

ЗМІНИ ЗАГАЛЬНОГО ПОТЕНЦІАЛУ ГЕМОКОАГУЛЯЦІЇ У ДІТЕЙ З ГОСТРИМ ГЕМАТОГЕННИМ ОСТЕОМІЄЛИТОМ

А. Ю. Казанський, Б. М. Боднар

Буковинський державний медичний університет, м. Чернівці

КЛЮЧОВІ

СЛОВА:

гострий гематогенний остеомієліт; гемостаз; тромбоцити; фібриноліз; діти.

РЕФЕРАТ

При гострому гематогенному остеомієліті (ГТО) у дітей спостерігали хронометричну гіпокоагуляцію, про що свідчили як процеси утворення тромбіну за внутрішнім (подовження часу рекальцифікації плазми крові та активованого парціального тромбопластинового часу) і зовнішнім (збільшення протромбінового часу) шляхами зсідання крові, так і зміни механізмів фібриногенезу (подовження тромбінового часу). Зниження протизсідальної здатності крові (пригнічення активності антитромбіну III на 18,5%) поєднувалося з значним збільшенням функціональної активності тромбоцитів (підвищення їх адгезивних і агрегаційних властивостей) більш ніж у 2 рази, що відбувалося на тлі сталого вмісту в крові фібриногену. Зміни у системі плазмового фібринолізу при ГТО характеризувалися пригніченням неферментної і, переважно, ферментної фібринолітичної активності плазми крові, що поєднувалося з інтенсифікацією Хагеман—залежного фібринолізу і супроводжувалося накопиченням у крові розчинних комплексів фібрин—мономеру. Отже, хронометрична гіпокоагуляція є вторинною, зумовленою впливом розчинних комплексів фібрин—мономеру, які блокують фібриногенез. Тому загальний потенціал зсідання крові у дітей з ГТО слід вважати структурною гіперкоагуляцією.

THE CHANGES OF GENERAL POTENTIAL OF HEMOCOAGULATION IN CHILDREN, SUFFERING AN ACUTE HEMATOGENIC OSTHEOMYELITIS

A.Yu. Kazanskiy, B. M. Bodnar

KEY

WORDS:

acute hematogenic osteomyelitis; hemostasis; thrombocytes; fibrinolysis; children.

SUMMARY

Chronometric hypocoagulation was observed in children, suffering an acute hematogenic osteomyelitis, witnessed by processes of thrombin formation according to internal (the prolonged time of the blood plasma recalcification and activated partial thromboplastin time) and external (the thrombin time enhancement) ways of the blood coagulation process, as well as changes in fibrinogenesis mechanisms (the thrombin time prolongation). The lowering of anticoagulant capacity of the blood (the antithrombin III activity inhibition by 18.5%) was combined with significant increase of the thrombocytes functional activity (the rising of their adhesive and aggregational properties) in more than two times, which have occurred on the background of constant content of fibrinogen in the blood. Changes in the system of the plasm fibrinolysis in an acute hematogenic osteomyelitis was characterized by inhibition of cofermental and, mainly, fermental fibrinolytic activity of the blood plasm, in conjunction with Hageman—dependent fibrinolysis intensification and was accompanied by accumulation of soluble complexes of fibrin—monomer in the blood. So far, chronometric hypocoagulation is secondary process, caused by the influence of soluble complexes of fibrin—monomer, which blocks fibrinogenesis. That's why the general potential of the blood coagulation system in children with an acute hematogenic osteomyelitis must be regarded as a structural hypercoagulation.

Лікування ГТО, частота якого становить 3 — 11% в структурі хірургічних захворювань дитячого віку, є актуальною проблемою. Частота переходу захворювання у хронічні форми досягає 11%, летальність становить 1,3% [6 — 8, 10]. Важливу роль у патогенезі ускладнень ГТО відіграють порушення у системі регуляції агрегатного стану крові.

Аналіз показників коагулограми свідчить, що у дітей з ГТО гіперкоагуляція поєднується з вираженою гіперфібринемією і пригніченням фібринолітичної активності плазми крові. Виходячи з цього, деякі вчені підтримують точку зору про необхідність призначення антикоагулянтів прямої дії (гепарин) разом з антиферментними пре-

паратами (контрикал) [5]. Проте, вплив зазначених препаратів на регуляцію агрегатного стану крові є складним, зокрема, гепарин спричиняє підвищення функціональної активності тромбоцитів [1], контрикал здатний знижувати інтенсивність плазмового фібринолізу [2]. Отже, для адекватного застосування препаратів, що впливають на процеси регуляції агрегатного стану крові, необхідно мати чітку уяву про зміни коагуляційного, тромбоцитарно—судинного гемостазу, протизсідальної і фібринолітичної систем крові при ГТО у дітей.

