

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ ДОНЕЦКОЙ НАРОДНОЙ РЕСПУБЛИКИ
ГОСУДАРСТВЕННАЯ ОБРАЗОВАТЕЛЬНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ВЫСШЕГО
ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ «ДОНЕЦКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ М. ГОРЬКОГО»

На правах рукописи

ТВЕРДОХЛЕБ ТАТЬЯНА АЛЕКСАНДРОВНА

УДК 616.61-002.3-007.271-036.12: 616.155.2)-089

**РЕАКТИВНОСТЬ ТРОМБОЦИТОВ ПРИ ГЕМАТУРИИ, СВЯЗАННОЙ С
КОНСЕРВАТИВНЫМ И ХИРУРГИЧЕСКИМ ЛЕЧЕНИЕМ
ХРОНИЧЕСКОГО ОБСТРУКТИВНОГО ПИЕЛОНЕФРИТА**

14.03.03 – патологическая физиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Донецк – 2020

Работа выполнена в Государственной образовательной организации высшего профессионального образования «Донецкий национальный медицинский университет имени М. Горького» (далее ГОО ВПО ДОННМУ ИМ. М. ГОРЬКОГО) Министерства здравоохранения Донецкой Народной Республики, г. Донецк

Научный
руководитель: доктор медицинских наук, профессор
Баринов Эдуард Фёдорович,
ГОО ВПО ДОННМУ ИМ. М. ГОРЬКОГО, заведующий
кафедрой гистологии, цитологии и эмбриологии

Официальные
оппоненты: доктор медицинских наук (14.03.03), профессор
Болотских Владимир Иванович,
ФГБОУ ВО «Воронежский государственный медицинский
университет им. Н. Н. Бурденко» Министерства
здравоохранения Российской Федерации, г. Воронеж,
заведующий кафедрой патологической физиологии

доктор медицинских наук (14.03.03), профессор
Золотухин Сергей Евгеньевич,
Республиканский травматологический центр Министерства
Здравоохранения Донецкой Народной Республики,
г. Донецк, заведующий отделом координации научных
исследований и прогнозирования

Ведущая
организация: Институт неотложной и восстановительной хирургии
им. В. К. Гусака Министерства Здравоохранения Донецкой
Народной Республики, г. Донецк

Защита состоится 29 января 2021 года в 10:00 на заседании
Диссертационного совета Д 01.022.05 при ГОО ВПО
ДОННМУ ИМ. М. ГОРЬКОГО по адресу: 283003, г. Донецк, пр-т Ильича, 16.
Тел. / факс: (062) 344 41 51, 344 41 51, e-mail: spec-sovet-01-022-05@dnmu.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГОО ВПО
ДОННМУ ИМ. М. ГОРЬКОГО по адресу: 283003, г. Донецк, пр. Ильича, 16.

Автореферат разослан _____ декабря 2020 года.

Ученый секретарь
Диссертационного совета Д 01.022.05
д. мед. н., профессор

С. В. Грищенко

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность. Мочекаменная болезнь (МКБ) занимает второе место по распространенности среди урологических заболеваний и имеет тенденцию к неуклонному росту (Мухин Н.А. и др., 2011, Chen H.Q. et al., 2018, Turk C. et al., 2016). Исследование реактивности тромбоцитов (Тц) продиктовано осложнениями МКБ. Наличие конкремента мочевыводящих путей (МВП) предопределяет нарушение оттока мочи и механическое повреждение слизистой оболочки, что приводит к развитию осложнений, ведущими из которых являются гематурия и хронический обструктивный пиелонефрит (ХОПН) (Аляев Ю.Г. и др., 2002, Лопаткин Н.А., 2008, Панфёрова Р.Д., 2011, Chen H.Q. et al., 2018). Проведение кавитационной контактно-фрезевой ультразвуковой литотрипсии (ЛТ) на фоне применения нестероидных противовоспалительных средств (НПВС) увеличивает риск развития гематурии (Wallis C. D. et al., 2017, Schnabel M.J. et al., 2014, Hiremath S. et al., 2009). Однако при данных видах лечения МКБ оценка выраженности гематурии изучена недостаточно. Известно, что НПВС ограничивают образование метаболитов арахидоновой кислоты путем ингибирования циклооксигеназы-1 (ЦОГ-1) и синтеза тромбоксана A_2 (TXA_2) в Тц, что затрудняет анализ механизмов ограничения гематурии и воспаления при МКБ (Culkin D.J. et al., 2014, Afshar K. et al., 2015). В этих условиях нуждается в изучении связь реактивности Тц с такими агонистами: арахидоновая кислота, аденозиндифосфат (АДФ, паракринный регулятор), адреналин (гуморальный регулятор, маркер активности симпатoadреналовой системы (САС)), фактор активации тромбоцитов (ФАТ, сильный паракринный индуктор активации Тц), серотонин (медиатор воспаления) (Баринов Э.Ф., 2012, Petito E. et al., 2018, Zhou L., 2005).

В последние годы появилось много исследований, анализирующих послеоперационные осложнения ЛТ, частота которых варьируется в пределах от 4,2% до 24,2% (Bhat A. et al., 2019, Geavlete P. et al., 2006, Stetsyshyn R., 2018). ЛТ позволяет избежать открытого вмешательства на МВП, тем не менее сопровождается гематурией (Massimo T. et al., 2014, Nabi G. et al., 2007). Исследование реактивности Тц в раннем послеоперационном периоде (1-6 часов и 24 часа) позволит выделить группу риска по гематурии после ЛТ и определить дифференцированный подход к применению гемостатиков. Консервативная терапия после ЛТ включает не только гемостатики и инфузионную терапию, но и противовоспалительные препараты (НПВС, глюкокортикостероиды (ГКС), антибиотики), которые обладают антиагрегантными свойствами (Ahluwalia K. et al., 2014, Culkin D.J. et al., 2014, Palmer S.C. et al., 2013, Schnabel M.J. et al., 2014). Немаловажной представляется оценка модулирующего влияния НПВС (блокада ЦОГ) и ГКС (блокада фосфолипазы A_2 (ФЛА $_2$)) в модуляции реактивности Тц через 24 часа после ЛТ. После выполнения ЛТ и введения антибиотиков с целью профилактики острого воспаления у части пациентов развивается пиелонефрит (Shafi H. et al. 2018, Carlos E.C. et al., 2018, Gravas S. et al., 2012, Schnabel M.J. et al., 2019). Можно

предположить наличие индивидуальной резистентности организма к инфекции, отражением чего может быть модулирующая функция Тц в отношении рекрутирования и активации лейкоцитов (Brühl M. et al., 2012). Доказана роль Тц в создании клеточных коопераций с лейкоцитами при воспалительном процессе (Hundelshausen von P. et al., 2009, Muller W. A., 2003). Однако остается не изученным, как на фоне противовоспалительной терапии изменяется взаимодействие Тц и лейкоцитов при реализации воспаления.

Степень разработанности темы исследования. Многочисленные исследования подтверждают необходимость знаний молекулярных механизмов функциональной активности Тц (Баринов Э.Ф., 2012, Koltai K. et al., 2017, Zhou L., 2005). Доказаны феномены остаточной реактивности и гиперфункции Тц на фоне антиагрегантной терапии (Kruithofl A.C. et al., 2015, Floyd C.N., 2015, Garabedian T., 2013). При этом наиболее изучен фенотип гиперактивных Тц, ассоциированный с риском развития тромботических осложнений и прогрессирования обструктивной уропатии (Gawaz M. et al., 2005, Hayes C. et al., 2014, Ito K. et al., 2004, Klahr S. et al., 2002, Spiliopoulos S. et al., 2015). Однако механизмы оценки гипореактивного статуса Тц и рисков развития кровопотери при уролитолизе ранее не проводились.

В исследовательских работах проведен анализ формирования агрегатограмм (Koltai K. et al., 2017, Smyth S.S. et al., 2009, Cattaneo M. et al., 2013, Lawrie A.S., 2014), но их оценка зачастую связана с изучением максимальной амплитуды агрегации. Отсутствует информация об интегративных показателях агрегационных кривых и дополнительно введенных параметров для первой и второй фаз агрегации с целью оценки влияния НПВС на реактивность Тц.

В ряде работ было подтверждено наличие феномена потенцирования и суммации в агрегации Тц (Maayani S. et al., 2001, N. Khan, 2015, Saeed S.A., 2003), при этом анализ повышения протромбогенного потенциала при одновременном введении в суспензию Тц субпороговых концентраций нескольких агонистов на фоне введения НПВС и гематурии при МКБ не проводился.

Малоинвазивное оперативное лечение уролитолиза ассоциировано с низким числом послеоперационных осложнений, но наиболее грозными из них являются гематурия и инфекция МВП (Bhat A. et al., 2019, Stetsyshyn R., 2018). Не было исследовано влияние реактивности Тц на выраженность гематурии в раннем послеоперационном периоде и развитие фазы рецидива ХОПН при медикаментозном ингибировании Тц. Также ранее не было предложений по оценке способности Тц формировать межклеточные агрегаты и расширять их качественный состав при индукции агонистами на фоне применения противовоспалительной терапии при уролитолизе.

Цель исследования: установить патогенетические механизмы изменения реактивности тромбоцитов при гематурии и пиелонефрите после консервативного и оперативного лечения уролитолиза.

Для достижения поставленной необходимо решение следующих **задач:**

1. Провести анализ реактивности Тц при гематурии, ассоциированной с уролитиазом на фоне применения НПВС.
2. Изучить влияние литотрипсии через 1-6 часов и 24 часа на выраженность гематурии и реактивность Тц на фоне противовоспалительной терапии.
3. Выявить особенности реактивности Тц при гематурии после литотрипсии.
4. Установить роль Тц в развитии острого воспаления после литотрипсии на этапе выписки.
5. Определить роль Тц в формировании клеточных коопераций в фазе рецидива и ремиссии пиелонефрита после литотрипсии на этапе выписки.

