

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

На правах рукописи

МАЛИНИН ЮРИЙ ЮРЬЕВИЧ

УДК 616.831-005.4-036.12-036.65-092

**ФАКТОРЫ РИСКА, ПАТОГЕНЕЗ ОСЛОЖНЕНИЙ, МЕХАНИЗМЫ
РЕГУЛЯЦИИ ГЕМОСТАЗА И ПИЕЛОНЕФРИТА ПОСЛЕ
КОНТАКТНОЙ ЛИТОТРИПСИИ**

14.03.03 – патологическая физиология

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание учёной степени
доктора медицинских наук

Научный консультант:
Баринов Эдуард Федорович
доктор медицинских наук, профессор

*Экземпляр идентичный всем
существующим у Учёного секретаря
Диссертационного совета Д 01.022.05*

Донецк – 2022

СОДЕРЖАНИЕ

ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	6
ВВЕДЕНИЕ.....	7
ГЛАВА 1 ПАТОГЕНЕЗ И ДИАГНОСТИКА ОСЛОЖНЕНИЙ, МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ГЕМОСТАЗА И ПИЕЛОНЕФРИТА ПОСЛЕ КОНТАКТНОЙ ЛИТОТРИПСИИ.....	19
1.1 Влияние литокинетической терапии на гемостаз и развитие острого пиелонефрита.....	19
1.2 Патогенез осложнений после КЛТ.....	23
1.3 Регуляция тромбоцитарного звена гемостаза после КЛТ.....	29
1.4 Молекулярные механизмы регуляции функциональной активности клеток крови при реализации воспаления.....	36
1.5 Ремоделирования внеклеточного матрикса слизистой оболочки мочеочника при нефролтиазе – как причина гематурии	42
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	48
2.1 Дизайн исследования и клиническая характеристика пациентов.....	48
2.2 Клинико-инструментальное обследование больных с нефролтиазом.....	54
2.3 Методы консервативного и хирургического лечения пациентов с наличием конкрементов в мочеочнике.....	56
2.4 Лабораторные исследования.....	58
2.5 Исследование агрегации тромбоцитов.....	60
2.6 Статистическая обработка результатов исследования.....	70
ГЛАВА 3. ПАТОГЕНЕЗ ГЕМАТУРИИ ПОСЛЕ КЛТ В ВЕРХНЕЙ ТРЕТИ МОЧЕТОЧНИКА ПРИ НЕЭФФЕКТИВНОЙ ЛКТ.....	71
3.1 Молекулярные механизмы регуляции агрегации Тц на этапе госпитализации.....	73
3.2 Состояние рецепторного аппарата Тц в течение первых суток после КЛТ при сохранении введения НПВП.....	81

3.3	Состояние рецепторного аппарата Тц через 48ч после КЛТ при сохранении введения НПВП.....	91
3.4	Молекулярные механизмы регуляции агрегации Тц через 72ч после КЛТ и отмены НПВП.....	98
3.5	Молекулярные механизмы регуляции агрегации Тц через 7 суток после КЛТ и отмены НПВП.....	104
ГЛАВА 4. КОМПЕНСАТОРНЫЕ И АДАПТАЦИОННЫЕ МЕХАНИЗМЫ ТРОМБОЦИТАРНОГО ЗВЕНА ГЕМОСТАЗА ПОСЛЕ КЛТ В ВЕРХНЕЙ ТРЕТИ МОЧЕТОЧНИКА ПРИ НЕЭФФЕКТИВНОЙ ЛКТ		110
4.1	Связь гематурии и реактивности рецепторов Тц после КЛТ в верхней трети мочеточника.....	111
4.2	Причинно-следственные связи факторов риска нефролитиаза и патогенетических факторов гематурии при локализации конкрементов в верхней трети мочеточника	118
4.3	Регуляция компенсаторных механизмов агрегации Тц после КЛТ при сохранении введения НПВП.....	121
4.4	Регуляция адаптационных механизмов агрегации Тц после КЛТ в верхней трети мочеточника при отмене НПВП	128
ГЛАВА 5. ПАТОГЕНЕЗ ПИЕЛОНЕФРИТА ПОСЛЕ КЛТ В ВЕРХНЕЙ ТРЕТИ МОЧЕТОЧНИКА ПРИ НЕЭФФЕКТИВНОЙ ЛКТ.....		145
5.1	Численность циркулирующих ТЛА, выраженность лейкоцитурии и функциональная активность рецепторов Тц после КЛТ.....	146
5.2	Молекулярные механизмы формирования ТЛА после КЛТ.....	153
5.3	Молекулярные механизмы, регулирующие лейкоцитурию после КЛТ....	162
5.4	Взаимодействие рецепторов на клетках крови, модулирующее развитие пиелонефрита после КЛТ	169
ГЛАВА 6. ПАТОГЕНЕЗ ГЕМАТУРИИ ПОСЛЕ КЛТ В СРЕДНЕЙ ТРЕТИ МОЧЕТОЧНИКА ПРИ НЕЭФФЕКТИВНОЙ ЛКТ.....		178

6.1	Молекулярные механизмы регуляции тромбоцитарного звена гемостаза на этапе госпитализации.....	179
6.2	Механизмы нарушения тромбогенеза в течение первых суток после КЛТ в средней трети мочеточника при сохранении введения НПВП	187
6.3	Механизмы нарушения тромбогенеза через 48ч после КЛТ в средней трети мочеточника при сохранении введения НПВП.....	196
6.4	Механизмы нарушения тромбогенеза через 72ч после КЛТ в средней трети мочеточника и отмены НПВП	203
6.5	Механизмы нарушения тромбогенеза через 7 суток после КЛТ в средней трети мочеточника и отмены . НПВП	212

ГЛАВА 7. ПАТОГЕНЕЗ ПИЕЛОНЕФРИТА ПОСЛЕ КЛТ В СРЕДНЕЙ ТРЕТИ МОЧЕТОЧНИКА ПРИ НЕЭФЕКТИВНОЙ ЛКТ..... 221

7.1	Численность циркулирующих ТЛА, выраженность лейкоцитурии и функциональная активность рецепторов Тц на этапе госпитализации у пациентов с конкрементами в средней трети мочеточника.....	221
7.2	Молекулярные механизмы развития пиелонефрита в течение первых суток после КЛТ при сохранении введения НПВП.....	223
7.3	Молекулярные механизмы поддержания пиелонефрита через 48ч после КЛТ при кратковременном введении НПВП.....	230
7.4	Молекулярные механизмы регуляции воспалительной реакции в МВП через 72ч после КЛТ при отмене НПВП.....	237
7.5	Молекулярные механизмы регуляции воспалительной реакции в МВП через 7 суток после КЛТ при отмене НПВП.....	242

ГЛАВА 8. МОДЕЛИРОВАНИЕ IN VITRO МЕХАНИЗМОВ РЕГУЛЯЦИИ КОМПЕНСАТОРНЫХ И АДАПТАЦИОННЫХ РЕАКЦИЙ КЛЕТОК КРОВИ ПОСЛЕ КЛТ В СРЕДНЕЙ ТРЕТИ МОЧЕТОЧНИКА..... 257

8.1	Анализ in vitro механизмов регуляции компенсаторных реакций Тц и лейкоцитов после КЛТ при сохранении введения НПВП.....	259

8.2	Анализ <i>in vitro</i> механизмов поздней фазы компенсаторных реакций Тц и лейкоцитов после КЛТ при введении НПВП.....	266
8.3	Анализ <i>in vitro</i> механизмов регуляции ранней фазы адаптационных реакций Тц и лейкоцитов через 72 ч после КЛТ и отмены НПВП.....	276
8.4	Анализ <i>in vitro</i> механизмов регуляции поздней фазы адаптационных реакций Тц и лейкоцитов через 7 суток после КЛТ и отмены НПВП.....	282
	АНАЛИЗ И ОБОБЩЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	290
	ВЫВОДЫ.....	317
	ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	323
	СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	325

ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АТц	–агрегация тромбоцитов
АТФ	–(Adenosine 5'-triphosphate disodium salt hydrate) нуклеотид
АДФ	–(Adenosine 5'-diphosphate sodium salt) – нуклеотид
Ан-2	–ангиотензин-2, олигопептидный гормон
ДИ	–доверительный интервал
ЕС	–эффективная концентрация агониста
КЛТ	– антеградная перкутанная нефро- уретеролитотрипсия (КЛТ)
ЛКТ	–литокинетическая терапия
РАС	–ренин-ангиотензиновая система
САС	–симпато-адреналовая система
ТЛА	–тромбоцитарно-лейкоцитарные агрегаты
ТхА ₂	–тромбоксан А ₂
Тц	–тромбоциты
ФАТ	–(β-Acetyl-γ-O-hexadecyl-L-α-phosphatidylcholine hydrate), Фактор Активации Тромбоцитов
А ₂ А-2R	–аденозиновый А ₂ А-рецептор к аденозину
α ₂ -АР	–α ₂ - адренорецептор к адреналину
АТ ₁ -R	–ангиотензиновый АТ ₁ -рецептор к Ангиотензину II
GPVI-R	–гликопротеиновый рецептор к коллагену IV типа базальной мембраны
P2X ₁ -R	–пуриновый P2X ₁ -рецептор к АТФ.
P2Y-R	–пуриновый P2Y-рецептор к АДФ
ТхА ₂ -R	–тромбоксановый рецептор к ТхА ₂
ФАТ- R	–фосфолипидный рецептор к ФАТ

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Нефролитиаз остается важной проблемой урологии вследствие значительной распространенности, высокого риска возникновения гематурии, рецидивирования пиелонефрита, обструкции мочевыводящих путей (МВП), трудностей диагностики этих осложнений на ранних этапах развития и недостаточно эффективного консервативного лечения [2,6, 23,55,343]. Появление эндоскопических технологий не избавило пациентов от таких послеоперационных осложнений как геморрагия, макрогематурия и развитие острого пиелонефрита и др. [1,5,11, 116, 273]. До настоящего времени отсутствует концепция патогенеза гематурии после уретеролитотрипсии, хотя не вызывает сомнений дисрегуляция тромбоцитов (Тц) [138, 298, 244]. Установлено, что агрегация тромбоцитов (АТц) в значительной степени связана с их количеством и морфологией, сенситивностью рецепторного аппарата плазмолеммы к различным агонистам, состоянием внутриклеточных сигнальных путей [335, 361, 48]. Нельзя исключить влияние факторов риска нефролитиаза на изменение функциональной активности Тц. Вполне вероятно, что при активации ренин-ангиотензиновой (РАС) и симпатoadреналовой (САС) систем после контактной уретеролитотрипсии (КЛТ) возрастает активность АТ₁-рецептора и α_2 адренорецептора на клетках крови; развитие системной воспалительной реакции может сопровождаться активацией ФАТ-рецептора и GPVI-рецептора к коллагену на Тц. Данная гипотеза требует проверки.

В литературе представлена ограниченная и противоречивая информация об участии Тц в нестабильной гематурии [287]. Можно ожидать, что исследование реактивности Тц позволит выделить группу пациентов с высоким риском развития макрогематурии после оперативного лечения нефролитиаза и определить дифференцированный подход к применению гемостатической терапии. В раннем послеоперационном периоде развивается острый пиелонефрит, что может быть связано с техническими особенностями

выполнения литотрипсии и наличием инфекции в МВП [12, 98. 326, 355]. Совершенствование тактики управления воспалительным процессом в стенке мочеточника сдерживается отсутствием теоретических знаний, касающихся механизмов регуляции трансэндотелиальной миграции лейкоцитов, а также трафика клеток крови в слизистой оболочке при наличии инфекции в МВП. Одним из методических подходов, позволяющих решить эту задачу, может быть анализ рецепторного аппарата клеток крови *in vitro* [145, 380, 99]. Можно предположить, что анализ активности рецепторов на Тц и лейкоцитах, регулирующих миграцию клеток на разных этапах развития воспалительной реакции, позволит воссоздать картину патогенеза острого пиелонефрита на этапах консервативного и оперативного лечения пациентов с нефролитиазом.

До настоящего времени нет показаний к отмене нестероидных противовоспалительных препаратов (НПВП) до- и после КЛТ, в то же время недостаточно изучен вопрос о зависимости выраженности гематурии от изменения реактивности Тц при длительном и кратковременном ингибировании ЦОГ [325]. Проведение консервативной терапии, включающей НПВП и антибиотики, для устранения или профилактики воспаления при хроническом обструктивном пиелонефрите (ХОПН), направлено, прежде всего, на подавление функциональной активности лейкоцитов и ограничения контаминации мочевыводящих путей [334]. Как при этом изменяется функциональная активность Тц и влияет ли этот фактор на развитие гематурии у пациентов после КЛТ, это те вопросы, которые не получили должного отражения в литературе. Данная гипотеза приобретает особую актуальность, поскольку отсутствует понимание молекулярных механизмов, координирующих развитие острого пиелонефрита и выраженности гематурии у пациентов с нефролитиазом. Отсутствует понимание причин различия тяжести гематурии после КЛТ в различных отделах мочеточника. С нашей точки зрения [4] отличия выраженности гематурии связаны с особенностями регуляции элиминации конкрементов из

разных отделов мочеточника в процессе литокинетической терапии (ЛКТ). В этом случае функциональная активность Тц (эффективность гемостаза после КЛТ) будет зависеть от спектра агонистов, участвующих в механизмах локальной (органной) и системной регуляции трафика конкремента в верхней и средней трети мочеточника. Расшифровка механизмов регуляции компенсаторных и адаптационных реакций клеток крови при неэффективной ЛКТ у пациентов с различной локализацией конкрементов позволит разработать новые методы профилактики и лечения осложнений, связанных с проведением КЛТ в верхнем, среднем и нижнем отделах мочеточника.

Степень разработанности темы исследования.

Патогенез геморрагии, гематурии и острого пиелонефрита после уретролитотрипсии, а также восстановления гемостаза и ограничения воспалительной реакции в МВП при длительном и кратковременном назначении НПВП; недостаточная информативность методов диагностики и прогнозирования гематурии, лейкоцитурии после КЛТ в разных отделах мочеточника при неэффективной ЛКТ являются актуальной областью фундаментальных исследований. Основными причинами развития осложнений после КЛТ считаются: характеристики конкремента и энергетического воздействия на них; наличие инфекции мочевыводящих путей (ИМП); сохранение фрагментов конкрементов в просвете мочеточника после малоинвазивного вмешательства; длительный дренаж МВП; пожилой возраст пациентов, наличие сопутствующих заболеваний [18, 22, 25, 77, 209, 300]. В то же время верификация патогенетических факторов риска осложнений после КЛТ; анализ внутриклеточной сигнализации, связанной с кластером активных рецепторов на клетках крови при нефролитиазе; установление информативных индикаторов функционального состояния Тц и лейкоцитов при длительной неэффективной ЛКТ и после КЛТ в разных отделах МВП, а также расшифровка механизмов регуляции компенсаторных и адаптационных реакций клеток крови при назначении и отмене НПВП не

получили должного отражения в литературе. Можно ожидать, что исследование патогенеза осложнений, механизмов гемостаза и ингибирования острой воспалительной реакции в стенке мочеточника позволит контролировать и корректировать эффективность лечебных мероприятий у пациентов после КЛТ. В этом контексте анализ молекулярных механизмов регуляции агрегации Тц и формирования тромбоцитарно-лейкоцитарных агрегатов (ТЛА), обеспечивающих рекрутирование лейкоцитов из сосудистого русла после малоинвазивных оперативных вмешательств, является перспективным направлением современной патофизиологии.

Связь с научными программами, планами, темами.

Диссертационная работа выполнена на кафедре урологии, а также кафедре гистологии, цитологии и эмбриологии ГОО ВПО «Донецкий национальный медицинский университет им. М. Горького», является фрагментом научно-исследовательской работы: «Моделирование ответа биологических систем (клеток, органов, организма) на действие факторов повреждения» (№ госрегистрации 0113U002251). Диссертант выполнил фрагмент научно-исследовательской работы, посвященной изучению реакции клеток крови после литотрипсии. Тема диссертации и научный консультант утверждены на заседании Ученого совета ГОО ВПО «Донецкого национального медицинского университета им. М. Горького», протокол №5 от 04.06.2021 г.

Цель исследования – выявить факторы риска, изучить патогенез гематурии и пиелонефрита, установить молекулярные механизмы регуляции агрегации тромбоцитов и воспалительной реакции после КЛТ в верхнем и среднем отделах мочеточника при неэффективной ЛКТ.

Задачи исследования:

1. Проанализировать выраженность гематурии на этапе госпитализации пациентов с наличием конкрементов $11,2 \pm 0,9$ мм мм (min-max 8,0-30,0мм) в верхней трети мочеточника при неэффективной ЛКТ.
2. Сопоставить активность рецепторов Тц с выраженностью гематурии в течение первых суток и через 48ч после КЛТ в верхней трети мочеточника на фоне продолжающегося введения НПВП; оценить выраженность гематурии и установить молекулярные механизмы, регулирующие функцию Тц через 72ч и 7 суток после КЛТ и отмены НПВП у пациентов с неэффективной ЛКТ.
3. На основании анализа активности Тц установить механизмы регуляции компенсаторных и адаптационных механизмов тромбоцитарного звена гемостаза после КЛТ в верхней трети мочеточника при назначении и отмене НПВП у пациентов с неэффективной ЛКТ.
4. Проанализировать динамику индикаторов пиелонефрита (количество циркулирующих ТЛА и выраженность лейкоцитурии) на этапе госпитализации, а также через 24ч, 48ч, 72ч и 7 суток после КЛТ конкрементов размерами $11,2 \pm 0,9$ мм мм (min-max 8,0-30,0мм) в верхней трети мочеточника при неэффективной ЛКТ.
5. Верифицировать механизмы формирования ТЛА и рекрутирования лейкоцитов из сосудистого русла в слизистую МВП после КЛТ в верхней трети мочеточника при назначении и отмене НПВП на фоне длительного ингибирования участка сигнализации ЦОГ-ТхА2 в клетках крови.
6. Изучить механизмы регуляции лейкоцитурии у пациентов с неэффективной ЛКТ после КЛТ в верхней трети мочеточника при назначении и отмене НПВП. Выявить взаимодействия α_2 -адренорецептора, АТ₁-рецептора, пуриновых Р2X₁-рецептора, Р2Y-рецепторов, А2А-рецептора, ТхА2-рецептора, ФАТ-рецептора и GPVI-рецептора на клетках крови, которые могут модулировать развитие пиелонефрита после КЛТ.

7. Сопоставить активность рецепторов Тц и выраженность гематурии через 24ч, 48ч после КЛТ при сохранении введения НПВП и через 72ч, 7 суток после отмены НПВП у пациентов с неэффективной ЛКТ при локализации конкрементов размерами $11,8 \pm 1,3$ мм (min-max 6,0-28,0мм) в средней трети мочеточника.

8. Исследовать молекулярные механизмы регуляции компенсаторных и адаптационных реакций клеток крови при развитии пиелонефрита и гематурии после КЛТ в средней трети мочеточника на фоне введения и отмены НПВП.

Объект исследования: мочекаменная болезнь (МКБ 10 – Камни мочеточника N20.1).

Предмет исследования: результаты клинико-инструментальных методов исследования (ультразвуковое обследование, компьютерная томография почек); лабораторные показатели (микробиологический посев мочи, гематурия, лейкоцитурия, циркулирующие ТЛА); рецепторный аппарат клеток крови в базальных условиях и при связывании с агонистами в концентрации EC_{50} и EC_{10} (функциональная активность α_2 -адренорецептора, ангиотензинового AT_1 -рецептора, пуриновых $P2X_1$ - и $P2Y$ -рецепторов, аденозинового A_2A -рецептора, TxA_2 -рецептора, ФАТ-рецептора и $GPVI$ -рецептора Тц); взаимодействие рецепторов при компенсаторных и адаптационных реакциях клеток крови у пациентов после КЛТ при сохранении и отмене НПВП.

Научная новизна полученных результатов.

В работе впервые проведен комплексный анализ механизмов патогенеза геморрагий, гематурии и пиелонефрита путем сопоставления клинико-инструментальных данных и характеристик функционального состояния Тц и лейкоцитов. Впервые доказано, что клетки крови являются репрезентативной моделью для оценки выраженности гематурии и лейкоцитурии, а также исследования механизмов регуляции гемостаза и

развития пиелонефрита после КЛТ. Разработанная модель прогнозирования выраженности гематурии при неэффективной ЛКТ на этапе госпитализации позволяет обеспечить персонифицированную оценку рисков прогрессирования послеоперационной геморрагии гематурии. Впервые установлено, что снижение выраженности микрогематурии после КЛТ в верхней трети мочеточника при неэффективной ЛКТ и сохранении введения НПВП связано с компенсаторными реакциями Тц, которые регулируются $P2X_1$ -рецептором, AT_1 -рецептором, α_2 -адренорецептором и ФАТ-рецептором; при отмене НПВП гемостаз обеспечивается адаптационными реакциями Тц, которые регулируются GP VI-рецептором, α_2 -адренорецептором и AT_1 -рецептором, PУ-рецепторами.

Впервые выявлена трансформация кластера рецепторов на клетках крови, регулирующих формирование ТЛА и лейкоцитурию, которая зависит от активности ЦОГ и отдела мочеточника, на котором выполняется КЛТ. Показано, что после КЛТ в верхней трети мочеточника и сохранении введения НПВП образование ТЛА и лейкоцитурия связаны с активностью α_2 -адренорецептора, ФАТ-рецептора и $P2X_1$ -рецептора; после отмены НПВП стереотипными механизмами развития пиелонефрита являются стимуляция GPVI-рецептора и ФАТ-рецептора. В работе впервые описана функциональная активность рецепторного аппарата клеток крови у пациентов после КЛТ, выполненной в средней трети мочеточника при неэффективной ЛКТ. Продемонстрирована роль ФАТ-рецептора, $P2Y$ -рецепторов и α_2 -адренорецептора в восстановлении гемостаза и реализации воспалительной реакции при назначении НПВП после КЛТ. Доказано, что усиление компенсаторной реакции Тц достигается благодаря синергизму $P2Y$ -рецепторов и AT_1 -рецептора. Впервые установлены молекулярные механизмы регуляции адаптационной реакции клеток крови при восстановлении активности ЦОГ, которые определяют эффективность агрегации и исход пиелонефрита после КЛТ.

Теоретическая и практическая значимость работы.

Проведенное исследование способствовало созданию концепции патогенеза гематурии и пиелонефрита после малоинвазивных оперативных вмешательств на разных отделах мочеточника; позволило верифицировать механизмы регуляции компенсаторных и адаптационных реакций клеток крови при ингибировании и восстановлении активности ЦОГ, а также обеспечило понимание роли внутриклеточной сигнализации системы рецепторов, связанных с G-белками (GPCR, G-protein [guanine nucleotide-binding protein]-coupled receptors) в механизмах эффективности гемостаза и развития острого воспаления в МВП после КЛТ. На основании проведенного исследования активности рецепторов и сопряженных сигнальных путей клеток крови предложена система критериев для: диагностики и прогнозирования эффективности гемостаза и исхода пиелонефрита при нефролитиазе и после КЛТ; оценки влияния неэффективной ЛКТ на функциональную активность Тци лейкоцитов; диагностики геморрагий, выраженности гематурии и пиелонефрита при нефролитиазе и после КЛТ; прогнозирования риска развития и прогрессирования осложнений после оперативных вмешательств в верхней и средней трети мочеточника; определения эффективности компенсаторных и адаптационных механизмов гемостаза и ограничения развития пиелонефрита; идентификации мишеней фармакологической коррекции с целью оптимизации гемостатической и противовоспалительной терапии после малоинвазивных оперативных вмешательств на МВП.

Результаты диссертационной работы, отражающие молекулярные механизмы нарушений тромбогенеза и развития пиелонефрита после малоинвазивных оперативных вмешательств на мочеточнике, могут быть внедрены в учебный процесс кафедр медико-биологического профиля.

Положения, выносимые на защиту:

1. На этапе госпитализации пациентов с локализацией конкрементов в верхней трети мочеточника информативным показателем

прогнозирования выраженности гематурии является активность P2Y-рецепторов Тц.

2. После КЛТ в верхней трети мочеточника при неэффективной ЛКТ и сохранении введения НПВП снижение микрогематурии связано: через 24ч с активностью P2X₁-рецептора, АТ₁-рецептора и α₂-адренорецептора, через 48ч – с активностью α₂-адренорецептора, ФАТ-рецептора и P2X₁-рецептора. Через 72ч после КЛТ и отмены введения НПВП гемостаз регулируется GP VI-рецептором, α₂-адренорецептором и АТ₁-рецептором; через 7 суток – GP VI-рецептором, PY-рецепторами и АТ₁-рецептором.

3. Развитие воспалительной реакции, связанное с формированием ТЛА, через 48ч после КЛТ в верхней трети мочеточника контролируется активностью α₂-адренорецептора, ФАТ-рецептора и P2X₁-рецептора. Через 72ч после КЛТ количество ТЛА сопряжено с активностью α₂-адренорецептора, GPVI-рецептора, ₁-рецептора, АТ₁-рецептора и ФАТ-рецептора; через 7суток – с активностью GPVI-рецептора, P2Y-рецепторов, ТхА2-рецептора и ФАТ-рецептора.

4. Выраженность лейкоцитурии через 48ч после КЛТ в верхней трети мочеточника при сохранении введения НПВП связана с активностью α₂-адренорецептора, ФАТ-рецептора и P2X₁-рецептора. После отмены НПВП трафик лейкоцитов в слизистой МВП регулируется через 72ч после КЛТ активностью GPVI-рецептора, ФАТ рецептора, P2X₁-рецептора, α₂-адренорецептора; через 7 суток – активностью GPVI-рецептора, ТхА2-рецептора, ФАТ-рецептора, P2X₁-рецептора и аденозинового А2А-рецептора.

5. Снижение гематурии после КЛТ в средней трети мочеточника при сохранении введения НПВП обеспечивается стимуляцией пуриновых P2X₁-рецептора, P2Y-рецепторов, α₂-адренорецептора и АТ₁-рецептора. После отмены НПВП через 72ч после КЛТ гематурия ограничивается активностью P2Y-рецепторов, ТхА2-рецептора и α₂-адренорецептора; через 7 суток – P2Y-рецепторов, GPVI-рецептора, ФАТ-рецептора и ТхА2-рецептора.

6. Поддержание воспалительной реакции после КЛТ в средней трети мочеточника при сохранении введения НПВП зависит от формирования ТЛА, количество которых регулируется: через 24ч – ФАТ-рецептором, P2Y-рецепторами и α_2 -адренорецептором, через 48ч – P2Y-рецепторами, ФАТ-рецептором и AT₁-рецептором. Тяжесть лейкоцитурии через 24ч после КЛТ связана с активностью α_2 -адренорецептора, ФАТ-рецептора и P2X₁-рецептора через 48ч – с активностью α_2 -адренорецептора, GPVI-рецептора и A2A-рецептора.

7. Ограничение пиелонефрита через 72ч после КЛТ в средней трети мочеточника и отмены НПВП обусловлено снижением количества ТЛА вследствие стимуляции α_2 -адренорецептора, P2X₁-рецептора, ФАТ-рецептора и TxA₂-рецептора; выраженность лейкоцитурии лимитируется активностью ФАТ-рецептора, α_2 -адренорецептора, пуриновых P2Y-рецепторов и A2A-рецептора. Через 7 суток формирование ТЛА ингибируется активностью P2Y-рецепторов, P2X₁-рецептора, ФАТ-рецептора и GPVI-рецептора; тогда как лейкоцитурия ограничивается P2X₁-рецептором и TxA₂-рецептором.

8. Прогностическим фактором ограничения гематурии после КЛТ в средней трети мочеточника при сохранении введения НПВП является регистрация максимальных параметров агрегатометрии через 24ч при взаимодействии P2Y-рецепторов, α_2 -адренорецептора и ФАТ-рецептора, через 48ч – P2Y-рецепторов, AT₁-рецептора и ФАТ-рецептора. Фактором риска усиления воспалительной реакции является увеличение количества ТЛА *in vitro* через 24ч после КЛТ при взаимодействии α_2 -адренорецептора и ФАТ-рецептора; 48ч при взаимодействии ФАТ-рецептора и AT₁-рецептора, а также P2Y-рецепторов и ФАТ-рецептора.

9. Информативным показателем эффективности гемостаза после КЛТ в средней трети мочеточника при отмене НПВП являются параметры агрегатометрии через 72ч при одновременной стимуляции P2X₁-рецептора и α_2 -адренорецептора; через 7 суток – при взаимодействии P2Y-рецепторов и GPVI-рецептора. Фактором риска острого пиелонефрита является увеличение

количества ТЛА, воспроизводимое *in vitro* через 72ч при взаимодействии P2X₁-рецептора и ФАТ-рецептора, ФАТ-рецептора и α_2 -адренорецептора; через 7 суток – при взаимодействии P2X₁-рецептора и GPVI-рецептора.

Степень достоверности полученных данных.

Достоверность результатов, изложенных в диссертационной работе, базируется на использовании современных методов исследований, достаточном объеме материала, использовании методик адекватных поставленным задачам, применении корректных методов статистического анализа. Положения, изложенные в диссертации, построены на изученных и проверяемых фактах, которые согласуются с опубликованными данными.

Апробация результатов исследований.

Основные положения диссертационной работы представлены, обсуждены и получили положительную оценку на научных форумах: Українсько-Польському симпозиумі урологів (Львів, 2007); конференції «Малоінвазивні технології в урології» (Яремча, 2009); З'їзді асоціації урологів України (Київ, 2010); науково-практичній конференції «Інноваційні аспекти технологій в урології» (Київ, 2012); Всеукраїнської науково-практичної конференції «Урологія і нефрологія: вчора, сьогодні, завтра» (Харків, 2012); VI Російському конгресі по ендоеурології і новим технологіям з міжнародним участю (Санкт-Петербург, 2018); XI Міжнародної науково-практичної інтернет-конференції «Состояние здоровья: медицинские, социальные и психолого-педагогические аспекты» (Донецк, 2020); IV Міжнародному медичному форумі Донбасу «Наука перемає... хворобу» (Донецк, 2020); II Республіканської науково-практичної конференції «Репродуктивне здоров'я сім'ї як фактор демографічної безпеки Донбасу» (Донецк, 2022).

Личный вклад соискателя.

Вклад соискателя в результаты диссертационной работы является основным и заключается в самостоятельном обосновании научного

направления, определение целии задач исследования, разработке методических подходов и выборе методов исследования. Автором самостоятельно проведен сбор материала, выполнены малоинвазивные оперативные вмешательства на мочевыводящих путях, обобщены данные клинико-инструментального обследования пациентов с нефролитиазом. Трактовка данных агрегатометрии лабораторных показателей проведена совместно с заведующим кафедрой гистологии, цитологии и эмбриологии ГОО ВПО ДонНМУ им. М. Горького, д.мед.н., профессором Бариновым Э. Ф. Исследование рецепторного аппарата Тц и оценка ТЛА выполнены совместно с ассистентом кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии ГОО ВПО ДонНМУ им. М. Горького – Перенесенко А. О. Написание всех разделов, анализ и теоретическое обобщение результатов, формулировка выводов принадлежат лично автору. Диссертантом не были заимствованы результаты и идеи соавторов публикаций. Материалы, положения и выводы кандидатской диссертации соискателя в данной работе не использовались.

Публикации.

По материалам диссертации опубликовано 38 научных работ, в том числе: 28 статей в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК, и 10 тезисов – в материалах конгрессов, форумов и конференций. Получено 3 патента на полезные модели.

Структура и объем диссертации.

Диссертация изложена на 370 страницах печатного текста, состоит из «Введения», «Обзора литературы», «Материалов и методов исследования», шести глав собственных исследований, раздела «Анализ и обсуждение результатов исследования», «Выводов», «Практических рекомендаций», списка использованной литературы, насчитывающего 412 наименований (из них 24 отечественных и 388 – зарубежных источников). Диссертация содержит 42 таблицы и иллюстрирована 54 рисунками.

ГЛАВА 1

ПАТОГЕНЕЗ И ДИАГНОСТИКА ОСЛОЖНЕНИЙ, МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ГЕМОСТАЗА И ПИЕЛОНЕФРИТА ПОСЛЕ КОНТАКТНОЙ ЛИТОТРИПСИИ.

1.1. Влияние литокинетической терапии на гемостаз и развитие острого пиелонефрита.