Мета роботи: з'ясувати зміни первинного і вторинного гемостазу, фібринолізу і протизсідальної здатності крові у дітей з ГТО.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Обстежені 67 хворих на ГГО (дослідна група) віком від 5 до 18 років. Діагноз встановлювали на підставі аналізу скарг на біль, припухлість ураженого сегмента кінцівки, обмеження рухів, опорної функції, гострий початок захворювання, підвищення температури тіла до 40°C; даних обстеження: гіперемії, болючості при пальпації та осьовому навантаженні ураженого сегмента кістки. Зміни аналізу крові в перші дні захворювання були такими, як і при іншому гнійному ураженні, тільки більш вираженими. Хлопчиків було 41 (61,2%), дівчаток — 26 (38,8%).

Епіфізарна форма ГГО діагностована у 7 (10,2%) дітей, у решти — місцем ураження найчастіше був метафіз з поширенням на діафіз кістки. Ураження стегнової кістки відзначено у 26 (38,7%) дітей, кісток гомілки — у 22 (32,3%), плечової кістки — у 4 (6,4%), кісток таза — у 3 (5,5%), множинне ураження — у 3 (4,7%), кісток передпліччя — у 2 (3,5%), стопи — у 2 (3,5%), інших кісток — у 3 (4,7%).

Всі діти госпіталізовані на 3 — 5-ту добу від початку захворювання, у період вираженої ендогенної інтоксикації, про що свідчили такі клінічні ознаки, як лихоманка, озноб, загальмованість, сопорозний стан, запаморочення, загальна слабкість. Гострий, раптовий початок захворювання з підвищенням температури тіла до 40°C спостерігали у 57 (85%) пацієнтів. При госпіталізації у тяжкому стані були 50 (75%) дітей, середньої тяжкості — 17 (25%). Токсична форма захворювання діагностована у 8 (12%) дітей, септикопемічна — у 33 (49,2%), місцеве ураження кістки — у 26 (38,8%).

До контрольної групи, співставної за віком і статтю, включені 20 дітей з незапальними захворюваннями (фімоз, грижа), яких лікували у стаціонарі.

Відразу після госпіталізації в усіх пацієнтів з ліктьової вени забирали кров для дослідження параметрів гемостазу і фібринолізу. Як стабілізатор використовували 3,8% розчин натрію цитрату. Загальний коагуляційний потенціал крові (час рекальцифікації плазми, протромбіновий і тромбіновий час, активованій парціальний тромбoplastиновий час), потенційну активність плазміногену, антиплазміну, рівень фібриногену в плазмі крові, активність антитромбіну III і концентрацію розчинних комплексів фібрин—мономеру в крові визначали з використанням наборів реактивів фірми "Simko Ltd" (Україна).

Час рекальцифікації плазми визначали у цитратній плазмі, отриманій після центрифугування крові протягом 5 хв з швидкістю 1500 об./хв. У пробірку, змішену у водяну баню, вносили 0,2 мл буфера Міхаеліса з 0,025 мм кальцію хлориду. Через 1 — 2 хв додавали 0,2 мл плазми і одразу вмикали секундомір. Пробірку періодично струшували і визначали час утворення ниток фібрину (згортка).

Для визначення активованого парціального тромбoplastинового часу фіксували час рекальцифікації безтромбоцитної плазми після стандартизованої контактної (каоліном) та фосфоліпідної (кефаліном) активації

зсідання крові. У пробірку вносили 0,1 мл досліджуваної плазми та 0,1 мл каолін—кефалінової суміші (кефалін розчиняли в 1 мл 0,15 моль/л розчину натрію хлориду, 0,1 мл отриманої суспензії розводили суспензією каоліну у співвідношенні 1 : 9), перемішували та вміщували пробірку у водяний термостат при температурі 37°C. Через 5 хв в пробірку додавали 0,1 мл попередньо підігрітого до температури 37°C 0,025 моль/л розчину кальцію хлориду, одночасно вмикали секундомір. Злегка струшували пробірку та визначали час утворення згортка.