Объект исследования: реактивность тромбоцитов, тромбогенез, гематурия и воспаление на этапах консервативного и оперативного лечения МКБ.

Предмет исследования: показатели агрегатограмм, тромбоцитарно-лейкоцитарные агрегаты (ТЛА) при развитии осложнений МКБ и литотрипсии.

Теоретическая и практическая значимость работы. Патогенез МКБ и ее осложнений дополняют сведения о реактивности Тц при гематурии и рецидиве пиелонефрита. Оценка агрегационной реакции Тц может использоваться для прогнозирования эффектов противовоспалительной терапии уролитиаза. Анализ и определение гипореактивности Тц у пациентов при гематурии на разных этапах лечения МКБ может быть использована в клинической практике для персонифицированной коррекции нарушений тромбогенеза. Данные, касающиеся оценки функционального состояния Тц и ТЛА при уролитиазе, позволяют прогнозировать выраженность гематурии и развитие острой воспалительной реакции после оперативного лечения.

Научная новизна полученных результатов. Проведенное исследование способствовало установлению новых фактов и закономерностей, углубляющих и расширяющих представление о патогенезе осложнений (гематурии и пиелонефрита) при МКБ. Доказано, что реактивность Тц является репрезентативной моделью для оценки статуса системы первичного гемостаза в условиях гематурии и ингибирования ЦОГ-1. В работе определено, что эффективное применение НПВС с регистрацией гипореактивности Тц на разных сроках лечения МКБ является фактором, усиливающим выраженность гематурии. Установлены дополнительные показатели агрегационных кривых, позволяющие разделить анализ первой («outside-in») и второй («inside-out») фаз агрегации Тц. За счет чего были определены механизмы снижения функциональной активности Тц на фоне противовоспалительной терапии МКБ, связанные с ограничением первой и второй фаз агрегации и эффекта потенцирования. Доказано, что проведение ЛТ и декомпрессии МВП приводит к интенсификации гематурии. Сохранение гипер-нормореактивности Тц в послеоперационном периоде уролитиаза связано с реализацией эффекта потенцирования при введении АДФ (G_i , G_q) + адреналин (G_1) в ЕС₁₀.

Установлено, что повышение реактивности Тц на медиатор воспаления ФАТ 150 мкМ после ЛТ на фоне консервативной терапии является фактором риска рецидива пиелонефрита. В работе установлены факты, подтверждающие,

что формирование тромбоцитарно-лейкоцитарных агрегатов (ТЛА) при стимуляции Тц является отражением фаз клеточной миграции при воспалении.

Методология и методы исследования. Для решения поставленных задач проведено открытое, когортное проспективное исследование с использованием клинико-инструментальных и морфологических исследований, световой микроскопии для качественного и количественного определения ТЛА, функцию Тц оценивали *in vitro* спектрофотометрически на агрегометре ChronoLog, USA. Для оценки выраженности гематурии проводили общий анализ мочи и анализ мочи по Нечипоренко с подсчетом числа эритроцитов в 1 мл. Иммунологические методы включали общий анализ крови с подсчетом общего числа лейкоцитов и их морфологического состава, скорости оседания эритроцитов (СОЭ). Биохимические методы использовались для определения уровня С-реактивного белка (СРБ) и параметров коагулограммы. Также был применен культурологический анализ мочи с определением бактериурии в диагностическом титре более 10^5 колониеобразующих единиц (КОЕ) и оценкой антибиотикочувствительности.

Статистические методы применялись при обработке полученных результатов и включали параметрическую и непараметрическую статистику с использованием критерия t-Стьюдента или критериев Вилкоксона и Манна-Уитни, метода углового преобразования Фишера, дисперсионного анализа и метода множественного сравнения Шеффе или рангового критерия Краскела-Уоллиса и критерия Данна. При сравнении качественных признаков использовали критерий χ^2 . Для оценки диагностической значимости показателей проводили ROC-анализ. Для выявления связи между признаками применяли методы корреляционного анализа и рассчитывали коэффициент корреляции Пирсона или показатель ранговой корреляции Спирмена.

Положения, выносимые на защиту:

1. Эффективное применение НПВС до оперативного лечения уролитиаза ассоциировано с гипореактивным статусом Тц, который имеет связь по данным агрегатограмм с ограничением и первой (рецептор-агонист) фазы активации («outside-in»), и второй фазы – дегрануляции («inside-out»), а также со снижением эффекта потенцирования. Гипореактивность Тц является фактором риска повышения выраженности гематурии в предоперационном периоде.
2. Проведение ЛТ на фоне применения противовоспалительной терапии (в том числе НПВС), декомпрессии МВП (установка нефростомы, стента+нефростомы и стента), снижает агрегационный потенциал и эффект потенцирования Тц и усиливает выраженность гематурии в раннем послеоперационном периоде.
3. В фазе рецидива ХОПН на этапе выписки определяется повышение протромбогенной и провоспалительной функции Тц, несмотря на применение противовоспалительной терапии. К отличному прогностически эффективному маркеру фазы рецидива ХОПН после ЛТ, наряду с показателями системного воспалительного ответа, относится реактивность Тц на ФАТ в ЕС₅₀. Это указывает на необходимость использования данных

о реактивности Тц на ФАТ в ЕС₅₀ для дополнительной оценки выраженности воспалительного процесса.

4. Исследование ТЛА позволяет определять этапы клеточной миграции при рецидиве и ремиссии ХОПН после ЛТ.

Степень достоверности и апробация результатов диссертации.

Достоверность диссертационного исследования подтверждают достаточный объём исследовательских выборок, дизайн, адекватно сформулированные цель и задачи исследования, использование современных клинических и инструментальных исследований, методов статистического анализа с применением пакетов прикладных программ MedStat и MedCalc, публикации основных результатов исследования в рецензируемых научных изданиях.

Основные положения диссертационной работы представлены, обсуждены и получили положительную оценку на научных форумах и конференциях: Морфологические основы научных исследований в медицине. Научно-практическая конференция, посвященная 110-летию со дня рождения Н.И. Зазыбина (Киев, 2013), Фундаментальна та клінічна медицина. Наукова конференція, присвячена 90-річчю з дня народження К.С. Кабака (Киев, 2014), Актуальні питання експериментальної та клінічної патофізіології: Програма VI пленуму наукового товариства патофізіологів України та науково-практичної конференції за участю міжнародних спеціалістів (Винница, 2014), Теоретические основы клинической и профилактической медицины: Научно-практическая конференция XIII и XIV чтения им. В.В. Подвысоцкого (Одесса, 2014, 2015), Морфологічні аспекти ангіології (Тернополь, 2013), Научно-практическая конференция с международным участием «Профілактична медицина: здобутки сьогодення та погляд у майбутнє» (Днепропетровск, 2016), III Международный конгресс «Медицина транспорта – 2015», Укр НИИ медицины транспорта (Одесса, 2015), Патофізіологія і фармація: шляхи інтеграції: Програма VII Національного конгресу патофізіологів України з міжнародною участю (Харьков, 2016), Всероссийская медико-биологическая конференция молодых исследователей (с международным участием): Фундаментальная наука и клиническая медицина – человек и его здоровье (Санкт-Петербург, 2014, 2016, 2017, 2018, 2019 гг.).

Внедрение в практику результатов исследования. Материалы диссертационной работы, касающиеся диагностики состояния тромбоцитарного звена системы гемостаза в условиях гематурии и рецидива ХОПН при уролитиазе, внедрены в лечебную практику ДоКТМО (г. Донецк), а метод оценки влияния НПВС и повышения гипореактивности Тц с целью прогнозирования течения компенсаторно-приспособительных процессов – в практику Центральной научно-исследовательской лаборатории (ЦНИЛ) г. Донецка. Результаты диссертационной работы, отражающие патогенетические звенья нарушения гемостаза при уролитиазе и его осложнениях, внедрены в учебный процесс на кафедре патологической физиологии Донецкого медицинского университета и способствуют расширению представлений о реактивности организма, механизмах нарушения тромбогенеза и патогенезе обструктивной уропатии при МКБ.

Личный вклад автора в работу. Вклад соискателя в результаты диссертационной работы является основным и заключается в проведении исследования, статистической обработке данных, написании всех разделов диссертации, формулировании выводов. Морфологические и морфометрические исследования мазков крови, биохимические исследования проведены совместно с ассистентом кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии Перенесенко А.О. Формулировка научной концепции исследования, определение цели и задач исследования, разработка методических подходов и выбор методов исследования, анализ и теоретическое обобщение результатов выполнены под руководством д.м.н., профессора Баринаова Э. Ф. Диссертантом не были заимствованы результаты и идеи соавторов публикаций.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 25 научных работ, в том числе: 11 статей – в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК (из них одна – без соавторов) и 14 тезисов – в материалах конгрессов, форумов и конференций.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 156 страницах текста компьютерной верстки (132 страниц основного текста, 24 страницы списка литературы) и включает: введение, обзор литературы и методов исследования, трёх глав собственных исследований, заключение, выводы и практические рекомендации. Диссертация иллюстрирована 21 таблицей и 29 рисунками. Список литературы включает 242 источника, в том числе 21 отечественных и 221 иностранных авторов.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал и методы исследования. В процессе исследования проведен анализ клинико-лабораторных показателей 122 пациентов, госпитализированных в урологический стационар больницы «МедиФаст» (г. Мариуполь) с МКБ, осложненной ХОПН и гематурией для проведения ЛТ (рисунок 1).

