УДК [612.112.1:616-005.1-08]+616.711-007.5

СУЛЬФАТИРОВАННЫЕ ГЛИКОЗАМИНОГЛИКАНЫ КРОВИ В АСПЕКТЕ ГЕМОСТАЗА У БОЛЬНЫХ С ИДИОПАТИЧЕСКИМ СКОЛИОЗОМ

Лебедева М.Н., Русова Т.В., Иванова А.А., Шайдурова Н.В.

ФГБУ «НИИТО им. Я.Л. Цивьяна» Минздрава России, Новосибирск, e-mail: mlebedeva@niito.ru

Проанализированы данные, полученные в процессе хирургического лечения у 54 больных с идиопатическим сколиозом. Всем пациентам проводилось стандартное предоперационное исследование системы гемостаза и определялось количественное содержание в сыворотке крови сульфатированных гликозминогликанов. По объему интраоперационной кровопотери выделены две группы пациентов: I группа – 29 пациентов с объемом интраоперационной кровопотери до 20% объема циркулирующей крови; II группа – 25 пациентов с объемом кровопотери более 20% объема циркулирующей крови. Установлена сильная корреляционная связь показателей сульфатированных гликозаминогликанов с объемом интраоперационной кровопотери с коэффициентом Пирсона r = 0,88. Предоперационная оценка уровня сульфатированных гликозаминогликанов может применяться с целью прогнозирования кровопотери в хирургии сколиоза.

Ключевые слова: идиопатический сколиоз, кровопотеря, гемостаз, сульфатированные гликозаминогликаны

SULFATED GLYCOSAMINOGLYCANS IN THE BLOOD OF PATIENTS WITH IDIOPATHIC SCOLIOSIS FROM THE ASPECT OF HEMOSTASIS

Lebedeva M.N., Rusova T.V., Ivanova A.A., Shaydurova N.V.

Novosibirsk Research Institute of Traumatology and Orthopedics n.a. Y.L. Tsivyan, Novosibirsk, e-mail: mlebedeva@niito.ru

Data on surgical treatment of 54 patients with idiopathic scoliosis were analyzed. All patients underwent routine preoperative hemostasis evaluation, and the quantitative analysis of sulfated glycosaminoglycan content in the blood serum was performed. The patients were divided into 2 groups according to the volume of intraoperative blood loss: group I included 29 patients with intraoperative blood loss of up to 20% of the total circulating blood volume and group II included 25 patients who lost more than 20% of circulating blood. A strong correlation between the sulfated glycosaminoglycan levels and the volume of perioperative blood loss (Pearson's correlation coefficient, r=0.88) was determined. Preoperative evaluation of the sulfated glycosaminoglycan content can be used to predict blood loss in scoliosis surgery.

Keywords: idiopathic scoliosis, blood loss, hemostasis, sulfated glycosaminoglycans

Идиопатический сколиоз (ИС) – тяжелая многоплоскостная деформация позвоночника, приводящая к тяжелой инвалидизации детей и подростков. С целью коррекции сколиотических деформаций позвоночника в ведущих вертебрологических клиниках мира применяются хирургические технологии, неизбежной составляющей которых является интраоперационная кровопотеря. Обращает на себя внимание тот факт, что интраоперационная кровопотеря варьирует от минимальной до 100% объема циркулирующей крови (ОЦК) и более [6, 12]. И если вопросы взаимосвязи основных провоцирующих факторов (тяжесть деформации позвоночника, хирургическая технология, длительность операции, параметры гемодинамики, повышение внутрибрюшного давления) с величиной интраоперационной кровопотери в литературе достаточно освещены [5], то имеются лишь единичные сообщения об особенностях системы гемостаза у больных с ИС и отсутствуют надежные прогностические критерии ожидаемого объема интраоперационной кровопотери.

В частности, Калашникова Е.В., анализируя прокоагуляционное звено гемостаза у больных с ИС, обнаружила дефицит фактора Виллебранда, фактора VIII, нарушения полимеризации фибрин-мономеров, удлинение тромбинового времени [1]. Однако информационная значимость нарушений прокоагуляционного звена гемостаза не получила однозначного подтверждения – другие исследователи на предоперационном этапе у больных с ИС не обнаружили соответствующих значимых изменений [11]. Закономерно возникает вопрос, какие же факторы определяют столь широкий диапазон зарегистрированных разными исследователями объемов кровопотери при корригирующих операциях по поводу сколиоза.