Актуальной проблемой урологии является нефролитиаз вследствие значительной распространенности, высокого риска возникновения гематурии, рецидивирования пиелонефрита, обструкции мочевыводящих путей, трудностей диагностики этих осложнений на ранних этапах развития и недостаточно эффективного консервативного лечения [2, 23, 343, 55]. Назначение нестероидных противовоспалительных препаратов (НПВП) для купирования болевого синдрома при нефролитиазе и после выполнения оперативных вмешательств на лоханке и мочеточнике считается «золотым стандартом» в урологической практике [5, 343]. НПВП доказали свою эффективность у пациентов с манифестной клиникой МКБ, ингибируя опосредованную простагландином болевую афферентацию и уменьшая сократительную способность мочеточников [143, 344]. Мультиmodalная (или сбалансированная) анальгезия представляет собой современный подход к контролю боли во время оперативного лечения уролитиаза путем введения комбинации опиоидных и неопиоидных анальгетиков [148, 143]. В тоже время назначение НПВП сопровождается ингибированием ЦОГ и снижением синтеза TxA_2 – сильного паракринного активатора агрегации [211]. Возникающие при этом побочные эффекты в виде гематурии и пиелонефрита относят к ожидаемым осложнениям; тем не менее, недостаточная эффективность существующих методов профилактики и лечения диктует необходимость расширения фундаментальных исследований [321]. В этом контексте, ключевым вопросом является исследование компенсаторных реакций Тц на фоне ингибирования ЦОГ. Вероятно, остаточная реактивность Тц (сохранение проагрегантной активности тромбоцитов) на фоне введения

ингибиторов ЦОГ снижает риск развития геморрагии и гематурии, что указывает на необходимость исследования причин этого явления [261]. Подтверждение этой гипотезы можно найти у Moscardó A., Santos M. T. [255], которые исследовали – может ли адренореактивность организма модулировать функцию Тц у пациентов при ингибировании синтеза ТхА₂. Отмытые Тц, выделенные у пациентов получавших аспирин в течение 48ч и больных контрольной группы (не получавших аспирина) исследовали *in vitro*. Агрегация Тц сохранялась у 8 (17,8%) из 45 пациентов; у оставшихся 37 (82,2%) пациентов обнаружено торможение синтеза ТхА₂. Тем не менее, этот остаточный ТхА₂ являлся критическим для функционального ответа Тц. Оказалось, что если Тц этих пациентов одновременно стимулировали адреналином и прекурсором ТхА₂, то у 25 (67,6%) из 37 пациентов регистрировался высокий уровень агрегации Тц (в среднем 73%), а синтез ТхА₂ увеличивался в 5,5 раз. При этом фосфатидилинозитол-3-киназа (ФИЗ-3К) и цитозольный уровень Ca²⁺ принимали участие в ответе Тц, вызванном взаимодействием рецепторов, в то время как Rho/p160 (ROCK) или блокада пуринаргических рецепторов (P2Y₁, P2Y₁₂) не оказывали влияния. Таким образом, остаточная активность ЦОГ-1 и, повышенная адреналином тромбоксан-зависимая стимуляция Тц, могут снизить клинический эффект аспирина. Послеоперационная консервативная терапия (в течение 48ч после ЛТ), включает не только α_{1A}-адреноблокаторы, гемостатики и инфузионную терапию, но и противовоспалительные препараты (НПВП, глюкокортикоиды, антибиотики, анальгетики), которые обладают антиагрегантными свойствами [18, 135, 359]. В этих условиях тромбогенез будет определяться индивидуальной реактивностью Тц, а также соотношением эффектов про- и антиагрегантных стимулов. Приведенные факты объясняют интерес к изучению состоянию внутриклеточных сигнальных систем, участвующих в реализации эффектов различных агонистов на Тц, поскольку открывается возможность определить механизмы регуляции их компенсаторных реакций при назначении НПВП у пациентов после КЛТ.

Дискутабельным остается вопрос о целесообразности профилактического назначения антибиотиков до оперативного лечения нефролитиаза. Согласно современным рекомендациям при первичной диагностике почечной колики и инфекции МВП назначают антибиотики широкого спектра действия; в дальнейшее лечение должно быть скорректировано в зависимости от результатов исследования культуры мочи [2, 173, 409]. Чрескожная ЛТ является малоинвазивным оперативным вмешательством, однако может сопровождаться развитием инфекционных осложнений [77, 300]. Согласно опросу, проведенного среди урологов, от 21% до 39% респондентов сообщили о применении антибиотикотерапии длительностью более 24 часов перед проведением УЛТ и ЧНЛТ у пациентов с отрицательными и бессимптомными положительными культурами предоперационной мочи [73]. Тем не менее, считается, что профилактическое назначение антибиотиков до ЛТ у пациентов с нефролитиазом и отрицательным результатом бактериологического исследования не обеспечивает снижение риска инфекции МВП после ЛТ [326].

Причины низкой эффективности назначения α_{1A} -адреноблокаторов (α -АБ) в составе литокинетической терапии (ЛКТ) остаются не выясненными. Считается, что блокада α_{1A} -адренорецептора обеспечивает релаксацию гладко-мышечных клеток (ГМК), дилатацию просвета мочеточника и элиминацию конкрементов. Тем не менее, рандомизированные многоцентровые исследования не доказали преимущества такой терапии в отношении мелких конкрементов (≤ 6 мм) [67]. С нашей точки зрения, такая ситуация объясняется рядом факторов. Во-первых, низкая эффективность элиминации конкрементов при назначении α -АБ может быть связана с особенностями регуляции перистальтики мочевыводящих путей (МВП) при траффике конкрементов разных размеров; включением компенсаторных механизмов, зависящих от локализации конкрементов в МВП; степенью обтурации мочеточника. Логично предположить, что при наличии средних (10-20мм) и крупных (>20 мм) конкрементов, когда воспроизводится полная

обтурация просвета мочеточника, необходимо достигать максимальной релаксации ГМК в стенке мочеточника, тогда как трафик мелких конкрементов (<6мм) требует волнового усиления сократительной активности мышечной оболочки МВП. Последнее достигается как адренергическими, так и неадренергическими механизмами, регулирующими перистальтику мочеточника [141]. В этой связи, попытка селективного выключения α_{1A} -адренорецептора, контролирующего сокращение мышечной оболочки мочеточника, не гарантирует элиминации крупных конкрементов, если остальные действующие механизмы поддерживают спастическое состояние МВП. Во-вторых, введение α -АБ пациентам может оказаться малоэффективным при низкой чувствительности α_1 -адренорецептора или уменьшении секреции норадреналина из пресинаптической части нейромышечного синапса в МВП. В этом контексте представляет интерес активация симпато-адреналовой системы (САС) при нефролитиазе, поскольку на фоне введения α -АБ снижается стимуляция α_{1A} -адренорецептора на ГМК, но при этом сохраняется возможность сокращения мышечной оболочки МВП вследствие стимуляции адреналином α_2 -адренорецептора. Более того, при стимуляции α_2 -адренорецептора на пресинаптической части нервного окончания может снижаться секреция норадреналина в синаптическую щель [58]; как следствие, уменьшается стимуляция α_{1A} -адренорецептора, что ставит под сомнение целесообразность назначения α -АБ. Таким образом, эффективность элиминации конкрементов при назначении α -АБ может зависеть от стимуляции α_1 - и α_2 -адренорецепторов ГМК, что обосновывает необходимость исследования чувствительности разных типов адренорецепторов при ЛКТ. В-третьих, элиминация конкрементов зависит от компенсаторных механизмов, направленных на усиление сократительной активности или релаксации гладкой мышечной ткани мочеточника. Становление и модуляция компенсаторных механизмов при нефролитиазе определяется как системной, так и локальной (ауто-, паракринная) регуляцией. Системная регуляция

моторики мочеточника связана с активацией САС, возникающей при обструкции просвета МВП [38]. К наиболее значимым местным регуляторам перистальтики мочеточника следует отнести биологически активные вещества (в т.ч. АТФ, АДФ, аденозин, оксид азота), секретируемые уротелием, ГМК, тромбоцитами, лейкоцитами [20, 141]. В-четвертых, при оценке эффективности назначения α -АБ необходимо анализировать интегративное влияние на ГМК всех препаратов, входящих в состав ЛКТ, в том числе НПВП, спазмолитиков, блокаторов Ca^{2+} -каналов, водно-электролитных растворов, а также средств для профилактики и лечения инфекций МВП [334]. Такой методический подход позволит анализировать так называемые неспецифические механизмы модуляции мышечной оболочки мочеточника, возникающие в результате прямого или опосредованного воздействия на гомеостаз ГМК различных фармакологических препаратов ЛКТ.

Гипотеза. Если ЛКТ модулирует релаксацию гладкой мышечной ткани МВП, то неэффективная элиминация конкрементов может быть связана с нарушением сократительной активности ГМК вследствие изменившейся сигнальной трансдукции. В этом контексте исследование внутриклеточной сигнализации, участвующей в процессах сокращения и расслабления ГМК, при консервативной терапии позволит приблизиться к пониманию механизмов регуляции функциональной активности Тц и лейкоцитов.

1.2. Патогенез осложнений после КЛТ.

ЛТ является эффективным и безопасным методом удаления камней почки и мочеточника, тем не менее, по данным разных авторов частота осложнений, сопровождающих ЛТ, варьирует в пределах от 5,6% до 16,0% [17, 375, 355]. В настоящее время ЛТ считается лучшим методом элиминации конкрементов почки и мочеточника размером менее 20 мм [7, 98, 297]. Тем не менее, актуальным остается определение безопасности и эффективности применения ЛТ [24, 9]. При этом анализируются как предикторы возможных осложнений ЛТ, так и эффективность разных видов литотриптеров.

Дискуссия на этот счет на страницах Европейских журналов позволила не только конкретизировать возможные осложнения малоинвазивного оперативного вмешательства, но и подтвердить эффективность и безопасность ЛТ при удалении конкрементов из почки и мочеточника. К числу наиболее значимых исследований в этой области можно отнести публикацию [25], поскольку авторы впервые определили прогностические факторы, влияющие на эффективность экстракорпоральной ударно-волновой литотрипсии (ESWL) в отношении почечных конкрементов. Первичная ЛТ была выполнена у 2954 пациентов с одним или несколькими конкрементами размером <30 мм. Эффективность ESWL составила 86,7%. Сохранение неразрушенных конкрементов имело место в 7,3% случаев, а неспособность вывести фрагментированные камни наблюдалась в 6% случаев. Было установлено, что возраст пациента, размер конкремента, месторасположение, количество и состав камня, экскреторная функция почек и врожденные аномалии мочеточника оказывают существенное влияние на удаление конкрементов из МВП. В дальнейшем к значимости возраста пациентов как прогностического фактора эффективности ЛТ и риска послеоперационных осложнений возвращались [12, 11, 31, 182].

Влияние сопутствующих заболеваний на эффективность ЛТ впервые отмечено в работе Hubert K.C. et. al. [161], которые проанализировали потенциальную взаимосвязь между индексом коморбидности Charlson (CCI) и удалением конкрементов после ESWL. Учитывались возраст, сопутствующие болезни, размер и расположение камня, количество импульсов дробления и уровень мощности литотриптера. Многомерный логистический регрессионный анализ не выявил различий в характеристиках конкрементов, количестве ударов или уровне мощности ЛТ между пациентами, у которых имело место свободное отхождение фрагментов конкремента и теми, у кого данный процесс не достигался. Значимым предиктором свободного отхождения фрагментов конкремента являлось наличие и количество сопутствующих заболеваний. Проведенный [355]

многофакторный анализ подтвердил, что СД, обструктивный пиелонефрит в анамнезе и длина конкремента ≥ 20 мм являются факторами риска послеоперационной ИМП. Можно было предположить, что эффективность ЛТ, особенно при удалении конкрементов из дистальных отделов мочеточника, зависит от вида ЛТ и характеристик литотриптера [21; 13]. Ответ на данный вопрос можно найти в публикации [309]. Авторы представили результаты рандомизированного контролируемого исследования, что позволяет сопоставить эффективность трех разных литотриптеров для удаления конкрементов мочеточника. В анализ были включены 201069 пациентов, у которых использовались литотриптеры: LithoClast classic (группа 1), Holmium Laser (группа 2) и StoneBreaker™ (группа 3). Первоначальной конечной точкой являлось время фрагментации камня. В качестве вторичных точек исследования оценивались следующие параметры: свободное отхождение фрагментов камня, интраоперационные осложнения, длительность пребывания в стационаре, применение анальгетиков и потребность в дополнительных процедурах. Для определения клинических и хирургических факторов, влияющих на результат ЛТ, был проведен однофакторный и многофакторный анализ. Средний размер камня составлял $7,17 \pm 2,04$ мм в 1-й группе; $7,89 \pm 2,73$ мм во 2-й группе; и $7,79 \pm 2,97$ мм в 3-й группе ($p=0,79$). Срок фрагментации был схожим и составлял $27,12 \pm 4,07$ минут в группе с использованием Lithoclast; $21,78 \pm 2,81$ минут в группе – Holmium Laser и $27,14 \pm 4,71$ минут в группе – StoneBreaker ($p=0,74$). Свободное отхождение фрагментов конкремента было сопоставимым, его частота составляла $96,0\% \pm 11,2\%$ (1-я группа), $96,9\% \pm 8,0\%$ (2-я группа) и $96,9\% \pm 8,4\%$ (3-я группа) ($p=0,1$) соответственно. Не было определено никаких разногласий по поводу необходимости послеоперационного стентирования и необходимости вспомогательных процедур. Таким образом, разные виды литотриптеров были одинаково эффективны для удаления дистальных конкрементов в мочеточнике.

К наиболее частым осложнениям ЛТ относят транзиторную гематурию, кровопотерю, повреждение слизистой МВП и перфорацию мочеточника, рецидив пиелонефрита и сепсис [354, 98, 322]. Кровотечение является серьезной проблемой при проведении нефролитотомии, хотя встречается довольно редко – 4,4% при наличии конкремента в почке и – 0,14% при камне мочеточника [347, 300]. Казалось бы, такое редкое осложнение ЛТ не должно привлекать внимание специалистов, однако данные литературы свидетельствуют обратное. Существует достаточно много публикаций, касающихся выявления предикторов кровотечения во время ЛТ [405, 332]. Значение таких исследований очевидно – определить группу риска на этапе госпитализации пациентов. Это позволит индивидуализировать консервативную терапию и проведение ЛТ, а значит свести к минимуму саму возможность кровопотери в процессе операции. В тени, правда, остается другая менее обсуждаемая проблема – гематурия, которая постоянно возникает при вмешательстве на почке и мочеточнике. Данный вид кровопотери, традиционно, не рассматривается как критическое осложнение ЛТ, требующее разработки специальных методов диагностики и профилактики. Хотя понятно, что степень гематурии и ее длительность, а также формирование сгустков крови в просвете МВП могут потребовать не только проведения инфузионной терапии, но и стентирования мочеточника сразу после ЛТ. В этом контексте интерес к проблеме установления предикторов и механизмов гематурии после ЛТ становится понятным.

Начало проспективных исследований с целью выявления факторов, влияющих на кровопотерю во время нефролитотомии положили Kukreja R. et al. [195]. Многофакторный регрессионный анализ показал, что значимыми предикторами потери крови являются нефростомия, длительность операции, метод навигации (ультразвук, рентгеноскопия), метод дилатации МВП, формирование нескольких путей доступа к камню, диаметр просвета мочеточника, толщина паренхимы почек, а также наличие диабета. Частота переливания крови у пациентов составила 7,9%. Установлено, что уровень

гемоглобина до операции, наличие нескольких путей доступа, размер конкремента, объем кровопотери являлись существенными факторами в прогнозе необходимости переливания крови. Такие факторы, как возраст, гипертония, почечная недостаточность, инфекция МВП, степень гидронефроза, размер камня и ипсилатеральный блок оттока мочи не оказывали существенного влияния на потерю крови при ЛТ. Технические факторы, такие как квалификация хирурга и фиксация камня в чашечке, также не влияли на потерю крови. Авторы приходят к заключению, что диабет, методика формирования доступа к камню, длительность операции и возникновение интраоперационных осложнений, связаны со значительным увеличением геморрагии.

Традиционно считается, что локализация конкремента не является фактором риска развития осложнений после КЛТ [176]. Однако, установлена региональная неоднородность мочеточника, которая в значительной степени связана с возрастом, и в меньшей степени – с полом [336]. Оказалось, что (а) у молодых субъектов кривые напряжения продольной-циркулярной деформации верхнего мочеточника смещены в сторону меньших осевых напряжений, т. е. верхний отдел мочеточника менее резистентный в осевом направлении; (б) с возрастом верхний отдел мочеточника подвергается усилению осевой нагрузки; (в) старение организма сопровождается повышением содержания коллагена в стенке верхнего отдела мочеточника; (г) толщина стенки увеличивается с возрастом, отражая утолщение среднего (мышечного) и внутреннего (слизистой) слоев у пожилых людей. Таким образом, можно предположить, что ЛТ в разных отделах мочеточника, при прочих равных условиях (размер конкремента, возраст пациента, метод дробления конкрементов, назначение ЛКТ и т.д.) может проявляться различиями частоты и выраженности геморрагии и пиелонефрита.

Еще одним аспектом прогнозирования осложнений, связанных с ЛТ, является установка стента в мочеточник, поскольку возможно формирование сгустка в просвете мочеточника. В этом контексте хотелось бы остановиться

на мета-анализе, проведенном Song T. et al. [337]. Целью исследования было оценить необходимость стентирования мочеточника после уретероскопической ЛТ. Авторы провели систематическое исследование Medline и EMBASE относительно случаев стентирования и отсутствия такового у пациентов после ЛТ. В анализ были включены 15 исследований. Никаких различий не было выявлено в отношении стентирования и развития стриктуры мочеточника между двумя обследованными группами ($p=0,69$ и $p=0,67$). Пациенты со стентами имели более высокий риск инфицирования МВП (OR = 1,72, $p = 0,05$), дизурии (OR = 5,24, $p = 0,003$), гематурии (OR = 7,28, $p = 0,001$) и боли при мочеиспускании (OR=5,24, $p=0,003$). Оценка послеоперационной боли показала, что ее уровень также был выше в раннем периоде после операции у пациентов со стентом ($p = 0,002$). Не было обнаружено различий длительности госпитализации в обеих группах ($p = 0,22$). Таким образом, стентирование мочеточника не улучшает результаты лечения у пациентов, перенесших ЛТ, но повышает частоту послеоперационных осложнений, включая гематурию. В метаанализе, проведенном Wang H et al. [379], оценили преимущества и недостатки установки стентов в мочеточник при лечении уретеролитиаза. Систематический обзор включал 22 рандомизированных контролируемых исследования, сравнивающих результаты с- или без установки стента при проведенной КЛТ и дистанционной литотрипсии. В группе с установленным стентом в мочеточник частота развития гематурии (OR: 3,68, 95% ДИ: 1,86-7,29, $p < 0,001$), инфекции мочевыводящих путей (OR: 2,23, 95% ДИ: от 1,57 до 3,19, $p < 0,001$), дизурии (OR: 3,90, 95% ДИ: от 2,51 до 6,07, $p < 0,001$) наблюдалась значительно чаще. Исследователи сделали вывод, что стентирование не улучшает скорости элиминации камней, но приводит к дополнительным осложнениям. Тем не менее, стенты мочеточника позволяют предупредить незапланированную повторную госпитализацию, что находит подтверждение в исследовании [165].

Таким образом, актуальной проблемой урологии остается ранняя диагностика, прогнозирование и профилактика развития осложнений литотрипсии у больных с МКБ, осложненной хроническим пиелонефритом. Подходы к прогнозированию эффективности ЛТ, риска развития геморрагий и острого пиелонефрита, в основном, сориентированы на анализ клинико-инструментальных показателей. При этом без внимания остаются такие важные детерминанты патогенеза интар- и послеоперационных осложнений как реактивность организма, влияние механизмов, регулирующих моторику мочеточника при элиминации конкрементов, на компенсаторные и адаптационные реакции клеток крови. Эти размышления определили цель и задачи данного исследования.

1.3. Регуляция тромбоцитарного звена гемостаза после КЛТ.

Современная патофизиология Тц базируется на изучении спектра регуляторов тромбогенеза, включающего широкий круг тканевых и гуморальных факторов, действие которых опосредовано интегринами и гликопротеинами (GP). Ключевыми стимуляторами Тц являются гуморальные плазменные и аккумулированные в плотных гранулах Тц факторы: АДФ, АТФ, адреналин, серотонин и тромбин [54, 3]. Большинство рецепторов Тц ассоциированы преимущественно с Gq- или Gi-белками, которые, в свою очередь, связаны с определенными сигнальными системами, определяющими повышение уровня внутриклеточного Ca^{2+} . Так, Gq-белок (ассоциированный с P2Y₁-рецептором, АТ₁-рецептором, ТХА₂-рецептором, ФАТ-рецептором) через фосфолипазу С стимулирует образование диацилглицерола (ДАГ) с активацией протеинкиназы С, а также продукцией ФИ-3К, рецепторы к которой опосредуют выход ионов Ca^{2+} из депо [110, 373, 351]. В свою очередь, стимуляция Gi-белка, ассоциированного с α_2 -адренорецептором и P2Y₁₂ пуриновыми рецепторами, ингибирует активность аденилатциклазы и образование цАМФ, а также с участием Src и ФИ-3К, способствует повышению и поддержанию уровня внутриклеточного Ca^{2+} [82]. Адгезия Тц запускает сигнальный каскад, опосредованный тирозинкиназами

и G-ассоциированными рецепторами, которые ведут к активации Тц с сопутствующей дегрануляцией и привлечением дополнительных Тц в агрегат. Тц экспрессируют целый ряд гетеротримерных ГТФ-связывающих белков или G-белок ассоциированных рецепторов (GPCR), активация которых генерирует как стимулирующие, так и тормозящие сигналы. На начальных этапах активации Тц изменяется форма, что находит отражение в процессе регистрации агрегационной кривой в виде пика дезагрегации (снижения светопропускания). Гранулы в Тц централизуются и их содержимое выходит в просвет открытой канальцевой системы, из которой они поступают в межклеточное пространство (реакция дегрануляции, которая регистрируется в виде второй фазы агрегации) [82, 205]. Активация Тц приводит к образованию *de novo* ТХА₂ из фосфолипидов клеточных мембран. Секретируемый АДФ и образованный ТХА₂ выступают в качестве посредников с положительной обратной связью и вовлекают в активацию другие Тц, что приводит к амплификации начальных реакций Тц, а также способствуют формированию стабильного тромбоцитарного тромба [250, 296]. Механизм стабильной адгезии Тц к активированному эндотелию *in vitro* и *in vivo* опосредован связыванием тромбоцитарного $\alpha\text{IIb}\beta 3$ с фибриногеном и эндотелиальным $\alpha\nu\beta 3$ или ICAM-1 с последующей активацией Тц [239]. Активированный интегрин $\alpha\text{IIb}\beta 3$ связывает множественные лиганды, включая VWF, фибриноген, фибрин, фибронектин и незаменим для образования стабильных агрегатов Тц [167]. В последующем, Тц обеспечивают реализацию вторичного гемостаза, создавая каталитическую поверхность для активации коагуляционного каскада. Каскадная система активации внутриклеточных сигнальных путей характеризуется множеством путей проведения сигнала, дублированием и взаимозаменяемостью элементов и быстрому возврату к равновесному состоянию [14]. Это обеспечивает надежность и динамичность активности Тц. Известно, что эффект стимуляции Тц агонистами вызывает конформационные изменения (сигнализация «изнутри» или «inside-out») GPIIb/IIIa. В свою очередь

связывание лиганда GPIIb/IIIa приводит к изменениям, направленным на цитоплазму («внешняя сигнализация» или «outside-in») [203].

При нефролитиазе особый интерес представляет состояние α_2 -адренорецептора, пуриновых P2X₁-рецептора и P2Y-рецепторов, аденозинового A2A-рецептора, ангиотензинового AT₁-рецептора, TxA₂-рецептора, ФАТ-рецептора и GPVI-рецептора к коллагену IV типа, которые могут принимать участие в регуляции компенсаторных реакций Тц. Так, установлено что: (1) адреналин участвует в тромбогенезе и гемостазе [32], а повышение уровня катехоламинов в крови является фактором риска развития острой воспалительной реакции при мочекаменной болезни [4]. Реактивность α_2 -адренорецептора сохраняется при длительном назначении блокаторов ЦОГ [332]. (2) P2X-рецептор участвует в;=: тромбогенезе путем активации α IIb β 3 интегрина [51], апоптозе Тц [390, 245], регуляции секреции провоспалительных цитокинов Тц [393], интеграции процессов тромбогенеза и воспаления [275]. (3) пуриновые P2Y-рецепторов (P2Y₁-рецептор P2Y₁₂-рецептор) участвуют в механизмах аутокринной регуляции Тц и потенцировании тромбогенного эффекта коллагена, связанного с активацией интегринов α 2 β 1 и α IIb β 3 [208]. (4) аденозиновый A2A-рецептор является чувствительным индикатором гипоксии/ишемии и воспаления в тканях [371]. Стимуляция данного рецептора сопровождается уменьшением экспрессии тромбоспондина (TSP-1) в эндотелиальных клетках [127], снижением активности нейтрофилов, секретирующих ФАТ [118] и накоплением макрофагов в рыхлой волокнистой соединительной ткани [149]. Доказано ингибирующее влияние A2A-рецептора на передачу сигналов с GPVI-рецептора в Тц [85, 166]. (5) ангиотензиновый AT-рецептор представлен на плазмалемме Тц и лейкоцитов, что позволяет индуцировать агрегацию Тц и миграцию лейкоцитов посредством активации протеинкиназы С (ПКС), стимулируемой через Gq-белок сигнальный путь [229]. Стимуляция AT₁-рецептора сопровождается потенцированием коллаген-индуцированной АТц, вследствие кластеризации GPVI-рецептора [270]. Доказано существование

функциональной перекрестной связи между сигнализацией АТ₁-рецептора и другими сигнальными путями [183]. (6) ФАТ – рецептор: участвует в агрегации Тц посредством Gq-белка [277, 217]; обеспечивает взаимодействие клеток крови при реализации воспаления [372, 266]; регулирует проницаемость монослоя эндотелия и адгезию лейкоцитов [252, 277]. (7) активность ТхА2-рецептора является индикатором степени ингибирования активности ЦОГ [131, 327]; сигнализация ТхА2-рецептора сопровождается повышением функциональной активности Тц и лейкоцитов [160]. (8) GPVI-рецептор регулирует функциональную активность и взаимодействие Тц, лейкоцитов и эндотелия; трансмиграцию лейкоцитов через базальную мембрану стенки сосудов МЦР [42, 115, 238]. Активность GPVI-рецептора отражает процесс ремоделирования (синтез и деградацию) молекул внеклеточного матрикса, которые представлены в базальной мембране стенки сосудов и уротелия, что предопределяет диapedез эритроцитов в мочу (гематурия) [381, 199].

Известно, что выраженность кровотечения зависит от состояния тромбоцитарного звена гемостаза. Очевидно, что от эффективности механизмов, обеспечивающих активацию Тц при снижении их ответа на агонисты вследствие ингибирования синтеза ТхА2 (при введении НПВП), будет зависеть ограничение гематурии. В этом контексте имеет смысл акцентировать внимание на вторичной волне агрегации Тц, связанной с секрецией АДФ из плотных-гранул. Биологический смысл существования такой защитной реакции заключается в возможности амплификации внешнего сигнала [14]. Перекрестные взаимодействия между рецепторами к АДФ (обеспечивающим аутокринную стимуляцию Тц) и каскадами сигнальных систем, которые запускаются нейрогуморальными факторами, приводят к пониманию роли последних не только в контроле тромбогенеза, но и восстановлении функции гипореактивных Тц. Установлено, что в случае ингибирования ЦОГ воздействие агонистов сопровождается нестабильным ответом Тц, поскольку не достигается их критическая активация

(стационарное состояние) и тромбоцитарный агрегат распадается. В этой связи интересной представляется гипотеза об усилении роли аутокринного стимулирующего эффекта АДФ при повышении в циркулирующей крови адреналина. Известно, что α_{2A} -адренергический рецептор имеет общие перекрестные механизмы с G_q -сигнальным путем, опосредованные ФИ-3киназами/Akt. При реализации эффекта синергизма адреналин дополнительно вызывает секрецию плотных гранул, фосфорилирование белка плекстрина протеинкиназы C и усиливает сигнализацию от рецептора $P2X_1$. Добавление адреналина к Тц может стимулировать активацию Rap-1b [225]. Базисные знания механизмов, способных поддерживать агрегацию Тц в условиях ингибирования ЦОГ, представлены [305]. Как оказалось, повышение агрегации Тц возможно достигнуть при одновременной стимуляции ФАТ-рецептора и α_2 -адренорецептора благодаря сопряженности сигнальных путей, связанных с ФЛС, ЦОГ и МАР-киназой. Можно предположить, что если при уролитоазе или после проведении ЛТ происходит активация САС (повышается концентрация катехоламинов в крови), то адренореактивность Тц изменяется и это может проявляться усилением тромбогенеза.

Традиционно Тц рассматривают как элемент первичного (сосудисто – тромбоцитарного) звена гемостаза. Однако, в последние годы акцент исследований перенесен на участие Тц в развитии воспаления [122], поскольку индукция воспаления обеспечивается взаимодействием эндотелия сосудов, Тц и лейкоцитов [91]. Остаются невыясненными механизмы стимуляции Тц при воспалении. Медиаторы воспаления при хроническом обструктивном пиелонефрите (ХОПН) способствуют активации Тц за счет увеличения экспрессии поверхностных молекул адгезии эндотелия: фактора фон Виллебранда (VWF), Р- и Е-селектинов, ICAM-1 (молекула клеточной адгезии-1), VCAM-1 (сосудистая молекула клеточной адгезии-1) [121]. Развитие эндотелиальной дисфункции при обструктивной уропатии приводит к выходу Р-селектина и VWF из телец Вайбеля-Паладе в окружающую среду

с последующей адгезией Тц посредством рецепторного комплекса – GPIIb-IX-V [276]. Активированный Тц выделяет IL-1 β с индукцией эндотелиальной секреции интерлейкина (ИЛ)-6 и ИЛ-8, поверхностной экспрессии ICAM-1, α v β 3 и MCP-1 (моноцитарный хемоаттрактантный белок-1). При активации на поверхности Тц экспрессируется CD40-лиганд (CD40L, CD154), член семейства ФНО- α [107]. Связывание CD40L с эндотелиальными клетками приводит к активации провоспалительного фенотипа Тц [37]. Провоспалительный потенциал при активации Тц подтверждается их взаимодействием с моноцитами, нейтрофилами, эозинофилами, базофилами и Т-клетками с образованием тромбоцитарно-лейкоцитарных агрегатов (ТЛА) [324, 144]. Характеристики ТЛА в циркулирующей крови продолжают обсуждаться в контексте поиска ранних маркеров развития воспаления [3, 285]; идентификация таковой позволила бы приблизиться к возможности ограничения развития воспалительной реакции на самых ранних этапах. При дегрануляции Тц выделяют широкий спектр воспалительных и митогенных медиаторов [203]. В α -гранулах Тц содержатся хемокины СХС и СС классов [59]. Хемокин RANTES (CCL5), секретируемый Тц, является сильным хемоаттрактантом для клеток-участниц воспалительного процесса и переносится на поверхность эндотелия микрочастицами Тц [240]. В образовании ТЛА принимает участие CD40 на плазмолемме активированных Тц, который взаимодействует с CD154, CD147 и JAM на поверхности лейкоцитов [213]. Участие селектинов Тц в формировании ТЛА не вызывает сомнений. Более того, можно констатировать, что: (а) активированные Тц в циркулирующей крови являются носителями молекул CD62P; (б) экспрессия адгезивных молекул (CD62P и CAP1) повышается при стимуляции тромбоцитов АДФ, коллагеном и адреналином; (в) комбинация некоторых агонистов, в частности тромбина и АДФ, воспроизводит более выраженный эффект экспрессии адгезивных молекул.

Факт взаимодействия Тц с нейтрофилами – достаточно известный, однако роль такой кооперации клеток крови продолжает обсуждаться.

Известно, что Тц обычно циркулируют в состоянии покоя и только после активации они могут изменять свою форму, выделять и экспрессировать различные молекулы, в том числе молекулы адгезии [137]. Полагают, что взаимодействие тромбоцитов с нейтрофилами способствует: во-первых, рекрутированию нейтрофилов в очаг воспаления. Это взаимодействие нейтрофилов с тромбоцитами, в основном, опосредовано Р-селектином, $\beta 2$ и $\beta 3$ интегринами (CD11b/CD18, CD41/CD61). Во-вторых, прикрепленные Тц способствуют вторичному захвату (активации) нейтрофилов и других лейкоцитов. В-третьих, Тц секретируют активаторы, индуцирующие продукцию цитокинов нейтрофилами и эндотелиальными клетками. Таким образом, Тц могут рассматриваться как важные амплифайеры инициации воспаления. Установлено, что Тц усиливают трансэндотелиальную миграцию нейтрофилов [201], ингибируют генерацию АФК в нейтрофилах и моноцитах после установления межклеточных контактов [224]. Стимуляция Тц и последующее формирование ТЛА связано с формированием провоспалительного фенотипа лейкоцитов [279]. Комбинация разных агонистов (а это динамически меняющиеся взаимоотношения) могут существенно модулировать изолированный эффект любого агониста при формировании ТЛА [124]. Доказано, что адреналин и АДФ приводят к повышению образования ТЛА за счет усиления экспрессии CD11b, Р-селектина и гликопротеина IIb/IIIa [157].

Внутриклеточные сигнальные системы носят универсальный характер и присутствуют во всех клетках организма, в том числе и в лейкоцитах. В связи с этим похожие механизмы активации и системы вторичных посредников ответственны за регуляцию процесса воспаления. Доказана роль Тц в формировании ТЛА и определенную роль в этом играет ФАТ. ФАТ генерируется из лизофосфатидилхолина и ацетил-коэнзима А ферментом лизофосфатидил-холин-ацилтрансферазой. Деградацию ФАТ производит ацетилгидролаза из надсемейства фосфолипаз A_2 . ФАТ является мощным агонистом Тц и медиатором воспаления, а также регулятором устойчивой

адгезии нейтрофилов на поверхности иммобилизованных Тц [196]. При помощи ФАТ в нейтрофилах человека происходит изменение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} . ФАТ индуцирует фосфорилирование внеклеточной сигнально-регулируемой киназы (ERK), опосредованное ФИ-3К, ПКС, ФЛА₂, ФЛС и внеклеточным Ca^{2+} [79]. Активность САС оказывает влияние на кооперацию тромбоцит-лейкоцит. Повышение уровня катехоламинов при стрессе и травме посредством β_2 -адренергических рецепторов приводят к лейкоцитозу за счет выхода из маргинального пула цитотоксических лейкоцитов в кровообращение [100].

1.4. Молекулярные механизмы регуляции функциональной активности клеток крови при реализации воспаления.

Актуальной проблемой клинической медицины является уточнение механизмов активации и рекрутирования лейкоцитов из циркулирующей крови в очаг воспаления, что позволило бы приблизиться к возможности ограничения развития воспалительной реакции на самых ранних этапах после КЛТ [8].