Клинико-инструментальные исследования проводили на момент госпитализации, через 1-6 часов и 24 часа после оперативного лечения и на этапе выписки из стационара (на 3-5 день). На момент госпитализации проводили оценку общего анализа крови и мочи, биохимического анализа крови, определяли параметры коагулограммы. Культурологический анализ мочи с определением антибиотикочувствительности проводили при госпитализации и выписке из стационара.

При анализе гемограммы оценивали количество форменных элементов и лейкоцитарную формулу до и после проведения ЛТ (через 24 часа и 3-5 суток). Выраженность гематурии определяли по количеству эритроцитов в 1 мл мочи (по Нечипоренко) при госпитализации, 1-6 часов и 24 часа после ЛТ. В качестве маркеров воспалительной реакции использовали СОЭ и концентрацию СРБ на момент госпитализации, после ЛТ и на этапе выписки из стационара. Локализацию и размер конкрементов определяли при ультразвуковом

исследовании, компьютерной томографии, обзорной урографии, рентген-контрастном исследовании, экскреторной урографии и ретроградной уретеропиелографии.

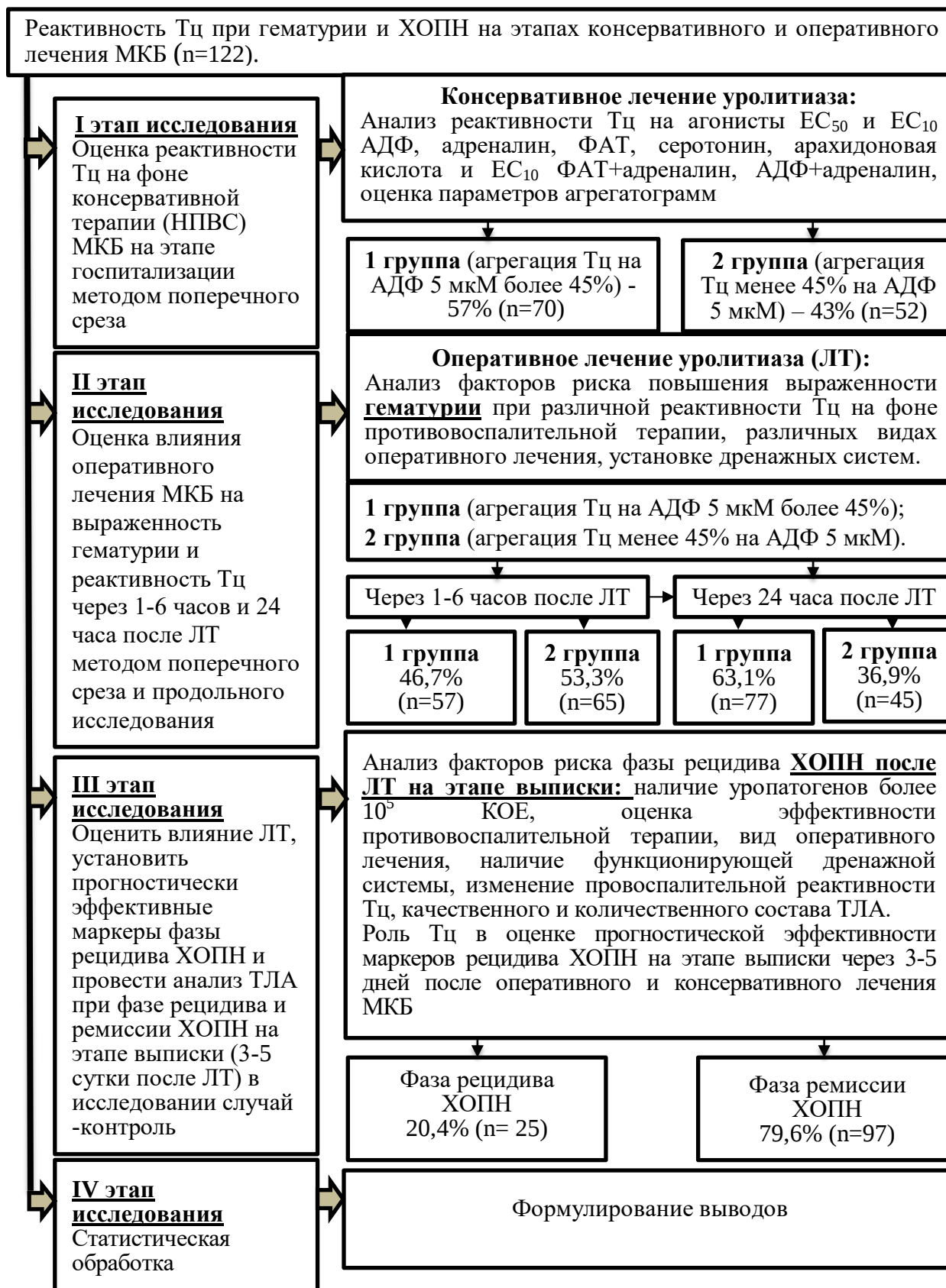


Рисунок 1. Дизайн исследования

Диагноз фазы обострения ХОПН был основан на присутствии, по меньшей мере, одного из трех основных симптомов (лихорадка, боль в реберно-позвоночном углу, инфекция МВП). Критериями воспаления являлись лейкоцитоз, сдвиг лейкоцитарной формулы влево и уровень СРБ. В фазе ремиссии (латентного течения) у пациентов отсутствовали клинические проявления хронического пиелонефрита; в общем анализе крови отсутствовали изменения, характеризующие острое воспаление, однако могли сохраняться лейкоцитурия и диагностически не значимая бактериурия (Yamamoto Y., 2012, Kakinoki H., 2018).

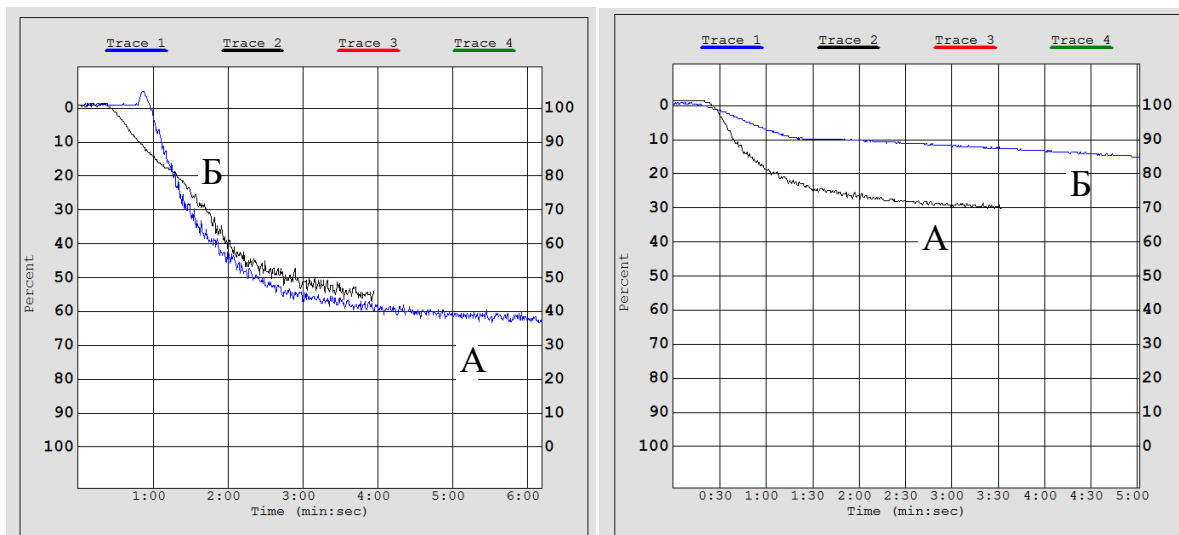
Всем больным проводилось восстановление уродинамики согласно стандартным протоколам лечения – с учетом локализации, размера и плотности конкрементов. Пациенты на догоспитальном и госпитальном этапах получали НПВС с целью купирования боли и дизурии, ГКС в период проведения ЛТ, антибиотикотерапию на всех этапах лечения МКБ. Оценку функционального состояния Тц проводили в тесте *in vitro* на анализаторе агрегации Тц ChronoLog (USA). В качестве агонистов использовали арахидоновую кислоту (500 мкМ) («Технология стандарт»); АДФ (5 и 0,5 мкМ) («Технология стандарт»); серотонин (5-НТ, 10 мкМ) («Технология стандарт»); адреналин (epinephrine, 5 и 0,1 мкМ) (Sigma); ФАТ (PAF, 150 и 30 мкМ) (Sigma). Проводили оценку параметров кривых агрегатограммы: амплитуды агрегации, площади под кривой, наклона кривой, лаг-времени, наклона 1 волны (угол α , $\text{tg } \alpha$) и 2 волны агрегатограммы (угол β , $\text{tg } \beta$). Группу контроля составили 20 здоровых волонтеров. Морфологическое исследование мазков периферической крови с анализом ТЛА проводили при окраске по методу Романовского - Гимзе. Статистическую обработку результатов проводили в MedStat и MedCalc.

Результаты исследования. На первом этапе исследования был проведен анализ влияния консервативной терапии уролитиаза на реактивность Тц. Установлено, что как на этапе госпитализации $3 \pm 1,2$ (95 % ДИ 1-6)%, так и через 1-6 часов $2 \pm 1,5$ (95% ДИ 0-15)% и 24 часа $4 \pm 1,51$ (95% ДИ 1-9)% после проведения ЛТ агрегация Тц на арахидоновую кислоту была менее 10%, что говорит об эффективном ингибировании ЦОГ-1 в Тц. Такой результат находит подтверждение в ранее проведенном исследовании Kruithofl A.C. et al., 2015. Однако реализация тромбогенеза не опосредована исключительно ТхА₂ и включает паракринную, гуморальную и провоспалительную активацию Тц.