Известно, что многие ученые занимались поиском возможных биохимических маркеров развития ИС в биологических жидкостях. Так А.И. Казьмин и Р.В. Меркурьева [2] обнаружили изменения уровня сывороточных гликозаминогликанов (ГАГ) у больных с ИС. В исследованиях Т.В. Русовой [8] обнаружена корреляционная связь между уровнем сывороточных ГАГ, активностью α-галактозидазы и степенью деформации позвоночника. Возникает предположение, что количественное определение

ГАГ в сыворотке крови может быть использовано с целью выявления нарушений баланса системы гемостаза у больных с ИС, так как известно, что одним из представителей сульфатированных гликозаминогликанов (Сгаг) является гепарин. Гепарин содержится в коже, легких, печени, сердце, стенках артерий, слизистой оболочке желудка. Выделяясь из гранул тучных клеток, гепарин играет роль матрицы, на которой разворачиваются многие внеклеточные реакции, направленность которых зависит от физиологической ситуации. По всей вероятности, эта ключевая роль в организме животных и человека и объясняет множество эффектов гепарина, одним из которых является его участие в системе гемостаза. Основная антикоагулянтная функция гепарина заключается в том, что он ингибирует ферменты гемокоагуляции в присутствии антитромбинов, а также препятствует полимеризации фибрин-мономеров, воздействуя на фактор ХШа [8].

На основании вышеизложенного, имеются все основания допустить, что повышенная кровопотеря может быть связана с различным содержанием гепарина в крови оперируемых больных. При анализе литературных источников подобных сведений нам не встретилось.

Цель исследования:

1. Определить уровень сульфатированных гликозаминогликанов в сыворотке крови у больных с идиопатическим сколиозом.
2. Выделить в составе сульфатированных гликозаминогликанов гепарин и установить его связь с объемом интраоперационной кровопотери у оперируемых больных.

Материалы и методы исследования

Проанализированы данные, полученные в процессе хирургического лечения у 54 больных с ИС, оперированных в клинике детской ортопедии №1 ФГБУ «НИИТО им. Я Л. Цивьяна». Всем пациентам на предоперационном этапе проводилось рутинное исследование системы гемостаза: протромбиновое время, МНО, ПТИ, АПТВ, фибриноген, тромбиновое время. Также на предоперационном этапе исследовали в крови количество факторов свертывания (VIII; XII) и количество Сгаг. Для выделения гликозминогликанов из сыворотки использовали метод Карякиной Е.В. и Косягина Д.В. [4]. Для определения количества Сгаг использован метод Jong J.G.N. [9]. С целью идентификации гепарина применен метод электрофореза ГАГ в 1% геле агарозы в 50мМ буфере ацетата бария pH 8,0 [10]. Предварительно гликозаминогликаны обрабатывали хондроитиназой АВС (Е.С.4.2.2.4) для удаления хондроитинсульфатов. Для определения референтных величин анализируемых показателей в исследовании также приняли участие 15 здоровых добровольцев соответствующей возрастной группы – контрольная группа.

Всем пациентам было выполнено хирургическое лечение в объеме дорсального спондилодеза с использованием гибридного инструментария (крюковая и транспедикулярная фиксация) в условиях многокомпонентной ингаляционной анестезии. Средний возраст больных: 18,8±7,1 лет (I), 16,9±6,2 лет (II). Ретроспективно у больных, включенных в исследование, были оценены показатели интраоперационной кровопотери, на основании которых выделены две группы: I группа – 29 пациентов с зарегистрированным объемом интраоперационной кровопотери до 20% объема циркулирующей крови (ОЦК); II группа – 25 пациентов с объемом интраоперационной кровопотери более 20% ОЦК.

Полученные количественные данные были обработаны с помощью программ Microsoft Excel и SPSS 13.0. Для проверки статистических гипотез о различии между исследуемыми группами использовали непараметрический критерий Манна-Уитни (где p – достигнутый уровень значимости). Для определения корреляционной зависимости между показателями высчитывался коэффициент корреляции Пирсона (r).

Результаты исследования и их обсуждение

Выделенные группы наблюдений были сопоставимы по основным исследуемым признакам: величина деформации позвоночника – 56,2±15,6° (I), 58,4±17,5° (II) ($p>0,05$), протяженность дорсального спондилодеза – 12,4±1,2 сегмент (I), 12,7±1,4 сегмент (II) ($p>0,05$), продолжительность операции – 144,4±33,6 мин (I), 173,1±42,7 мин (II) ($p>0,05$).

Величина зарегистрированной интраоперационной кровопотери в группах статистически значимо различалась и составила: 744,5±195,9 мл (20,6±4,9 % ОЦК) (I), 1175,3±286,4 мл (38,9±7,9 % ОЦК) (II) ($p<0,001$). Содержание Сгаг в сыворотке крови больных в группах также имело существенное различие. Результаты их количественного исследования представлены в таблице.