Участие α -адренорецепторов в регуляции активности лейкоцитов при воспалении. Адренергические рецепторы экспрессируются на поверхности лейкоцитов, но их роль в регуляции воспаления все еще недостаточно изучена. В обстоятельном обзоре Scanzano A., Cosentino M. [318] представлено обобщение знаний, касающихся адренергической модуляции воспалительной реакции. В частности, констатируется, что (а) лейкоциты имеют на поверхности адренорецепторы, которые связываются с норадреналином и адреналином; (б) катехоламины ингибируют миграцию нейтрофилов человека [256,234], стимулируют экспрессию молекул CD11b/CD18 и окислительный метаболизм; в) экспрессия β_2 -адренорецепторов моноцитов ограничивает воспаление. Существуют многочисленные доказательства, подтверждающие критическую роль адренергических механизмов в регуляции воспаления. Во-первых, симпатический отдел вегетативной нервной системы регулирует выработку

провоспалительных миелоидных клеток из гемопоэтических клеток-предшественников [370]. Во-вторых, имеются данные [178], что провоспалительные медиаторы могут влиять на экспрессию адренергических рецепторов лейкоцитов; в свою очередь лейкоциты способны самостоятельно синтезировать катехоламины при развитии воспаления [46]. Установлено, что антагонист α_2 -адренорецепторов может подавлять выработку провоспалительных цитокинов мононуклеарами, в то время как агонисты приводили к развитию острой воспалительной реакции. В-третьих, приводятся доказательства [92], что стимуляция α - и β -адренорецепторов сопровождается увеличением фагоцитарной способности макрофагов, экспрессией индуцибельной синтазы оксида азота (iNOS₂) и повышением продукции NO; в основе данных процессов, вероятно, лежит активация ядерного фактора каппа В (NF- κ B). Sud R. [345] предлагают рассматривать α_2 -адренорецепторы макрофагов как триггер воспалительной реакции, поскольку соответствующие агонисты индуцируют увеличение продукции медиатора воспаления – фактора некроза опухоли (ФНО α). Адренергическая система клеток крови обеспечивает регуляцию адгезии при рекрутировании лейкоцитов из сосудистого русла. Так, адреналин значительно усиливал экспрессию Р-селектина и гликопротеина IIb / IIIa на Тц [157]. β -адренергическая блокада перед инкубацией клеток крови с адреналином увеличивала взаимодействие Тц и нейтрофилов, а также экспрессию молекул адгезии (CD11b, Р-селектина и гликопротеина IIb/IIIa). Эти результаты показывают, что опосредованное α -адренергическими рецепторами увеличение экспрессии молекул адгезии на Тц может вносить существенный вклад в активацию лейкоцитов путем формирования ТЛА.

Оставалось не выясненным - могут ли адренорецепторы модулировать трансэндотелиальную миграцию лейкоцитов при реализации воспаления? В этом контексте важными представляются результаты исследований [152]. У мышей на разных моделях воспаления при введении агонистов α_2 -

адренорецепторов (ксилазина или UK14304) наблюдалось значительное снижение миграции нейтрофилов; α_2 -адренергический антагонист (RX821002) отменял этот эффект. Аналогичные эксперименты с эндотелиальными клетками (монослой HUVEC) показали, что UK14304 предотвращал активацию ICAM-1 и уменьшал макромолекулярный транспорт через монослой клеток. В посткапиллярных венулах предварительная обработка эндотелиальных клеток посредством α_2 -агонистов снижала трансэндотелиальную миграцию нейтрофилов. Эти данные свидетельствуют, что α_2 -адренорецепторы запускают сигналы на эндотелиальных клетках, которые защищают целостность межклеточных контактов во время воспалительного ответа. Экспрессированный в лейкоцитах β_2 -адренорецептор играет важную роль в регуляции развития острой воспалительной реакции [139, 318]. Функциональная активность β_2 -адренорецепторов мононуклеарных клеток снижается у пациентов с хроническими воспалительными заболеваниями [301]. Агонисты β_2 -адренорецепторов, могут ингибировать различные воспалительные и иммуноэффекторные функции клеток; возможно, что эти лекарственные средства влияют на защитные механизмы организма. В этой связи необходимо было ответить на вопрос – может ли агонист β_2 -адренорецепторов модифицировать рекрутирование нейтрофилов крови человека и их антимикробную активность? Приведенные в литературе факты свидетельствуют, что: (а) β -аррестин2 / AP-1-зависимая передача сигналов β -адренорецепторов участвует в регуляции экспрессии хемокина CCR2 и рекрутировании лейкоцитов в острой фазе воспаления [139]; (б) в нейтрофилах активация β_2 -адренергического рецептора, связанного с Gs-белком, ингибирует воспалительную реакцию [62]; (в) α - и β -адренорецепторы необходимы для стимуляции всех стадий фагоцитарного процесса [155, 290].

Экспрессия пуринаергических P2-рецепторов лейкоцитов при воспалении. Внеклеточные нуклеотиды признаны важными медиаторами

активации лейкоцитов, инициирующими множественные ответы через P2X-ионотропные рецепторы и G-белок-связанные P2Y-рецепторы [246, 352]. Моноциты и макрофаги экспрессируют разнообразные P2-рецепторы на клеточной поверхности для 5'-аденозин-трифосфата (АТФ), который способен повысить уровень цитоплазматического Ca^{2+} [206]. Это достигается либо путем прямого проникновения ионов Ca^{2+} через ионотропные рецепторы P2X, либо путем мобилизации внутриклеточных запасов кальция при активации метаболотропных рецепторов P2Y [350]. Экспрессия рецепторов P2X1, P2X4, P2X5 и P2X7 была подтверждена на моноцитах и макрофагах человека. В настоящее время АТФ рассматривается как паттерн-молекула, связанная с повреждением клетки (damage-associated molecule pattern, DAMP) [68]. Обнаружение лейкоцитами экзогенного освобожденного АТФ инициирует воспаление и заживление раны. АТФ активирует сигнальные пути макрофагов, связанные с продукцией активных форм кислорода и MIP-2, который регулирует миграцию нейтрофилов [34]. Как известно, хемокины и АТФ являются ключевыми медиаторами в зоне воспаления, которые могут попадать в системное кровообращение при нарушении гисто-гематического барьера. Основной функцией хемокинов является мобилизация лейкоцитов, тогда как АТФ запускает воспаление. Amison R.T. et al. [35] установили, что хемокины контролируют АТФ-зависимую секрецию ИЛ-1 β моноцитами.

Рекрутирование воспалительных клеток к участкам повреждения тканей и / или инфекции контролируется множеством сигнальных процессов, влияющих на межклеточные взаимодействия между эндотелиальными клетками сосудов в посткапиллярных венулах и циркулирующими лейкоцитами. В последние годы обсуждается участие пуринергических P2Y-рецепторов в активации эндотелиальных клеток при воспалении [220,36]. Однако механизмы регуляции высвобождения АТФ из эндотелия остаются неясными. Установлено [219], что АТФ-пропускающий-канал паннексин-1 (Panxexin-1) открывается посредством ФНО- α . Этот процесс включает

активацию рецепторов ФНО, стимуляцию киназ семейства Src (SFK) и SFK-зависимое фосфорилирование паннексина-1. Таким образом, во время острого системного воспаления эндотелиальные клетки секретируют АТФ и, тем самым, могут стимулировать адгезию и миграцию лейкоцитов через венозную стенку. Рецептор эндотелия P2Y1 индуцирует активацию эндотелиальных клеток, которая сопровождается адгезией лейкоцитов [215, 147].

Существует восемь подтипов P2Y-рецепторов (P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11, P2Y12, P2Y13 и P2Y14), которые активируют каскады сигналов для регуляции различных клеточных процессов, включая пролиферацию, дифференцировку, фагоцитоз, секрецию, ноцицепцию, адгезию и миграцию клеток [316, 110]. Эти сигнальные каскады работают, главным образом, за счет последовательной активации или дезактивации гетеротримерных и мономерных G-белков, фосфолипаз, аденилат- и гуанилилциклаз, протеинкиназ и фосфодиэстераз. Рецепторы P2Y широко экспрессируются на разных клетках и играют важную роль в физиологии [207]. Все больше данных свидетельствуют о важной функции P2Y-рецепторов в дифференцировке и созревании иммунных клеток, миграции и апоптозе клеток [94]. Проточная цитометрия позволила установить, что мононуклеарные и полиморфноядерные клетки экспрессируют рецепторы P2Y-1,2,4,6,11,14. Вероятно, в лейкоцитах низкие концентрации АТФ индуцируют высвобождение нуклеотидов посредством активации рецепторов P2Y-2,4,6,11, а в более высоких концентрациях – через рецепторы P2X [269]. Таким образом, АТФ-индуцированное высвобождение нуклеотидов представляет собой потенциальный механизм, ведущий к усилению пуринергической сигнализации. Представляет интерес пуриновый рецептор P2Y14, который экспрессируется на высоком уровне в нейтрофилах человека [299]. Scrivens M., Dickenson J.M [323] показали, что агонист P2Y1-рецепторов (2MeSATP) увеличивал адгезию лейкоцитов к эндотелиальным клеткам и продукцию ФНО- α *in vitro*. Представленные данные подтверждают

возможность модуляции эндотелиальных клеток, связанной с функционированием пуриnergического рецептора P2Y1. В этой связи, P2Y1-рецептор может использоваться в качестве потенциальной мишени для контроля хронического воспаления. Эндотелиальные клетки сосудов также экспрессируют рецепторы P2Y6 [333]. Проведенные исследования продемонстрировали селективную индукцию рецептора P2Y6 (более чем в 4 раза за 24 часа), а также зависимую от времени и дозы индукцию P2Y6-рецептора *in vitro* и *in vivo* при стимуляции эндотелиальных клеток во время воспалительной реакции. Эти исследования демонстрируют важный вклад передачи сигналов с P2Y6-рецепторов эндотелиальных клеток в усилении воспаления, а также обосновывают перспективность воздействия на данный рецептор в качестве терапевтической мишени при системной воспалительной реакции. Представляет интерес – какие из пуриновых P2-рецепторов Тц являются ответственными за рекрутирование лейкоцитов и хемотаксис, что в перспективе позволит разработать таргетное лечение воспаления на ранних стадиях. Установлено, что рекрутирование нейтрофилов, индуцированное ЛПС, ингибируется у мышей, которым вводили антагонисты P2Y1- или P2Y14-рецептора [33]. Время кровотечения значительно увеличивалось у мышей, которым вводили антагонисты P2Y1, P2Y12 или P2X1-рецепторов, при этом агрегация тромбоцитов в ответ на АДФ значительно снижалась. Анализ хемотаксиса *in vitro* выявил прямой антагонизм P2Y1-рецепторов Тц с подвижностью нейтрофилов в отношении хемокинов, продуцируемых макрофагами (MDC, CCL22). Стимуляция Тц селективными агонистами P2Y14 приводила к значительному хемотаксису нейтрофилов. Эти результаты подтверждают роль активации P2Y1 и P2Y14-рецепторов Тц в развитии воспалительной реакции. В этом контексте, баланс между протромбогенными и провоспалительными стимулами позволяет оптимизировать регуляцию компенсаторных и адаптационных реакций Тц и лейкоцитов в организме после КЛТ на фоне ЛКТ.

1.5. Ремоделирование внеклеточного матрикса слизистой оболочки МВП при нефролитиазе - как причина гематурии.

Априори считается, что механическое повреждение слизистой оболочки МВП конкрементом является ключевым фактором патогенеза гематурии (по сути повреждения стенки сосудов). Однако, в данном контексте более корректно учитывать инициацию воспалительной реакции, которая проявляется инфильтрацией периваскулярной ткани лейкоцитами с последующей альтерацией стенки сосудов микроциркуляторного русла [227]. В сущности, гематурия при нефролитиазе ассоциирована с воспалением [241]. Механизмы возникновения, поддержания и прекращения таких «транзиторных» кровотечений не привлекают должного внимания урологов, поскольку нет убедительных доказательств влияния исходной гематурии на развитие осложнений после ЛТ. Тем не менее, если будет доказано влияние предсуществующего воспаления в тканях почки и мочевыводящих путях при нефролитиазе на развитие послеоперационных осложнений, то это заставит пересмотреть тактику консервативной терапии на этапе предшествующем госпитализации пациентов [257].

Остается не изученным влияние перманентной микрогематурии при нефролитиазе на гемопоэз, следствием чего может быть гипоксия/ишемия органов. На важность разграничения степени гематурии (наличие микро- и макрогематурии) обращают внимание [244]. Причины этого явления остаются не выясненными; можно только согласиться с доводами [298], что микрогеморрагия связана с увеличением проницаемости или повреждением стенки капилляров, а макрогеморрагии возникают вследствие деструкции стенки более крупных сосудов. Тем не менее, нельзя исключить индивидуальные отличия пациентов в реактивности тромбоцитарного звена гемостаза [5]. Что касается факторов риска гематурии, то имеющиеся данные на первый взгляд представляются неожиданными. Так, [244] считают, что значимыми факторами риска микрогематурии у женщин являются нефролитиаз и ...курение. Gottlieb M. et al., [144] исследовали зависимость

частоты клинически значимого гидронефроза и микрогематурии от среднего размера камня мочеточника. Микрогематурия имела место у 82% пациентов. Средний размер камня мочеточника при отсутствии гематурии составил 5,7 мм, а при наличии гематурии – 4,7 мм. Причем у пациентов с конкрементами 5 мм и более частота умеренного и тяжелого гидронефроза достигала 49%, тогда как при размерах конкрементов менее 5 мм аналогичная частота не превышала 14% ($p < 0,0001$). Логично, что конкременты больших размеров увеличивают риск обструкции мочеточника и развития гидронефроза, но почему не возникает гематурия? Не вдаваясь в трактовку парадоксальных результатов, авторы приходят к важному выводу: у пациентов без гематурии, как правило, имеются клинически более значимые камни в мочеточнике, что делает их выявление более важным, чем диагностика гематурии. Во многом созвучны выводы [294], которые исследовали взаимосвязь между размером камня и наличием гидронефроза, гематурии и маркерами воспаления. Авторы пришли к заключению, что выраженность боли и гематурии не связаны с размером камня. Одним из объяснений появления гематурии, вне зависимости от размера конкремента, может быть использование пациентами антибиотиков и противовоспалительных препаратов, которые блокируют образование тромбоксана A₂ (TxA₂) в тромбоцитах. В этой связи представляет интерес исследование [313]. Авторы исследовали влияние прекращения антитромбоцитарной терапии (ацетилсалициловой кислоты, 100 мг/день) на развитие гематурии после чрескожной нефролитотрипсии. Оказалось, что длительная макроскопическая гематурия (в среднем 3,5 дня) присутствовала в 25,7% случаев при назначении антитромбоцитарной терапии; тогда как при отсутствии таковой – частота осложнения составила 5,7% (средняя продолжительность гематурии – 2 дня). При анализе логистической регрессии установлено, что, из всех проанализированных факторов риска, использование препаратов ацетилсалициловой кислоты увеличивает риск макроскопической гематурии в 5,8 раза.

Возвращаясь к факту возможной ассоциации гематурии с воспалением, возникает вопрос: может ли воспалительная реакция в МВП быть фактором риска геморрагии и какой механизм в этом случае может ее инициировать? Для корректного анализа данной ситуации необходимо конкретизировать структурные компоненты органа, которые вовлекаются в процесс альтерации. Тщательного анализа при воспалении заслуживает рыхлая волокнистая соединительная ткань, в частности, ее внеклеточный матрикс [307]. По сути, при повреждении конкрементом многослойного эпителия воспалительный процесс развивается в собственной пластинке слизистой оболочки МВП, что и сопровождается разрушением межклеточного вещества. Наибольший интерес представляет состояние коллагеновых волокон базальной мембраны стенки сосуда и периваскулярной соединительной ткани, в которой формируются лейкоцитарные инфильтраты. Основными компонентами базальной мембраны сосудов являются коллаген IV-типа, ламинины, гепарансульфат-протеогликаны и нидоген, а также связанные белки, такие как коллаген XVIII и фибронектин [364, 401]. Данные компоненты регулируют функцию эндотелиальных клеток и перицитов капилляров, тем самым влияют на ангиогенез и поддержание сосудистого гомеостаза [232]. Ремоделирование внеклеточного матрикса (ВКМ) может быть связано с деградацией коллагеновых волокон. Marchand M. et al. [231] исследовали метаболизм коллагена у 81 пациента с хроническими заболеваниями почек и обнаружили высокие уровни содержания в плазме фрагментов разрушенного коллагена III, IV и VI типов. Авторы полагают, что биомаркеры деградации коллагена могут предоставить дополнительную важную информацию к традиционным маркерам почечной функции для оценки прогрессирования хронических заболеваний почек. Возвращаясь к анализу состояния коллагена IV-типа стенки сосудов, как возможной причине гематурии, следует упомянуть исследование [293], в котором подтверждается, что повышенный уровень коллагена IV-типа в сыворотке связан с ремоделированием кровеносных сосудов. Поскольку,

коллаген IV типа взаимодействует с базальной поверхностью эндотелиальных клеток посредством полудесмосом, то возможна модуляция проницаемости сосудистой стенки и диapedез эритроцитов (гематурия) [255]. Известно, что ремоделирование белков матрикса связано с воспалением, при этом в эндотелии возрастала активность киназы, связанной с рецептором ИЛ-1 β (IRAK-1) и повышался синтез цитокин-индуцированного хемоаттрактанта нейтрофилов (CINC-1) [53]. На связь проницаемости стенки капилляров с продукцией провоспалительных цитокинов обращают внимание [349]. Установлено, что ИЛ-1 β усиливает связывание $\alpha 5\beta 1$ интегрина с его лигандом фибронектином, при этом изменяется локализация белка плотного соединения клавина-5 в межклеточных контактах эндотелия. Блокада интегрина $\alpha 5\beta 1$ снижает ИЛ-1 β -индуцированную трансэндотелиальную миграцию моноцитов периферической крови. Эти данные свидетельствуют, что ИЛ-1 β -индуцированное воспаление дестабилизирует плотные соединения между эндотелием, как следствие – повышается проницаемость стенки сосудов, возрастает миграция клеток крови и происходит их накопление в периваскулярном пространстве. Лейкоциты используют области низкой экспрессии матричных белков в базальной мембране сосудов для трансмиграции [198]. Белки внеклеточного матрикса обеспечивают структурную поддержку миграции лейкоцитов и воспроизводят множество сигналов, помогающих выполнять разнообразные функции лейкоцитов во время воспалительной реакции [304]. Так, активация лейкоцитов может быть связана с виментином, коллагеном IV-типа и фибриногеном [386]. В свою очередь, секреция лейкоцитами провоспалительных веществ (прежде всего металлопротеиназ) приводит к ремоделированию внеклеточного матрикса.

Многие исследователи склоняются к мысли, что деградация белков внеклеточного матрикса при воспалении и повышение проницаемости стенки сосудов связаны с активацией матричных металлопротеиназ [52]. Матричные металлопротеиназы обладают способностью, во-первых, активировать продукцию провоспалительных молекул, таких как хемокин

CXCL-8, ИЛ-1 β ФНО- α [363]; во-вторых, способствуют прохождению клеток крови через эндотелиальный слой, благодаря деградации коллагена IV типа и белков плотного соединения [385]. Матриксные металлопротеиназы могут разрушать белки внеклеточного матрикса, например, коллаген, протеогликаны, эластин или фибронектин базальной мембраны сосудов. Исследования [108] позволили обнаружить связь активности ММР-2 и ММР-9 с нарушением структурного гомеостаза сосудистой стенки. Иммунобиологическое исследование продемонстрировало ММР-9-позитивную нейтрофильную инфильтрацию периваскулярного пространства, что сопровождалось выраженной деградацией коллагена IV типа стенки венул. ММР-9 также обеспечивает доступ моноцитов и Т-лимфоцитов к стенке сосудов, причем для прохождения лимфоцитов продуцируются протеиназы моноцитами [267]. На основании изложенных фактов, можно предположить, что если в физиологических условиях существуют механизмы, обеспечивающие транспорт клеток через стенку сосудов, то при развитии воспаления усиление данных механизмов или деструкция стенки сосудов активированными лейкоцитами может проявляться гематурией.

Ранее [187] установлено, что длительная инфузия ангиотензина-II сопровождается развитием интерстициального фиброза как в почках, так и в сердце в результате хемокин-зависимой миграции моноцитов и последующего образования фибробластов. Тубуло-интерстициальное отложение коллагена в почках обусловлено синергизмом эффектов ФНО- α и ангиотензина-II. Активация РАС является фактором риска повышения проницаемости стенки капиляров, что связано со снижением экспрессии белков плотных соединений между эндотелиальными клетками и разрушением коллагена IV типа в базальной мембране посредством металлопротеиназ [310]. В этой связи представляется оправданным использование блокаторов ангиотензин-превращающего фермента на ранних этапах фиброзирования почки. Эффективность такого подхода подтвердили [400]. Использование прямого ингибитора ренина также сопровождалось

снижением уровня профиброгенных цитокинов и окислительного стресса, ограничением интерстициального фиброза и инфильтрации тканей, уменьшением протеинурии. Отложению гломерулярного внеклеточного матрикса может способствовать ФАТ, что связано с активацией протеинкиназы C [158]. Наблюдаемый антифибротический эффект статинов связан с ограничением секреции ФАТ и ингибированием сигнального пути передачи сигнала: протеинкиназа C -TGF β 1. Важным участником процессов фиброзирования почки и деградации коллагена IV типа являются макрофаги. При воспалении моноцитарный хемоаттрактантный белок-1 (MCP-1) привлекает макрофаги в зону альтерации [242]. Важным компонентом провоспалительной передачи сигналов в соединительной ткани является пуриновый рецептор P2X7, который экспрессирован на макрофагах. Участие нуклеотидов в воспалительной реакции подтверждается [271], причем введение блокатора P2X рецептора уменьшало почечный фиброз вследствие регуляции функции Т-лимфоцитов. Sikora J. et al. [330] обнаружили активацию P2X7 рецептора на моноцитах при ишемии/реперфузии почки. В эксперименте было установлено, что через 24 часа после ишемии почки повреждение почечных канальцев сопровождалось повышенной экспрессией P2X7-рецептора на лейкоцитах. Раннее введение блокатора (A438079) данного рецептора после начала ишемии ослабляло выраженность структурных нарушений почек. Полученные результаты свидетельствуют, что ингибирование P2X7-рецептора эффективно снижает повреждение почечных канальцев и провоспалительный ответ.

Представленные выше факты позволяют предположить, что знание молекулярных механизмов регуляции функции клеток крови и ремоделирования внеклеточного матрикса МВП будет способствовать разработке новых терапевтических стратегий, направленных на профилактику гематурии и рецидива пиелонефрита при нефролитиазе, а также позволит ограничить частоту и выраженность развития осложнений, связанных с проведением КЛТ.

ГЛАВА 2

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Дизайн исследования и клиническая характеристика пациентов

Исследование носило проспективный характер, являлось одномоментным, типа «случай-контроль»; уровень доказательности С (IIb). В исследование включены 192 пациента с визуализационными признаками наличия конкрементов в верхней и средней трети мочеточника. Пациенты находились на стационарном лечении в отделении рентген-ударно-волнового дистанционного дробления камней и эндоурологии ДОКТМО с 2020 по 2022 год (Таблица 2.1). Средний возраст когорты больных – $55,5 \pm 1,9$ года (min-max 20,0-79,0 лет); наибольший контингент больных представлен в возрастном диапазоне 40-70 лет (Рисунок 2.1). В 1-й группе (n=118) с локализацией конкрементов в верхней трети мочеточника представлено 65 (55,1%) мужчин, средний возраст – $54,5 \pm 1,7$ года (min-max 27,0-79,0 лет); наибольшая когорта пациентов находилась в возрастном диапазоне 40-70 лет – 39 (65,0%) мужчин (Рисунок 2.2). Также обследованы 53 (44,9%) женщины, средний возраст $51,9 \pm 2,3$ года (min-max 21,0-77,0 лет); в возрастном диапазоне 40-70 лет – находилась 33 (62,3%) женщины. Во 2-ю группу (n=74) с локализацией конкрементов в средней трети мочеточника включено 37 (50,0%) мужчин, средний возраст – $57,2 \pm 2,5$ года (min-max 31,0-79,0 лет); в возрастном диапазоне 40-70 лет находилось 15 (40,5%) мужчин (Рисунок 2.3). Также обследованы 37 (50,0%) женщин, средний возраст $52,5 \pm 2,6$ года (min-max 21,0-76,0 лет); в возрастном диапазоне 40-70 лет – находилось 9 (24,3%) женщин. В 1-й группе средний размер конкремента составил $11,2 \pm 0,6$ мм (min-max 6,0-30,0 мм); наиболее часто (46 пациентов, 39,1%) встречались конкременты от 11,0 до 15,0 мм. Во 2-й группе – средний размер конкремента составил $12,5 \pm 1,3$ мм (min-max 8,0-28,0 мм); наиболее часто (37 пациентов, 50,0%) встречались конкременты размером 8,0-10,0 мм.

Таблица 2.1

**Частота выявления анализируемых показателей у пациентов с
локализацией конкрементов в верхней (1-я группа) и
средней (2-я группа) трети мочеточника**

Показатели	Группы сравнения		
	Всего случаев	1-я группа	2-я группа
Пол:	192	118 (61,5±3,5%)	74
Мужчины	102	65 (55,1±4,6%)	37(50,0±5,8%)
Женщины	90	53 (44,9±4,9%)	37 (50,0±5,8%)
Возраст:			
<65 лет	146	92 (78,0±3,8%)	54 (73,0±5,2%)
>65 лет	46	26 (22,0±3,8%)	20 (27,0±5,2%)
Размер конкремента			
6-7 мм	32	22 (18,6±3,6%)	10 (13,5±4,0%)
8-10 мм	73	36 (30,5±4,2%)	37 (50,0±5,8%)
11-15мм	61	46 (39,1±4,5%)	15 (20,3±4,7%)
16-20мм	15	9 (7,6±2,4%)	6 (8,1±3,2%)
>20 мм	11	5 (4,2±1,8%)	6 (8,1±3,2%)
Обструкция МВП			
-полная	132	98 (83,0±3,4%)	34 (45,9±5,8%)
-частичная	49	12 (10,2±2,8%)	37 (50,0±5,8%)
-отсутствует	11	8 (6,8±2,3%)	3 (4,1±2,3%)
Лейкоцитоз ($>9 \times 10^9 / \text{л}$)			
-имеет место	75	66 (55,9±4,6%)	9 (12,2±3,8%)
-отсутствует	117	52 (44,1±4,6%)	65 (67,8±3,8%)
Артериальная гипертензия:			
-имеет место	49	43 (36,4±4,4%)	37 (50,0±5,8%)
-отсутствует	143	75 (63,6±4,4%)	37 (50,0±5,8%)
Гипергликемия:			
-имеет место	37	18 (15,3±3,3%)	9 (12,2±3,8)
-отсутствует	155	100 (84,7±3,3%)	65 (87,8±3,8%)
Инфекция МВП:			
-выявлена	34	23 (19,5±3,6%)	11 (14,9±4,1%)
-отсутствует	158	95 (80,5±3,6%)	63 (85,1±4,1%)
Использование НПВП до госпитализации:			
-имело место	140	80 (67,8±4,3%)	60 (81,1±4,6%)
-не применялись	52	38 (32,2±4,3%)	14 (18,9±4,6%)

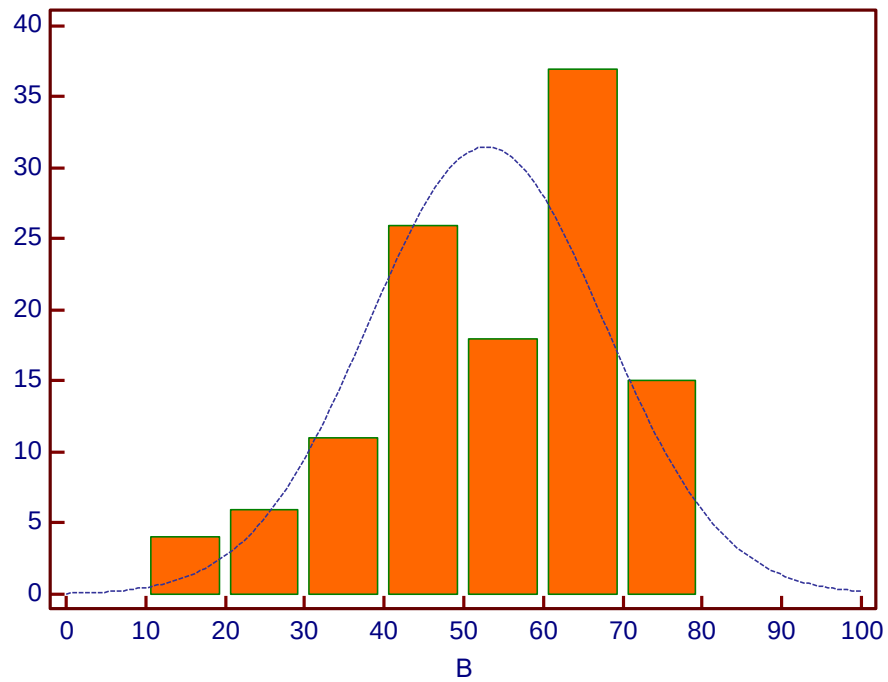


Рис. 2.1. Частотное распределение по возрасту обследованной когорты пациентов с нефролитиазом.

Примечание. По оси абсцисс - возраст в годах, по оси ординат - количество пациентов соответствующего возраста.

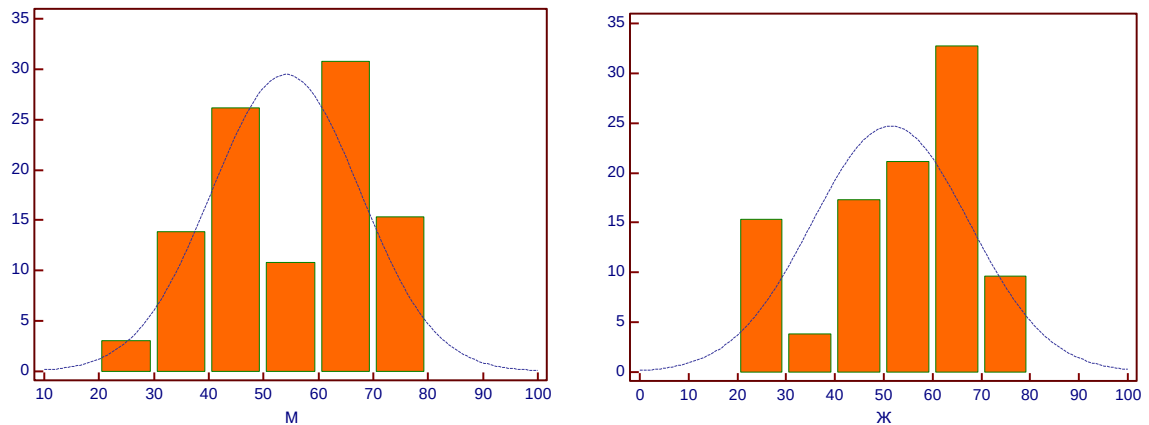


Рис. 2.2. Гистограммы, демонстрирующие распределение возраста мужчин и женщин с наличием конкрементов в верхней трети мочеточника.

Примечание. По оси абсцисс - возраст в годах, по оси ординат - относительная частота регистрации пациентов с соответствующим возрастом

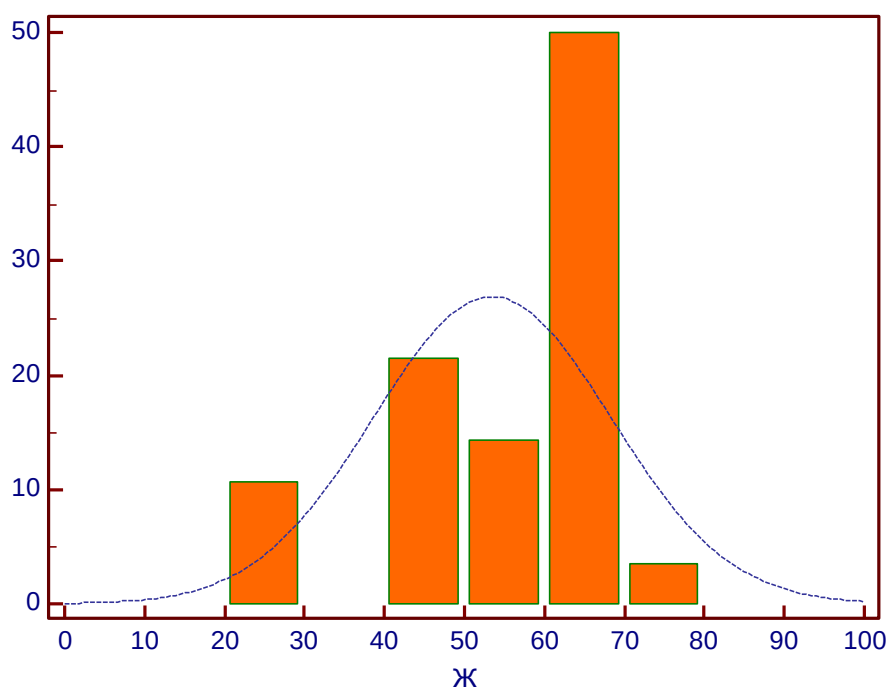
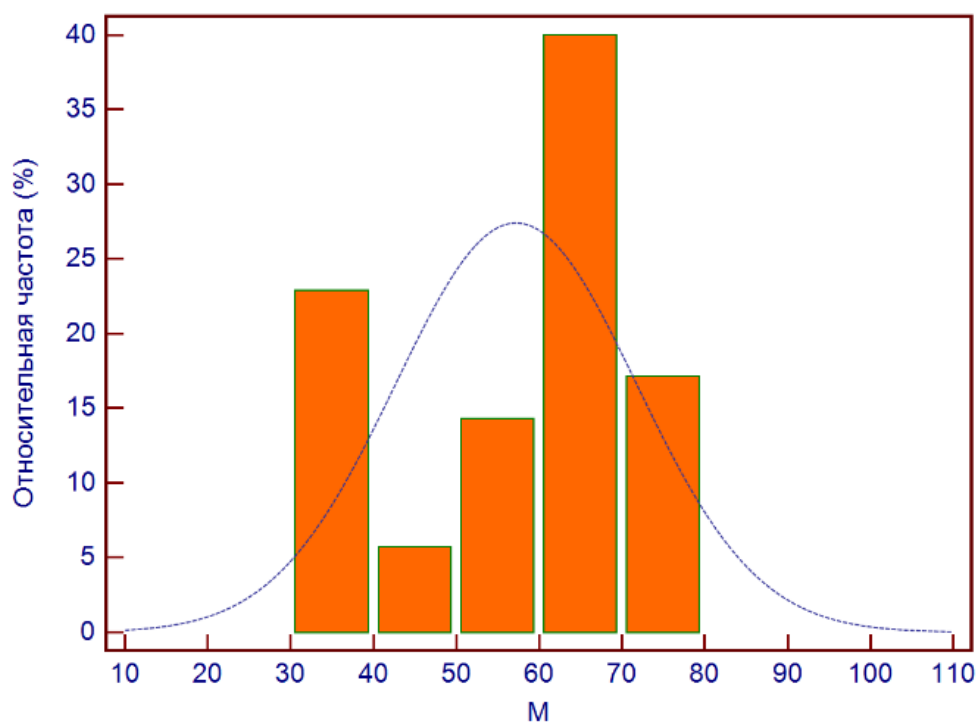


Рис. 2.3. Гистограммы, демонстрирующие распределение возраста мужчин и женщин с наличием конкрементов в средней трети мочеточника.