Для визначення протромбінового часу в ступці розтирали 10 мг тромбoplastину в 1 мл дистильованої води і центрифугували протягом 20 хв з швидкістю 2000 об./хв. У термостат при температурі 37°C ставили 3 пробірки. У кожен з них вносили 0,1 мл буфера Міхаеліса з 0,025 моль/л кальцію хлориду і 0,1 мл суспензії тромбoplastину. Через 30 с у першу пробірку додавали 0,1 мл досліджуваної плазми і одночасно вмикали секундомір. Пробірку струшували до появи згортка, відмічали час його утворення. Таку саму маніпуляцію здійснювали з другою та третьою пробірками. З отриманих даних обчислювали середнє арифметичне, яке є показником протромбінового часу досліджуваної плазми.

Для визначення тромбінового часу готували маточний розчин тромбіну з концентрацією 50 од. NIH/мл розчину, для чого до вмісту флакона "Тромбін людини" додавали 2 мл 0,15 моль/л розчину натрію хлориду. З маточного розчину готували робочий розчин з активністю 10 од. NIH/мл розчину (тобто, маточний розчин змішували з 0,15 моль/л натрію хлориду у співвідношенні 1 : 4). Тестували активність робочого розчину тромбіну за плазмою здорових донорів. Робочий розчин тромбіну зберігав активність протягом 12 — 15 с. Плазму (0,2 мл) прогрівали протягом 1 хв у водяному термостаті при температурі 37°C, після чого до неї додавали 0,2 мл робочого розчину тромбіну, одразу включали секундомір і визначали час утворення згортка за періодичного струшування пробірки.

При дослідженні концентрації фібриногену в плазмі крові до розбавленої цитратної плазми додавали розчин тромбіну і визначали час утворення фібринового згортка. При надмірній кількості тромбіну час утворення згортка залежить від концентрації фібриногену, яку визначали за калібрувальною кривою. Розведену (1 : 9) цитратну плазму в об'ємі 0,2 мл проби нагрівали протягом 1 хв у водяному термостаті, додавали 0,2 мл розчину тромбіну (активність 10 NIH/мл) та негайно вмикали секундомір. Визначали час утворення ниток фібрину (невеликого згортка) за періодичного струшування пробірки. Час утворення згортка фіксували за показником термостата ТПС—8 (Росія).

При дослідженні активності антитромбіну III розведену плазму крові інкубували з стандартною кількістю тромбіну з активністю 10 NIH/мл (частина тромбіну при цьому з'єднується з антитромбіном III), потім за часом зсідання фібриногену визначали залишкову активність тромбіну. До 0,2 мл робочого розчину тромбіну додава-

ли 0,1 мл пробі (плазма, розведена у 20 разів). Суміш інкубували протягом 2 хв при температурі 37°C. Пробірку виймали з водяної бані, інтенсивно струшували її кілька разів для ретракції утвореного згортка. Швидко відбирали 0,2 мл суміші, додаючи її до 0,3 мл розчину фібриногену (нагрітого протягом 1 хв при температурі 37°C) і одночасно вмикали секундомір. Пробірку виймали з водяної бані і струшували її на фоні потоку світла матової панелі термостата ТПС-8, фіксували час утворення фібринового згортка. За калібрувальною кривою визначали активність антитромбіну III.

Стан тромбоцитарної ланки первинного гемостазу оцінювали за кількістю адгезивних тромбоцитів [4], а також індексом спонтанної агрегації тромбоцитів [9].

Для визначення стану фібринолітичної системи крові досліджували інтенсивність сумарного, ферментного і неферментного фібринолізу (патент України 30727 А від 17.05.2000). При інкубації азофібрину з стандартною кількістю плазміногену в присутності активаторів фібринолізу, які містяться в плазмі крові, утворюється плазмін, активність якого оцінюють за інтенсивністю забарвлення розчину в лужному середовищі внаслідок лізису азофібрину – в присутності амінокапронової кислоти (неферментний фібриноліз) або без неї (сумарна фібринолітична активність). Різниця між показниками відображує стан ферментного фібринолізу.