Одним из критериев эффективного применения НПВС является наличие гипореактивности Тц при индукции агрегации АДФ 5,0 мкМ. Выбор данного агониста оправдан тем, что на поверхности Тц экспрессированы два типа пуринорецепторов P2Y₁ и P2Y₁₂. Использование АДФ позволяет активировать внутриклеточные сигнальные пути, ассоциированные с: P2Y₁ – G_q-белком → ФЛС_β (фосфолипаза С_β), ИЗФ и ДАГ → мобилизация ионов Ca⁺² → синтез ТхА₂, централизация гранул, изменение формы → активация протеинкиназы С → дегрануляция, экспозиция рецепторов для фибриногена GPIIb-IIIa → необратимая агрегация; P2Y₁₂ – G_i-белком → ингибирование аденилатциклазы и активация SFK (Lyn) → активация ФИЗФ → потенцирование секреции гранул, активация рецепторов для фибриногена.

Пациенты с уролитиазом на этапе консервативного лечения были разделены на две группы: 1 группа (гипер-нормореактивные Тц) при амплитуде агрегации на АДФ 5 мкМ более или равно 45%, что является проявлением резистентности Тц к НПВС; 2 группа (гипореактивные Тц) при регистрации амплитуды агрегации Тц на АДФ 5 мкМ менее 45% ($p < 0,0001$) и говорит об эффективном применении НПВС с ингибированием агрегации Тц (рисунок 2).

Для оценки механизмов влияния НПВС на агрегацию Тц и в связи с регистрацией снижения адренореактивности Тц ($p < 0,0001$) при определении гипопуринореактивности (2 группа) был проведен анализ параметров агрегатограмм. Как видно из рисунка 2 в двух группах кривая агрегации на адреналин 5 мкМ сохраняет двухфазный характер. Кривая агрегации индуцированная АДФ 5 мкМ не позволяет выделить две волны агрегации и характеризуется монофазностью. Такой результат позволяет считать агрегатограммы при введении в суспензию Тц адреналина EC_{50} репрезентативными для анализа первой и второй фаз агрегации Тц при различной реактивности Тц. Первая фаза отражает рецептор-опосредованные изменения, вторая фаза – этап дегрануляции, амплификации и потенцирования агрегации с экспозицией рецепторов к фибриногену и формированием стойких агрегатов.



1 группа

Резистентность Тц к НПВС

2 группа

Эффективное применение НПВС

Рисунок 2. Примеры агрегационных кривых с различной реактивностью тромбоцитов у пациентов с МКБ на фоне консервативной терапии

Примечание. А – агрегатограмма при введении АДФ 5 мкМ, Б – агрегатограмма при введении адреналина 5 мкМ

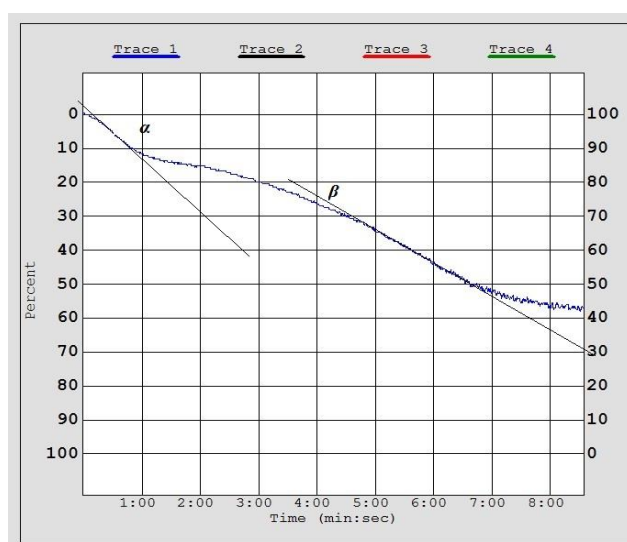
Гипореактивный статус Тц во 2 группе (таблица 1) был связан со снижением в 1,95 раза площади под кривой ($p < 0,0075$), в 2 раза ($p < 0,0001$) скорости формирования агрегатов (наклоне кривой) и пролонгацией в 1,7 раза времени задержки ($p = 0,0024$). Эффективное применение НПВС (2 группа) приводило к достоверному снижению в 1,5 раза показателей угла α ($p = 0,0367$) и в 2,76 раза угла β ($p < 0,0001$) по сравнению с 1 группой.

Таблица 1

**Параметры агрегационных кривых при индукции адреналином 5 мкМ
у пациентов с различной реактивностью тромбоцитов**

Показатели агрегатограмм Me±m (95% ДИ)	1 группа	2 группа	p
Амплитуда агрегации, %	48±4,66	18±4,64	p < 0,0001
Скорость (Slope), %/мин	26±6,654 (20-33)	13±1,00 (11-15)	p < 0,0001
Lag-время, сек	11,5±2,2 (8-14)	19±2,11 (14-20)	p = 0,0024
Площадь под кривой, %×мин	108,45±19,87 (83,5-155,1)	55,7±10,77 (40-82,2)	p = 0,0075
Угол α	44,5±5,354 (35-53)	29,5±6,135 (22-39)	p = 0,0367
tg угла α	0,985±3,234 (0,7-1,33)	0,57±3,23 (0,4-0,81)	p = 0,0367
Угол β	58±6,56 (44-73)	21±4,03 (14-31)	p < 0,0001
tg угла β	1,6±0,61 (0,97-3,27)	0,38±0,096 (0,25-0,6)	p < 0,0001

Проведенный в исследовании отдельный расчет углов α и β (рисунок 3) позволил детализировать изменения в механизмах, обеспечивающих инициацию агрегации (этап «outside-in») и дегрануляцию с экспозицией рецепторов к фибриногену (этап «inside-out») на фоне введения НПВС при МКБ.



**Рисунок 3. Пример агрегатограммы (угол α и угол β) при индукции
тромбоцитов адреналином 5 мкМ**

Наличие феномена ингибирования агрегации Тц на АДФ и адреналин на фоне применения НПВС ограничивает возможность Тц участвовать в воспалительном ответе. Во 2 группе индуцированная агрегация Тц на ФАТ и

серотонин определялась на гипореактивном уровне и была ниже показателей 1 группы соответственно в 3,5 ($49,5 \pm 9,59$ vs $14 \pm 4,08$ %, $p = 0,03$) и в 6 раз ($24 \pm 8,59$ vs $4 \pm 2,65$ %, $p = 0,02$).

Эффективное применение НПВС и снижение проагрегантного потенциала Тц на пороговые концентрации адреналина и АДФ приводят к повышению риска развития периоперационной гематурии. Показатель гематурии во 2 группе был в 12 раз выше аналогичного показателя 1 группы ($0,875 \pm 0,39$ (95%ДИ 0,25-1,75) $\times 10^3$ /мл vs $10,5 \pm 8,51$ (95%ДИ 2,25-27,5) $\times 10^3$ /мл, $p = 0,024$). Данный результат говорит о влиянии гипореактивного статуса Тц на выраженность гематурии на дооперационном этапе лечения уролитиаза.

Исследование возможности повышения протромбогенного потенциала при гипореактивности Тц является перспективным и заслуживает внимания при риске развития гематурии. Эффект ко-активации (потенцирования) представляет интерес в качестве индикатора остаточной реактивности Тц в условиях медикаментозного ингибирования.

Взаимоактивация АДФ+адреналин при ЕС₁₀ снижалась в 2,3 раза ($61 \pm 7,85$ vs $27 \pm 3,87$ %, $p = 0,0001$) и на ФАТ+адреналин в 6,16 раз ($30,8 \pm 16,13$ vs $5 \pm 2,52$ %, $p = 0,0039$) во 2 группе по сравнению с 1 группой. Эффективное применение НПВС ограничивает феномен потенцирования агрегации Тц (рисунок 4).

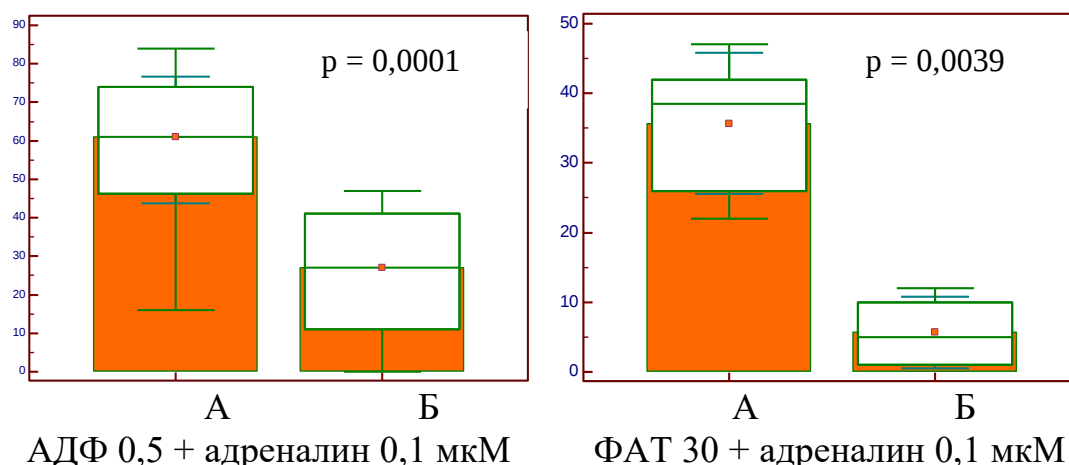


Рисунок 4. Сравнительная характеристика реализации эффектов потенцирования у пациентов на фоне приема НПВС

Примечание. По оси абсцисс – амплитуда агрегации (%), по оси ординат – частота регистрации данного уровня агрегации. А – 1 группа, Б – 2 группа

На рисунке 5 представлены результаты влияния оперативного лечения МКБ на выраженность гематурии на этапах через 1-6 часов и 24 часа после ЛТ.