Примечание. По оси абсцисс - возраст в годах, по оси ординат - относительная частота регистрации пациентов с соответствующим возрастом

Межгрупповые сопоставления показали, что средний размер конкрементов, возраст пациентов, гендерная характеристика когорты больных статистически значимо не различались ($p>0,05$). В 1-й группе полная обструкция мочеточника обнаружена у 98 (83,0%) человек и частичная – у 12 (10,2%) человек, у 8 пациентов сохранялся пассаж мочи. Во 2-й группе нарушение оттока мочи имела место, соответственно, у 34 (45,9%) и 37 (50,0%) пациентов. Нарушение оттока мочи может рассматриваться как фактор риска пиелонефрита. Подтверждением этой гипотезы может быть лейкоцитоз, отражающий наличие системной воспалительной реакции; у пациентов 1-й группы данный признак проявлялся у 66 (55,9%) человек, тогда как во 2-й группе только у 9 (12,2%) человек. Инфекция мочевых путей (ИМП) выявлена в равной степени в когорте больных с локализацией конкрементов в верхней и средней трети мочеточника, соответственно, у 23 (19,5%) пациентов 1-й группы и у 11 (14,9%) пациентов 2-й группы. Основными патогенами, обнаруженными в моче были *Enterococcus faecalis* (36,4%), *Klebsiella pneumonia* (27,3%) и *Escherichia coli* (18,2%).

При нефролитиазе с целью обезболивания пациентам назначались НПВП; в этой связи целесообразно было сопоставить частоту применения соответствующих лекарственных средств в обеих группах, поскольку при ингибировании ЦОГ не только ограничивается острая воспалительная реакция в слизистой МВП, но и воспроизводится антиагрегантный эффект провоцирующий гематурию. Оказалось, что до госпитализации в 1-й группе 80 (67,8%) человек использовали НПВП; во 2-й группе – 60 (81,1%) человек; различия в частоте использования НПВП у пациентов с локализацией конкрементов в верхней и средней трети мочеточника не выявлялись ($P=0,065$). У 43 (36,4%) обследованных пациентов 1-й группы с НЛТ выявлена артериальная гипертензия (АГ). Возраст пациентов составил $58,5\pm 1,6$ года. АГ I степени имела место у 33 (76,7%) пациентов, АГ II степени – у 8 (18,6%) и АГ III степени – у 2 (4,7%) пациента. Во 2-й группе АГ обнаружена у 37 (50,0%) пациентов; средний возраст $56,9\pm 2,0$ года. АГ I

степени имела место у 29 (78,4%) пациентов. АДс составило $137,9 \pm 2,5$ мм.рт.ст. (95% ДИ 135,4-140,3 мм.рт.ст.) и ДАД – $87,9 \pm 2,2$ мм.рт.ст. (95% ДИ 85,4-92,0 мм.рт.ст.). По заключению эндокринолога на момент госпитализации у 18 ($15,3 \pm 3,3\%$) пациентов 1-й группы имела место гипергликемия натощак $7,5 \pm 0,2$ ммоль /л (95% ДИ 7,0-8,0 ммоль/л); во 2-й группе гипергликемия обнаружена у 9 (12,2%) пациентов, которая находилась в диапазоне $7,0 \pm 0,3$ ммоль /л (95% ДИ 6,5-7,7 ммоль/л).

Критерии включения в исследование:

- наличие информированного согласия пациента о включении его данных в исследование;
- пациенты обоих полов в возрасте ≥ 18 лет;
- наличие одного и более конкрементов в верхней и средней трети мочеточника;
- размер конкремента ≥ 10 мм при неэффективной литокинетической терапии (ЛКТ) в течение 7-9 суток;
- размер конкрементов менее ≤ 10 мм при отсутствии эффекта ЛКТ на протяжении 7-9 суток и желании пациента прекратить боль, связанную с трафиком конкремента.

Критерии исключения:

- отказ больного от участия в исследовании и последующего наблюдения;
- прием антиагрегантов и статинов в течение последних 6 месяцев;
- коагулопатия, тромбоцитопения, менструация;
- острый пиелонефрит;
- нефроптоз, стриктура мочеточника;
- онкологическая патология;
- аневризма аорты, наличие стентов коронарных сосудов; нарушение сердечной деятельности (искусственный водитель ритма, мерцательная аритмия, сердечно-легочная недостаточность);
- острые и хронические воспалительные заболевания другой локализации.

Группа контроля включала 20 здоровых лиц, у которых при диагностическом обследовании не выявлены клиничко-лабораторные признаки сердечно-сосудистой и урологической патологии. Контрольная группа была сопоставима по возрасту с таковой при наличии нефролитиаза.

2.2. Клиничко-инструментальное обследование больных с нефролитиазом.

Исследование проводили на момент госпитализации пациентов в урологический стационар, в первые сутки (через 1-3ч и 24ч), через 48ч и 72ч, а также через 7-9 суток после проведения КЛТ. Все больные были информированы об исследованиях и плане лечения; получено письменное согласие на участие в исследовании. Учитывали демографические факторы: пол, возраст; оценивали анамнез аболевания и предыдущие эпизоды нарушения уродинамики. Анализировали семейный анамнез МКБ; наличие воспалительных заболеваний мочевой системы и прием лекарственных препаратов; уточняли коморбидный фон пациентов, а именно наличие ИБС, гипертонической болезни и СД.

Локализацию и размер конкрементов определяли при ультразвуковом исследовании, спиральной компьютерной томографии, обзорной урографии, рентген-контрастном исследовании, экскреторной урографии и ретроградной уретеропиелогграфии. Наиболее информативным методом диагностики МКБ является визуализацию конкрементов при помощи спиральной компьютерной томографии (64 срезовый аппарат КТ Philips, Brilliance 16). Использование данного метода позволяло: конкретизировать локализацию, размеры, плотность и количество конкрементов; определить расстояние от кожи до камня; уточнить информацию об особенностях топографической анатомии, что повышает эффективность КЛТ и снижает риск интраоперационных осложнений. Ультразвуковое исследование (УЗИ) почек, мочевого пузыря и мочеточников проводилось ультразвуковым сканнером Philips HD7 с частотой сканирования 3,5-7,5 МГц. Выполнение УЗИ мочевыводящих путей и/или обзорной урографии (рентгенографию

мочевыделительной системы) также использовалось в качестве метода диагностического контроля отхождения камня или наличия фрагментов конкрементов в послеоперационном периоде [19].

Для объективизации оценки хронического обструктивного пиелонефрита пользовались общепризнанными критериями пиелонефрита (Таблица 2.2). Диагноз фазы обострения ХОПН был основан на присутствии, по меньшей мере, одного из трех основных симптомов (лихорадка, боль в реберно-позвоночном углу, ИМП).

Таблица 2.2

Критерии оценки хронического обструктивного пиелонефрита

№ п/п	Исследования	Признаки	Ремиссия	Рецидив
1.	Обще-клинические симптомы:	-повышение температуры тела; -артралгии, миалгии; -лихорадка в ночное время; -повышение АД	+ — + +	+ + — —
2.	Местные симптомы:	-боль и напряжение мышц поясничной области; -дизурия; -никтурия	+ + +	+ + +
3.	Общий анализ крови:	- лейкоцитоз; - смещение лейкоцитарной формулы влево; -увеличение СОЭ	+ + +	+ ± ±
4.	Общий анализ мочи:	-лейкоцитурия; -протеинурия; -эритроцитурия; -цилиндрурия;	+ — — +	+ + + +
5.	Биохимический анализ крови	-повышение уровня С-реактивного белка.	—	+
6.	Ультразвуковое исследование почек	- увеличение размеров почки с наличием конкремента; -увеличение толщины паренхимы; -расширение чашечно-лоханочной системы	— + —	+ + +

Критериями воспаления являлись лейкоцитоз, сдвиг лейкоцитарной формулы влево и уровень СРБ. Лейкоцитурия или бактериурия являлись вспомогательными критериями, подтверждающими наличие ИМП. В фазе

ремиссии (латентного течения) у пациентов отсутствовали клинические синдромы хронического пиелонефрита, однако, могла сохраняться лейкоцитурия и диагностически не значимая бактериурия; в общем анализе крови отсутствовали изменения, характеризующие острое воспаление.

2.3. Методы консервативного и хирургического лечения пациентов с наличием конкрементов в мочеточнике.

Стандартная ЛКТ включала НПВП (диклофенак натрия, 100-150 мг/сут), селективный α_{1A} -адреноблокатор (тамсулозин, 0,4 мг/сут), антибиотики и спазмолитики. Несмотря на множество работ, доказывающих эффективность консервативной ЛКТ, она остается предметом дискуссий из-за появления рандомизированных многоцентровых исследований, в которых преимущества такой терапии не были доказаны/ В последнем метаанализе Кокрейновского сообщества доказана эффективность селективных α_{1A} -адреноблокаторов, только если размер конкремента превышает 5 мм [67].

Техника выполнения антеградной контактной уретеролитотрипсии. Основанием для КЛТ служила неэффективность консервативной медикаментозной терапии, а также размеры конкрементов более 6 мм, что определяло низкую вероятность самостоятельного их отхождения. К преимуществам антеградного дробления камней относят: надежный доступ к почке, возможность использования инструментов большего размера, широкий просвет мочеточника выше уровня камня, отсутствие грануляций в области слизистой мочеточника при доступе к камню, низкий риск дистальной миграции фрагментов при «вколоченном» характере конкремента, возможность экстракции фрагментов конкремента без риска повреждения и отрыва мочеточника [7, 13, 15]. Всем пациентам КЛТ выполняли под эпидуральной анестезией с внутривенной седацией в положении на животе с использованием ригидного нефроскопа 24-26Fr Karl Storz, Германия (Операционный тубус 27293BD, широкоугольная оптика прямого видения Hopkins 6° 27292AMA), эндомата Endomat LC Karl Storz

203303 20 (Германия), осветителя LED Nova 100 Karl Storz 201610 20 (Германия), телевизионного блока Telecam DX II Karl Storz 202330 20 (Германия). С целью минимизации времени операции и стандартизации почечного доступа после выполнения ретроградной уретеронефрографии конкременты мочеточника преднамеренно смещались из средней или верхней трети мочеточника в лоханку почки с помощью ригидного уретерореноскопа R.Wolf 8703.536 (Германия), 43cm, 8,5Fr, после чего в обеих группах для подачи контрастного вещества и ирригационной жидкости в лоханку проводился мочеточниковый катетер 8-10Fr. Фистулизация проводилась после репозиции под комбинированным ультразвуковым и флюороскопическим контролем. Создание фистулы во всех случаях проводилось стандартно пошагово с помощью телескопических бужей Алкена Karl Storz 27290A (Германия) через сосочки малых чашечек нижнего или среднего бокала.

Для создания транскутанного доступа использовались: С-дуга Philips BV Pulsera, rel.2.3 (Голландия), ультразвуковые сканнеры Siemens Sonoline Adara 5927194-LH-700(Германия) и Philips HD7(ФРГ). Выбор места доступа основывался на геометрической анатомии с целью удалить конкремент (конкременты через один доступ). После визуализации камня(камней) в полости МВП выполнялась стандартная литотрипсия и(или) литоэкстракция. Для фрагментации конкрементов использовались: электроимпульсный литотриптер «Уролит» (ООО «МедЛайн», Россия), ультразвуковой литотриптор KARL STORZ Calculase II 27750220-1(Германия), гольмиевый лазерный литотриптор KARL STORZ Calculase II 27750220-1(Германия) с диаметром лазерного волокна 600 мкм или их комбинация. Режимы дробления зависели от плотности и размера конкремента; плотность камней оценивали в ед. Хоунсфилда от 300 до 1360 HU при компьютерной томографии - спиральный компьютерный томограф Philips «Cleveland» (Германия). Фрагменты удалялись с помощью экстрактора или током жидкости. После ревизии полостной системы почки на наличие

резидуальных фрагментов камня устанавливались нефростома 16-18Fr, а, при необходимости, стент мочеточника антеградно. Нефростома выдерживалась до 3-7 суток, стент до 3-20 суток (по необходимости). Среднее время основных этапов операции составило в 1-й группе 29,6 (15 - 54) мин и во 2-й группе – 35,2 (20-135) мин. Во всех случаях использовался один пункционный доступ. Необходимость повторной операции по удалению резидуальных камней возникла у 4 (3,4%) пациентов 1-й группы и 4 (5,4%) во 2-й группе. Послеоперационное обострение пиелонефрита с повышением температуры отмечено в 1-й группе у 14 (11,9%) пациентов и во 2-й группе у 16 (21,6%) больных. Гемотрансфузии в послеоперационном периоде не проводились. По эффективности проведенного хирургического лечения группы практически не отличались: 95,9% против 95,7%, соответственно в 1-й и 2-й группах.

2.4. Лабораторные исследования

На момент госпитализации, а также через 1-3ч, 24ч, 48ч, 72ч и 7 суток после КЛТ у больных проводили анализ параметров биохимии крови и водно-электролитного баланса. При анализе гемограмм (гемоанализатор) определяли количество форменных элементов, лейкоцитарную формулу и абсолютное количество различных видов лейкоцитов. При анализе реакции организма на развитие воспаления оценивали СОЭ и уровень С-реактивного белка. Оценивали уровень общего белка и альбуминов (фотометрический метод). О выраженности катаболических процессов судили по показателям обмена азота – содержанию мочевины и креатинина (фотометрический метод). Кроме того, оценивали концентрацию глюкозы в крови; наличие гипергликемии констатировалось при значениях $>6,1$ ммоль/л.

Концентрацию глюкозы оценивали глюкозооксидантным методом (интенсивность окраски продукта реакции измерялась фотометрическим методом при длине волны 500 нм на спектрофотометре). Для оценки глубины метаболических нарушений липидного обмена проводили исследования

концентрации общего холестерина, триглицеридов, липопротеинов высокой и низкой плотности (ЛПВП и ЛПНП) (колориметрический фотометрический метод). Для микробиологического исследования мочи использовали автоматический бактериологический анализатор. Для посева использовали 1 µl мочи; оценка результатов проводилась через 48 ч инкубации. Количество бактерий $\geq 10^5$ CFU/mL в утренней средней порции мочи рассматривалось как наличие инфекций мочевыводящих путей.

Для оценки показателей плазменного гемостаза использовался метод оптической коагулометрии (коагулометр К-3002 OPTIC, Польша). Верификация степени гематурии основывалась на общем анализе мочи, согласно которому микрогематурия характеризуется наличием 3-х и более эритроцитов в поле зрения. Видимая гематурия констатируется, если количество эритроцитов (не вылуженных) занимает 1/2 поля зрения и больше. Для градации макрогематурии подсчитывать по Нечипоренко количество тысяч эритроцитов в 1 мл мочи]. Лейкоцитурию определяли при наличии 11 и более лейкоцитов в поле зрения при микроскопии осадка мочи; при этом выделяли легкую степень – 11-15 л/пз, среднюю – 16-25 л/пз и тяжелую степень лейкоцитурии более 25 л/пз.

Для оценки процесса рекрутирования лейкоцитов из сосудистого русла в ткани рассчитывали количество циркулирующих в крови ТЛА. С этой целью проводили микроскопию мазков крови, окрашенных по методу Паппенгейма; число ТЛА рассчитывали в процентном отношении на 100 клеток (в %). Формирование ТЛА моделировалось *in vitro* при инкубации крови с агонистами в концентрации EC₁₀.

2.5. Исследование агрегации тромбоцитов.

Протокол исследования агрегационной способности Тц соответствует Европейским рекомендациям по стандартизации агрегометрии [205, 81]. Исследование Тц проведено на периферической венозной крови; в качестве

антикоагулянта использовался раствор цитрата натрия в объемном отношении 9:1. Богатую тромбоцитами плазму (БТП) получали центрифугированием образцов крови при $200-250 \times g$ в течение 10 минут при температуре $+21 - +24^{\circ}\text{C}$. Количество Тц в исследуемом образце соответствовало 200.000 ± 50.000 клеток в 1,0 мкл. Исследование агрегации Тц (АТц) проводили турбидиметрическим методом на анализаторе ChronoLog (USA). Регистрацию индуцированной агрегации проводили в течение 7 минут при температуре 37°C и перемешивании мешалки со скоростью 1000 об/мин.

Суспензию Тц использовали в качестве модели для оценки функциональной активности α_2 -адренорецептора, пуриновых $P2X_1$ -рецептора и $P2Y$ -рецепторов, аденозинового $A2A$ -рецептора, ангиотензинового AT_1 -рецептора, TxA_2 -рецептора, ФАТ-рецептора и $GPVI$ -рецептора к коллагену IV типа.

Представленный выбор рецепторов обусловлен следующими соображениями:

1. Сигнализация α_2 -адренорецептора связана с Gi- белком и обеспечивает увеличение концентрации Ca^{2+} в Тц и лейкоцитах [46]. Известно, что адреналин участвует в тромбогенезе и гемостазе [32]. Повышение уровня катехоламинов в крови является фактором риска развития острой воспалительной реакции при мочекаменной болезни. Реактивность α_2 -адренорецептора сохраняется при длительном назначении блокаторов ЦОГ [332]. Наличие гиперреактивности α_2 -адренорецептора отражает роль физических и психических стрессоров в активации Тц [192]. Доказана возможность сопряженности внутриклеточных сигнальных путей, связанных с α_2 -адренорецептором и другими G-ассоциированными рецепторами [225]. Таким образом, исследование активности α_2 -адренорецептора позволяет мониторить влияние на функцию Тц и лейкоцитов симпатoadреналовой системы (САС), активность которой возрастает при нефролитиазе и хирургическом стрессе.

2. Пуриновый P2X-рецептор представляет собой управляемый АТФ ионный канал, который обеспечивает повышение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} в Тц и лейкоцитах. Агонист АТФ является локальным фактором, который накапливается в плотных гранулах Тц, поддерживает аутокринную стимуляцию Тц и обеспечивает паракринную активацию лейкоцитов. Внеклеточный аденозинтрифосфат (АТФ), считается молекулой DAMP (danger-associated molecular pattern DAMP), которая выделяется во внеклеточную среду во время воспаления поврежденными клетками, лейкоцитами и активированными Тц [356]. В этой связи представляет интерес пуринергическая передача сигналов в регулировании функции нейтрофилов [383]. Целесообразность анализа P2X-рецептора обусловлена его участием в тромбогенезе путем активации $\alpha\text{IIb}\beta 3$ интегрина [51]; апоптозе Тц [390]; модуляции иммунных ответов на бактериальные инфекции [206, 87]; регуляции секреции провоспалительных цитокинов Тц [392]; модуляции активности матриксной металлопротеиназы-9 (ММР-9), следствием чего может быть деградация белков плотных контактов (ZO-1 и окклюдина) [397, 410]; интеграции процессов тромбогенеза и воспаления [275]; усилении сигнальных и функциональных событий в клетках крови [174]. Таким образом, оценка активности P2X₁-рецептора открывает возможность анализировать механизмы кооперации клеток крови и патогенеза геморагии, гематурии и пиелонефрита после КУЛТ.

3. Пуриновые P2Y-рецепторов (P2Y₁-рецептор P2Y₁₂-рецептор) связаны с Gi- и Gq-белком, сигнализация с которых обеспечивает повышение концентрации Ca^{2+} в клетках крови, следствием чего является индукция агрегации Тц и активация лейкоцитов. АДФ – является локальным фактором, который накапливается в плотных гранулах Тц, поддерживает аутокринную стимуляцию Тц. и обеспечивает паракринную активацию лейкоцитов. Целесообразность исследования активности пуриновых P2Y рецепторов при нефролитиазе, консервативном и хирургическом лечении контингента больных с МКБ продиктована возможностью: анализа тяжести

гипоксии/ишемии тканей, механизмов гемостаза, оценки альтерации эндотелия активными формами кислорода в процессе ишемии/реперфузии почки [284]; исследования механизмов ингибирования и восстановления функции нейтрофилов, а также прогнозирования тромбогенного эффекта коллагена, связанного с активацией интегринов $\alpha 2\beta 1$ и $\alpha \text{IIb}\beta 3$ [115, 401].

4. Аденозиновый A2A-рецептор, связан с G-белком, передает сигнализацию через стимулирующий G-белок (G_s -), что приводит к активации аденилатциклазы и повышению уровня циклического аденозинмонофосфата (цАМФ), следствием чего может быть ингибирование агрегации [85]. Активность A2-рецепторов рассматривается как чувствительный индикатор гипоксии/ишемии и воспаления в тканях [371]. Установлено, что: аденозин ингибирует транспорт оксалатов в эпителии кишечника путем снижения поверхностной экспрессии анионного обменника (PAT1) [176]; аденозин-опосредованная стимуляция A2-рецептора является основным механизмом ишемического preconditionирования [366]; при активации A2A-рецептора снижается экспрессия тромбоспондина (TSP-1) в эндотелиальных клетках [127]; стимуляция A2-рецепторов на клетках крови сопровождается снижением активности нейтрофилов, секретирующих ФАТ [118] и накоплением макрофагов в рыхлой волокнистой соединительной ткани [149]. Доказано ингибирующее влияние A2A-рецептора на передачу сигналов с GPVI-рецептора в Тц [85]. Таким образом, исследование аденозиновых A2A-рецепторов Тц позволяет контролировать эффективность антиагрегантных и противовоспалительных механизмов, лимитирующих тромбогенез и развитие острого пиелонефрита после КУЛТ.

5. Ангиотензиновый AT-рецептор представлен на плазмалемме Тц и лейкоцитов может индуцировать агрегацию и миграцию лейкоцитов посредством активации протеинкиназы C (ПКС), стимулируемой через G_q -белок сигнальный путь [229, 406, 351]. Доказано модулирующее влияние AT_1 -рецептора на воспалительную реакцию, поскольку возрастает адгезия лейкоцитов к эндотелию и проницаемость стенки сосудов

микроциркуляторного русла [86, 311]. Ан-2 является триггером воспалительной реакции в эндотелии [75]; обеспечивает активацию Т-клеток и продукцию ИЛ-2 [360]. Исследование АТ₁-рецептора позволяет мониторить регуляцию активности синтазы оксида азота (eNOS) [314, 284]; генерацию активных форм кислорода (АФК) в стенке сосудов [164]; Доказано существование функциональной перекрестной связи между сигнализацией АТ₁-рецептора и другими сигнальными путями [183]. Стимуляция АТ₁-рецептора сопровождается потенцированием коллаген-индуцированной АТц, вследствие кластеризации GPVI-рецептора [270]. Таким образом, исследование АТ₁-рецептора позволяет мониторить регуляцию клеток крови, в частности, при активации РАС после КЛТ.

6. Фактор активации Тц (ФАТ) - фосфолипидный медиатор, обеспечивающий стимуляцию Тц и лейкоцитов (аутокринный механизм), а также взаимодействие клеток крови при реализации воспаления [372, 266]. Агрегация Тц развивается при активации Gq-белка, связанного с ФАТ-рецептором [277]. ФАТ является триггером острой воспалительной реакции, поскольку стимулирует активность нейтрофилов [348]; считается специфическим регулятором механизма, который обеспечивает защиту организма от бактериальных инфекций [339]; содержание ФАТ в плазме рассматривается как информативный биомаркер воспаления [196, 222]. Исследование ФАТ также представляется оправданным, поскольку (а) активация соответствующего рецептора на клетках крови сопровождается повышением экспрессии Р- и L-селектинов, следствием чего является формирование тромбоцитарно-лейкоцитарных агрегатов (ТЛА), которые обеспечивают рекрутирование лейкоцитов из сосудистого русла [142]; (б) ФАТ-рецептор на эндотелиальных клетках регулирует проницаемость монослоя эндотелия и адгезию лейкоцитов [252, 277], причем воспаление повышает чувствительность данного рецептора [408]; (в) ФАТ-рецептор модулирует функциональную активность нейтрофилов, что проявляется высвобождением содержимого гранул (миелопероксидазы,

лактатдегидрогеназы, лактоферрина, эластазы и матриксной металлопротеиназы-9), следствием чего является не только альтерация микроорганизмов, но и деградация внеклеточного матрикса в слизистой мочеточника [156, 170]; (г) ФАТ-рецептор контролирует высвобождение внеклеточной ловушки нейтрофилов (Neutrophil extracellular trap, NET), которое зависит от гликолиза, митохондриального синтеза АТФ и пуринергической передачи сигналов [289]; в этой связи, анализ взаимодействия ФАТ-рецептора и P2X-рецептора позволяет прогнозировать эффект потенцирования функциональной активности нейтрофилов. Приведенные факты обосновывают целесообразность исследования активности ФАТ-рецепторов для анализа механизмов компенсаторной и адаптационной реакции лейкоцитов при развитии острого пиелонефрита после КЛТ.

7. Сигнализация ТхА2-рецептора связана с Gq- и G₁₃- белками, что сопровождается повышением внутриклеточной концентрации Ca²⁺ в Тц и лейкоцитах. Активность ТхА2-рецептора является индикатором степени ингибирования активности ЦОГ [211]. Установлена зависимость агрегации Тц и функциональной активности лейкоцитов от активности ТхА2-рецептора [29]. При блокаде ЦОГ доказано взаимодействие ТхА2-рецептора и α₂-адренорецептора с целью компенсаторного повышения агрегации Тц [250]; доказана взаимосвязь ТхА2-рецептора и ФАТ-рецептора при координации процессов, контролирующих коагуляцию крови и развитие воспаления [222]. Приведенные факты свидетельствуют, что ФАТ-рецептор находится на пересечении множества сигнальных путей, регулирующих различные функции клеток крови. В этом контексте, целесообразность исследования активности ТхА2-рецепторов продиктована не только необходимостью оценки степени ингибирования ЦОГ (индивидуальная резистентность пациента к НПВП), но и возможностью верификации механизмов, регулирующих гемостаз и развитие воспалительной реакции при назначении и отмене НПВП.

8. Активность GPVI-рецептора отражает процесс ремоделирования (синтез и деградацию) молекул внеклеточного матрикса, которые представлены в базальной мембране стенки сосудов и уротелия, что предопределяет диапедез эритроцитов в мочу (гематурия). Интерес к GPVI-рецептору связан с его участием в адгезии и активации Тц во время тромбогенеза, причем агрегация Тц обусловлена активацией тирозинкиназы. Совместное взаимодействие молекул $\alpha 2\beta 1$ и GPIb /V/IX генерирует временные пики внутриклеточного Ca^{2+} , которые усиливают GPVI-зависимую передачу Ca^{2+} сигналов [288]. Доказано влияние коллагена IV-типа на функциональную активность и взаимодействие Тц, лейкоцитов и эндотелия. Данный эффект может быть связан с: активацией Тц и секрецией пуриновых нуклеотидов, цитокинов [42, 238]; ингибированием функции лейкоцитов [115]; повышением проницаемости эндотелия [231]; трансмиграцией лейкоцитов через базальную мембрану стенки сосудов МЦР [381, 199]. Доказательства влияния коллагена на функцию лейкоцитов впервые представили [115]. Лейкоциты имеют рецепторы к коллагену [199], что позволяет функциональному ансамблю тромбоциты-эндотелий сосудов регулировать экстравазацию клеток крови и модулировать их активность во время воспалительной реакции [304]. На лейкоцитах экспрессированы интегрины $\alpha \text{L}\beta 2$, $\alpha \text{M}\beta 2$ и $\alpha \text{X}\beta 2$, позволяющие распознавать разные типы коллагенов, что необходимо для их трансмиграции через БМ стенки сосудов МЦР [381, 199]. Установлено, что внутриклеточная сигнализация, связанная с активацией GPVI-рецептора, регулирует функцию эндотелиальных клеток и перицитов в стенке капилляров и венул [210, 231]. Приведенные факты обосновывают целесообразность исследования активности GPVI-рецептора для анализа альтерации гисто-гематического и гисто-уринального барьеров, что предопределяет диапедез эритроцитов и лейкоцитов; механизмов тромбогенеза; прогнозирования эффективности регенерации слизистой МВП и исхода воспалительной реакции.

Для анализа состояния рецепторного аппарата Тц использовались следующие агонисты.

Адреналин (Epinephrine bitartrate) - агонист адренорецепторов (α_1 -, α_2 -адренорецепторов). Фирма производитель Sigma-Aldrich Chemie GmbH Merck KGaA (Германия). Продукт в каталоге - PHR1509; CAS Number: 51-42-3. Эмпирическая формула (Hill Notation): $C_9H_{13}NO_3 \cdot C_4H_6O_6$; молекулярный вес: 333,33 г/моль. Приготовление маточного раствора: во флакон с адреналином вносят 8,0 мл 0,9% NaCl ($t = + 20^\circ C$) и в течение 10 минут периодически перемешивают. Полученный маточный раствор адреналина содержит 500 мкг/мл, который хранят при $t = +2 + 8^\circ C$; раствор может быть использован в течение 1 месяца. Обоснование возможных доз агониста для изучения функциональной активности α_2 -адренорецептора Тц представлен в публикации [30].

АТФ (Adenosine 5'-triphosphate (ATP) disodium salt hydrate) – пуринергический агонист P2X-рецептора; повышает активность Ca^{2+} -активируемых K^+ -каналов; субстрат для АТФ-зависимых ферментных систем. Фирма производитель Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Германия). Продукт в каталоге – A1852. CAS Number: 34369-07-8. Эмпирическая формула (Hill Notation): $C_{10}H_{14}N_5O_{13}P_3Na_2 \cdot x H_2O$; молекулярный вес: 551,14 г/моль. Милимолярный коэффициент экстинкции раствора АТФ при pH 7,0 составляет 14,9- 15,6 при максимальной длине волны поглощения 259 -260нм. Обоснование возможных доз агониста для изучения функциональной активности P2X- рецепторов Тц представлен в публикации [301].

АДФ (Adenosine 5'-diphosphate sodium salt) - адениннуклеотид, который связывается с пуриновыми рецепторами Тц ($P2Y_1$, $P2Y_{12}$). Фирма производитель Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Германия). Продукт в каталоге - A2754. CAS Number: 20398-34-9. Эмпирическая формула (Hill Notation): $C_{10}H_{15}N_5O_{10}P_2$; молекулярный вес: 427.20. Милимолярный коэффициент экстинкции раствора натриевой соли АДФ при pH 7,0 составляет 15,4 при максимальной длине волны поглощения 259 нм. Маточный раствор АДФ (1

мг/мл) получают введением во флакон 2,0 мл 0,9% NaCl ($t = + 20^{\circ}\text{C}$). Натриевая соль АДФ является стабильной в растворе в течение нескольких месяцев при хранении в условиях -20°C и pH 7,0. Обоснование возможных доз агониста для изучения функциональной активности P2Y_1 и P2Y_{12} -рецепторов Тц представлен в публикации [30].

Аденозин (9- β -D-Ribofuranosyladenine, Adenine riboside, Adenine-9- β -D-ribofuranoside) агонист аденозиновых A_2 -рецепторов. Фирма производитель Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Германия). Продукт в каталоге – A9251. CAS Number: 58-61-7. Молекулярная формула: $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_4$; молекулярная масса: 267,24. Милимолярный коэффициент экстинкции раствора аденозина при pH 7,0 составляет 14,6- 15,2 при максимальной длине волны поглощения 259 - 260 нм. Обоснование возможных доз агониста для изучения функциональной активности P2Y_1 и P2Y_{12} -рецепторов Тц представлен в публикации [122].

Ангиотензин-2 (Angiotensin II human; Synonyms: Ang II, Hypertensin II) - октапептидный гормон, является агонистом AT_1 - и AT_2 -рецепторов. Последовательность аминокислот: Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe. Молекулярная формула: $\text{C}_{50}\text{H}_{71}\text{N}_{13}\text{O}_{12}$; молекулярная масса: 1046.18 Da. Catalog Number A9525 Product Number: C8374 Company: Sigma-Aldrich Chemie GmbH. CAS-No.: 9007-34-5. Лиофилизированный пептид является стабильным при $t = 0^{\circ}\text{C}$ в течение двух лет. Ангиотензин-2 растворяют в воде (25 мг/мл) при pH 5,0-8,0. Стационарные растворы при нейтральном pH и $t = -20^{\circ}\text{C}$, остаются активными в течение двух месяцев. Обоснование возможных доз агониста для изучения функциональной активности Тц представлено в публикации [144].