Хагеман–залежний фібриноліз оцінювали за здатністю активованого коаліном фактора XII перетворювати плазміноген на плазмін. У поліетиленову пробірку, що містить 0,25 мл плазми, додавали 4 мл робочого ацетатного буфера, одразу вносили 0,25 мл суспензії коаліну, перемішували і вміщували у водяний термостат при температурі 37°C. Контактну активацію фактора XII з утворенням фактора XIIa, що необхідно для перетворення плазміногену на плазмін, проводили протягом 45 хв за періодичного перемішування вмісту дерев'яною паличкою. За цей час плазміноген перетворюється на плазмін за допомогою фактора XIIa та кофакторів "контактної" активації. Пробірки центрифугували протягом 10 хв з швидкістю 2000 об./хв. Надосадову рідину зливали, пробірки перевертали та повністю виливали їх вміст на фільтрувальний папір. Еуглобуліновий згорткок суспензували в 0,25 мл боратного буферного розчину, додавали 0,25 мл розчину кальцію хлориду, пробірку з сумішшю негайно ставили у водяну баню при температурі 37°C. Інтервал від часу утворення згортка до його повного розчинення є часом лізису згортка, який виражали у хвилинах.

Розчинні комплекси фібрин–мономеру в плазмі крові визначали за аналізом їх рецепторної взаємодії з спеціальним штамом золотистого стафілокока, яку оцінювали візуально за аглютинацією бактеріальних клітин. Плазму отримували з цитратної крові. Кров центрифугували з швидкістю 1500 об./хв протягом 7 хв, отримуючи в надосаді багату на тромбоцити плазму. До 0,1 мл плазми у скляній пробірці додавали 0,1 мл розчину тромбіну з активністю 10 NIH. Пробірку струшували та

інкубували у водяному термостаті при температурі 37°C протягом 7 хв.

Статистичну обробку отриманих результатів проводили з використанням програми "BioStat" з визначенням t -критерію Ст'юдента [3].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У дітей з ГТО спостерігали подовження часу рекальцифікації плазми крові на 33,5% у порівнянні з контрольними показниками. Активованій парціальний тромбопластиновий час перевищував контрольний рівень на 25,5%, протромбіновий час – на 30,5%, тромбіновий час – на 48,1%.

Отже, у гострому періоді ГТО виникає хронометрична гіпокоагуляція, про що свідчать зміни як процесів утворення тромбіну за внутрішнім (подовження часу рекальцифікації плазми крові та активованого парціального тромбопластинового часу) і зовнішнім (збільшення протромбінового часу) шляхами зсідання крові, так і механізмів фібриногенезу (підвищення тромбінового часу).

Концентрація фібриногену в плазмі крові достовірно не змінювалася. Активність антитромбіну III зменшувалася в 1,3 разу, кількість адгезивних тромбоцитів та індекс їх спонтанної агрегації перевищували контрольні величини відповідно у 2,1 та 2,9 разу.

Таким чином, при ГТО у дітей зниження протизсідальної здатності крові (пригнічення активності антитромбіну III на 18,5%) поєднується з значним збільшенням функціональної активності тромбоцитів (більш ніж дворазове підвищення їх адгезивних і агрегаційних властивостей), що відбувається на тлі сталого вмісту в крові фібриногену.

Сумарна фібринолітична активність плазми крові у дітей дослідної групи була на 47% меншою, ніж у пацієнтів контрольної групи. При цьому інтенсивність неферментного фібринолізу знижувалася на 37,4%, ферментна фібринолітична активність була вдвічі меншою за таку у контролі. Структура сумарного плазмового фібринолізу дещо змінювалася, проте, частка низькоефективного неферментного лізису фібрину збільшувалася з 25 до 30%. Хагеман–залежний фібриноліз збільшувався відносно такого у контролі на 27,2%. У крові дітей дослідної групи виявляли розчинні комплекси фібрин–мономеру, у пацієнтів контрольної групи їх не було.

Отже, зміни у системі плазмового фібринолізу при ГТО неоднозначні: пригнічення неферментної і, переважно, ферментної фібринолітичної активності плазми крові поєднується з інтенсифікацією Хагеман–залежного фібринолізу, що супроводжується накопиченням у крові розчинних комплексів фібрин–мономеру.

За даними кореляційного аналізу, вміст розчинних комплексів фібрин–мономеру у крові позитивно корелює з часом рекальцифікації плазми крові ($y = 12,28 + 66,59x$; $r = 0,970$; $n = 17$, $P < 0,001$), протромбіновим ($y = 2,126 + 16,21x$; $r = 0,614$; $n = 17$, $P < 0,01$) і тромбіновим ($y = 2,335 + 12,71x$; $r = 0,753$; $n = 17$, $P < 0,001$) часом. Набли-

жалає до достовірності і взаємозалежність між концентрацією в крові розчинних комплексів фібрин—мономеру та активованим парціальним тромбoplastиновим часом ($y = 2,787 + 41,06x$; $r = 0,467$; $n = 17$, $P > 0,05$).