Выраженность гематурии в первые 1-6 часов ($p < 0,0001$) и через 24 часа ($p < 0,0001$) после ЛТ достоверно превышала показатели дооперационного периода. Оперативное лечение является фактором риска интенсификации гематурии.

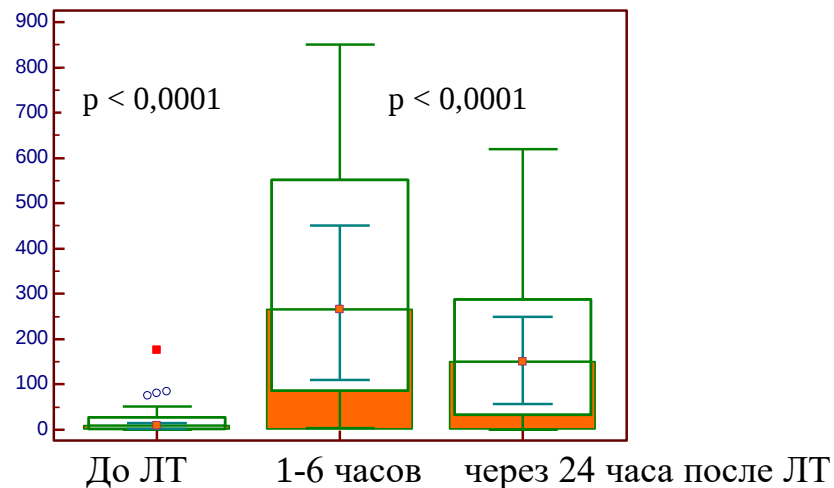


Рисунок 5. Выраженность гематурии по Нечипоренко (в 1 мл) на разных сроках лечения уролитиаза

К наиболее вероятным причинам повышения выраженности послеоперационной гематурии можно отнести наличие дренажных систем в МВП, размер и локализация конкремента, продолжительность обструкции, вид оперативного вмешательства, реактивность Тц, применение противовоспалительной терапии в периоперационном периоде.

Выраженность гематурии через 24 часа после ЛТ при проведении дренирования МВП была достоверно выше в группе с установленной нефростомой – $248,5 \pm 109,7$ (95% ДИ $12,5-500$) $\times 10^3/\text{мл}$, $p = 0,0196$ и одновременной установкой стента и нефростомы – $150 \pm 53,64 \times 10^3/\text{мл}$ (95% ДИ $56,25-300$) $\times 10^3/\text{мл}$, $p = 0,009$ ($p = 0,0196$) по сравнению с бездренажным ведением пациентов.

Перспективным направлением в диагностике и предупреждении периоперационной кровопотери в урологической практике является оценка функционального статуса Тц. Особый интерес представляет оценка вариабельности ответа Тц на АДФ EC_{50} через 1-6 часов и 24 часа после ЛТ: 1 группа с амплитудой агрегации более 45% и 2 группа – менее 45% на АДФ 5 мкМ после оперативного лечения уролитиаза.

Достоверно чаще в 2,2 раза ($32,31 \pm 5,8\%$ ($n=21$), $p=0,01$) пациентам во 2 группе была проведена антеградная контактная нефроуретеролитотрипсия. Такой результат подтверждает более травматичный вид оперативного лечения МКБ при необходимости элиминации конкрементов из чашечно-лоханочной системы и мочеточника антеградным доступом. Достоверных межгрупповых различий по размеру и локализации конкремента и декомпрессии МВП не было определено.

При сравнении показателей кровопотери через 1-6 часов после ЛТ выраженность гематурии была выше в 5,5 раз во 2 группе $510 \pm 154,4$ (95% ДИ $58,5-825$) $\times 10^3/\text{мл}$ по сравнению с 1 группой $92,5 \pm 46,27$ (95% ДИ $0,75-244$) $\times 10^3/\text{мл}$, $p = 0,052$. Через 24 часа выраженность гематурии во 2 группе была в 11,6 раз ($184,5 \pm 99,71$ (95% ДИ $52-450$) $\times 10^3/\text{мл}$) выше, чем регистрировалась в 1 группе ($15,88 \pm 11,35$ (95% ДИ $1-142,45$) $\times 10^3/\text{мл}$) при $p = 0,0316$. Снижение

функциональной активности Тц при индукции АДФ 5 мкМ менее 45% через 1-6 часов и 24 часа после ЛТ является одним из факторов риска увеличения выраженности гематурии.

Особый интерес заслуживает оценка механизмов гипореактивного статуса Тц после проведения ЛТ по данным агрегатограмм. Так, несмотря на наличие гипoadренореактивности в двух исследуемых группах, амплитуда агрегации на адреналин была в 2,4 раз ниже во 2 группе ($p < 0,0001$) через 1-6 часов и в 1,73 раза ($p = 0,0001$) во 2 группе через 24 часа после ЛТ. Полученные результаты позволяют использовать кривые агрегации на адреналин 5 мкМ для оценки механизмов ингибирования функциональной активности Тц после ЛТ.

При сравнении параметров через 1-6 часов после ЛТ определялось снижение во 2 группе интегративных показателей: площади под кривой в 3,3 раза ($p = 0,0032$), скорости наклона кривой в 1,8 раза ($p = 0,0005$) и увеличение времени задержки агрегации в 1,6 раза ($p = 0,0349$) по сравнению с 1 группой. Также регистрировалось снижение дополнительно введенных показателей в 3 раза для первой (угол α и $\text{tg } \alpha$ при $p = 0,033$) и в 1,75 раза для второй волны (угол β и $\text{tg } \beta$ при $p = 0,04$) агрегации.

Через 24 часа после ЛТ во 2 группе были снижены в 3,2 раза показатели площади под кривой ($p = 0,0001$), в 2,79 раза наклон кривой ($p = 0,0001$) и в 1,89 раза параметры для первой ($p = 0,012$) и в 2,7 раза для второй ($p = 0,023$) волн агрегации по сравнению с 1 группой.

Корреляционный анализ позволил установить влияние фазы дегрануляции (показателей угла β и $\text{tg } \beta$) на амплитуду агрегации на адреналин 5 мкМ во 2 группе через 1-6 часов $r = 0,67$ ($p = 0,0244$) и 24 часа после ЛТ $r = 0,842$ ($p = 0,0006$).

Такой результат преимущественного влияния на амплитуду агрегации Тц в двух группах фазы дегрануляции (параметров второй волны агрегатограммы) подтверждает важную роль паракринной взаимоактивации, за счет чего происходит реализация эффекта резистентности при антиагрегантной терапии и сохраняется функция первичного гемостаза, несмотря на ингибирование рецептор-опосредованной фазы агрегации Тц.

Учитывая усиление выраженности гематурии через 1-6 часов и 24 часа после проведения ЛТ, исследование возможности повышения протромбогенного потенциала Тц в условиях медикаментозного ингибирования представляется актуальным исследовательским вопросом.

Через 1-6 часов после ЛТ эффект потенцирования при индукции АДФ 0,5+адреналин 0,1 мкМ сохраняется в двух группах, однако во 2 группе снижается в 2,18 раза ($48 \pm 3,41$ (95% ДИ 44-52) vs $22 \pm 3,34$ (95% ДИ 13-31)%, $p < 0,0001$) и в 2,17 раза на ФАТ 30+адреналин 0,1 мкМ ($39 \pm 8,213$ (95% ДИ 7-43) vs $18 \pm 4,24$ (95% ДИ 11-31)%, $p = 0,05$) при сравнении с 1 группой.

Интерес представляет тот факт, что эффект потенцирования при регистрации гипопуринореактивности (2 группа) Тц через 1-6 часов и 24 часа полностью не ингибируется.

Через 24 часа после ЛТ в 1,96 раза снижается ко-активация Тц во 2 группе при введении АДФ 0,5+адреналин 0,1 мкМ ($45 \pm 4,97$ (95% ДИ 38-55) vs $23 \pm 4,21$

(95% ДИ 12-32)%, $p = 0,0001$) и в 1,92 раза на ФАТ 30+адреналин 0,1 мкМ при $p = 0,143$.

Полученные результаты подтверждают ограничение потенцирования агрегации Тц в условиях эффективного применения противовоспалительной терапии и усиления выраженности кровопотери.

Для оценки прогностически эффективных маркеров сохранения пуринореактивности Тц более 45% был проведен ROC-анализ с использованием амплитуды агрегации на адреналин 5 мкМ и АДФ+адреналин в EC_{10} после проведения ЛТ. Повышение амплитуды агрегации на АДФ+адреналин в EC_{10} Тц более 42% (AUC $0,92 \pm 0,046$, Se 76,5%, Sp 100%) через 1-6 часов и более 34% (AUC $0,83 \pm 0,062$, Se 78,8%, Sp 94,4%) через 24 часа после ЛТ на фоне медикаментозного ингибирования является отличным прогностическим маркером определения резистентности Тц к НПВС ($p < 0,0001$). Отличную через 1-6 часов (AUC $0,82 \pm 0,056$, $p < 0,0001$) и хорошую через 24 часа (AUC $0,8 \pm 0,055$, $p < 0,0001$) прогностическую ценность для определения пуринореактивности Тц более 45% демонстрирует агрегация Тц на адреналин 5 мкМ.