ФАТ (β -Acetyl- γ -O-hexadecyl-L- α -phosphatidylcholine hydrate) – внеклеточный сигнальный липид, который является лигандом для ФАТ-рецепторов. Молекулярная формула: $\text{C}_{26}\text{H}_{54}\text{NO}_7\text{P} \cdot \text{xH}_2\text{O}$; молекулярная масса: 523,68 г / моль. Состав алкильной группы: 56% пальмитил (гексадецил, C_{16}), 10% стеарил (октадецил, C_{18}), 11% пентадецил (C_{15}), 13% является не идентифицированным. Product Number: P4904. Company: Sigma-

Aldrich Chemie GmbH. CAS-No.: 74389-68-7 P4904. Лиофилизированный порошок ФАТ является фосфолипидным медиатором, который активирует различные типы клеток (Тц, нейтрофилы, моноциты, Т-лимфоциты, эозинофилы, базофилы). Активация Тц обусловлена связыванием ФАТ с его рецептором на поверхности клеток, активацией Gq и образованием инозитол-3-фосфата, что сопровождается повышением уровня Ca^{2+} . Водную дисперсию ФАТ готовят в 0,15 М NaCl, содержащем 2,5 мг/мл бычьего сывороточного альбумина (BSA). Обоснование возможных доз агониста для изучения функциональной активности ФАТ-рецептора Тц представлено в публикации [93].

Арахидоновая кислота (*cis,cis,cis,cis*-5,8,11,14-Eicosatetraenoic acid) представляет собой ненасыщенную жирную кислоту $\omega 6$, входящую в состав фосфолипидов клеточных мембран. Субстрат метаболизируется в простагландины и тромбоксаны по крайней мере двумя изоформами циклооксигеназы (ЦОГ). Фирма производитель Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Германия). Продукт в каталоге – A3611. CAS Number: 506-32-1. Молекулярная формула: $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_4\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$; молекулярная масса: 304.47.

Коллаген (Collagen from human placenta; Synonyms: Collagen Type IV) - связывается с GPVI-рецептором Тц, гепатоцитов, кератиноцитов, эндотелиальных клеток. Product Number: C8374 Company: Sigma-Aldrich Chemie GmbH. CAS-No.: 9007-34-5. Молекулы коллагена состоят из трех полипептидных цепей, расположенных в тройной спиральной конформации; в первичной структуре, в основном, глицин повторяется в каждой 3-й позиции, а пролин или 4-гидроксипролин часто предшествуют глицину. Тип IV коллагена представлен в базальных мембранах и содержит до шести генетически отличных α -цепей. IV тип коллагена используется для оценки функции Тц [166].

Начальный процесс приготовления раствора базируется на солюбилизации коллагена при добавлении 1,0 г порошка в 50 мл холодной

очищенной воды (50% конечного объема). Смесь перемешивается в течение 15 минут, после чего добавляется 50 мл холодной 0,02 М HCl, что позволяет установить окончательную концентрацию коллагена на уровне 10 мг/мл; раствор может храниться (при -20°C) в течение года. pH смеси должна поддерживаться в диапазоне от 2,0–3,0. Гомогенизация смеси коллагена достигается в течение 15 минут при $t = + 20^{\circ}\text{C}$. Перед исследованием АТц окончательная концентрация коллагена 1,0 мг / мл достигается разведением с 0,01М HCl. Обоснование возможных доз агониста представлено в публикации [30].

В контрольной серии исследований в суспензию Тц добавляли физиологический раствор для оценки спонтанной агрегации. Инкубацию проводили в течение 4-6 минут при температуре 37°C и при перемешивании мешалкой со скоростью 1000 об/мин до выхода кривой на плато.

Анализ агрегатограмм проводили по следующим параметрам:

Амплитуда агрегации тромбоцитов (АТц,%) – показатель рассчитывается автоматически и определяет максимальную степень агрегации индуцированную агонистом.

Время задержки агрегации (Lag-time, сек) – рассчитывается автоматически. Трактуются как период времени, необходимый для взаимодействия агонист-рецептор и активации рецептор-опосредованного каскада внутриклеточной сигнальной системы.

Площадь под кривой (AUC, area under curve, U) – интегрирующий показатель между амплитудой и скоростью агрегации, который отражает пул Тц принимающих участие в агрегации.

Максимальный наклон кривой (Slope, %/мин) – рассчитывается автоматически и отражает скорость агрегации; позволяет оценить эффективность сигнальной системы, ассоциированной с рецептором.

2.6. Статистическая обработка результатов исследования.

Анализ полученных результатов осуществлялся с помощью методов биостатистики. При проведении анализа использовались статистические пакеты MedStat и MedCalc. Оценка величин, подлежащих анализу, проводилась путем расчета среднего арифметического признака ($\bar{X}$) или его медианы (Me) и соответствующей стандартной ошибки (m). Для качественных характеристик использовали показатель частоты признака (%) и стандартную ошибку (m%). При анализе межгрупповых различий в случае двух групп применяли критерий Стьюдента (в случае нормального закона распределения и количественных характеристик) и критерии Вилкоксона и Манна-Уитни (в случае отличия закона распределения от нормального и количественных характеристик), метод углового преобразования Фишера (в случае сравнения частоты качественных признаков). В случае сравнения трех и более групп использовали методы множественных сравнений: дисперсионный анализ и метод множественного сравнения Шеффе – в случае нормального закона распределения; ранговый критерий Краскела – Уоллиса и критерий Данна – в случае отличия закона распределения от нормального. При сравнении качественных признаков в этом случае использовали критерий χ^2 . Для выявления связи между признаками применяли методы корреляционного анализа: рассчитывали коэффициент корреляции Пирсона r (в случае нормального закона распределения) или показатель ранговой корреляции Спирмена (в случае отличия закона распределения от нормального). Для оценки диагностической значимости показателей использовали ROC-анализ с определением площади ROC-кривой и диагностической чувствительности и специфичности в пакете MedCalc. Во всех случаях отличие считалось статистически значимым при уровне значимости $p < 0,05$.

ГЛАВА 3

ПАТОГЕНЕЗ ГЕМАТУРИИ ПОСЛЕ КЛТ В ВЕРХНЕЙ ТРЕТИ МОЧЕТОЧНИКА ПРИ НЕЭФФЕКТИВНОЙ ЛКТ.

До настоящего времени отсутствует концепция патогенеза гематурии после малоинвазивных оперативных вмешательств на мочевыводящих путях (МВП). Значимость фундаментальных знаний в этой области трудно переоценить, учитывая, что арсенал фармакологических препаратов для остановки кровотечений представляется весьма ограниченным и, в основном, сориентирован на повышение коагуляции крови. С нашей точки зрения, к факторам риска выраженности послеоперационной гематурии следует отнести введение НПВП для анальгезии у пациентов с мочекаменной болезнью в процессе ЛКТ и/или после малоинвазивного оперативного вмешательства [249; 325]. Известно, что ингибирование ЦОГ и снижение синтеза ТхА₂ в тромбоцитах (Тц) при назначении НПВП вызывает нарушение их адгезии и агрегации, следствием чего может быть геморрагия [113]. Не менее значимой проблемой урологии остается прогнозирование риска макрогематурии в раннем послеоперационном периоде после отмены НПВП, поскольку остаются не выясненными причины различной эффективности механизмов гемостаза. Тромбоцитарное звено гемостаза традиционно рассматривается как мишень для профилактики тромбогенеза. Функциональная активность Тц является индикатором не только геморрагии, но и микрогематурии после КЛТ. Можно предположить, что (а) рецепторы Тц в разной степени модулируют тромбогенез, ограничивающий выход клеток крови из сосудистого русла (геморрагию); (б) взаимодействие Тц и лейкоцитов обеспечивает диапедез эритроцитов в просвет мочевыводящих путей (гематурия) при условии критического повышения проницаемости гистогематического барьера (ГГБ), включающего эндотелий сосудов микроциркуляторного русла, периваскулярную рыхлую волокнистую соединительную ткань и многослойный переходный эпителий (уротелий).

Известно, что при формировании тромбоцитарно-лейкоцитарных агрегатов (ТЛА) в циркулирующей крови происходит процесс взаимной индукции Тц и лейкоцитов. Результатом такого взаимодействия является миграция лейкоцитов в ткань (инфильтрация тканей МВП при пиелонефрите); при этом происходит функциональная деградация коллагена IV типа БМ эндотелия, эпителия и межклеточного вещества соединительной ткани, что сопровождается диapedезом эритроцитов (микрогематурией).

Гипотеза. Можно предположить, что механизмы тромбоцитарного звена гемостаза зависят от активности ЦОГ, модулирующей сигнализацию в Тц. При длительном назначении высоких доз НПВП пациентам с нефролитиазом происходит ингибирование ЦОГ в клетках крови, что сопровождается трансдукцией сети внутриклеточной сигнализации, которая определяет эффективность компенсаторных механизмов гемостаза. Сохранение введения НПВП после КЛТ создает риски геморрагий и макрогематурии. При отмене НПВП после КЛТ происходит восстановление активности ЦОГ и возвращение к адаптационным механизмам агрегации Тц, которые должны обеспечить гемостаз и ограничение гематурии. Логично предположить, что исследование рецепторного аппарата Тц позволит не только верифицировать патогенетические факторы, влияющие на выраженность гематурии, но и – анализировать молекулярные механизмы регуляции гемостаза.

Цель исследования – сопоставить функциональную активность рецепторов Тц с выраженностью гематурии на этапе госпитализации пациентов с локализацией конкрементов средних размеров в верхней трети мочеточника при неэффективной ЛКТ и после КЛТ; установить молекулярные механизмы, модулирующие гемостаз при назначении и отмене НПВП.

3.1 Молекулярные механизмы регуляции агрегации Тц на этапе госпитализации.

Исследовательский вопрос – сопровождается ли обструкция верхней трети мочеточника конкрементами средних размеров изменением функциональной активности рецепторов Тц? На этапе госпитализации выявлена средняя степень микрогематурии $-(26,0 \pm 3,7 \text{ э/пз}; 95\% \text{ДИ } 18,2-33,8 \text{ э/пз})$. При анализе рецепторного аппарата Тц обнаружена гиперреактивность α_2 -адренорецептора, P2X₁-рецептора, ТхА2-рецептора, ФАТ-рецептора, GPVI-рецептора и АТ₁-рецептора, а также гипореактивность P2Y-рецепторов и А2А-рецептора (Таблица 3.1). Активность α_2 -адренорецептора, P2X₁-рецептора и ТхА2-рецептора была сопоставимой ($p > 0,05$). Кластер функциональной активности рецепторов может быть представлен следующим образом: активность α_2 -адренорецептора = активности P2X₁-рецептора = активности ТхА2-рецептора > активности ФАТ-рецептора = активности GPVI-рецептора = активности АТ₁-рецептора. Следовательно, при локализации конкрементов в верхней трети мочеточника патогенетическими факторами нефролитиаза, которые могут стимулировать клетки крови, являются: (а) активация САС и РАС, что проявляется увеличением уровня катехоламинов и Ан-2 в крови; (б) гипоксия/ишемия вследствие перманентно возникающей вазоконстрикции, при этом тяжесть ишемии проявляется степенью повышения внеклеточного уровня АТФ; (в) воспалительная реакция, при которой лейкоциты выделяют цитокины, способные модулировать функцию Тц; индикатором функциональной активности лейкоцитов является активность ТхА2-рецептора и ФАТ-рецептора. Ключевым патогенетическим механизмом нефролитиаза может считаться гипореактивность аденозиновых А2А-рецепторов, поскольку в этом случае нарушается трафик конкрементов и создаются условия для нарушения уродинамики вследствие недостаточной релаксации ГМК; а также не запускаются противовоспалительный и противоишемический защитные механизмы.

Таблица 3.1

**Индукцированная агрегация Тц у пациентов на этапе госпитализации
при локализации конкрементов в верхней трети мочеточника**

Агонист EC50	Среднее значение АТц (%), $\bar{X} \pm SD$	Min –Max	Левый (95% ДИ)	Правый (95% ДИ)
Адреналин	70,71 $\pm$ 0,8	65,0-77,0	69,0	72,3
АТФ	70,3 $\pm$ 0,7	66,0-76,0	68,8	71,2
ТхА2	69,2 $\pm$ 0,5	64,0-74,0	68,2	70,3
ФАТ	60,3 $\pm$ 0,8 P<0,001	60,0-70,0	53,0	66,0
Коллаген	59,0 $\pm$ 0,7 P<0,001	54,0-65,0	57,6	60,4
Ан-2	58,5 $\pm$ 0,9 P<0,001	51,0-64,0	56,6	60,4
АДФ	41,3 $\pm$ 0,6*** P<0,001	36,0-46,0	40,0	42,6
Аденозин	37,9 $\pm$ 0,7** P<0,001	35,0-45,0	36,4	39,5

Примечание. Р – вероятность различий АТц относительно эффекта адреналина; ** – достоверность различий показателей на уровне $p < 0,01$ и *** – $p < 0,001$ по сравнению со значениями предыдущего агониста.

Низкая активность пуриновых P2Y-рецепторов может рассматриваться как компенсаторная реакция, направленная на снижение тонуса гладкой мышечной ткани мочеточника. Снижение активности P2Y-рецепторов по сравнению с такой P2X₁-рецептора (на 41,3%; $P < 0,001$), вероятно, достигается путем активации 5'-нуклеотидазы. Таким образом, на этапе госпитализации пациентов с наличием конкрементов в верхней трети мочеточника факторами патогенеза нефролитиаза являются активация САС и РАС, гипоксия/ишемия тканей МВП, пиелонефрит и снижение продукции аденозина; доказательством влияния указанных патогенетических факторов на клетки-мишени может быть реактивность Тц.

Анализ множественной корреляции выявил отрицательную связь между выраженностью гематурии и активностью α_2 -адренорецептора ($r_{ГТ-\alpha_2AP} = -0,578$; $p < 0,05$), P2X₁-рецептора ($r_{ГТ-P2X1} = -0,300$; $p < 0,05$), ТхА2-рецептора

($r_{\text{ГТ-ТхА2}} = -0,645$; $p < 0,05$), ФАТ-рецептора ($r_{\text{ГТ-ФАТ}} = -0,524$; $p < 0,05$), GP VI-рецептора ($r_{\text{ГТ-GPVI-R}} = -0,683$; $p < 0,05$), АТ₁-рецептора ($r_{\text{ГТ-АТ1}} = -0,384$; $p < 0,05$) и P2Y-рецепторов ($r_{\text{ГТ-P2Y}} = -0,710$; $p < 0,05$). Имела место *положительная* связь между активностью P2Y-рецепторов и α_2 -адренорецептора ($r_{\text{P2Y-}\alpha_2\text{AP}} = 0,718$; $p < 0,05$), ТхА2-рецептора ($r_{\text{P2Y-ТхА2}} = 0,533$; $p < 0,05$), GP VI-рецептора ($r_{\text{P2Y-GPVI}} = 0,606$; $p < 0,05$), АТ₁-рецептора ($r_{\text{ГТ-АТ1}} = 0,445$; $p < 0,05$). Не обнаружена корреляционная связь между активностью P2Y-рецепторов и P2X₁-рецептора, ФАТ-рецептора. В чем смысл сформировавшихся причинно-следственных связей между активностью рецепторов Тц применительно к регуляции компенсаторных механизмов гемостаза? Гипотеза- выраженность гематурии зависит от агрегационной способности Тц, которая регулируется соответствующими рецепторами. Очевидно, что геморрагия усиливается в тех случаях, когда функциональная активность рецепторов Тц – снижается. Однако, почему микрогематурия при нефролитиазе присутствует и ее выраженность варьирует, если повышена реактивность рецепторов, усиливающих АТц? Данный феномен, вероятно, может возникать, если (а) рецепторы инициируют разные механизмы повышения уровня Ca^{2+} (например, P2Y-рецепторы запускают сигнализацию посредством Gi- и Gq-белков, тогда как АТФ открывают Ca^{2+} -канал), при этом не достигается пик внутриклеточного содержания ионов; (б) рецептор сопряжен с сигнальным путем, который модулируется другим рецептором (например, α_2 -адренорецептор сопряжен с Gi-белком, который связан с P2Y₁₂-рецептором). В этом контексте представляют интерес P2Y-рецепторы, которые, во-первых, благодаря связи одновременно с Gi- и Gq-белками могут участвовать в потенцировании эффектов других рецепторов; во-вторых, обеспечивают аутокринную стимуляцию Тц, т.е. по сути являются триггерами агрегации. Вероятно, выраженность микрогематурии связана с функциональной активностью P2Y-рецепторов.

Исследовательский вопрос – отличается ли внутриклеточная сигнализация, индуцированная P2Y-рецепторами, при различной выраженности микрогематурии у пациентов с нефролитиазом?

В этом контексте вариационный ряд значений микрогематурии распределили на две подгруппы: А- с легкой степенью и В-со средней степенью гематурии; в подгруппе В микрогематурия в 4,7 раза выше, чем в подгруппе А ($P<0,001$) (Рисунок 3.1). Установлено, что активность P2Y-рецепторов в сформированных подгруппах статистически значимо отличается. Так, в подгруппе А активность пуриновых P2Y-рецепторов находилась в диапазоне $43,8\pm0,4\%$ (95%ДИ 42,9-44,7%), в подгруппе В – на уровне $39,0\pm0,5\%$ (95% ДИ 37,9-40,1%), т.е. при легкой степени гематурии активность P2Y-рецепторов была на 12,3% больше ($P<0,001$). Поскольку α_2 -адренорецептор сопряжен с Gi-белком, а P2Y-рецепторы, одновременно с Gi- и Gq-белками, то можно ожидать ко-активацию Gi-белка, повышение содержания внутриклеточного Ca^{2+} и усиление АТц.

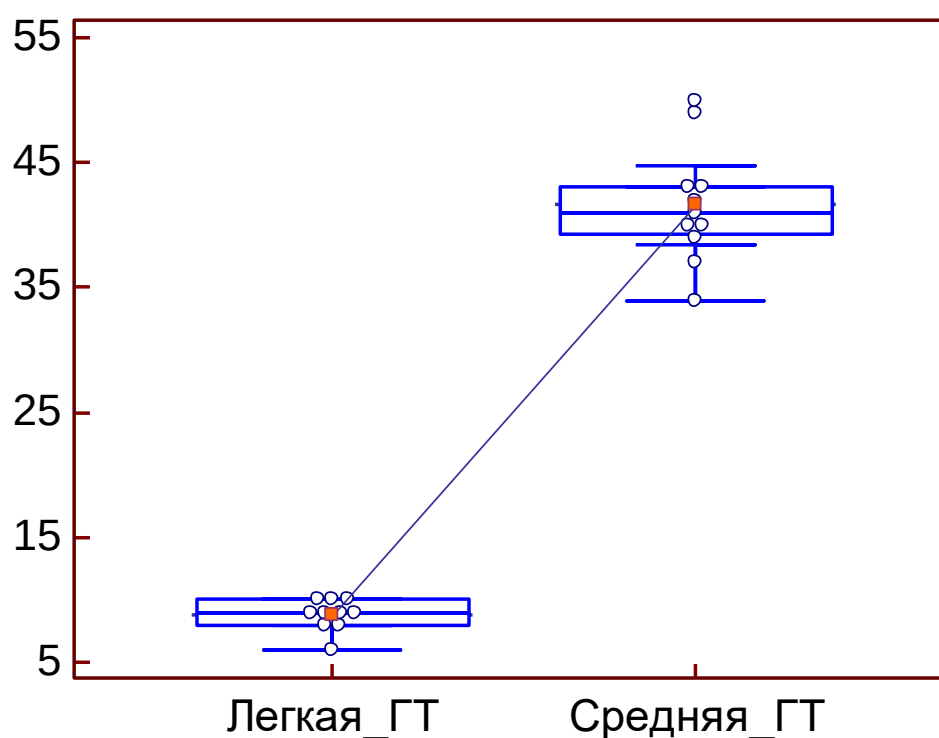
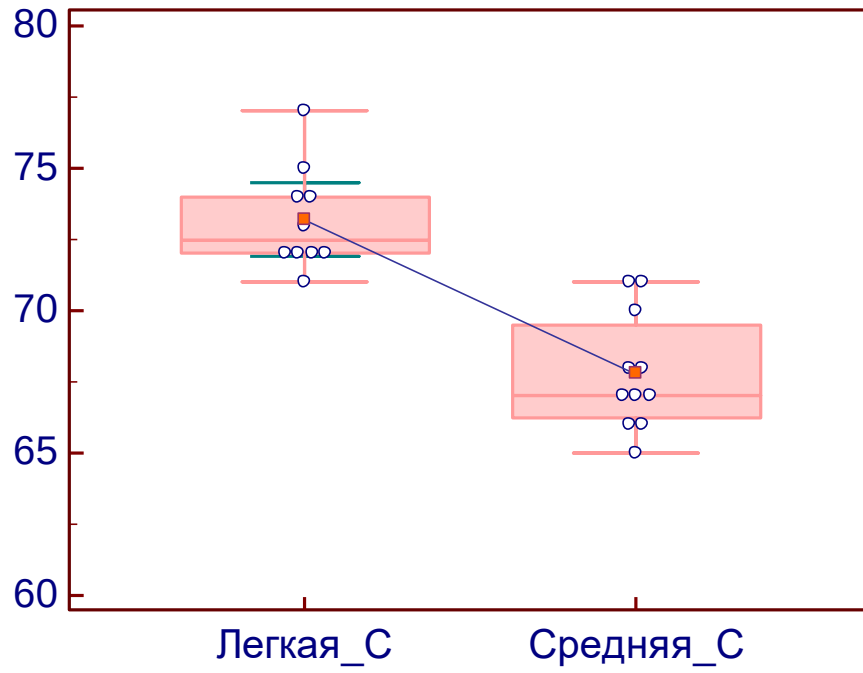


Рис. 3.1 Значения микрогематурии на этапе госпитализации пациентов с неэффективной ЛКТ.

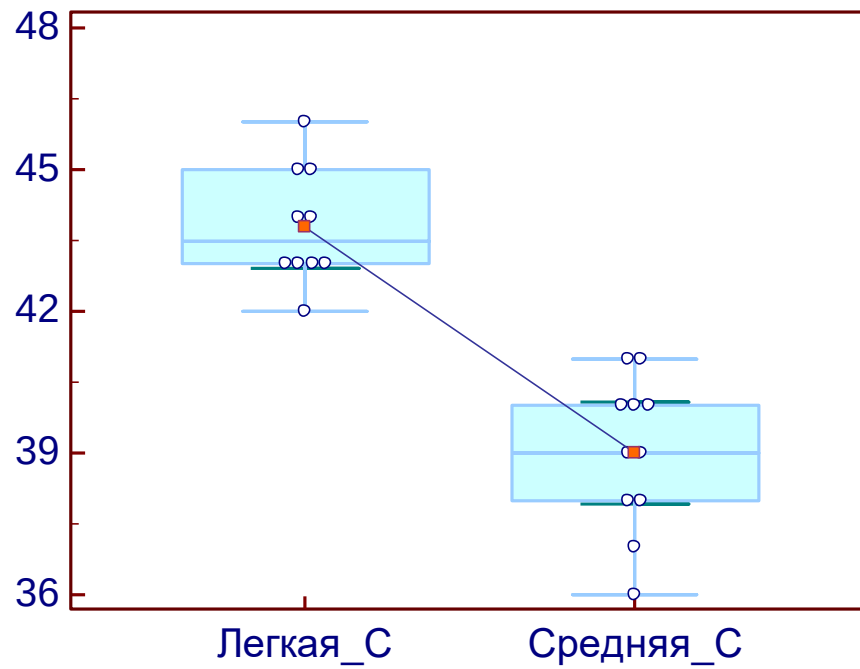
По оси ординат – количество эритроцитов в пз; по оси абсцисс – подгруппы с легкой (ГТ) и средней (ГТ) степенью выраженности микрогематурии.

Исследовательский вопрос – отличается ли АТц-индуцированная α_2 -адренорецептором и P2Y-рецепторами при разной степени микрогематурии? При легкой степени микрогематурии активность α_2 -адренорецептора была на 8,0% ($P < 0,001$) и активность P2Y-рецепторов на 12,3% ($P < 0,001$) больше, чем при средней степени микрогематурии (Рисунок 3.2). Следовательно, более высокие значения, АТц-индуцированные α_2 -адренорецептором, могут быть обусловлены сопряженностью сигнальных путей связанных с Gi-белком; в этом контексте ключевую роль играет активность P2Y-рецепторов. В связи с проверкой данной гипотезы имело смысл сопоставить активность P2X₁-рецептора и P2Y-рецепторов, которые не воспроизводят трансактивацию G-белков. Оказалось, что при легкой степени гематурии активность P2X₁ рецептора была на 8,4% ($P < 0,001$) больше, чем при средней степени микрогематурии, при этом активность P2Y-рецепторов статистически значимо не различалась (Рисунок 3.3). Следовательно, сопряженность сигнальных путей, связанных с Gi- и Gq-белками, может быть причиной более высокой реактивности рецепторов Тц; ключевую роль в этом процессе могут играть P2Y-рецепторы.

Представляет интерес прогнозирование возможности потенцирования эффектов при взаимодействии рецепторов на основании анализа активности P2Y-рецепторов. При выборе оптимального порога принятия решения (по Youden Index) установлен критический порог АДФ-индуцированной АТц (АДФcrit) на уровне 40% (Рисунок 3.4). При значении показателя АДФcrit >40% возможна амплификация внутриклеточной сигнализации с рецепторов, связанных с Gi- и Gq-белками, за счет вовлечения аутокринной петли стимуляции P2Y-рецепторов, а при значении АДФcrit <40% – такая возможность отсутствует. Для выбранного порога чувствительность предлагаемого диагностического теста составляет 84,6% (95% ДИ 54,6%-98,1%) и специфичность – 87,5% (95% ДИ 47,6%-99,7%). Площадь под кривой операционных характеристик AUC = 0,928 (95% ДИ 0,727 –0,995).



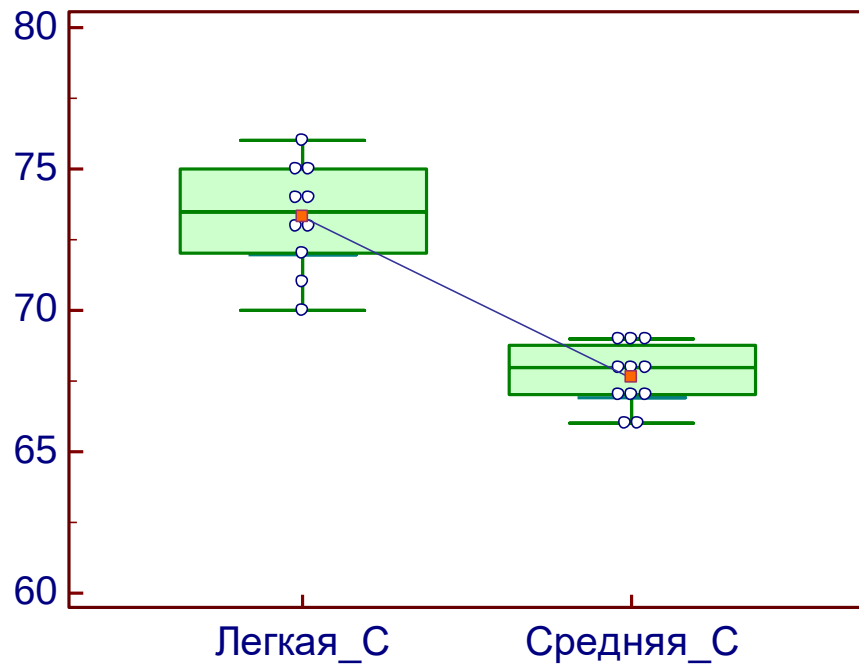
а



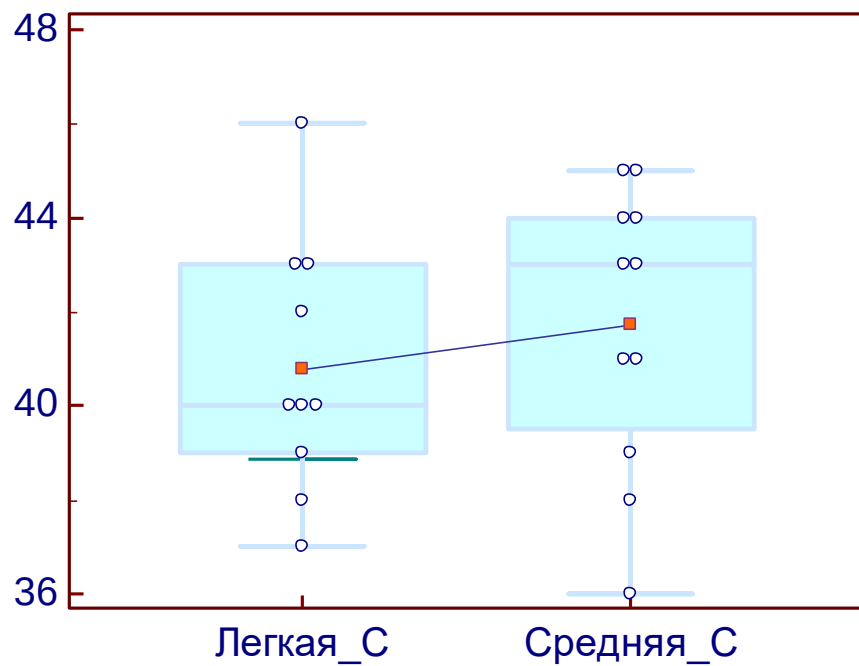
б

Рис. 3.2. Реактивность α_2 -адренорецептора (а) и пуриновых P2Y-рецепторов (б) Тц при легкой и средней степени микрогематурии на этапе госпитализации при неэффективной ЛКТ.

По оси ординат – индуцированная агрегация Тц (%); по оси абсцисс – степень микрогематурии.



а



б

Рис. 3.3. Реактивность пуриновых P2X₁-рецептора (а) и P2Y-рецепторов (б) Тц при легкой и средней степени микрогематурии на этапе госпитализации при неэффективной ЛКТ.

По оси ординат – индуцированная агрегация Тц (%); по оси абсцисс – степень микрогематурии.

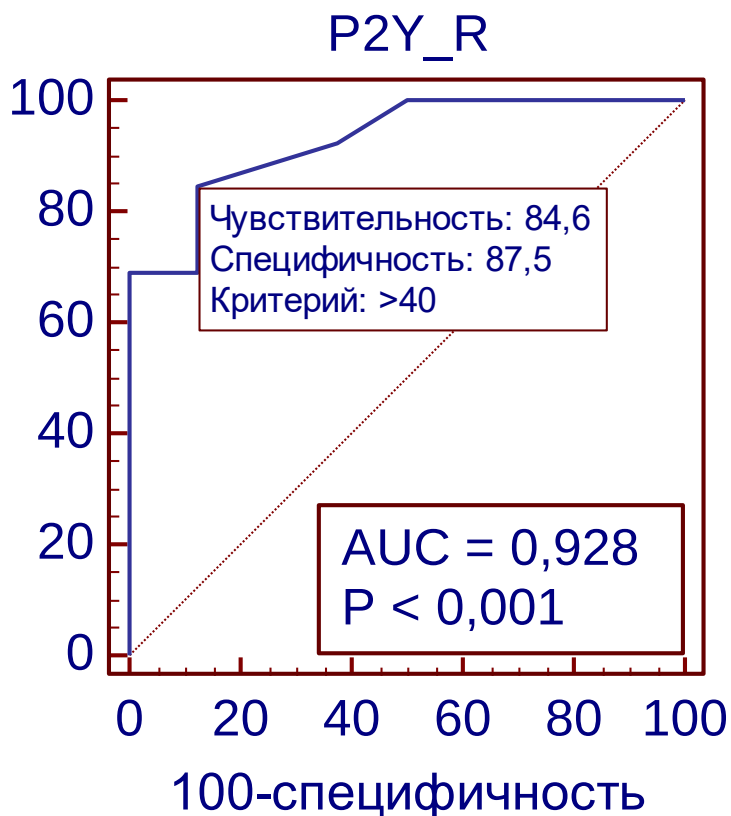


Рис. 3.4. Кривые операционных характеристик (ROC) определения амплификации внутриклеточной сигнализации по активности P2Y-рецепторов.

На основании анализа активности рецепторов можно воссоздать следующую картину причинно-следственных связей, развивающихся при локализации конкрементов в верхней трети мочеточника. При перманентной «почечной колике» развивается стресс-реакция, которая проявляется активацией САС и сопровождается стимуляцией юкста-гломерулярного аппарата нефрона. Развитие вазоконстрикции и компрессия стенки мочеточника при обструкции влечет за собой гипоксию/ишемию тканей МВП.

Повышение уровня внеклеточного АТФ и активация пуриновых P2X₁-рецепторов, наряду со стимуляцией α₂-адренорецептора и АТ₁-рецептора модулирует усиление силы сокращения ГМК и обеспечивает трафик конкремента. При наличии в просвете конкрементов средних размеров

усиление перистальтики мочеточника при отсутствии аденозинергической релаксации является малоэффективной. Имеющееся нарушение уродинамики приводит к развитию пиелонефрита, что сопровождается активацией лейкоцитов; последние вызывают деградиацию БМ стенки сосудов следствием чего и является диапедез эритроцитов. «Рикошетным эффектом» активации α_2 -адренорецептора, P2X₁-рецептора, TxA₂-рецептора, ФАТ-рецептора, GPVI-рецептора и AT₁-рецептора является ограничение гематурии.

3.2. Состояние рецепторного аппарата Тц в течение первых суток после КЛТ при сохранении введения НПВП.

Априори считается, что в течение первых суток после КЛТ имеет место «спонтанное» прекращение геморрагии, а длительность и тяжесть послеоперационных осложнений зависит от компенсаторных механизмов гемостаза. Однако, связь гематурии с активностью Тц в литературе не обсуждается. С нашей точки зрения, гематурия представляют собой сложный многоэтапный процесс, включающий: (а) диапедез клеток крови из сосудистого русла в периваскулярное пространство, что обусловлено их прохождением через стенку сосудов микроциркуляторного русла (межэндотелиальное пространство и базальная мембрана); (б) трафик эритроцитов в соединительной ткани слизистой оболочки (СО) мочевыводящих путей (МВП); (в) преодоление барьерной функции уротелия (гисто-уринальный барьер) и поступление клеток крови в мочу.

Гипотеза. В первые сутки после оперативного вмешательства проявляется эффект влияния хирургической «стресс-реакции» на компенсаторные механизмы гемостаза. Выраженность гематурии зависит от активности рецепторов Тц, регулирующих адгезию и агрегацию.