Содержание Сгаг в сыворотке крови доноров и больных с ИС

Показатель	Исследуемые группы		
	Контрольная группа (n= 15)	I группа (n= 29)	II группа (n=27)
Сгаг (мкг хондроитинсульфата С в1 мл крови)	3,25±0,75	1,93±0,38*#	2,61±0,28

* – достоверность отличий относительно контрольного уровня ($p<0,05$); # – достоверность отличий между группами I и II ($p<0,05$).

Выявлено, что у больных с ИС в обеих группах содержание Сгаг в сыворотке крови было снижено относительно границ установленных контрольных значений. Но если в группе II это различие было недостоверным, то в группе I содержание Сгаг было в 1,7 раза ниже контрольной группы и в 1,35 раза ниже уровня I группы, что являлось статистически значимым.

Возникает вопрос: действительно ли величина кровопотери зависит от уровня Сгаг? Чтобы ответить на этот вопрос после выделения Сгаг из крови методом электрофореза в геле агарозы исследовали их качественный состав (с целью определения присутствия гепарина) (рис. 1).

Электрофоретическая подвижность в электрическом поле ГАГ сыворотки крови из разных групп пациентов значительно различалась. Если в группе I обнаружена заметная полоса ГАГ возле стартовой позиции, то в группе II этой полосы не обнаружено. Обработка специфическими хондроитиназами ABC, разрушающими хондроитинсульфаты AC и дерматансульфат, позволила выделить гепарин/гепаран сульфат – Сгаг наиболее значимый для системы гемостаза (рис. 2).

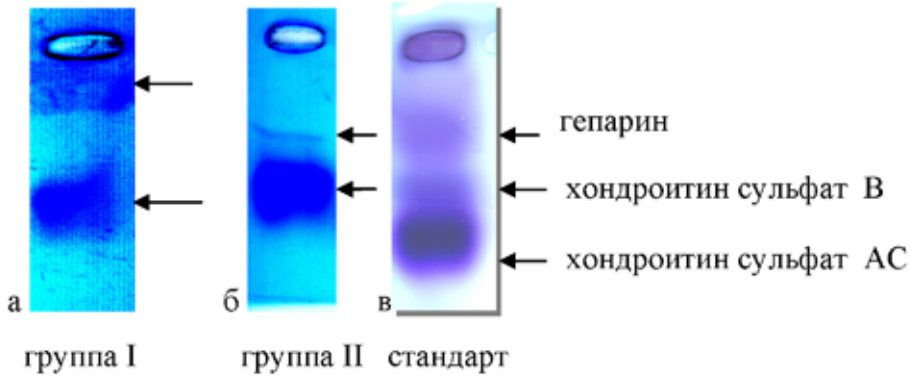

Рис. 1. Электрофорез исходных Сгаг сыворотки крови больных ИС:
а – группа I; б – группа II; в (стандарт) – смесь стандартных
ГАГ – хондроитинсульфатов A,B,C и гепарина. Стрелками указаны разделяющиеся ГАГ

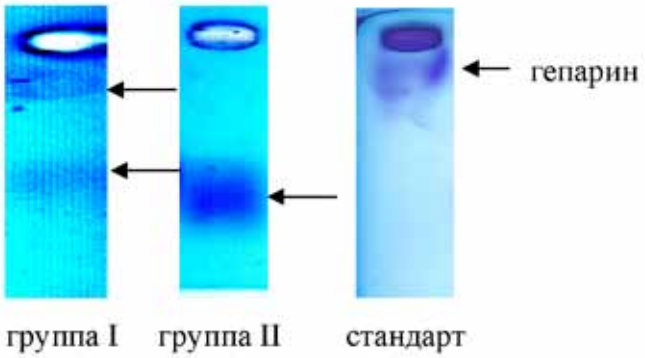

Рис. 2. Электрофорез стандартного набора Сгаг и образцов Сгаг крови больных ИС после обработки их раствора хондроитиназами ABC:
группа I; группа II, смесь стандартных Сгаг. Стрелками указаны следы Сгаг (гепарина/гепаран сульфата), сохранившиеся в растворе после разрушения основного компонента ГАГ крови – хондроитин сульфата

Обработка АВС хондроитиназами, разрушая все виды хондроитин сульфатов, позволила выявить присутствие в крови обеих групп гепарина небольших молекулярных размеров, поскольку в электрическом поле зарегистрировано его движение на уровне хондроитин сульфатов, в отличие от стандартных образцов. Однако у больных в группе I в структуре крови выявлено существенное отличие – небольшая концентрация гепарина/гепаран сульфата (Геп/ГС) с относительно большими молекулярными размерами (в электрическом поле он движется медленно и остается недалеко от старта), тогда как у больных группы II относительное количество этой фракции было не только больше, но и её подвижность в электрическом поле была выше. Известно, что небольшие фрагменты (олигосахариды) как гепарина, так и ГС обладают более активными антикоагулянтными свойствами, чем больше сульфатированные цепи этих ГАГ [13]. Поэтому весьма вероятно, что в крови у больных группы II фракция Геп/ГС обладала более активными свойствами. Геп/ГС способствуют конформационным изменениям и в ингибиторе (антитромбин III) и в белке – мишени (тромбине). Это приводит к образованию необратимого комплекса, который не принимает участия в каскаде свертывания крови. По сведениям из литературных источников при наличии гепарина процесс инактивации развертывается очень быстро [3]. В проведенном исследовании установлена сильная корреляционная связь показателей Сгаг с объемом интраоперационной кровопотери у оперированных больных с коэффициентом Пирсона r = 0,88.