На следующем этапе исследования представлены результаты влияния реактивности Тц на развитие острого воспалительного процесса после ЛТ на этапе выписки. К предикторам рецидива ХОПН после проведения ЛТ можно отнести уropатогены, альтерацию слизистой оболочки МВП, установку дренажных систем, прогрессирование обструктивной уropатии, повышение реактивности Тц, отсутствие эффективной противовоспалительной терапии.

Диагноз фазы рецидива ХОПН на этапе выписки был верифицирован у 25 пациентов (20,4%) на основе жалоб, анамнестических данных, объективного осмотра, лабораторных и дополнительных исследований.

По данным клинко-лабораторного анализа в фазе рецидива ХОПН регистрировался в 1,46 раза выше уровень общего числа лейкоцитов ($10,65 \pm 0,3$ vs $7,3 \pm 0,43$ Г/л, $p = 0,0012$) за счет сегментоядерных нейтрофилов ($75,5 \pm 2,25$ vs $59 \pm 4,58\%$, $p = 0,0428$) по сравнению с фазой ремиссии ХОПН. Уровень СРБ был выше показателя группы сравнения в 3 раза ($18 \pm 1,61$ vs $6 \pm 0,5$ мг/мл, $p = 0,0016$). Выраженность лейкоцитурii в 4 раза превышала аналогичный показатель фазы ремиссии ХОПН ($25 \pm 20,04$ vs $6,25 \pm 2,40 \times 10^3$ /мл, $p = 0,0093$).

По данным проведенного исследования в фазе рецидива ХОПН достоверно чаще была проведена $57,14 \pm 10,8\%$ контактная нефролитотрипсия (КНЛТ) ($p = 0,047$) по сравнению с фазой ремиссии ХОПН, при которой ведущим оперативным лечением была контактная уретеролитотрипсия (КУЛТ) $81,25 \pm 9,76\%$ ($p = 0,048$). Такой результат подтверждает более высокий риск развития послеоперационных инфекционных осложнений при нефролитиазе и проведении КНЛТ. Группы были гомогенны по видам антибиотикотерапии и по спектру уropатогенов так как достоверных различий между фазой рецидива и ремиссии ХОПН не было зарегистрировано.

Агрегационный потенциал Тц у пациентов с МКБ в фазе рецидива ХОПН при индукции медиатором воспаления ФАТ 150 мкМ на этапе выписки был в 2,76 раза выше ($34,5 \pm 5,17$ (95% ДИ 24-42)% vs $12,5 \pm 3,6$ (95% ДИ 6-17)%, $p =$

0,0073) по сравнению с фазой ремиссии. Амплитуда агрегации в фазе рецидива ХОПН на этапе выписки в 1,8 раза на АДФ 5,0 мкМ ($p < 0,0001$) и в 1,85 раза на адреналин 5 мкМ ($p = 0,0417$) превышала показатели фазы ремиссии. Эффект ко-активации при стимулированной агрегации АДФ 0,5+адреналин 0,1 мкМ в 1,7 раза ($p = 0,0019$) был выше, чем у пациентов в фазе ремиссии ХОПН. Такой результат говорит о повышении протромбогенного и провоспалительного потенциала Тц у пациентов после ЛТ и при активном воспалительном процессе МВП несмотря на применение НПВС.

Верификация фазы рецидива ХОПН после ЛТ требует комплексного анализа клиничко-лабораторных показателей системного и локального воспалительного процесса и осложнена стертой клинической картиной в условиях применения противовоспалительной терапии. В исследовании были проанализированы прогностические факторы фазы рецидива ХОПН на этапе выписки после оперативного лечения МКБ (рисунок 6). Повышение амплитуды агрегации при индукции ФАТ 150 мкМ более 35% ($Se=50\%$; $Sp = 100\%$) говорит об эффективном прогнозе рецидива ХОПН ($AUC\ 0,77\pm0,126$, $p=0,0344$), как и при повышении уровня сегментоядерных нейтрофилов более 71% ($Se=68,7\%$; $Sp = 77,4\%$; $AUC\ 0,78\pm0,066$, $p<0,0001$) после ЛТ на этапе выписки. В то время как СОЭ и СРБ являются плохими прогностическими маркерами рецидива ХОПН на момент выписки из стационара.

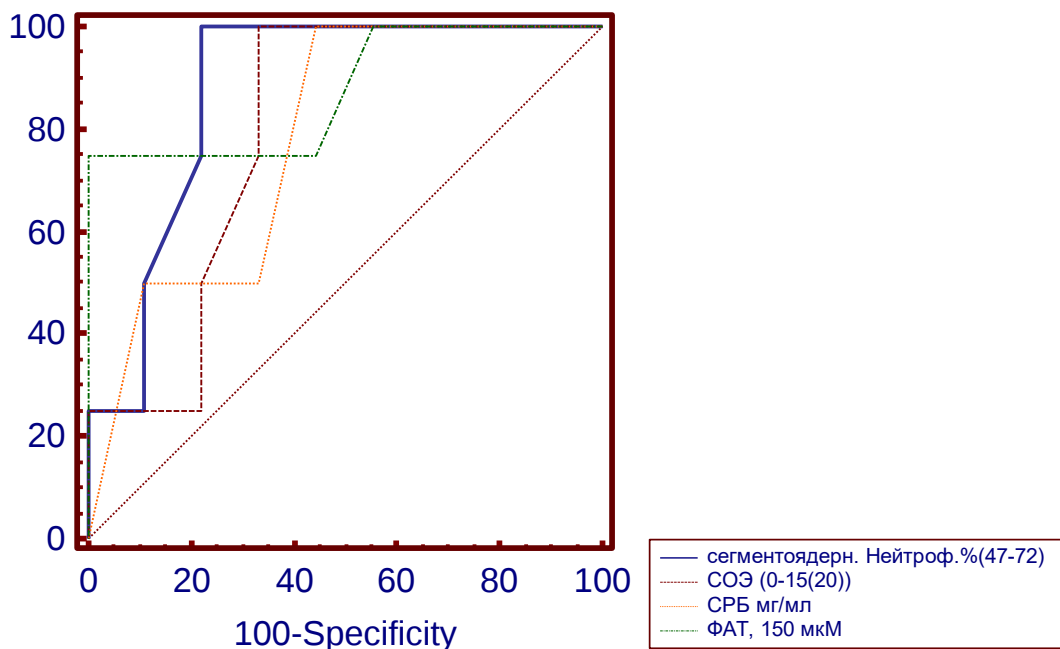


Рисунок 6. Информативность показателей воспалительного ответа (ROC-кривые) на этапе выписки у пациентов с МКБ на фоне комплексного лечения

Провоспалительный потенциал при активации Тц подтверждается взаимодействием с моноцитами, полиморфноядерными нейтрофилами, эозинофилами, базофилами и лимфоцитами с образованием ТЛА (Ren F. et al., 2016).

В острую фазу воспалительного процесса в составе ТЛА при индукции АДФ и адреналином преобладают нейтрофилы, а в фазе ремиссии качественный состав ТЛА расширяется за счет моноцитов и лимфоцитов (рисунок 7).

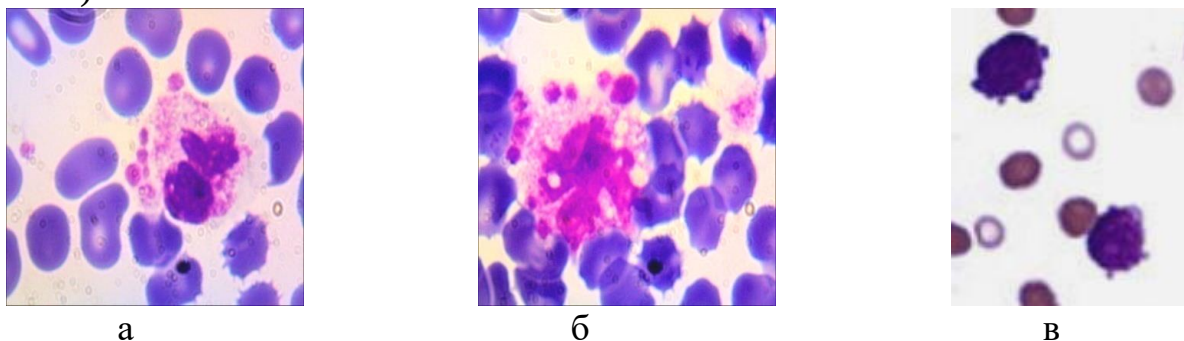


Рисунок 7. Варианты ТЛА у пациентов с МКБ после ЛТ, окраска по Романовскому-Гимзе, увеличение $\times 400$

Примечание. а – нейтрофильно-тромбоцитарный агрегат; б – моноцитарно-тромбоцитарный агрегат, в – лимфоцитарно-тромбоцитарный агрегат

В фазах ремиссии и рецидива ХОПН преобладающим вариантом ТЛА были тромбоцитарно-нейтрофильные кооперации. Однако стимуляция Тц АДФ 5 мкМ в фазе ремиссии ХОПН приводила к качественному расширению составов ТЛА за счет увеличению числа тромбоцитарно-лимфоцитарной кооперации $10 \pm 2,98$ (95% ДИ 0-12,5)% vs $0 \pm 1,22$ (95% ДИ 0-3)%, $p = 0,0043$, а при введении в суспензию Тц адреналина 5,0 мкМ увеличивалось число тромбоцитарно-моноцитарных коопераций $25 \pm 6,26$ (95% ДИ 23,1-50)% vs $0 \pm 9,23$ (95% ДИ 0-25)%, $p = 0,0314$ по сравнению с пациентами в фазе рецидива ХОПН.