Цель исследования — оценить выраженность гематурии после КЛТ конкрементов средних размеров в верхней трети мочеточника при неэффективной ЛКТ; установить молекулярные механизмы регуляции

гемостаза в течение первых суток после малоинвазивного оперативного вмешательства на фоне продолжающегося введения НПВП.

Исследовательский вопрос – изменяется ли выраженность гематурии в течение первых суток после КЛТ на фоне предшествующей длительной ЛКТ? В течение первых суток после КЛТ в верхней трети мочеточника установлено увеличение выраженности микрогематурии от средней до тяжелой степени тяжести. Через 1-3 ч после малоинвазивного оперативного вмешательства у 5 (23,8%) пациентов имела место макрогематурия; микрогематурия возросла на 90,1% – до $42,4 \pm 2,9$ э/пз ($P < 0,001$; 95% ДИ 36,3-48,4 э/пз) по сравнению с таковой до начала ЛКТ. Через 24ч макрогематурия обнаружена у 6 (28,6%) больных; выраженность микрогематурии увеличилась в 1,8 раза – до $75,6 \pm 2,1$ э/пз ($P < 0,001$; 95% ДИ 71,1-81,1 э/пз) по сравнению со сроком наблюдения 1-3ч после КЛТ (Рисунок 3.5). Таким образом, учитывая динамику микрогематурии в течение первых суток после КЛТ можно констатировать, что эффективность компенсаторных механизмов гемостаза снижалась. Связан ли данный факт с дисрегуляцией Тц?

Исследовательский вопрос – изменяется ли функциональная активность рецепторов Тц через 1-3ч после КЛТ на фоне сохранения введения НПВП?

Через 1-3ч после КЛТ выявлена сопоставимая гиперреактивность шести рецепторов – ФАТ-рецептора, ТхА2-рецептора, АТ₁-рецептора, GPRVI-рецептора, пуриновых P2X₁- и P2Y-рецепторов (Таблица 3.2). Оставшиеся два рецептора (α_2 -адренорецептора и аденозиновый А2А-рецептор) имели низкую активность. Таким образом, потенциальными индукторами активации клеток крови после КЛТ могут быть: ФАТ, секретируемый лейкоцитами, которые участвуют в воспалительной реакции; ТхА2; синтез которого поддерживается несмотря на введение НПВП; Ан-2 продукция которого усиливается при активации ЮГА; коллаген IV типа БМ, содержание которого, зависит от функциональной активности лейкоцитов; АТФ и АДФ, образование которых обусловлено интенсификацией пуринового метаболизма при гипоксии/ишемии тканей мочеточника

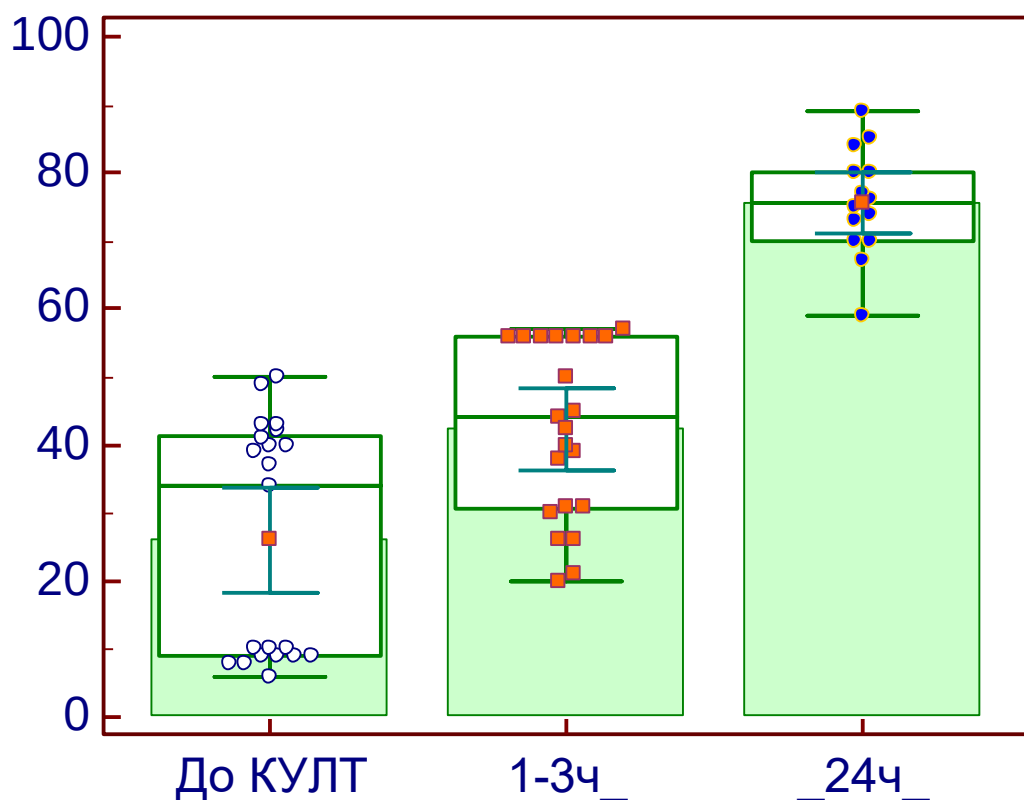


Рис. 3.5. Динамика микрогематурии до–, через 1-3ч и 24ч после КЛТ в верхней трети мочеточника.

По оси ординат – количество эритроцитов в поле зрения; по оси абсцисс – сроки наблюдения.

Сопоставление кластера рецепторов относительно такового на этапе госпитализации, позволило оценить *влияние* малоинвазивного оперативного вмешательства на предсуществующую регуляцию функции Тц. Установлено, что активность α_2 -адренорецептора, P2X₁-рецептора и TxA₂-рецептора снижалась, соответственно, на 44,3%, 14,5% и 7,7% ($P < 0,001$). Активность GPVI-рецептора повысилась ($p < 0,05$) на 5,2%, AT₁-рецептора – на 8,7%, ФАТ-рецептора – на 8,1%, аденозинового A₂A-рецептора – на 11,3% и P2Y-рецепторов – на 41,2%. Следовательно, через 1-3ч после КЛТ в верхнем отделе мочеточника при сохранении введения НПВП снижалась активация САС, гипоксия/ишемия и активность ЦОГ, т.е. устранялись основные компоненты стресс-реакции, связанные с обструкцией мочеточника и раздражением

нервных окончаний вегетативной нервной системы. Следствием этого являлась, снижение вазоконстрикции и ишемии тканей мочеочника. Сохранение гиперреактивности ТхА2-рецептора, вероятно, отражает «ускользание» ЦОГ при длительном назначении НПВП.

Таблица 3.2.

Индукцированная агрегация Тц через 1-3ч после КЛТ в верхней трети мочеочника при сохранении введения НПВП у пациентов с неэффективной ЛКТ.

Агонист ЕС ₅₀	Среднее значение АТц (%), $\bar{X} \pm SD$	Min –Max	Левый (95% ДИ)	Правый (95% ДИ)
ФАТ	65,2±0,8	57,0-70,0	63,5	66,9
ТхА2	63,9±1,0	57,0-69,0	61,8	
Ан-2	63,6±1,0	56,0-69,0	61,5	60,4
Коллаген	62,1±1,2 P=0,039	55,0-71,0	59,7	64,6
АТФ	60,1±0,7 P<0,001	54,0-66,0	58,6	61,5
АДФ	58,3±1,0 P<0,001	52,0-66,0	56,2	58,3
Адреналин	39,1±0,8*** P<0,001	35,0-45,0	37,5	40,8
Аденозин	42,2±0,8 P<0,001	37,0-49,0	40,6	43,9

Примечание. P – достоверность различий индуцированной агрегации тромбоцитов (АТц) относительно эффекта ФАТ. ***– достоверность различий показателей на уровне p<0,001 по сравнению с значениями предыдущего агониста.

Вызывают интерес возможные факторы прогрессирования послеоперационных осложнений. К таковым можно отнести: (а) усиление активности ЮГА, что сопровождается повышением уровня Ан-2, следствием чего может быть вазоконстрикция и поддержание воспаления; (б) увеличение функциональной активности лейкоцитов, секретирующих ФАТ, что приводит к повышению функции Тц, формированию ТЛА и рекрутированию активированных лейкоцитов из сосудистого русла в ткань. Возникающая при этом деградация коллагена IV типа БМ эндотелия и эпителия, сочетается с повышением проницаемости стенки сосудов МЦР, развитием отека слизистой оболочки мочеточника и диапедезом эритроцитов; возрастание проницаемости уротелия провоцирует микробную инвазию и развитие острого пиелонефрита; (в) интенсификацию метаболизма пуринов, которая сопровождается повышением содержания внеклеточного АДФ. Данный мессенджер способствует поддержанию гипертонуса гладкой мышечной ткани и может индуцировать агрегацию Тц. Вероятно, интегративный эффект метаболизма пуринов будет определяться возможностями повышения уровня аденозина, который может нивелировать релаксацию ГМК и тромбогенез.

Анализ множественной корреляции позволяет конкретизировать возможные механизмы патогенеза и ограничения геморрагии, гематурии в ранние сроки после КЛТ. Обнаружено снижение силы отрицательной связи между выраженностью гематурии и активностью P2Y-рецепторов по сравнению с таковой на этапе госпитализации пациентов, соответственно, $r_{ГТ-P2Y} = -0,545$ ($p < 0,05$) и $r_{ГТ-P2Y} = -0,710$ ($p < 0,05$), а также между выраженностью гематурии и активностью GP VI-рецептора, соответственно, $r_{ГТ-GPVI} = -0,488$ ($p < 0,05$) и $r_{ГТ-GPVI} = -0,683$ ($p < 0,05$). Снижалась корреляционная связь между активностью P2Y-рецепторов и GP VI-рецептора ($r_{P2Y-GPVI} = 0,468$; $p < 0,05$). Положительная связь присутствовала между выраженностью гематурии и активностью A2A-рецептора ($r_{ГТ-A2A} = 0,503$; $p < 0,05$); отрицательная связь имела место между активностью A2A-рецептора и α_2 -адренорецептора, P2X₁-

рецептора, ТхА2-рецептора, соответственно, $r_{A2A-\alpha_2AP} = -0,411$ ($p < 0,05$), $r_{A2A-P2X} = -0,400$ ($p < 0,05$), $r_{A2A-TxA2} = -0,332$ ($p < 0,05$). Не обнаружена корреляционная связь между гематурией и активностью α_2 -адренорецептора, P2X₁-рецептора, ФАТ-рецептора и ТхА2-рецептора. Таким образом, через 1-3ч после КЛТ, несмотря на гиперреактивность ФАТ-рецептора, ТхА2-рецептора, АТ₁-рецептора, GPVI-рецептора, пуриновых P2X₁- и P2Y-рецепторов Тц, микрогематурия прогрессировала. Выявленная связь между выраженностью микрогематурии и активностью P2Y-рецепторов и GP VI-рецептора позволяет констатировать, что внутриклеточная сигнализация, сопряженная с активацией участка SFK–ФИ-3К является основой функционирования компенсаторных механизмов, ограничивающих геморрагию и микрогематурию. Снижение эффективности механизмов гемостаза по сравнению с таковой до начала КЛТ может быть связано с повышением активности А2А- рецептора, который не только вызывал десенситизацию α_2 -адренорецептора, но и нарушал сопряженность сигнализации с P2Y-рецепторов и GP VI-рецептора.

Как уже отмечалось через 24ч после КЛТ при сохранении введения НПВП у части пациентов сохранялась макрогематурия, а микрогематурия усиливалась. Выявлена гиперреактивность АТ₁-рецептора, ФАТ-рецептора, ТхА2-рецептора, P2X₁-рецептора и GP VI-рецептора (Таблица 3.3). Еще три рецептора – P2Y-рецепторы, α_2 -адренорецептор и А2А-рецептора демонстрировали нормореактивность. По сравнению со сроком наблюдения 1-3ч после КЛТ, реактивность α_2 -адренорецептора и аденозинового А2А-рецептора повысилась, соответственно, на 33,2% и 19,7% ($P < 0,001$). Активность ФАТ-рецептора снизилась на 5,7%, ТхА2-рецептора – на 6,4%, GPVI-рецептора на –6,5% и P2Y-рецепторов –7,0% ($p < 0,05$); активность АТ₁-рецептора и P2X₁-рецептора не изменилась ($p > 0,05$). Таким образом, через 24ч после КЛТ в верхнем отделе мочеточника при сохранении введения НПВП повышалась активация САС, как следствие усиления ноцицепции.

Таблица 3.3.

**Индукцированная агрегация Тц через 24ч после КЛТ в верхней трети
мочеточника при сохранении введения НПВП у пациентов с
неэффективной ЛКТ.**

Агонист ЕС ₅₀	Среднее значение АТц (%), $\bar{X} \pm SD$	Min – Max	Левый (95% ДИ)	Правый (95% ДИ)
Ан-2=	61,9±0,7	57,0-68,0	60,3	64,0
ФАТ	61,5±0,7	56,0-69,0	60,0	63,0
ТхА2	59,8±0,8	54,0-67,0	58,1	61,5
АТФ=	58,6±0,5 P < 0,01	53,0-63,0	57,6	59,7
Коллаген	58,1±0,8 P=0,004	52,0-64,0	56,3	60,0
АДФ	54,2±0,6*** P<0,001	50,0-65,0	53,9	58,3
Адреналин	52,1±0,9 P<0,001	50,0-64,0	50,2	54,0
Аденозин	50,5±0,6 P<0,001	47,0-57,0	49,3	51,7

Примечание. P – вероятность различий индуцированной АТц относительно эффекта АДФ. * – достоверность различий показателей на уровне $p < 0,05$ и *** – $p < 0,001$ по сравнению с значениями предыдущего агониста.

Положительным моментом являлось восстановление до нормореактивности аденозинового А2А-рецептора, что позволяет обсуждать влияние компенсаторных эффектов аденозина. Снижение активности ТхА2-рецептора, вероятно, связано с усилением ингибирующего влияния на ЦОГ клеток крови при кратковременном назначении стероидных гормонов; следствием данного процесса являлось уменьшение активности лейкоцитов, секретирующих ФАТ, и деградации коллагена IV типа БМ. Стабильная гиперреактивность АТ₁-рецептора и P2X₁-рецептора, отражает зависимость вазоконстрикции от уровня Ан-2, следствием чего является нарушение микроциркуляции и гипоксия/ишемия тканей МВП. Данный факт

свидетельствует, что консервативная терапия в течение первых суток не обеспечивала устранение этого звена патогенеза дисфункции мочеточника. Обращает на себя внимание кластер пуриновых рецепторов, в котором активность $P2X_1$ -рецептора $> P2Y$ -рецепторов $> A2A$ -рецептора, что отражает интенсификацию метаболизма пуринов, связанную с необходимостью повышения продукции аденозина.

Анализ множественной корреляции позволил установить наличие отрицательной связи между выраженностью гематурии и активностью AT_1 -рецептора ($r_{ГТ-AT} = -0,505$; $p < 0,05$), $P2X_1$ -рецептора ($r_{ГТ-P2X} = -0,557$; $p < 0,05$), α_2 -адренорецептора ($r_{ГТ-\alpha_2AP} = -0,570$; $p < 0,05$). При этом имела место положительная корреляционная связь между активностью α_2 -адренорецептора и $P2X_1$ -рецептора, AT_1 -рецептора, соответственно, $r_{\alpha_2AP-P2X} = 0,633$ ($p < 0,05$) и $r_{\alpha_2AP-AT} = 0,521$ ($p < 0,05$). Сохранялась положительная связь между выраженностью гематурии и активностью $A2A$ -рецептора ($r_{ГТ-A2A} = 0,574$; $p < 0,05$). Проявилась отрицательная связь между активностью $A2A$ -рецептора и $P2Y$ -рецепторов, TxA_2 -рецептора, соответственно, $r_{A2A-P2Y} = -0,529$ ($p < 0,05$), $r_{A2A-TxA_2} = -0,404$ ($p < 0,05$). Не обнаружена корреляционная связь между гематурией и активностью $P2Y$ -рецепторов, $GPVI$ -рецептора, $ФАТ$ -рецептора и TxA_2 -рецептора. Следовательно, через 24ч после КЛТ, несмотря на гиперреактивность AT_1 -рецептора, $ФАТ$ -рецептора, TxA_2 -рецептора, $P2X_1$ -рецептора и $GP VI$ -рецептора микрогематурия продолжала прогрессировать и у 6 (28,6%) сохранялась макрогематурия. Выявленная связь между выраженностью микрогематурии и активностью AT_1 -рецептора, $P2X_1$ -рецептора и α_2 -адренорецептора позволяет предположить их участие в регуляции компенсаторной реакции тромбоцитарного звена гемостаза.

Для проверки данной гипотезы целесообразно использовать метод моделирования взаимодействия рецепторов Тц *in vitro* с использованием субпороговой дозы агонистов. При сравнении параметров агрегации установлено, что максимальный эффект наблюдался при изолированной стимуляции АТФ (Таблица 3.4).

Таблица 3.4.

Характеристика показателей агрегации Тц через 24ч после КЛТ при моделировании взаимодействия рецепторов *in vitro*

Агонисты EC ₁₀	Показатели агрегатограммы		
	Амплитуда агрегации (%)	Slope (% мин)	AUC (U)
АТФ	13,3±0,4 (95% ДИ 12,4-14,2)	15,7±1,0 (95% ДИ 13,5-17,9)	20,7±1,1 (95% ДИ 18,3-23,1)
Ан-2	12,2±0,4 (95% ДИ 11,3-13,1)	13,2±0,4# (95% ДИ 12,4-14,0)	15,3±0,6### (95% ДИ 13,9-16,7)
Адреналин	11,3±0,4 (95% ДИ 10,3-12,3)	14,2±0,7 (95% ДИ 12,7-15,7)	17,6±0,6# (95% ДИ 16,2-19,0)
АТФ + Ан-2	22,3±0,8 (95% ДИ 20,6-24,1)	23,4±1,5 (95% ДИ 20,3-26,5)	27,4±2,0 (95% ДИ 23,2-31,6)
Ан-2 + Адреналин	12,1±0,8*** (95% ДИ 10,4-13,8)	12,5±0,7*** (95% ДИ 11,1-13,9)	21,7±1,8*** (95% ДИ 17,8-25,6)
АТФ + Адреналин	11,3±0,8 (95% ДИ 9,7-12,9)	13,4±1,1 (95% ДИ 11,2-15,7)	20,1±1,7 (95% ДИ 16,6-23,6)

Примечание: #— статистически значимое различие значений показателя агрегатограммы при изолированном воздействии агониста на уровне $p<0,05$ по сравнению со значениями предыдущего агониста; ###— на уровне $p<0,001$. ***—различие значений показателя агрегатограммы при комбинации воздействия агонистов на уровне $p<0,001$ по сравнению со значениями предыдущей комбинации агонистов.

Связывание Ан-2 с АТ₁-рецептором воспроизводило амплитуду агрегации сходную с таковой при стимуляции P2X₁-рецептора, однако наклон кривой агрегации (Slope) и площадь под кривой агрегации (AUC) были ниже аналогичных показателей, соответственно, 15,9% ($p<0,01$) и 26,1% ($p<0,001$). Максимальный эффект агрегации Тц отмечен при взаимодействии P2X₁-рецептора и АТ₁-рецептора. Амплитуда, Slope и AUC

при одновременной стимуляции P2X₁- рецептора и АТ₁-рецептора были выше, соответственно, на 67,7%, 49,0% и 32,4% ($P < 0,001$) относительно таковых при изолированной стимуляции P2X₁-рецептора. В основе данного эффекта может лежать синергизм возникающий вследствие повышения уровня внутриклеточного Ca²⁺ при открытии Ca²⁺-канала (P2X₁- рецептор) и сигнализации, расположенной ниже Gq –белка (АТ₁-рецептор). В случае взаимодействия P2X₁-рецептора и α₂-адренорецептора синергизм существенно понижался. Так, амплитуда, Slope и AUC агрегатограмм были меньше, соответственно, на 50,7%, 42,7% и 26,6% ($P < 0,001$) по сравнению с одновременной стимуляцией P2X₁-рецептора и АТ₁-рецептора. Следовательно, взаимодействие α₂-адренорецептора с P2X₁-рецептором менее эффективно, чем взаимодействие P2X₁-рецептора и АТ₁-рецептора и причина этого, вероятно, кроется в достижении порогового уровня вторичного мессенджера Ca²⁺ при одновременном функционировании АТФ-зависимого Ca²⁺-канала (P2X₁- рецептор) и сигнализации связанной с ингибированием Gs-белка (α₂-адренорецептор). Подтверждением этой гипотезы может быть сопоставимость показателей агрегатограмм при одновременной и изолированной стимуляции P2X₁-рецептора и α₂-адренорецептора. Так, амплитуда, Slope и AUC при одновременной стимуляции АТ₁-рецептора и α₂-адренорецептора были ниже, соответственно, на 54,3%, 46,6% и 20,8% ($P < 0,001$) таковых при взаимодействии P2X₁-рецептора и α₂-адренорецептора. При этом амплитуда и скорость агрегации при одновременной стимуляции рецепторов не отличалась от таковых при их изолированной стимуляции; различия касались AUC, значение которого были на 23,3% ($P < 0,001$) больше, чем при изолированной стимуляции α₂-адренорецептора. Следовательно, при одновременной стимуляции АТ₁-рецептора и α₂-адренорецептора воспроизводился синергизм, который мог быть связан с оптимизацией внутриклеточной сигнализации, расположенной ниже Gq –белка, в случае ингибирования Gs-белка.

Таким образом, через 24ч после КЛТ на фоне введения НПВП имела место гиперреактивность АТ₁-рецептора, ФАТ-рецептора, ТхА₂-рецептора, Р2Х₁-рецептора и GРVІ-рецептора, а также нормореактивность Р2У-рецепторов, α₂-адренорецептора и А2А-рецептора Тц. Синергизм при стимуляции Р2Х₁-рецептора и АТ₁-рецептора, α₂-адренорецептора и АТ₁-рецептора, Р2Х₁-рецептора и α₂-адренорецептора проявлялся усилением АТц. Эффективность компенсаторного усиления функции Тц ограничивалась аденозиновым А2А-рецептором, который ингибировал сигнализацию, связанную со стимуляцией Р2У-рецепторов и ТхА₂-рецептора.

3.3. Состояние рецепторного аппарата Тц через 48ч после КЛТ при сохранении введения НПВП.

Цель исследования – оценить выраженность гематурии и выяснить молекулярные механизмы, регулирующие функцию Тц через 48ч после КЛТ в верхней трети мочеточника у пациентов с неэффективной ЛКТ при сохранении введения НПВП в течение двух суток после оперативного вмешательства. В данный срок наблюдения макрогематурия имела место у 9 (42,9%) и микрогематурия у 12 (57,1%). У 5 (41,7%) пациентов микрогематурия соответствовала средней степени тяжести – $45,8 \pm 1,5$ э/пз (95% ДИ 41,5 -50,1 э/пз) и у 7 (58,3%) пациентов тяжелой степени – $63,6 \pm 4,0$ э/пз (95% ДИ 54,5-72,6 э/пз; $P=0,002$). Следовательно, после КЛТ на фоне введения НПВП сохранялась частота макрогематурии; выраженность микрогематурии уменьшилась на 25,7% ($p<0,001$), в среднем до $56,2 \pm 3,4$ п/з (95% ДИ 48,6-63,7 п/з) по сравнению с таковой в предыдущий срок наблюдения. В этой связи возникает вопрос – изменяется ли спектр рецепторов Тц регулирующих агрегацию Тц? Через 48ч после КЛТ выявлена гиперреактивность α₂-адренорецептора, нормореактивность ФАТ-рецептора и Р2Х₁-рецептора, а также гипореактивность пуриновых Р2У-рецепторов, АТ₁-рецептора, GРVІ-рецептора и А2А-рецептора (Таблица 3.5).

Таблица 3.5

**Индукцированная агрегация Тц у пациентов через 48ч после КЛТ в
верхней трети мочеточника при сохранении введения НПВП
у пациентов с неэффективной ЛКТ.**

Агонист EC ₅₀	Среднее значение $\bar{x} \pm SD$	Min –Max	Левый (95% ДИ)	Правый (95% ДИ)
Адреналин	59,8±0,9	55,0-66,0	58,1	61,5
ФАТ	45,6±1,4 P<0,001	38,0-59,0	42,7	48,4
АТФ	45,6±1,2 P<0,001	40,0-57,0	42,9	48,0
АДФ	41,0±1,3* P<0,001	34,0-50,0	38,4	43,7
Ан-2	39,7±1,2 P<0,001	33,0-48,0	37,1	42,3
Коллаген IV типа	36,0±1,2* P<0,001	30,0-49,0	33,4	38,6
ТхА2	32,3±0,6* P<0,001	29,0-37,0	31,1	33,6
Аденозин	32,4±0,8* P <0,001	27,0-39,0	30,7	34,0

Примечание. P – вероятность различий индуцированной АТц относительно эффекта адреналина. *– достоверность различий показателей на уровне p<0,05 по сравнению с значениями предыдущего агониста.

Следовательно, потенциальными индукторами активации клеток крови могли быть адреналин, ФАТ и АТФ. По сравнению со сроком наблюдения 24ч после КЛТ, реактивность α_2 -адренорецептора повысилась на 14,8%(P<0,001). Активность P2X₁-рецептора снизилась на 22,2%, P2Y-рецепторов –24,4%, ФАТ-рецептора – на 25,9%, A2A-рецептора –на 26,0%, АТ₁-рецептора –на 35,9%, GPVI-рецептора на –38,0% и ТхА2-рецептора – на 46,0% (P<0,001). Таким образом, через 48ч после КЛТ при сохранении введения НПВП имело место: (а) восстановление микроциркуляции и устранение гипоксии/ишемии тканей (индикатор активность P2X₁-

рецептора); (б) повышение активности САС и снижение стимуляции РАС; (в) уменьшение активности ТхА2-рецептора, следствием чего являлось уменьшение активности лейкоцитов и деградации коллагена IV типа БМ.

Анализ множественной корреляции позволил установить наличие отрицательной связи между выраженностью гематурии и активностью α_2 -адренорецептора ($r_{ГТ-\alpha_2AP} = -0,673$; $p < 0,05$), P2X₁-рецептора ($r_{ГТ-P2X} = -0,593$; $p < 0,05$), ФАТ-рецептора ($r_{ГТ-ФАТ} = -0,572$; $p < 0,05$) и РY-рецептора ($r_{ГТ-P2Y} = -0,555$; $p < 0,05$). Не обнаружена корреляционная связь между гематурией и активностью GPVI-рецептора, ТхА2-рецептора и АТ₁-рецептора. Множественный корреляционный анализ выявил значимые связи между активностью α_2 -адренорецептора и P2X₁-рецепторов, ФАТ-рецептора, (соответственно, $r_{\alpha_2AP-P2X} = 0,594$; $r_{\alpha_2AP-ФАТ} = 0,567$; $p < 0,05$), а также между активностью P2X₁-рецепторов и ФАТ-рецептора ($r_{AT-\alpha_2AP} = 0,514$; $p < 0,05$). Следовательно, через 48ч после КЛТ при сохранении ингибирования ЦОГ в Тц снижение выраженности микрогематурии могло быть связано с гиперреактивностью α_2 -адренорецептора, ФАТ-рецептора и P2X₁-рецептора. Можно предположить, что данный кластер рецепторов участвует в реализации компенсаторных механизмов гемостаза через 48ч после КЛТ.

Моделирование *in vitro* взаимодействия рецепторов в процессе усиления агрегации Тц подтвердило данную гипотезу. Установлено, что при изолированной стимуляции α_2 -адренорецептора регистрировался максимальный эффект (Таблица 3.6). Связывание агониста с P2X₁-рецептором воспроизводило параметры агрегации ниже, чем при стимуляции α_2 -адренорецептора. Так, амплитуда, Slope и AUC были меньше аналогичных показателей, соответственно, на 30,2%, 32,5% и 26,8% ($p < 0,001$). Менее выраженный эффект агрегации Тц наблюдался при стимуляции ФАТ-рецептора. Так, амплитуда АТц, значение Slope и AUC были на 18,0%, 24,8% и 13,6% меньше ($p < 0,001$), чем при стимуляции P2X₁-рецептора.

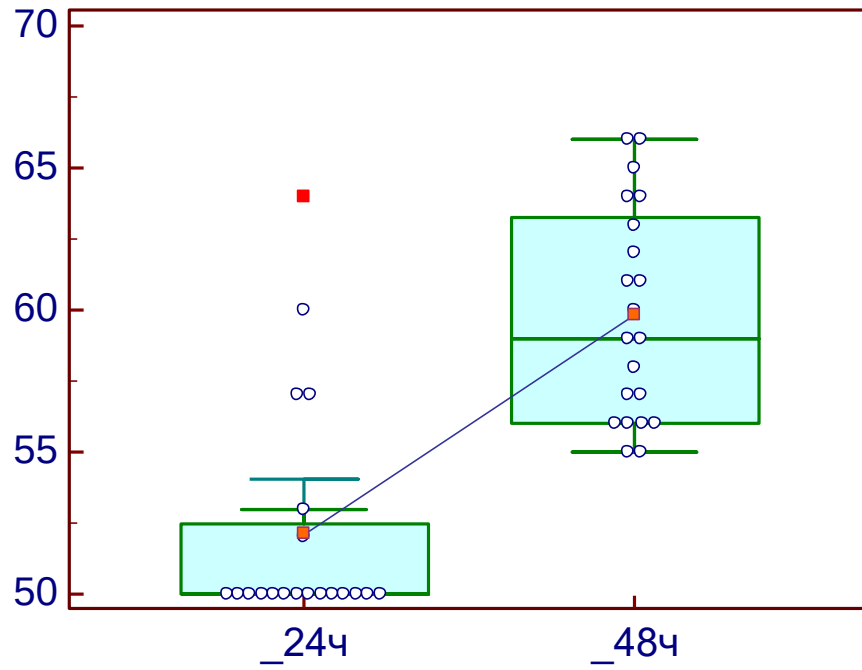
Таблица 3.6.

Характеристика показателей агрегации Тц через 48ч после КЛТ при моделировании взаимодействия рецепторов in vitro.

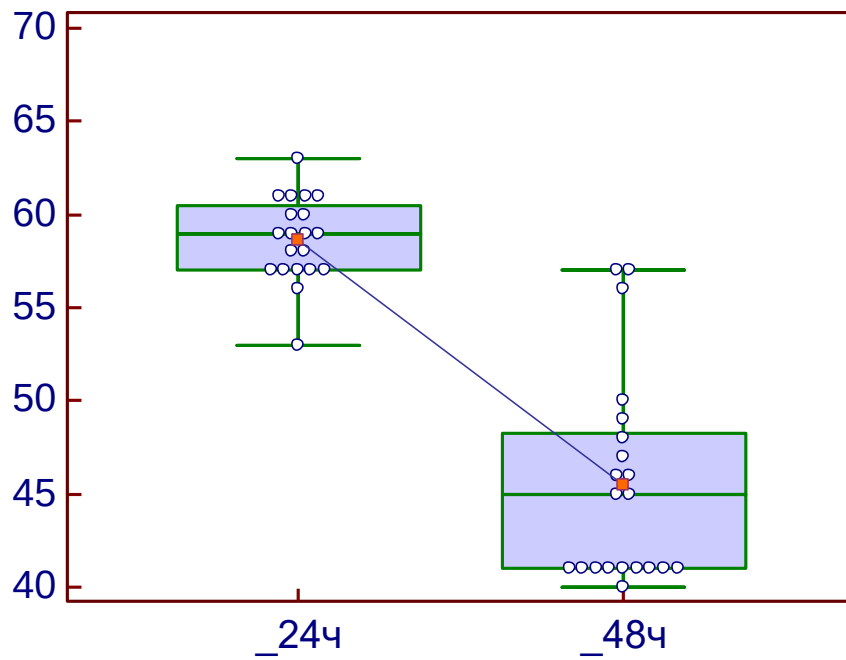
Агонисты ЕС ₁₀	Показатели агрегатограммы		
	Амплитуда агрегации (%)	Slope (% мин)	AUC (U)
Адреналин	15,9±0,8 (95% ДИ 14,2-17,6)	19,7±1,0 (95% ДИ 17,5-21,9)	23,1±0,8 (95% ДИ 21,3-24,8)
АТФ	11,1±0,5 ^{###} (95% ДИ 9,8-13,3)	13,3±0,5 ^{###} (95% ДИ 12,1-14,5)	16,9±0,8 ^{###} (95% ДИ 15,2-18,3)
ФАТ	9,1±0,5 [#] (95% ДИ 14,0-17,4)	10,0±1,0 [#] (95% ДИ 17,7-22,3)	14,6±0,4 [#] (95% ДИ 21,6-25,2)
Адреналин + АТФ	16,5±0,5 (95% ДИ 15,5-17,5)	21,1±0,7 (95% ДИ 19,7-22,6)	31,60±0,9 (95% ДИ 29,6-33,5)
Адреналин + ФАТ	14,1±0,6 ^{**} (95% ДИ 12,8-15,4)	17,3±0,8 ^{***} (95% ДИ 15,7-19,0)	24,7±1,3 ^{***} (95% ДИ 22,0-27,4)
АТФ +ФАТ	12,1±0,6 (95% ДИ 10,8-13,3)	15,3±1,0 (95% ДИ 13,0-17,6)	21,0±1,3 (95% ДИ 18,2-23,7)

Примечание: #— статистически значимое различие значений показателя агрегатограммы при изолированном воздействии агониста на уровне $p < 0,05$ по сравнению со значениями предыдущего агониста; ###— на уровне $p < 0,001$.
*—различие значений показателя агрегатограммы при комбинации воздействия агонистов на уровне $p < 0,05$ по сравнению со значениями предыдущей комбинации агонистов; ***— на уровне $p < 0,001$.

Через 48ч после КЛТ сохранялась реактивность α_2 -адренорецептора и P2X₁-рецептора. особенностью компенсаторных механизмов гемостаза являлась инверсия активности α_2 -адренорецептора и P2X₁-рецептора (Рисунок 3.6).