Изучаемые стандартные параметры гемостаза в обеих группах значимых отклонений от условно нормальных значений не имели, однако в группе II было отмечено снижение количества фактора XII до нижней границы нормального уровня (в пределах 50-80 мкг/мл) и снижение показателя фибринолитической активности до 17 мин и более. В результате выполненного исследования был предложен комплекс измерений для дооперационного прогнозирования возможной кровопотери [7] с целью оптимизации индивидуальной предоперационной подготовки больного.

Заключение. Выполненное исследование позволило сделать заключение, что у больных с идиопатическим сколиозом в крови содержание сульфатированных гликозаминогликанов снижено относительно здоровых людей. Но у части больных уровень этих веществ в крови достигает нижней границы нормальных значений. У больных этой группы обнаружено содержание низкомолекулярной фракции сульфатированных гликозаминогликанов – гепарин/гепаран сульфат, которая обладает более активными свойствами, что вероятно и приводит к различным результирующим потерям крови. Предоперационная количественная оценка уровня сульфатированных гликозаминогликанов может применяться с целью прогнозирования интраоперационной кровопотери в хирургии сколиоза.

Список литературы

1. Калашникова Е.В., Екимов В.М., Кривов В.А. Зависимость величины кровопотери у больных диспластическим сколиозом от вида хирургической коррекции и нарушений системы гемостаза // Проблемы хирургии позвоночника и спинного мозга: тезисы Всерос. конф. – Новосибирск. – 1996. – С. 83–84.

2. Казьмин А.И., Меркурьева Р.В. О роли нарушений метаболизма гликозаминогликанов в патогенезе сколиоза // Ортопедия, травматология и протезирование. – 1971. – № 11. – С. 87-91.

3. Кондашевская М. В. Современые представления о роли гепарина в гемостазе и регуляции ферментативной и гормональной активности // Вестник РАМН. – 2010. – №7. – С. 35 – 43.

4. Карякина Е.В., Косягин Д.В. Определение гликозаминогликанов в сыворотке крови // Лаб. Дело. – 1982. – №10. – С. 591- 593.

5. Лебедева М.Н., Агеенко А.М., Новиков В.В. Иванова А.А., Васюра А.С., Михайловский М.В., Шевченко В.П., Е.Ю.Иванова // Хирургия позвоночника. – 2012. – № 2. – С. 70 – 78.

6. Михайловский М.В., Фомичев Н.Г. Хирургия деформаций позвоночника. – Н. – 2011. – 592 с.

7. Патент РФ №2013112724/15, 21.03.2013. Иванова А.А., Русова Т.В., Лебедева М.Н. Способ прогнозирования интраоперационной кровопотери у больных идиопатическим сколиозом // Патент России №2521363. – 2014. – Бюл. №18.

8. Русова Т. В., Шайдурова Н. В., Зайдман А. М. Возможные биохимические маркеры сколиотической болезни // Хирургия позвоночника. – 2011. – №1. – С. 62 – 67.

9. Jong J.G.N., Wevers R.A., Sambeek R. Measuring urinary glycosaminoglycans in the presence of protein: an improved screening procedure for mucopolysaccharidoses based on dimethylmethylene blue // Clin. Chem. – 1992. – V.38. – P. 803 – 807.

10. Lest C.H., Versteeg E.M.M., Veerkamp J.H., Kuppevelt T.H. // Analyt.Biochem. – 1994. – V.221. – P. 356 – 361.

11. Kannan S., Meert K. L., Mooney J. F., Hillman-Wiseman C., Warrier I. // Pediatric Critical Care Medicine. – 2002. – Vol. 3. – P. 364 – 369.

12. Mooney J.F., Barfield W.R. Validity of Estimates of Intraoperative Blood Loss in Pediatric Spinal Deformity Surgery // J Spine Deformity. – 2013. (1). – P. 2 1– 24.

13. Taylor K.R., Gallo R.I. Glycosaminoglycans and their proteoglycans: host-associated molecular for initiation and modulation of imflamation // FASEB J. – 2006. – V.20. – P.9-22.