ВЫВОДЫ

В диссертационной работе на основании морфологических, спектрофотометрических, иммунологических, биохимических, культурологических и клинко-инструментальных методов исследования автором решена актуальная научная задача современной патофизиологии: установлены патогенетические механизмы изменения реактивности тромбоцитов при гематурии и пиелонефрите после консервативного и оперативного лечения уролитиаза, что имеет важное значение для теоретической и практической медицины.

1. Эффективное применение НПВС при уролитиазе приводит к снижению протромбогенного (в 1,8 раза на АДФ 5 мкМ ($p < 0,0001$), в 2,7 раза на адреналин 5 мкМ ($p < 0,001$)) и провоспалительного (в 3,5 раза на ФАТ 150 мкМ ($p = 0,03$), в 6 раз на серотонин 10 мкМ и ($p = 0,02$)) потенциала тромбоцитов за счет как первой ($p = 0,0367$), так и второй ($p < 0,0001$) фаз агрегации тромбоцитов, ограничения эффекта потенцирования (в 2,3 раза на АДФ 0,5 мкМ + адреналин 0,1 мкМ ($p = 0,0001$) и в 6,16 раза на ФАТ 30 мкМ + адреналин 0,1 мкМ ($p = 0,0039$)) и

усилению выраженности гематурии в 12 раз ($p = 0,024$) по сравнению с группой резистентной к НПВС на этапе госпитализации.

2. Проведение оперативного лечения уролитиаза и, в частности, антеградной контактной нефроуретеролитотрипсии ($p = 0,01$), декомпрессии мочевыводящих путей с установкой нефростомы ($p = 0,0196$) или стента+нефростомы ($p = 0,009$), снижение пуринореактивности ($p < 0,0001$) и адренореактивности ($p < 0,0001$) тромбоцитов на фоне противовоспалительной терапии с ограничением 1 и 2 волн агрегатограмм, сопряжено с повышением выраженности гематурии через 1-6 часов и 24 часа после литотрипсии.
3. К отличному прогностическому фактору гипер-нормореактивности тромбоцитов при гематурии на фоне применения противовоспалительной терапии относится сохранение эффекта потенцирования АДФ 0,5 мкМ+адреналин 0,1 мкМ более 42% через 1-6 часов ($AUC\ 0,92 \pm 0,046$) при $p < 0,0001$ и более 34% через 24 часа ($AUC\ 0,83 \pm 0,062$) при $p < 0,0001$ после оперативного лечения МКБ.
4. Повышение агрегации тромбоцитов на медиатор воспаления ФАТ 150 мкМ более 35% ($AUC\ 0,77 \pm 0,13$, $p = 0,034$) наряду с повышением уровня сегментоядерных нейтрофилов более 71% ($AUC\ 0,78 \pm 0,07$, $p < 0,0001$) определено как отличный прогностический маркер фазы рецидива хронического обструктивного пиелонефрита.
5. Индуцированное формирование ТЛА после литотрипсии на этапе выписки определяет изменение фаз клеточной миграции при воспалительном ответе на фоне противовоспалительной терапии: полинуклеарную с преобладанием тромбоцитарно-нейтрофильной кооперации при рецидиве пиелонефрита; моноклеарную при фазе ремиссии с увеличением тромбоцитарно-моноцитарной кооперации ($p = 0,031$) на адреналин 5 мкМ и тромбоцитарно-лимфоцитарной кооперации ($p = 0,004$) при введении АДФ 5 мкМ по сравнению с фазой рецидива.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО МАТЕРИАЛАМ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК:

1. Гендерные особенности лейкоцитопоза при хроническом обструктивном пиелонефрите / Э.Ф. Баринов, А.Н. Кравченко, Т.А. Твердохлеб, А.О. Балыкина // Вестник неотложной и восстановительной медицины. – Том 15, №2, 2014. – С. 258-260. *(Диссертант провела статистическую обработку и анализ полученных результатов).*
2. Анализ факторов риска осложнений, индуцированных литотрипсией / Э.Ф. Баринов, А.Н. Кравченко, Т.А. Твердохлеб, А.О. Балыкина // Український журнал хірургії. – 2014. – № 1(24). – С. 123-127. *(Диссертант провів дослідження агрегації тромбоцитів).*
3. Індивідуальна реактивність тромбоцитів у пацієнтів після літотрипсії / Е.Ф. Барінов, А.Н. Кравченко, Т.О. Твердохліб, А.О. Баликіна // Світ

медицини та біології – Полтава: ВДНЗУ «Українська медична стоматологічна академія», 2014. – №2 (44). – С. 9-12. *(Диссертант провела лабораторное исследование агрегации тромбоцитов и подготовила материалы к печати).*

4. Возрастные особенности реакции лейкоцитов мужчин при хроническом обструктивном пиелонефрите / Э.Ф. Баринов, А.Н. Кравченко, Т.А. Твердохлеб, М.Э. Барина // Клиническая лабораторная диагностика. – 2014. – Т. 59, № 6. – С. 16-18. *(Диссертант провел лабораторное исследование и подготовил материалы к печати).*
5. Возрастные особенности адаптационной реакции клеток крови у женщин при рецидиве хронического обструктивного пиелонефрита / Э.Ф. Баринов, А.О. Балыкина, А.Н. Кравченко, Т.А. Твердохлеб // Успехи геронтологии. – Т. 27, № 3. – 2014. – С. 472-476. *(Диссертант провела статистическую обработку и подготовил материалы к печати).*
6. Пуриновые рецепторы и сопряженные внутриклеточные сигнальные системы в регуляции функции тромбоцитов / Э.Ф. Баринов, О.Н. Сулаева, Н.Н. Канана, Т.А. Твердохлеб // Кардиология. – 2014. – № 2. – С.56-62. *(Диссертант подготовила материалы к печати).*
7. Особенности реакции клеток крови у женщин при хроническом обструктивном пиелонефрите / Э.Ф. Баринов, Т.А. Твердохлеб, А.Н. Кравченко (и др.) // Journal of Health Sciences. – Radom, Poland, 4(2), 2014. – С. 201-218. *(Диссертант провела лабораторное исследование).*
8. Механізми ініціації рецидиву хронічного обструктивного пієлонефриту / Е.Ф. Барінов, А.Н.Кравченко, Т.О Твердохліб, А.О. Баликіна // Актуальные проблемы транспортной медицины – Одесса, 2014 – том 1 (36-I), №2. – С. 130-134. *(Диссертант провела лабораторное исследование и подготовила материалы к печати).*
9. Твердохлеб, Т.А. Адренореактивность тромбоцитов при мочекаменной болезни // Питання експериментальної та клінічної медицини: зб. статей. – Донецьк, 2014. – Вип. 18, Т. 3. – С. 140-147.
10. Выраженность гематурии после оперативного лечения уролитиаза: роль индивидуальной реактивности тромбоцитов на агонисты / Э.Ф. Баринов, Т.А. Твердохлеб, А.Н. Кравченко, М.Э. Барина // Экспериментальная и клиническая урология. – 2015. – № 3. – С. 72-77. *(Диссертант провела исследование агрегации тромбоцитов и анализ полученных результатов).*
11. Молекулярные механизмы индивидуальной реактивности тромбоцитов при гематурии, ассоциированной с литотрипсией / Э.Ф. Баринов, Т.А. Твердохлеб, А.Н. Кравченко (и др.) // Урология. – 2016. – №5. – С. 10-15. *(Диссертант провела лабораторное исследование агрегации тромбоцитов и подготовила материалы к печати).*

Материалы конгрессов, форумов и конференций:

12. Барінов, Е.Ф. Предиктори розвитку рецидиву хронічного обструктивного пієлонефриту у чоловіків / Е.Ф. Барінов, Т.О. Твердохліб, А.М. Кравченко // Морфологічні аспекти ангіології. – Тернопіль: ТДМУ, Укрмедкнига, 2013. – С. 8-9.

