy leupreliną zbadano parametry aktywności koagulologicznej i fibrynolitycznej. Aktywność głównego inhibitora odpowiedzi fibrynolitycznej, PAI, zmniejszyła się o 25%, co sugeruje wpływ na reakcję fibrynolityczną. Stężenia w surowicy fragmentów degradacji fibryny były niższe o 35%, co sugeruje zmniejszenie tempa powstawania i degradacji fibryny. Zmniejszenie ilości kompleksów trombina-antytrombina III oraz fragmentów protrombiny, wskazuje, że efekt ten został osiągnięty przez redukcję aktywności prokoagulantów.

Oznacza to, że terapia analogami Gn-RH obniża podstawowe tempo procesów koagulacyjnych. Lindoff i wsp. [10] oznaczali u kobiet przed rozpoczęciem i po 6-miesięcznej terapii gosereliną, surowicze stężenia estradiolu, t-PA, PAI-1, antytrombiny III, fibrynogenu oraz aktywność białka C i czynnika VII. Stężenie antytrombiny III i aktywność białka C w trakcie leczenia uległy znaczącemu obniżeniu.

W porównaniu z kontrolą, stężenia PAI-1 i t-PA były znacząco wyższe zarówno przed, jak i po leczeniu, czego jednak nie stwierdzono w przebiegu leczenia. Stwierdzono różną ekspresję czynników aktywujących i hamujących plazminogen w komórkach *endometrium* kobiet chorujących na endometriozę oraz zdrowych.

Badano stężenia uPA, PAI-1 i -2 oraz rozpuszczalny receptor PA (suPA-R). Na stężenie uPA i PAI-2 nie miała wpływu terapia sterydowa, nie wykazano też różnic między grupą badaną a kontrolną.

Stężenie PAI-1 regulowane było pozytywnie przez promegestron w obu grupach. Natomiast, na ekspresję suPA-R leczenie nie miało wpływu, ale wartości były znacząco wyższe w komórkach endometrioidalnych. Widać tutaj odmienną aktywność plazminogenu w *endometrium* kobiet chorych na endometriozę oraz zwiększony potencjał proteolityczny fragmentów błony śluzowej macicy [11].

Wnioski

W przeciwieństwie do wstępnych założeń pracy nie stwierdzono istotnych różnic dotyczących parametrów fibrynolizy w surowicy krwi pomiędzy grupą badaną a kontrolną. Nie wyklucza to jednak ich istnienia na poziomie lokalnym, w ognisku endometriozy i jego sąsiedztwie.

Duży zakres rozrzutu danych eksperymentalnych może wynikać z niejednorodności grupy badanej, w której pacjentki wykazywały różne nasilenie zmian spowodowanych endometriozą. Sugeruje to celowość kontynuowania badań, co umożliwi wyciągnięcie klinicznych wniosków.

Piśmiennictwo

1. Gilbert-Estelles J, Castello R, Gilbert J, [et al.]. Plasminogen activators and plasminogen activator inhibitors in endometriosis. *Front Biosci.* 2005, 10, 1162-1176.
2. Bromboszcz A, Blacharski J, Lisiewicz J, [et al.]. Częstość powikłań krwotocznych, a układ hemostatyczny u chorych z endometriozą. *Ginekol Pol.* 1981, 52, 819-823.
3. Booth N. Fibrinolysis and thrombosis. *Baillieres Best Pract Res Clin Hematol.* 1999, 12, 423-433.
4. Edelman G, Lecander I, Larsson B, [et al.]. Fibrinolysis in the peritoneal fluid during adhesions, endometriosis and ongoing pelvic inflammatory disease. *Inflammation.* 1998, 22, 341-351.
5. Hellebrekers B, Emeis J, Kooistra T, [et al.]. A role for the fibrinolytic system in postsurgical adhesion formation. *Fertil Steril.* 2005, 83, 122-129.
6. Bruse C, Bergqvist A, Carlstrom K, [et al.]. Fibrinolytic factors in endometriotic tissue, endometrium, peritoneal fluid, and plasma from women with endometriosis and in endometrium and peritoneal fluid from healthy women. *Fertil Steril.* 1998, 70, 821-826.
7. Bruse C, Guan Y, Carlberg M, [et al.]. Basal release of urokinase plasminogen activator, plasminogen activator inhibitor-1, and soluble plasminogen activator receptor from separated and cultured endometriotic and endometrial stromal and epithelial cells. *Fertil Steril.* 2005, 83, suppl 1, 1155-1160.
8. Dunselman G, Bouckaert P, van Wersch J, [et al.]. Fibrinolytic properties of peritoneal fluid in endometriosis. *Gynecol Obstet Invest.* 1988, 26, 302-307.
9. Winkler U, Buhler K, Koslowski S, [et al.]. Plasmatic haemostasis in gonadotrophin-releasing hormone analogue therapy: effects of leuporelin acetate depot on coagulatory and fibrinolytic activities. *Clin Ther.* 1992, 14, suppl A, 114-120.
10. Lindoff C, Petersson F, Samsioe G, [et al.]. Treatment with a GnRH analogue: effects on hemostatic risk factors for thrombo-embolic disease. *Int J Fertil Menopausal Stud.* 1994, 39, 133-139.
11. Sillem M, Prifti S, Monga B, [et al.]. Soluble urokinase-type plasminogen activator receptor is over-expressed in uterine endometrium from women with endometriosis. *Mol Hum Reprod.* 1997, 3, 1101-1105.