Хронометрична гіпокоагуляція у дітей з ГГО є наслідком накопичення у крові розчинних комплексів фібрин—мономеру, які заважають процесам полімеризації фібрину, впливають на тривалість хронокоагуляційних тестів [1, 2]. Тобто, зниження інтенсивності зсідання крові є несправжнім, зумовленим високою концентрацією в крові продуктів фібринолізу. У свою чергу, вміст у крові розчинних комплексів фібрин—мономеру позитивно корелював з Хагеман—залежним фібринолізом ($y = 1,097 + 9,117x$; $r = 0,661$; $n = 17$, $P < 0,01$), інтенсивність якого відносно такої у контролі збільшувалась; не встановлена кореляційна залежність з сумарною, неферментною і ферментною фібринолітичною активністю плазми крові, яка у дітей з ГГО пригнічена.

Таким чином, основною причиною змін у системі коагуляційного гемостазу є вторинне подовження часових параметрів зсідання крові внаслідок дії розчинних комплексів фібрин—мономеру, які блокують фібриногенез. Тому загальний потенціал зсідання крові у дітей з ГГО слід вважати структурною гіперкоагуляцією.

ВИСНОВКИ

1. У гострому періоді гематогенного остеомиєліту виникає хронометрична гіпокоагуляція, яка проявляється змінами як процесів утворення тромбіну за внутрішнім (подовження часу рекальцифікації плазми крові та активованого парціального тромбoplastинового часу) і зовнішнім (збільшення протромбінового часу) шляхами згортання крові, так і механізмів фібриногенезу (подовження тромбінового часу).

2. У дітей з ГГО зниження протизсідальної здатності крові (пригнічення активності антитромбіну III на 18,5%) поєднується з значним збільшенням функціональної активності тромбоцитів (більш ніж дворазове

підвищення їх адгезивних і агрегаційних властивостей), що відбувається на тлі сталого вмісту в крові фібриногену.

3. Зміни у системі плазмового фібринолізу при ГГО неоднозначні: пригнічення неферментної і, переважно, ферментної фібринолітичної активності плазми крові поєднується з інтенсифікацією Хагеман—залежного фібринолізу, що супроводжується накопиченням у крові розчинних комплексів фібрин—мономеру. Хронометрична гіпокоагуляція є вторинною, зумовленою дією розчинних комплексів фібрин—мономеру, які блокують фібриногенез. Тому загальний потенціал зсідання крові у дітей з ГГО слід вважати структурною гіперкоагуляцією.

ЛІТЕРАТУРА

1. Балуда В. П. Физиология системы гемостаза. — М.: Медицина, 1995. — 293 с.
2. Братчик А. М. Клинические проблемы фибринолиза. — К.: Здоровья, 1993. — 433 с.
3. Гланц С. Медико—биологическая статистика. — М.: Практика, 1999. — 459 с.
4. Мищенко В. П., Крохмаль Н. В., Надутый К. А. Простой метод определения адгезивно—агрегационных свойств тромбоцитов // Физиол. журн. — 1980. — Т. 26, № 2. — С. 282—283.
5. Разиньков А. Г., Косяков Г. А. Лечение острого гематогенного остеомиелита у детей с учетом иммунологической реактивности и коагуляционных свойств крови // Клини. хирургия. — 1980. — № 5. — С. 45—48.
6. Щитинин В. Е., Коровин С. А., Дворовенко Е. В. и др. Лечение острого гематогенного остеомиелита у детей // Дет. хирургия. — 2000. — № 5. — С. 8—11.
7. Hui—Chin Kao, Yhu—Chering Huang, Cheng—Hsun Chiu et al. Acute hematogenous osteomyelitis and septic arthritis in children // J. Microbiol. Immunol. Infect. — 2003. — Vol. 36. — P. 260—265.
8. Le Saux N., Howard A., Barrowman N. J. et al. Shorter courses of parenteral antibiotic therapy do not appear to influence response rates for children with acute hematogenous osteomyelitis: a systematic review // BMC Infect. Dis. — 2002. — Vol. 2. — P. 16—25.
9. Taccola A., Gotti G. B., Baruffini A., Cipolli P. L. Su un metodo di determinazione quantitativa della aggregabilità plastrinica spontanea // Rass. Med. Sper. — 1980. — Vol. 27, N 12. — P. 795—804.
10. Vazquez M. Osteomyelitis in children // Cur. Opin. Pediatr. — 2002. — Vol. 14. — P. 112—115.