13. Барінов, Е.Ф. Патогенез хронічного обструктивного пієлонефриту: реактивність тромбоцитів / Е.Ф. Барінов, А.Н. Кравченко, Т.О. Твердохліб // Актуальні питання експериментальної та клінічної патофізіології: Програма VI пленуму наукового товариства патофізіологів України та науково-практичної конференції за участю міжнародних спеціалістів. – Вінниця, 2014. – Т. 18, № 2. – С. 485-489.
14. Модуляция функции тромбоцитов после литотрипсии / Э.Ф. Баринов, А.Н. Кравченко, Т.А. Твердохлеб, А.О. Балыкина // Фундаментальна та клінічна медицина. Наукова конференція, присвячена 90-річчю з дня народження К.С. Кабака. – Київ, 2014. – С. 59-60.
15. Твердохлеб, Т.А. Реактивность клеток периферической крови у пациентов с хроническим обструктивным пиелонефритом / Т.А. Твердохлеб, А.О. Балыкина, А.Н. Кравченко // XVII Всероссийская медико-биологическая конференция молодых исследователей (с международным участием): Фундаментальная наука и клиническая медицина – человек и его здоровье. – Санкт-Петербург: СПбГУ, 2014. – С. 438-439.
16. Терещук, Б.П. Реактивность тромбоцитов при назначении НПВП у пациентов с хроническим обструктивным пиелонефритом / Б.П. Терещук, Т.А. Твердохлеб, О.И. Николенко // XIV-е чтения В.В. Подвысоцкого: материалы конференции. – Одесса: Укр НИИ медицины транспорта, 2015. – С.202.
17. Сенситивность альфа-2 адренорецепторов тромбоцитов у здоровых индивидуумов / Э.Ф. Баринов, С. Мамедалиева, Т.А. Твердохлеб (и др.) // Сборник материалов III Международного конгресса «Медицина транспорта – 2015». – Одесса: Укр НИИ медицины транспорта, 2015. – С. 34-35.
18. Твердохлеб, Т.А. Реактивность тромбоцитов при различной выраженности гематурии после оперативной терапии уролитиаза // XIV-е чтения В.В. Подвысоцкого: материалы конференции. – Одесса: Укр НИИ медицины транспорта, 2015. – С.199.
19. Твердохлеб, Т.А. Адаптационные механизмы тромбоцитов женщин с гематурией при мочекаменной болезни // Фундаментальная наука и клиническая медицина – человек и его здоровье: XVIII Международная медико-биологическая конференция молодых исследователей: материалы. – Санкт-Петербург, 2015. – С. 535-536.
20. Баринов, Э.Ф. Внутриклеточные механизмы реализации гипoadренореактивности тромбоцитов после литотрипсии (Текст) / Э.Ф. Баринов, Т.А. Твердохлеб // ПРС. Профілактична медицина: здобутки сьогодення та погляд у майбутнє: матеріали НІ конф. 2016. – С. 83-85.
21. Информативность показателей агрегатограммы для трактовки механизмов формирования агрегатов / Э.Ф. Баринов, Т.А. Твердохлеб, А.Н. Кравченко и др. // Патофізіологія і фармація: шляхи інтеграції: тези доповідей VII Національного конгресу патофізіологів України з міжнародною участю (5-7 жовтня 2016 р.). – Х.: Вид-во НФаУ, 2016. – С. 37.
22. Твердохлеб, Т.А. Механизмы реализации индивидуальной

адренореактивности тромбоцитов // Фундаментальная наука и клиническая медицина: Тезисы XIX Международной медико-биологической конференции молодых исследователей: материалы – СПб.: Изд-во СПбГУ, 2016. – С. 555-556.

23. Твердохлеб, Т.А. Механизмы снижения потенцирования агрегации тромбоцитов на фоне лечения уролитиаза / Т.А. Твердохлеб, Т. И. Фабер // Фундаментальная наука и клиническая медицина: Тезисы XX Международной медико-биологической конференции молодых исследователей: материалы – СПб.: Изд-во СПбГУ, 2017. – С. 555-556.
24. Твердохлеб, Т.А. Факторы риска развития гематурии при оперативном лечении уролитиаза / Т.А. Твердохлеб, Т.И. Фабер // Фундаментальная наука и клиническая медицина – Человек и его здоровье: тезисы XXI Международной медико-биологической конференции молодых исследователей. – СПб.: Изд-во СПбГУ, 2018. – С. 432-433.
25. Твердохлеб, Т.А. Выраженность гематурии и реактивность тромбоцитов при обструктивной уropатии / Т. А. Твердохлеб, И. А. Коровка // Фундаментальная наука и клиническая медицина – человек и его здоровье: тезисы XXII Международной медико-биологической конференции молодых исследователей. – СПб.: Изд-во СПбГУ, 2019. – С. 499-500.

АННОТАЦИЯ

Твердохлеб Т. А. Реактивность тромбоцитов при гематурии, связанной с консервативным и хирургическим лечением хронического обструктивного пиелонефрита. – На правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.03 – патологическая физиология. – ГОО ВПО «ДОНЕЦКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ М. ГОРЬКОГО», МЗ ДНР, Донецк, 2020.

Диссертационная работа посвящена решению актуальной научной задачи современной патофизиологии – реактивности тромбоцитов (Тц) при гематурии, связанной с консервативным и хирургическим лечением хронического обструктивного пиелонефрита (ХОПН) при уролитиазе. Проведен анализ клинико-инструментальных и лабораторных данных у 122 пациентов с мочекаменной болезнью (МКБ) при гематурии и ХОПН на этапах консервативного и оперативного лечения (через 1-6 часов, 24 часа и 3-5 суток после кавитационной контактно-фрезевой ультразвуковой литотрипсии (ЛТ)). Выраженность гематурии определяли по количеству эритроцитов в 1 мл мочи по Нечипоренко. Оценку функционального состояния Тц проводили в тесте *in vitro*. Для анализа реактивности Тц использовали агонисты (арахидоновую кислоту, АДФ, адреналин, ФАТ, серотонин) в концентрации, соответствующей 50 % (EC₅₀) агрегации Тц. В исследовании использованы также субпороговые концентрации агонистов (АДФ, адреналин, ФАТ, АДФ+адреналин, ФАТ+адреналин), которые вызывали агрегацию Тц на уровне 10 % (EC₁₀). Оценку агрегации Тц проводили на анализаторе ChronoLog (США). Формирование тромбоцитарно-лейкоцитарных агрегатов (ТЛА)

воспроизводили в условиях *in vitro* при инкубации стимулированных Тц (адреналин и АДФ в концентрации EC_{50}) и интактных лейкоцитов, выделенных из периферической крови пациентов с ХОПН. Морфометрические исследования мазков суспензии клеток (на 100 лейкоцитов) проводили после окраски по методу Романовского-Гимзе. Полученные данные обрабатывали методами биостатистики в пакетах MedCalc и MedStat.

Эффективное применение НПВС при уролитиазе приводит к снижению протромбогенного (на АДФ 5 мкМ ($p < 0,0001$) и адреналин 5 мкМ ($p < 0,001$)) и провоспалительного (на ФАТ 150 мкМ ($p = 0,03$) и на серотонин 10 мкМ и ($p = 0,02$)) потенциала тромбоцитов за счет как первой ($p = 0,0367$), так и второй ($p < 0,0001$) фаз агрегации Тц, ограничению эффекта потенцирования Тц и усилению выраженности гематурии в 12 раз ($p = 0,024$) по сравнению с группой резистентной к НПВС на этапе госпитализации. Проведение ЛТ, установка нефростомы ($p = 0,0196$) или стента+нефростомы ($p = 0,009$), снижение пуринореактивности ($p < 0,0001$) и адренореактивности ($p < 0,0001$) Тц на фоне противовоспалительной терапии с ограничением 1 и 2 волн агрегатограмм сопряжены с повышением выраженности гематурии через 1-6 часов и 24 часа после ЛТ. К отличному классификатору сохранения гипер-нормореактивности Тц при гематурии на фоне применения противовоспалительной терапии относится сохранение эффекта ко-активации АДФ+адреналин в EC_{10} более 42% через 1-6 часов при ($p < 0,0001$) и более 34% через 24 часа ($p < 0,0001$) после оперативного лечения МКБ. Повышение агрегации Тц на медиатор воспаления ФАТ 150 более 35% наряду с повышением уровня сегментоядерных нейтрофилов более 71% ($p < 0,0001$) определено как отличный прогностический маркер фазы рецидива ХОПН. Анализ формирования ТЛА после ЛТ на этапе выписки позволяет определить тенденции фаз клеточной миграции: полинуклеарную с преобладанием тромбоцитарно-нейтрофильной кооперации при фазе рецидива пиелонефрита; моноклеарную при фазе ремиссии ХОПН.

Ключевые слова: тромбоциты, хронический обструктивный пиелонефрит, литотрипсия, воспаление, гематурия, лейкоциты, адреналин, АДФ.

ANNOTATION

Tverdokhleb T. A. Platelet reactivity in hematuria associated with conservative and surgical treatment of chronic obstructive pyelonephritis. - Manuscript.

Thesis submitted for the Candidate of Medicine Degree in speciality 14.03.03 - pathological physiology. - M. GORKY DONETSK NATIONAL MEDICAL UNIVERSITY, Donetsk, 2020.

The analysis of clinical, instrumental and laboratory data was performed in 122 patients with urolithiasis associated with hematuria and chronic obstructive pyelonephritis (COPN) at the stages of conservative and surgical treatment (1-6 hours, 24 hours and 3-5 days after cavitation contact ultrasonic lithotripsy (LT)). The effective use of NSAIDs before and after LT was associated with a hyporeactive platelet (PL) status at threshold agonist concentrations (ADP, adrenaline, PAF,

serotonin), a decrease in the first and second phases of PL activation according to the results of aggregation curves, co-activation effect (EC 10 ADF+adrenaline, PAF+adrenaline) of PL and increased hematuria. Conducting lithotripsy, installing a nephrostomy or a stent + nephrostomy, reducing platelet reactivity are risk factors for increased hematuria after surgical treatment of urolithiasis. Increased platelet aggregation on PAF is a prognostic effective marker for the relapse phase of COPN within 3-5 days after LT. Blood cells interaction depends on stimulation of platelets by agonists, which determine the composition of platelet-leukocyte aggregates during remission and relapse phases of COPN.

Keywords: urolithiasis, chronic obstructive pyelonephritis, lithotripsy, inflammation, hematuria, platelets, leukocytes, platelet-leukocyte aggregates, epinephrine, ADP.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АДФ – аденозиндифосфат
 ГКС – глюкокортикостероиды
 ЛТ – литотрипсии
 МКБ – мочекаменная болезнь
 МВП – мочевыводящие пути
 НПВС – нестероидные противовоспалительные средства
 ТЛА – тромбоцитарно-лейкоцитарные агрегаты
 ТХА₂ – тромбоксан А₂
 Тц – тромбоциты
 СРБ – С-реактивный белок
 ФАТ – фактор активации тромбоцитов
 ХОПН – хронический обструктивный пиелонефрит
 ЦОГ-1 – циклооксигеназа-1
 ИЗФ – инозитол-3-фосфат
 ДАГ – диацилглицерол