а



б

Рис. 3.6. Реактивность α_2 -адренорецептора (а) и P2X₁-рецептора (б) Тц через 24ч и 48ч после КЛТ при сохранении введения НПВП.

По оси ординат – индуцированная агрегация Тц (%); по оси абсцисс – срок наблюдения.

Вероятно, поочередная доминирующая активность α_2 -адренорецептора и P2X₁-рецептора является следствием меняющегося влияния САС на микроциркуляцию тканей МВП в условиях проводимой консервативной терапии. Через 48ч усиление стресс-реакции не сопровождалось провоцированием гипоксии/ишемии и воспаления в стенке МВП. Закономерно, что при гиперреактивности α_2 -адренорецептора в процесс агрегации вовлекалось больше Тц, чем при нормореактивности P2X₁-рецептора. Различия сигнализации P2X₁-рецептора и ФАТ-рецептора, вероятно, связаны с большей эффективностью функционирования Ca²⁺-канала, чем участка сигнализации, связанного с Gq-белком.

Возможен ли синергизм при одновременной стимуляции α_2 -адренорецептора, P2X₁-рецептора и ФАТ-рецептора через 48ч после КЛТ на фоне введения НПВП? Проведенный анализ показал, что максимальный эффект агрегации Тц регистрировался при одновременной стимуляции α_2 -адренорецептора и P2X₁-рецептора, связывающих субпороговую дозу агонистов. Синергизм может быть связан с сопряженностью внутриклеточной сигнализации обеспечивающей повышение уровня внутриклеточного Ca²⁺. Подтверждением гипотезы может быть увеличение значений AUC на 36,8% (P<0,001) по сравнению с изолированной стимуляцией α_2 -адренорецептора. Поскольку взаимодействие α_2 -адренорецептора и P2X₁-рецептора имело место в регуляции компенсаторных механизмов агрегации Тц через 24ч после КЛТ, то имело смысл сопоставить их эффективность (Рисунок 3.7). Оказалось, что через 48ч количество Тц, участвующих в агрегации, возросло на 50,5% (P<0,001) по сравнению с таковым на предыдущем сроке исследования. В этом контексте повышение активности α_2 -адренорецептора при десенситизации P2X₁-рецептора свидетельствует, что сигнализация связанная с ингибированием Gs-белка является определяющей в повышении АТц.

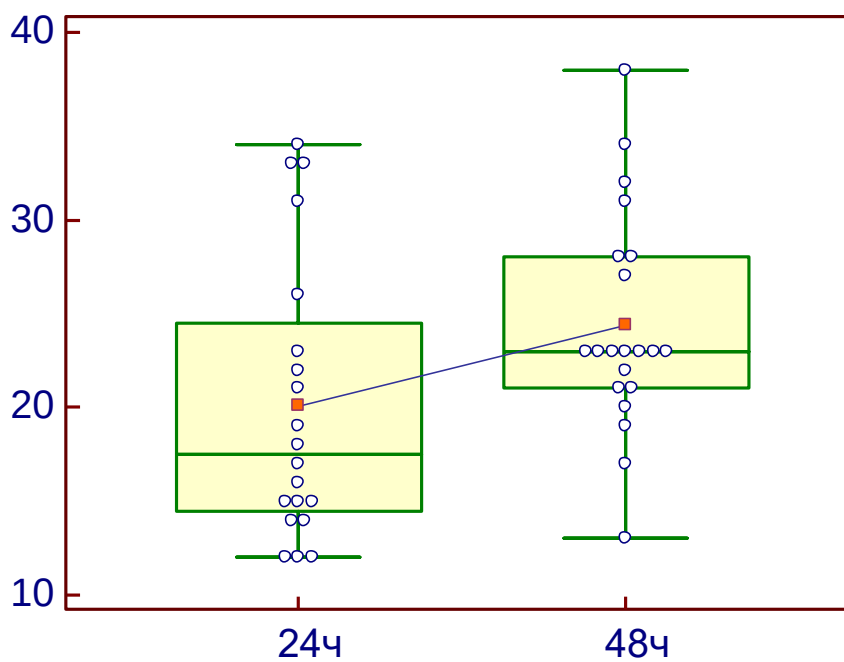


Рис. 3.7. Значения показателя AUC агрегатограмм через 24ч и 48ч после КЛТ при сохранении ингибирования ЦОГ.

По оси ординат – значения AUC (U); по оси абсцисс – срок наблюдения.

При одновременной стимуляции α_2 -адренорецептора и ФАТ-рецептора амплитуда, Slope и AUC не отличались от таковых при изолированной стимуляции α_2 -адренорецептора. Вероятно, при стимуляции α_2 -адренорецептора и ФАТ-рецептора не воспроизводилась ко-активация сигнальных путей. При одновременной стимуляции α_2 -адренорецептора и ФАТ-рецептора амплитуда, Slope и AUC были ниже таковых при одновременной стимуляции α_2 -адренорецептора и P2X₁-рецептора, соответственно, на 14,5%, 18,0% и 21,8% ($P < 0,05$). Различия потенцирования агрегации при двух рассмотренных комбинациях рецепторов обусловлены тем, что сигнализация связанная с Gi-белком (α_2 -адренорецептор) более эффективна, чем сигнализация опосредованная Gq-белком (ФАТ-рецептор). При моделировании взаимодействия P2X₁-рецептора и ФАТ-рецептора не выявлены различия характеристик агрегатограмм по сравнению с таковыми при взаимодействии α_2 -адренорецептора и ФАТ-рецептора ($p > 0,05$).

Вероятно, сигнализация связанная со стимуляцией ФАТ-рецептора в равной степени может усиливаться при сигнализации связанной с Gi-белком (α_2 -адренорецептор) и повышении внутриклеточного уровня Ca^{2+} вследствие открытия Ca^{2+} -канала ($\text{P}X_1$ -рецептор).

Таким образом, через 48ч после КЛТ при ингибировании ЦОГ возникала гиперреактивность α_2 -адренорецептора, что сопровождалось его взаимодействием с $\text{P}2X_1$ -рецептором и ФАТ-рецептором; в результате возрастала проагрегантная активность Тц и уменьшалась выраженность микрогематурии.

3.4. Молекулярные механизмы регуляции агрегации Тц через 72ч после КЛТ и отмены НПВП

Цель исследования – оценить выраженность гематурии и выяснить молекулярные механизмы, регулирующие гемостаз через 72ч после КЛТ в верхней трети мочеточника. Данная точка исследования представляет интерес, поскольку в течение 24ч после оперативного вмешательства пациентам не вводили НПВП и можно было проанализировать восстановление адаптационных механизмов Тц. В данный срок наблюдения макрогематурия отсутствовала; микрогематурия соответствовала средней степени тяжести $-25,6 \pm 1,2$ э/пз (95% ДИ 23,1 -28,1э/пз), т.е. уменьшилась в 2,2 раза по сравнению со сроком наблюдения 48ч после КЛТ на фоне введения НПВП.

Через 72ч после КЛТ выявлена нормореактивность α_2 -адренорецептора, GPVI -рецептора, AT_1 -рецептора, TxA_2 -рецептора, ФАТ-рецептора и $\text{P}2X_1$ -рецептора, а также гипореактивность пуриновых $\text{P}2Y$ -рецепторов и A_2A -рецептора (Таблица 3.7). По сравнению со сроком наблюдения 72ч после КЛТ, реактивность α_2 -адренорецептора снизилась на 7,9% ($P < 0,001$). Активность AT_1 -рецептора повысилась на 23,4%, A_2A -рецептора – на 32,1%, GPVI -рецептора на $-46,1\%$, TxA_2 -рецептора – на 53,6% ($P < 0,001$). Не изменилась ФАТ-рецептора, $\text{P}2X_1$ -рецептора, $\text{P}2Y$ -рецепторов.

Таблица 3.7.

Индукцированная агрегация Тц через 72ч после КЛТ в верхней трети мочеточника при отмене НПВП у пациентов с неэффективной ЛКТ.

Агонист EC ₅₀	Среднее значение $\bar{x} \pm SD$	Min – Max	Левый (95% ДИ)	Правый (95% ДИ)
Адреналин	55,1±0,9	50,0-62,0	53,3	56,9
Коллаген IV типа	52,6±0,8* P<0,05	47,0-59,0	50,8	54,4
Ан-2	49,0±0,6* P<0,001	45,0-56,0	47,6	50,4
ТхА2	49,6±1,1 P<0,001	29,0-37,0	47,4	51,8
ФАТ	46,3±0,8* P<0,001	41,0-53,0	44,6	48,1
АТФ	45,8±1,0 P<0,001	40,0-54,0	43,7	47,8
АДФ	40,2±0,5*** P<0,001	43,0-60,0	39,1	41,3
Аденозин	42,8±1,1 P<0,001	35,0-52,0	40,4	45,2

Примечание. P – вероятность различий индуцированной АТц относительно эффекта адреналина. *– достоверность различий показателей на уровне $p<0,05$ по сравнению со значениями предыдущего агониста; ***– на уровне $p<0,001$.

Таким образом, через 72ч после КЛТ отмена НПВП проявлялась: (а) восстановлением физиологической активности САС и РАС, активности ЦОГ в клетках крови; (б) сохранением стабильной перфузии тканей МВП, позволяющей поддерживать оптимальный уровень оксигенации тканей (индикатор – активность P2X₁-рецептора). При этом более низкая реактивность P2Y-рецепторов по сравнению с таковой P2X₁-рецептора ($P<0,001$) и повышение активности A2A-рецептора по сравнению с предыдущим сроком наблюдения ($P<0,001$) свидетельствуют об интенсификации участка метаболизма пуринов, связанного с повышением продукции аденозина; (в) снижением деградации коллагена IV типа БМ.

Анализ множественной корреляции выявил наличие отрицательной связи между выраженностью гематурии и активностью GP VI-рецептора ($r_{\text{ГТ-ГРVI-R}} = -0,825$; $p < 0,05$), α_2 -адренорецептора ($r_{\text{ГТ-}\alpha_2\text{AP}} = -0,784$; $p < 0,05$), AT_1 -рецептора ($r_{\text{ГТ-AT}_1} = -0,450$; $p < 0,05$) и TxA_2 -рецептора ($r_{\text{ГТ-TxA}_2} = -0,682$; $p < 0,05$). Не обнаружена корреляционная связь между гематурией и активностью пуриновых P_2X_1 -рецептора, P_Y -рецепторов и ФАТ-рецептора. Судя по силе корреляционной связи, ведущую роль в адгезии и АТц играет локальный фактор – коллаген IV-типа БМ стенки сосудов. Значимость данного факта является предсказуемой, поскольку: (а) в местах повреждения стенки сосудов Тц контактируют с субэндотелиальным коллагеном IV типа, что вызывает их активацию и образование тромба; (б) включается эффективный механизм физиологического тромбогенеза с использованием фибрина. В настоящее время признано, что адгезия Тц к коллагену требует предварительной активации интегринов посредством сигналов «inside-out», которые генерируются GP VI-рецептором и усиливаются высвобождаемыми из Тц медиаторами второй волны агрегации – АДФ и TxA_2 . Множественный корреляционный анализ позволил выявить значимые связи между активностью GP VI-рецептора и α_2 -адренорецептора ($r_{\text{ГРVI-}\alpha_2\text{AP}} = 0,577$; $p < 0,05$), AT_1 -рецептора ($r_{\text{ГРVI-AT}_1} = 0,410$; $p < 0,05$), а также между активностью α_2 -адренорецептора и AT_1 -рецептора ($r_{\alpha_2\text{AP-AT}_1} = 0,437$; $p < 0,05$). Выявлена отрицательная корреляционная связь между активностью A_2A -рецептора и α_2 -адренорецептора ($r_{\text{A}_2\text{A-}\alpha_2\text{AP-P}_2\text{Y}} = -0,571$; $p < 0,05$). Таким образом, через 24ч после отмены НПВП (72ч после КЛТ) снижение выраженности микрогематурии может быть связано со стимуляцией и взаимодействием GP VI-рецептора, α_2 -адренорецептора и AT_1 -рецептора, находящихся в состоянии нормореактивности. Участие катехоламинов в компенсаторных механизмах гемостаза после КЛТ независимо от реактивности α_2 -адренорецептора свидетельствует, что сигнализация связанная с Gi-белка является стереотипным механизмом повышения АТц (Рисунок 3.8).

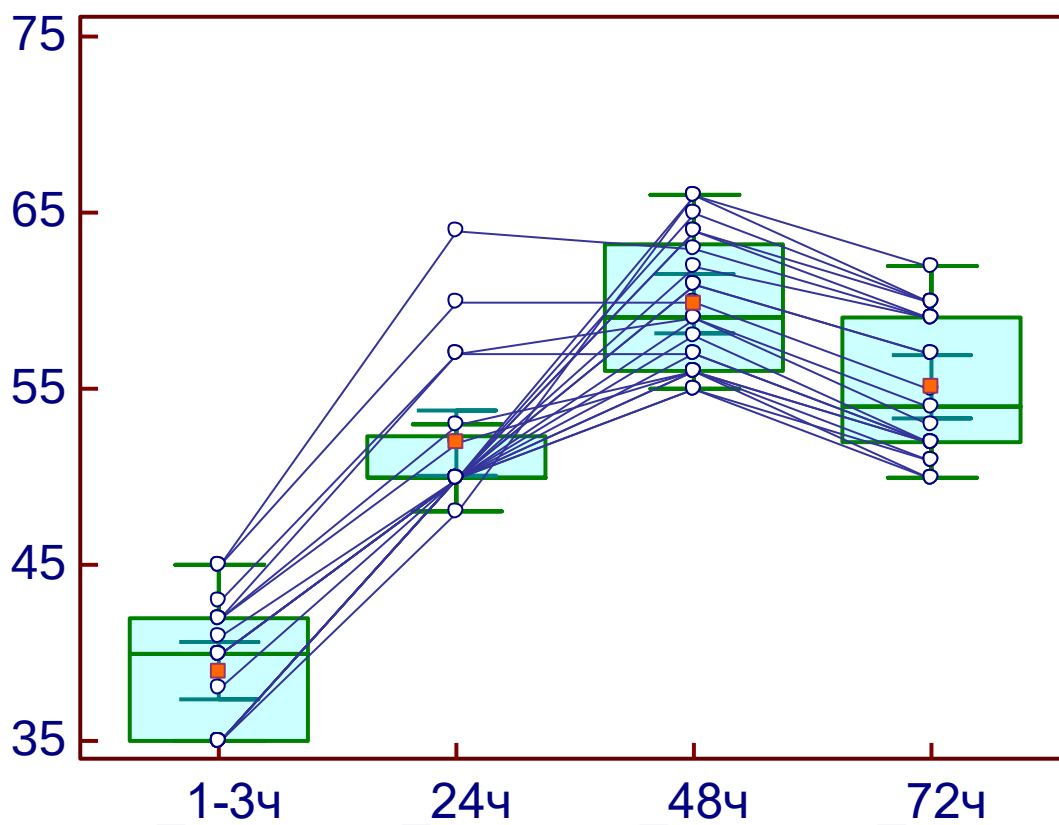


Рис.3.8. Реактивность α_2 -адренорецептора Тц после КЛТ в верхней трети мочеоточника в различные сроки после КЛТ.

По оси ординат – индуцированная агрегация Тц (%); по оси абсцисс – срок наблюдения.

Можно предположить, что кластер рецепторов, включающий GP VI-рецептор, α_2 -адренорецептор и AT_1 -рецептор, участвует в реализации адаптационных механизмы гомеостаза через 24ч после отмены введения НПВП. Моделирование *in vitro* взаимодействия рецепторов в процессе усиления активности Тц подтвердило данную гипотезу. Установлено, что селективная стимуляция GP VI-рецептор и AT_1 -рецептора воспроизводила сходные ($p > 0,05$) значения амплитуды АТц и наклона (Slope); различия касались только площади под кривой (AUC) (Таблица 3.8).

Таблица 3.8

Характеристика показателей агрегации Тц через 72ч после КЛТ при моделировании взаимодействия рецепторов *in vitro*.

Агонисты EC ₁₀	Показатели агрегатограммы		
	Амплитуда агрегации (%)	Slope (% мин)	AUC (U)
Коллаген IV типа	15,7±0,7 (95% ДИ 13,8-17,0)	19,0±1,0 (95% ДИ 16,7-21,3)	26,1±0,8 (95% ДИ 24,2-28,0)
Ан-2	13,4±0,5 (95% ДИ 12,2-14,6)	17,8 ±0,5 (95% ДИ 16,6-19,0)	20,4±0,6 ^{###} (95% ДИ 19,0 -21,8)
Адреналин	12,3±0,5 ^{##} (95% ДИ 11,1-13,5)	13,9±0,6 ^{###} (95% ДИ 12,6-15,2)	17,6±0,7 ^{##} (95% ДИ 16,0-19,2)
Коллаген IV типа + Адреналин	20,6±0,5 (95% ДИ 19,4-21,7)	28,4±0,8 (95% ДИ 26,8-30,0)	39,2±0,9 (95% ДИ 37,3-41,2)
Коллаген IV типа + Ан-2	15,6±0,5*** (95% ДИ 14,6-16,6)	19,4±0,8*** (95% ДИ 17,8-21,0)	33,2±1,0*** (95% ДИ 33,1-35,4)
Адреналин + Ан-2	11,9±0,5*** (95% ДИ 10,9-12,9)	15,5±0,9*** (95% ДИ 13,7-17,3)	27,1±1,0*** (95% ДИ 25,1-29,1)

Примечание: ##— статистически значимое различие значений показателя агрегатограммы при изолированном воздействии агониста на уровне $p<0,01$ по сравнению со значениями предыдущего агониста; ###— на уровне $p<0,001$.
*—различие значений показателя агрегатограммы при комбинации воздействия агонистов на уровне $p<0,05$ по сравнению со значениями предыдущей комбинации агонистов; ***— на уровне $p<0,001$.

Менее выраженный эффект агрегации регистрировался при стимуляции α_2 -адренорецептора. Так, при адреналин-индуцированной АТц амплитуда, Slope и AUC были меньше, соответственно, на 8,2%, 21,9% и 13,7% ($p<0,05$), чем при изолированной стимуляции АТ₁-рецепторов. По сравнению со значениями агрегатограмм при стимуляции GP VI-рецептора

разница этих показателей была еще более демонстративной – меньше, соответственно, на 21,7%, 26,8% и 32,6% ($P < 0,001$). Можно констатировать, что количество Тц, участвующих в агрегации при функционировании сигнального пути связанного с участком фосфолипаза $C\beta$ –ФИ-3К/Akt (GPVI-рецептор) больше, чем при сигнализации через Gq-белок (AT_1 -рецептор) и Gi-белок (α_2 -адренорецептор). Одной из причин этого явления, может быть десенситизация P2Y-рецепторов, что снижает эффективность аутокринной стимуляции Тц. В этом контексте ослабление вторичной волны агрегации, связанной с секрецией АДФ из плотных гранул, в большей степени проявлялось при стимуляции α_2 -адренорецептора.

Исследовательский вопрос – действительно ли взаимодействие GPVI-рецептора, AT_1 -рецептора и α_2 -адренорецептора может обеспечить усиление агрегации Тц? Установлено, что максимальный эффект агрегации Тц воспроизводился при взаимодействии пуриновых GPVI-рецептора и α_2 -адренорецептора, что может быть связано с ко-активацией участка сигнализации SFK–ФИ-3К. Подтверждением этой гипотезы может быть увеличение значений амплитуды, Slope и AUC при одновременной стимуляции GPVI-рецептора и AT_1 -рецептора, соответственно, на 31,2%, 49,5% и 50,2% ($P < 0,001$), по сравнению с изолированной стимуляцией GPVI-рецептора. При одновременной стимуляции GPVI-рецептора и AT_1 -рецептора – амплитуда, Slope и AUC были, соответственно, на 24,3%, 31,7% и 15,3% меньше, чем при одновременной стимуляции GPVI-рецептора и α_2 -адренорецептора ($P < 0,001$). Различия параметров агрегации, вероятно, связаны с большей сопряженностью сигнализации на участке Syk –ФИ-3К (GPVI-рецептор) с сигнализацией связанной с Gq-белком (AT_1 -рецептор) по сравнению с сигнализацией связанной с Gi- белком (α_2 -адренорецептор). Значения амплитуды, Slope и AUC при одновременной стимуляции AT_1 -рецептора и α_2 -адренорецептора были ниже, соответственно, на 23,7%, 20,1% и 18,4% ($P < 0,001$) относительно таковых при взаимодействии GPVI-рецептора и AT_1 -рецептора. По сравнению с синергизмом GPVI-рецептора и

α_2 -адренорецептора величина амплитуды, Slope и AUC при стимуляции AT_1 -рецептора и α_2 -адренорецептора были ниже, соответственно, на 42,2%, 45,4% и 30,9% ($P < 0,001$). Вероятно, менее эффективная регуляция Тц проявлялась в случае сопряженности сигнализации связанной с Gq-белком (AT_1 -рецептор) с Gi- белком (α_2 -адренорецептор), что связано с имеющимся нарушением аутокринной стимуляции Тц посредством АДФ.

Таким образом, через 72ч после КЛТ в верхней трети мочеточника при отмене НПВП (а) восстанавливалась нормореактивность α_2 -адренорецептора, GPVI-рецептора, AT_1 -рецептора, TxA2-рецептора, ФАТ-рецептора и P2X₁-рецептора; (б) сохранялось нарушение аутокринной стимуляции Тц с участием P2Y-рецепторов, причем нарушение сигнализации имело место выше Gi-белка и Gq-белка, поскольку нижерасположенные участки функционировали при стимуляции α_2 -адренорецептора и AT_1 -рецептора; (в) адаптационный механизм агрегации Тц регулировался GPVI-рецептором; (г) взаимодействие GPVI-рецептора, AT_1 -рецептора и α_2 -адренорецептора обеспечивало усиление проагрегантного эффекта, что способствовало ограничению микрогематурии.

3.5. Молекулярные механизмы регуляции агрегации Тц через 7 суток после КЛТ и отмены НПВП.

Нет ясности в вопросе продолжительности сохранения гематурии после КЛТ при длительном назначении НПВП у пациентов с нефролитиазом. Такая ситуация складывается в случае неэффективной элиминации конкрементов из МВП с последующим проведением КЛТ. В литературе отсутствует анализ функциональной активности клеток крови в отдаленные сроки после отмены ЛКТ. Как следствие, сдерживается совершенствование тактики управления послеоперационной геморрагией и гематурией, а также – репаративными процессами в стенке МВП.

Цель исследования – оценить выраженность гематурии и выяснить молекулярные механизмы, регулирующие функции Тц через 7суток после КЛТ и отмены НПВП у пациентов с неэффективной ЛКТ.

В данный срок наблюдения макрогематурия отсутствовала; микрогематурия сохранялась на уровне средней степени тяжести $-17,6 \pm 0,8$ э/пз (95% ДИ 15,9 - 19,2 э/пз), хотя и уменьшилась на 31,2% ($P < 0,001$) по сравнению со сроком наблюдения 72ч после КЛТ. Через 7 суток после КЛТ выявлена гиперреактивность GPVI-рецептора и TxA₂-рецептора; нормореактивность P2Y-рецепторов, АТ₁-рецептора, ФАТ-рецептора, P2X₁-рецептора, α_2 -адренорецептора и A2A-рецептора (Таблица 3.9).

Таблица 3.9.

Индукцированная агрегация Тц у пациентов через 7суток после КЛТ в верхней трети мочеточника и отмены НПВП у пациентов с неэффективной ЛКТ.

Агонист ЕС ₅₀	Среднее значение $\bar{x} \pm SD$	Min – Max	Левый (95% ДИ)	Правый (95% ДИ)
Коллаген IV типа	$57,2 \pm 0,8$	50,0-62,0	55,4	58,9
TxA ₂	$56,1 \pm 0,9$	49,0-62,0	54,1	58,0
АДФ	$55,4 \pm 0,8$	49,0-61,0	53,6	57,2
Ан-2	$53,3 \pm 0,8$ $P < 0,01$	45,0-59,0	51,6	55,1
ФАТ	$50,6 \pm 0,8^*$ $P < 0,001$	45,0-58,0	49,0	52,2
АТФ	$48,8 \pm 0,8$ $P < 0,001$	44,0-56,0	47,2	50,4
Адреналин	$45,9 \pm 1,1^*$ $P < 0,001$	38,0-59,0	43,5	48,2
Аденозин	$53,4 \pm 0,96^{**}$	47,0-60,0	51,5	55,2

Примечание. Р – вероятность различий АТц относительно эффекта коллагена IV типа. * – достоверность различий показателей на уровне $p < 0,05$ по сравнению с значениями предыдущего агониста; *** – на уровне $p < 0,001$.

По сравнению со сроком наблюдения 72ч после КЛТ, реактивность α_2 -адренорецептора снизилась на 16,7% ($P<0,001$); увеличилась активность P2X₁-рецептора на 6,5%, GPVI-рецептора – на 8,7%, AT₁-рецептора – на 8,8%, ФАТ-рецептора –9,3%, TxA₂-рецептора – на 13,1%, A₂A-рецептора –на 24,8% и P2Y-рецепторов –на 37,8% ($P<0,001$). Следовательно, через 7суток после КЛТ и отмены НПВП: (а) сохранялась физиологическая активность САС и РАС; (б) повышалась активность ЦОГ и функция лейкоцитов, возрастала деградация коллагена IV типа БМ; (в) усиливался метаболизм пуринов и продукция аденозина.

Анализ множественной корреляции выявил наличие отрицательной связи между выраженностью гематурии и активностью GP VI-рецептора ($r_{ГТ-GPVI-R} = -0,778$; $p<0,05$), AT₁-рецептора ($r_{ГТ-AT1} = -0,606$; $p<0,05$), TxA₂-рецептора ($r_{ГТ-TxA2} = -0,444$; $p<0,05$); PY-рецепторов ($r_{ГТ-P2Y} = -0,710$; $p<0,05$), α_2 -адренорецептора ($r_{ГТ-\alpha_2AP} = -0,511$; $p<0,05$), P2X₁-рецептора ($r_{ГТ-P2X} = -0,377$; $p<0,05$) и ФАТ-рецептора ($r_{ГТ-ФАТ} = -0,440$; $p<0,05$). Положительная корреляционная связь присутствовала между выраженностью гематурии и активностью A₂A-рецептора ($r_{ГТ-A2A} = 0,524$; $p<0,05$) и отрицательная корреляционная связь между активностью A₂A-рецептора и α_2 -адренорецептора ($r_{A2A-\alpha_2AP-P2Y} = -0,571$; $p<0,05$). Установлены корреляционные связи между активностью GPVI-рецептора, ФАТ-рецептора и TxA₂-рецептора ($r_{GPVI-ФАТ} = 0,632$; $p<0,05$; $r_{GPVI-TxA2} = 0,422$; $p<0,05$ и $r_{ФАТ-TxA2} = 0,543$; $p<0,05$), что отражает усиление активности ЦОГ в клетках крови через 7 суток после отмены НПВП, повышение активности лейкоцитов и их участие в деградации коллагена VI-типа базальной мембраны. Выявлены корреляционные связи между активностью GPVI-рецептора и PY-рецепторов ($r_{GPVI-P2Y} = 0,636$; $p<0,05$), AT₁-рецептора ($r_{GPVI-AT} = 0,535$; $p<0,05$), а также между активностью PY-рецепторов и AT₁-рецептора ($r_{P2Y-AT1} = 0,401$; $p<0,05$), что отражает возможности взаимодействия данных рецепторов в адаптационных реакциях тромбоцитарного звена гемостаза.

Моделирование взаимодействия рецепторов Тц позволило установить оптимальные комбинации рецепторов, при стимуляции которых воспроизводился синергизм. Через 7 суток после КЛТ снижение выраженности микрогематурии может быть связано с взаимодействием GP VI-рецептора, P₂Y-рецепторов и AT₁-рецептора. По сравнению с предыдущим сроком наблюдения активность рецепторов повысилась ($p < 0,001$). Взаимодействие GPVI-рецептора с AT₁-рецептора отмечено через 72ч после КЛТ; данный факт свидетельствует, что в отдаленные сроки после отмены НПВП сигнализация посредством участка фосфолипаза C β –ФИ-3К (GP VI-рецептор) и через Gq-белок (AT₁-рецептор) лежит в основе синергизма рецепторов при реализации компенсаторных механизмов гемостаза. При сравнении параметров агрегации установлено, что селективная стимуляция GP VI-рецептор и P₂Y-рецепторов воспроизводила сходные ($p > 0,05$) значения амплитуды АТц, Slope и AUC (Таблица 3.10). Менее выраженный эффект агрегации регистрировался при стимуляции AT₁-рецептора. В данном случае значения амплитуды, Slope и AUC были, соответственно, на 18,7%, 27,4% и 38,0% меньше ($p < 0,05$), чем при стимуляции P₂Y-рецепторов. По сравнению со значениями стимуляции GP VI-рецептора амплитуда, Slope и AUC были меньше, соответственно, на 22,7%, 33,7% и 35,0% ($P < 0,001$). Следовательно, эффективность взаимодействия и количество Тц, участвующих в агрегации при функционировании сигнального пути, связанного с участком фосфолипаза C β –ФИ-3К (GPVI-рецептор) и сигнализации ассоциированной с Gi- и Gq-белками (P₂Y-рецепторы) являлись сопоставимыми. Вероятно, эффект достигался вследствие (а) восстановления нормореактивности пуриновых P₂Y-рецепторов; (б) участия аутокринной стимуляции в агрегации Тц при стимуляции GPVI-рецептора. При одновременной стимуляции GPVI-рецептора и P₂Y-рецепторов отмечено увеличение значений амплитуды, Slope и AUC, соответственно на 79,1%, 55,9% и 52,3%% ($P < 0,001$), по сравнению с изолированной стимуляцией GPVI рецептора.

Таблица 3.10.

**Характеристика показателей функциональной активности Тц через
7 суток после КЛТ при моделировании взаимодействия рецепторов Тц *in vitro* с использованием субпороговой дозы агонистов**

Агонисты EC ₁₀	Показатели агрегатограммы		
	Амплитуда агрегации (%)	Slope (% мин)	AUC (U)
Коллаген IV типа	16,3±0,9 (95% ДИ 14,3-18,3)	25,2±1,2 (95% ДИ 22,5-27,8)	33,1±1,3 (95% ДИ 30,0-36,2)
АДФ	15,5±1,0 (95% ДИ 13,03-17,7)	23,0±1,4 (95% ДИ 19,9-26,1)	34,7±1,5 (95% ДИ 31,2-38,2)
Ан-2	12,6±0,5 [#] (95% ДИ 11,4-13,8)	16,7 ±1,3 ^{##} (95% ДИ 13,8-19,6)	21,5±1,6 ^{###} (95% ДИ 17,8 -25,2)
Коллаген IV типа + АДФ	29,2±0,9 (95% ДИ 27,5-30,9)	39,3±1,1 (95% ДИ 36,9-41,7)	50,4±2,3 (95% ДИ 45,5-55,2)
Коллаген IV типа + Ан-2	30,0±0,7 (95% ДИ 28,5- 31,6)	35,1±1,1 ^{**} (95% ДИ 33,1-37,2)	41,4±1,2 ^{***} (95% ДИ 38,9-44,0)
АДФ+Ан-2	21,6±0,8 ^{***} (95% ДИ 19,9- 23,3)	27,0±1,0 ^{***} (95% ДИ 24,9-29,1)	32,8±1,3 ^{***} (95% ДИ 30,1-35,6)

Примечание: #– статистически значимое различие значений показателя агрегатограммы при изолированном воздействии агониста на уровне $p<0,05$ по сравнению со значениями предыдущего агониста; ## – на уровне $p<0,01$; ###– на уровне $p<0,001$. **–различие значений показателя агрегатограммы при комбинации воздействия агонистов на уровне $p<0,01$ по сравнению со значениями предыдущей комбинации агонистов. ***– на уровне $p<0,001$.

При стимуляции следующей пары агонистов– GPVI-рецептора и AT₁-рецептора основные параметры агрегации Тц превышали ($p<0,05$) таковые при изолированной стимуляции GPVI--рецептора. В тоже время, скорость агрегации и AUC при одновременной стимуляции GPVI-рецептора и AT₁-

рецептора были ниже, соответственно, на 10,7% и 17,9% ($P < 0,05$) относительно таковых при взаимодействии GPVI-рецептора и P2Y-рецепторов. Следовательно, при взаимодействии GPVI-рецептора и AT₁-рецептора сопряженность сигнализации, связанной с участком SFK-ФИ-3K (GP VI-рецептор) при активации Gq-белка (AT₁-рецептор) – менее эффективная, чем при дополнительной сигнализации посредством Gi- и Gq-белков (P2Y-рецепторы). Амплитуда, Slope и AUC при одновременной стимуляции P2Y-рецепторов и AT₁-рецептора были ниже, соответственно, на 28,0%, 23,0% и 20,8% ($P < 0,001$) относительно таковых при взаимодействии GPVI-рецептора и AT₁-рецептора. По сравнению с одновременной стимуляцией GPVI-рецептора и P2Y-рецепторов амплитуда, Slope и AUC при стимуляции P2Y-рецепторов и AT₁-рецептора были ниже, соответственно, на 26,0%, 31,3% и 34,9% ($P < 0,001$). Следовательно, наименее эффективный синергизм проявлялся в случае сопряженности сигнализации связанной с одним и тем же Gq-белком (AT₁-рецептор и P2Y₁-рецептор), что возможно в случае нормореактивности пуриновых P2Y-рецепторов.

Таким образом, через 7 суток после КЛТ в верхней трети мочеточника и отмены НПВП: выявлена гиперреактивность GPVI-рецептора и TxA₂-рецептора Тц; нормореактивность P2Y-рецепторов, AT₁-рецептора, ФАТ-рецептора и P2X₁-рецептора, α₂-адренорецептора и A2A-рецептора. Наличие данного кластера активности рецепторов сопровождалось: (а) восстановлением аутокринной стимуляции Тц и продукции аденозина; (б) повышением реактивности Тц в ответ на стимуляцию GPVI-рецептора; (в) взаимодействием GP VI-рецептора, PY-рецепторов и AT₁-рецептора, позволяющим усилить адаптационную реакцию Тц; при этом сопряженность сигнализации, связанной с участком SFK-ФИ-3K (GP VI-рецептор) при активации Gi- и Gq-белков (P2Y-рецепторы), была наиболее эффективной; (г) повышением функциональной активности лейкоцитов, развитием воспалительной реакции в МВП и деградацией коллагена IV типа БМ сосудов и уротелия, что могло провоцировать диapedез эритроцитов.

ГЛАВА 4

КОМПЕНСАТОРНЫЕ И АДАПТАЦИОННЫЕ МЕХАНИЗМЫ ТРОМБОЦИТАРНОГО ЗВЕНА ГЕМОСТАЗА ПОСЛЕ КЛТ В ВЕРХНЕЙ ТРЕТИ МОЧЕТОЧНИКА ПРИ НЕЭФФЕКТИВНОЙ ЛКТ

Тромбоцитарное звено гемостаза традиционно рассматривается как мишень для профилактики тромбогенеза. В случае ингибирования внутриклеточных сигнальных путей при использовании фармакологических препаратов (стероидных гормонов, НПВП, блокаторов Ca^{2+} -каналов) функциональная активность Тц снижается. В этих условиях ограничение гематурии должно происходить путем включения компенсаторных механизмов поддержания гемостаза. Что собой представляют такие компенсаторные механизмы остается не ясным. После отмены НПВП возможно восстановление адаптационных механизмов Тц, связанное с оптимизацией функционирования внутриклеточной сигнализации на участке ЦОГ-ТхА2. Информация касающаяся регуляции Тц при переходе от компенсаторных к адаптационным механизмам —отсутствует.

Гипотеза. Можно предположить, что: спектр компенсаторных и адаптационных реакций Тц формируется в зависимости от локального (органного) и системного гуморального «запроса» организма; регулируется функциональной активностью рецепторов Тц, а, следовательно, является переменным. При этом возможен синергизм отдельных рецепторов, позволяющий усиливать агрегацию Тц. В этой связи исследование активности рецепторов Тц (анализ кластеров функционально активных рецепторов) позволило бы мониторить регуляцию и эффективность компенсаторных и адаптационных механизмов гемостаза, обеспечивающих ограничение гематурии. В перспективе данный подход открывает возможности прогнозирования риска развития макрогематурии и позволяет уточнить пути разработки эффективных методов фармакологической коррекции геморрагии.

Цель исследования – выявить причинно-следственные связи факторов риска нефролитиаза и патогенетических факторов гематурии при локализации конкрементов средних размеров в верхней трети мочеточника после КЛТ при назначении и отмене НПВП у пациентов с неэффективной ЛКТ; установить механизмы регуляции компенсаторных и адаптационных механизмов тромбоцитарного звена гемостаза после КЛТ при назначении и отмене НПВП.

4.1. Связь гематурии и реактивности рецепторов Тц после КЛТ в верхней трети мочеточника.

Исследовательский вопрос – как изменяется функциональная активность рецепторов Тц при различной выраженности гематурии после КЛТ в верхней трети мочеточника при сохранении введения и отмене НПВП?

На протяжении двух суток после КЛТ при введении НПВП выраженность микрогематурии соответствовала тяжелой степени, которая в дальнейшем снижалась до средней степени; через 7 суток микрогематурия находилась на уровне $17,6 \pm 0,8$ э/пз (95% ДИ 15,9-19,3 э/пз) (Рисунок 3.1). Через 24ч после КЛТ при сохранении введения НПВП выявлена тяжелая степень микрогематурии; при этом имела место гиперреактивность АТ₁-рецептора, ФАТ-рецептора, ТхА₂-рецептора, Р2Х₁-рецептора и GР VI-рецептора; Р2У-рецепторы, α₂-адренорецептор и А2А-рецептора демонстрировали нормореактивность. По сравнению со сроком наблюдения 1-3ч после КЛТ, реактивность α₂-адренорецептора и аденозинового А2А-рецептора повысилась, соответственно, на 33,2% и 19,7% (P<0,001). Активность ФАТ-рецептора снизилась на 5,7%, ТхА₂-рецептора – на 6,4%, GРVI-рецептора на –6,5% и Р2У-рецепторов –7,0% (p<0,05); активность АТ₁-рецептора и Р2Х₁-рецептора не изменилась (Рисунки 3.1-3.5).

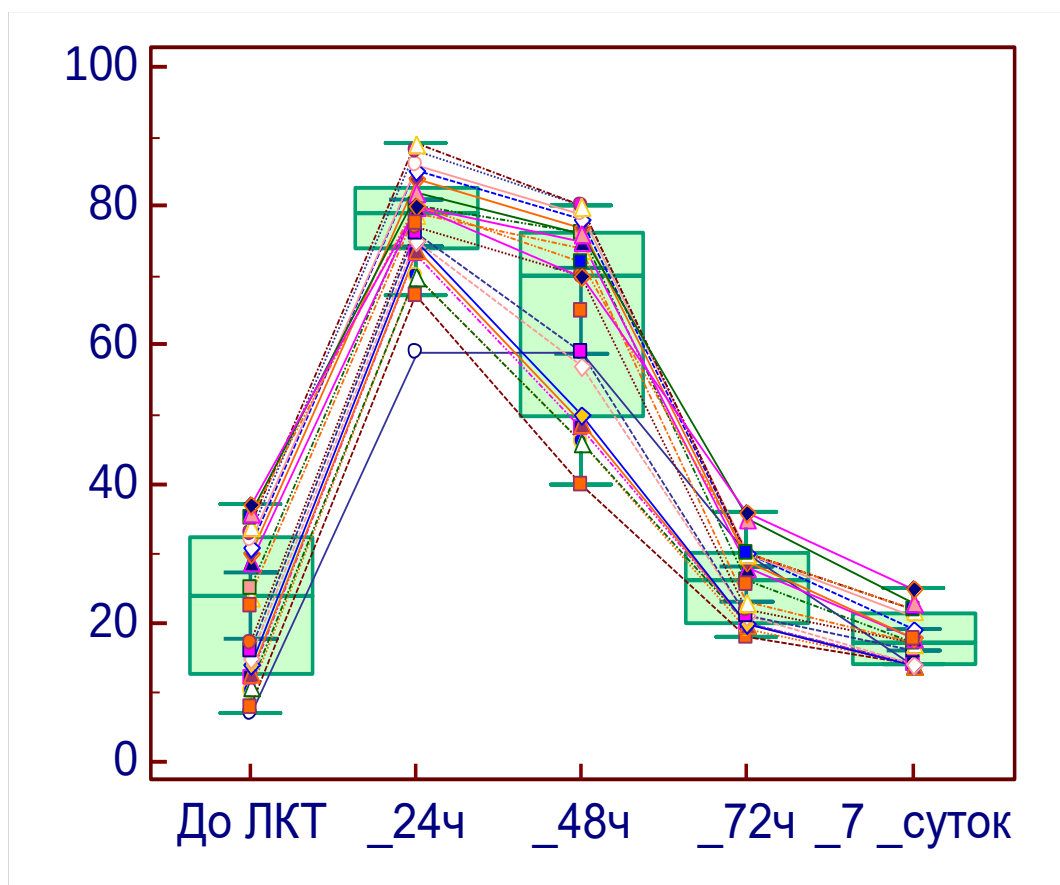
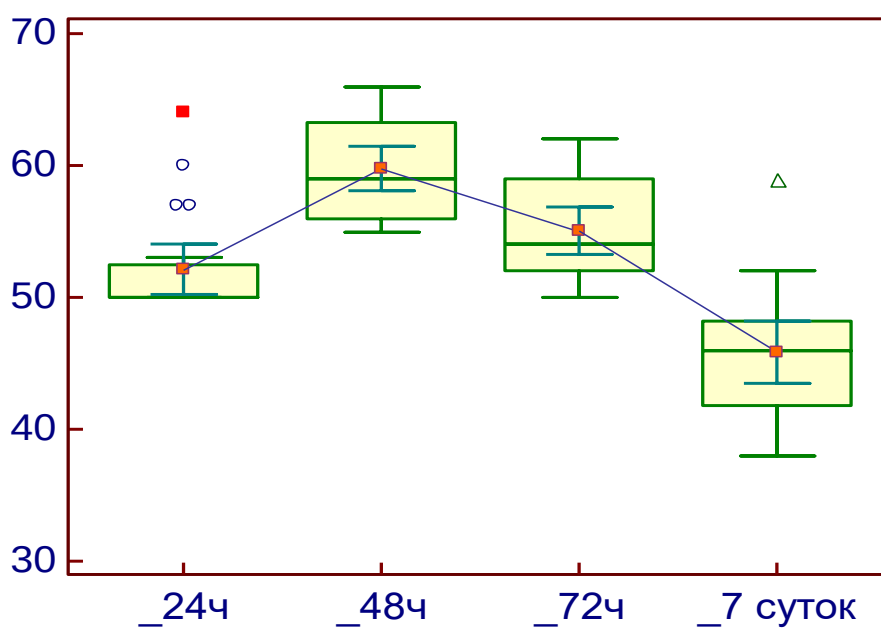


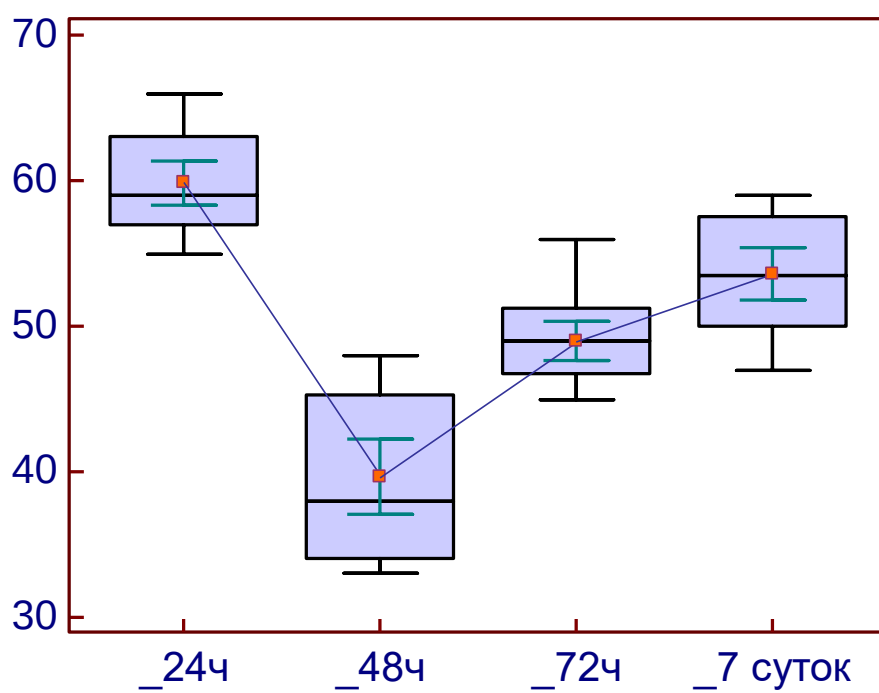
Рис. 3.1 Динамика микрогематурии после КЛТ в верхней трети мочеочника.

По оси ординат – выраженность микрогематурии (э/пз); по оси абсцисс – срок наблюдения.

Через 48ч после КЛТ при сохранении введения НПВП выраженность микрогематурии уменьшилась на 25,7% ($p < 0,001$) по сравнению с предыдущим сроком наблюдения. При этом выявлена гиперреактивность α_2 -адренорецептора, нормореактивность ФАТ-рецептора и $P2X_1$ -рецептора, а также гипореактивность пуриновых $P2Y$ -рецепторов, AT_1 -рецептора, $GPVI$ -рецептора и $A2A$ -рецептора. Следовательно, через 48ч после КЛТ повышалась активация САС. По сравнению со сроком наблюдения 24ч после КЛТ, реактивность α_2 -адренорецептора повысилась на 14,8% ($P < 0,001$).



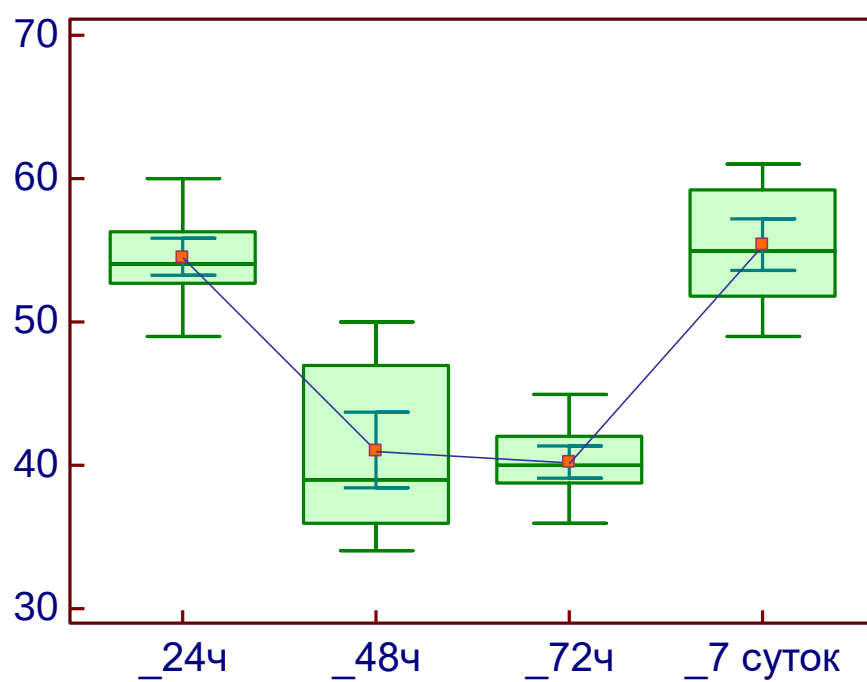
а



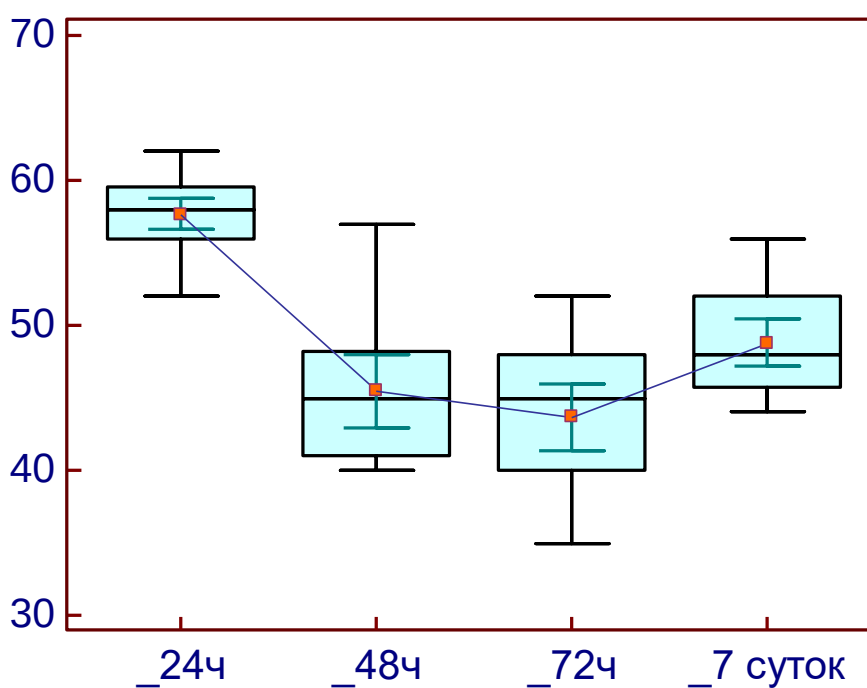
б

Рис. 3.2. Реактивность α_2 -адренорецептора (а) и AT_1 -рецептора (б) Тц в различные сроки после КЛТ в верхней трети мочеточника.

По оси ординат – индуцированная агрегация Тц (%); по оси абсцисс – срок наблюдения.



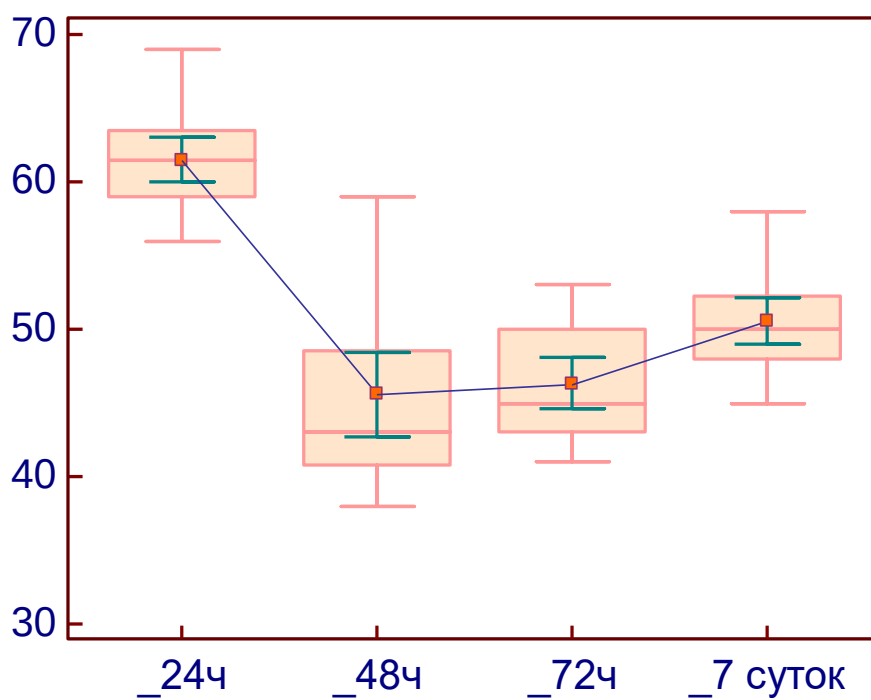
а



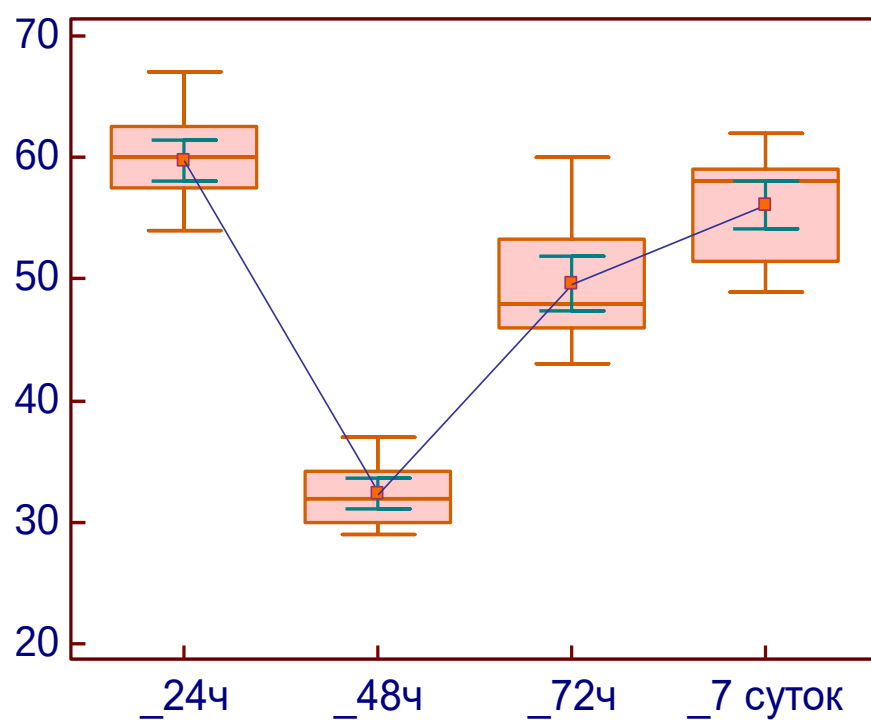
б

Рис. 3.3. Реактивность пуриновых P2Y-рецепторов (а) и P2X₁-рецепторов (б) Тц после КЛТ в верхней трети мочеточника.

По оси ординат – индуцированная агрегация Тц (%); по оси абсцисс – срок наблюдения



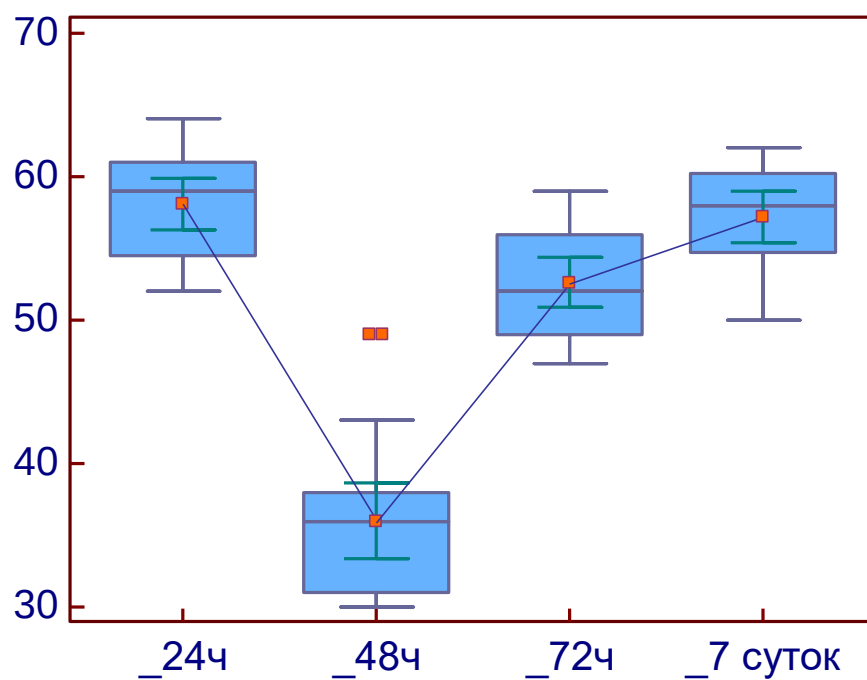
а



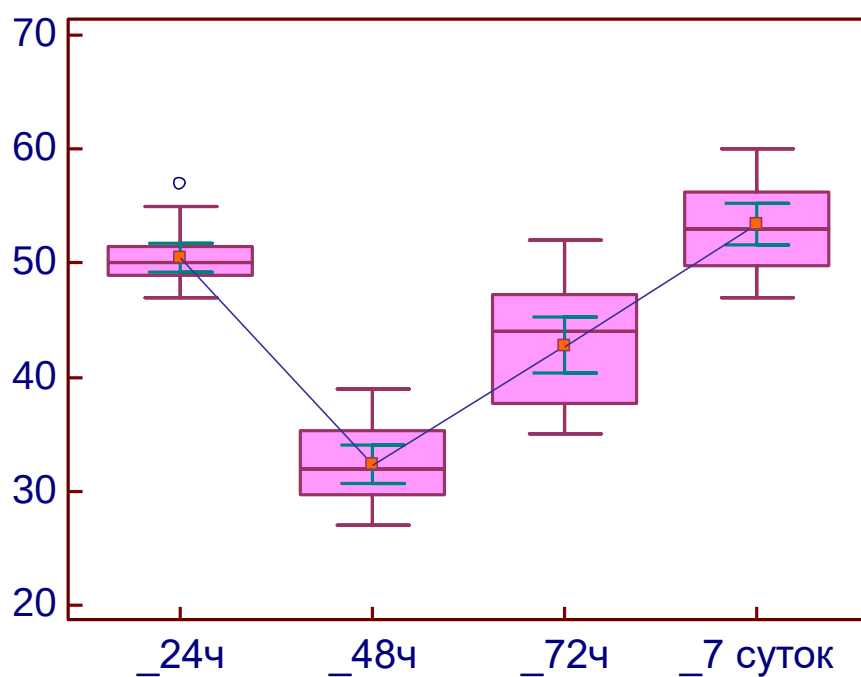
б

Рис.3.4. Реактивность ФАТ-рецепторов (а) и ТхА2-рецепторов (б) Тц после КЛТ в верхней трети мочеточника.

По оси ординат – индуцированная агрегация Тц (%); по оси абсцисс – срок наблюдения



а



б

Рис. 3.5. Реактивность GVI-рецепторов (а) и A2A-рецепторов (б) Тц после КЛТ в верхней трети мочеточника.

По оси ординат – индуцированная агрегация Тц (%); по оси абсцисс – срок наблюдения

Активность P2X₁-рецептора снизилась на 22,2%, P2Y-рецепторов –24,4%, ФАТ-рецептора – на 25,9%, A2A-рецептора –на 26,0%, АТ₁-рецептора –на 35,9%, GPVI-рецептора на –38,0% и ТхА2-рецептора – на 46,0% (P<0,001).

Через 72ч после КЛТ (через 24ч после отмены НПВП) микрогематурия уменьшилась в 2,2 раза по сравнению со сроком наблюдения 48ч после КЛТ (p<0,001) и соответствовала средней степени выраженности).

Функциональная активность Тц модулировалась нормореактивностью α_2 -адренорецептора, GPVI-рецептора, АТ₁-рецептора, ТхА2-рецептора, ФАТ-рецептора и P2X₁-рецептора. По сравнению со сроком наблюдения 48ч после КЛТ, реактивность α_2 -адренорецептора снизилась на 7,9% (P<0,001).

Активность АТ₁-рецептора повысилась на 23,4%, A2A-рецептора –на 32,1%, GPVI-рецептора на –46,1%, ТхА2-рецептора – на 53,6% (P<0,001). Не изменилась ФАТ-рецептора, P2X₁-рецептора, P2Y-рецепторов. Через 7 суток после КЛТ (120ч после отмены НПВП) микрогематурия уменьшилась на 31,2% (P<0,001) по сравнению с предыдущим сроком наблюдения. В модуляции тромбоцитарного звена гемостаза могли принимать участие GPVI-рецептор и ТхА2-рецептор (состояние гиперреактивности), а также P2Y-рецепторы, АТ₁-рецептор, ФАТ-рецептор, P2X₁-рецептор и α_2 -адренорецептор (состояние нормореактивности). По сравнению со сроком наблюдения 72ч после КЛТ, реактивность α_2 -адренорецептора снизилась на 16,7% (P<0,001); увеличилась активность P2X₁-рецептора на 6,5%, GPVI-рецептора – на 8,7%, АТ₁-рецептора – на 8,8%, ФАТ-рецептора –9,3%, активность ТхА2-рецептора – на 13,1%, A2A-рецептора –на 24,8% и P2Y-рецепторов –на 37,8% (P<0,001).

Исследовательские вопросы – связана ли активация α_2 -адренорецептора и АТ₁-рецептора; пуриновых P2X₁-рецептора, P2Y-рецепторов, A2A-рецептора; ТхА2-рецептора, ФАТ-рецептора и GPVI-рецептора с выраженностью гематурии после КЛТ; какие молекулярные механизмы задействованы в патогенезе дисфункции Тц и восстановлении гемостаза при назначении и отмене ЛКТ?

4.2. Причинно-следственные связи факторов риска нефролитиаза и патогенетических факторов гематурии при локализации конкрементов в верхней трети мочеточника.

При анализе факторов риска и механизмов гематурии, возникающей после КЛТ, обращает на себя внимание корреляционная связь ($r_{ГТ-В}=0,540$; $p<0,05$) между выраженностью гематурии и возрастом пациентов. По сути, это означает, что у лиц пожилого возраста более часто возможно развитие тяжелой гематурии после КЛТ, чем у молодых пациентов. Пожилой возраст пациентов традиционно рассматривается как фактор риска появления конкрементов в почке [31] и развития системной геморрагии [278]. Проведенный анализ корреляционных связей позволяет рассматривать несколько причин, обуславливающих выраженность геморрагии у данного контингента больных. Во-первых, наличие хронического воспалительного процесса в МВП. Так, выявленная корреляция между возрастом и лейкоцитурией ($r_{В-Лу}=0,619$; $p<0,05$), возрастом, активностью α_2 -адренорецептора и AT_1 -рецептора (соответственно, $r_{В-\alpha_2AP}=0,317$; $r_{В-AT_1P}=0,515$; $p<0,05$) позволяет предложить следующую особенность развития хронического воспаления у лиц пожилого возраста при МКБ. Повышение экспрессии адренорецепторов и ангиотензиновых рецепторов на клетках крови вследствие активации САС и ренальной РАС после КЛТ сопровождается развитием периваскулярных инфильтратов, синтезом провоспалительных цитокинов, альтерацией рыхлой волокнистой соединительной ткани мочеточника и миграцией лейкоцитов в просвет мочеточника. На этом фоне, повышение проницаемости гисто-гематического барьера будет сопровождаться диапедезом эритроцитов и гематурией. Наличие связи между возрастом и размером конкрементов ($r_{В-РК}=0,354$; $p<0,05$) позволяет предположить, что у пожилых пациентов размеры конкремента, оказывающего механическое воздействие на слизистую

оболочку МВП, определяет площадь развития в ней воспалительной реакции, на фоне которой осуществляется КЛТ. Во-вторых, высокое потребление Na^+ с пищей подавляет секрецию альдостерона, что увеличивает кальциурию и создает предпосылки для формирования камней в почках [50], причем данный процесс развивается на фоне снижения резистентности тканей к микробной инвазии [99]. В-третьих, заболевания, связанные с возрастом, в основном вызваны прогрессирующей деградацией целостности коммуникационных систем внутри органов и между ними [193]. Это частично опосредовано снижением эффективности внутриклеточных сигнальных систем рецепторов и возрастающей неспособностью организма справляться со стрессом, приводящим к апоптозу и клеточному старению [312].

Нет единой точки зрения относительно связи послеоперационной гематурии с размером и локализацией конкремента. Косвенным подтверждением существования такой связи считаются длительность литотрипсии. В наших исследованиях установлена корреляционная связь между размером конкремента и выраженностью гематурии ($r_{\text{ГТ-РК}}=0,488$; $p<0,05$), что может быть связано с удельным объемом альтерации слизистой мочеточника. Значения данного индикатора определяются: (а) низкой резистентностью верхнего отдела мочеточника к механической деформации [336]; (б) нарушениями трофики тканей МВП, что предопределяет вовлеченность в патологический процесс стенки сосудов. Наличие связи между размером конкремента и возрастом ($r_{\text{В-РК}}=0,354$; $p<0,05$), вероятно, является отражением влияния тяжести воспалительного процесса в МВП у лиц пожилого возраста [282]. Можно предположить, что чем больше размер конкремента, тем больше площадь механического повреждения слизистой мочеточника. Как следствие, развивается периваскулярная инфильтрация лейкоцитами и отек рыхлой волокнистой соединительной ткани, возникает вазодилатация сосудов. Ранее было показано, что инициация и поддержание интенсивности диапедеза эритроцитов определяется клеточным составом

периваскулярных инфильтратов, секретирующих провоспалительные БАВ [95], а также апоптозом эндотелиальных клеток [387].

Таким образом, выполнение литотрипсии на фоне хронического воспаления в СО мочеточника ожидаемо будет сопровождаться геморрагией. Вызывает интерес корреляция между размером конкремента и активностью АТ₁-рецептора ($r_{PK-AT1}=0,550$; $p<0,05$), что отражает предсуществующее влияние РАС на водно-электролитный гомеостаз при МКБ [31]. В данном контексте риск образования камней в почках связан со снижением реабсорбции ионов Ca^{2+} и повышением их концентрации в дефинитивной моче. После оперативного вмешательства следствием активации РАС может быть артериальная гипертензия, провоцирующая диапедез эритроцитов. Важной представляется отрицательная связь между размером конкремента и активностью аденозинового А₂А рецептора ($r_{PK-A2A}=-0,438$; $p<0,05$). Известно, что аденозин ингибирует транспорт оксалатов в эпителии кишечника путем снижения поверхностной экспрессии анионного обменника (РАТ1) [176]. Выявленная корреляция может свидетельствовать о связи МКБ с воспалительным заболеванием кишечника, провоцирующим гипероксалурию. Учитывая роль аденозина в релаксации ГМК [402] нельзя исключить роль нарушения моторики мочеточника при снижении активности аденозиновых А₂А-рецепторов, поскольку замедляется отток мочи и создаются условия для формирования, роста кристаллов. После КЛТ нормореактивность А₂А-рецепторов может вызвать снижение протромбогенной активности Тц. Остаются не выясненными механизмы сохранения длительной гематурии после оперативных вмешательств на МВП. В этом контексте представляется актуальным анализ возможных причин нарушения тромбогенеза и факторов способных ограничить геморрагию после литотрипсии. Одной из причин послеоперационной гематурии может быть использование НПВП, поскольку ингибируется синтез ТхА₂, нарушается адгезия и агрегация Тц.

4.3. Регуляция компенсаторных механизмов агрегации Тц после КЛТ при сохранении введения НПВП.

Через 48ч после КЛТ (соответствует 9 суткам ЛКТ от момента начала амбулаторного лечения пациентов) микрогематурия уменьшилась на 25,7% ($p<0,001$) по сравнению со сроком наблюдения 24ч. Достигнутый результат обеспечивался механизмами гемостаза, которые развивались на фоне длительного введения высоких доз фармакологических препаратов. В сущности, данные механизмы ограничения геморрагии и гематурии являются компенсаторными, поскольку направлены на усиление функции клеток крови в условиях ингибирования оси ЦОГ-метаболиты арахидоновой кислоты. Установлено, что ингибирование синтеза ТхА₂ в Тц провоцирует геморрагию [367, 280]. В этой связи возникает вопрос – какие рецепторы Тц участвуют в компенсаторных механизмах тромбогенеза, обеспечивающих ограничение гематурии? Выявленная корреляционная связь между гематурией и тромбиновым временем ($r_{ГТ-ТВ}=-0,503$; $p<0,05$) свидетельствует о сохранении конечного этапа коагуляции крови у пациентов с МКБ после КЛТ. Данный факт свидетельствует о включении компенсаторных механизмов в тромбоцитарном звене гемостаза. Известно, что адреналин участвует в тромбозе и гемостазе [32]. Активация α_2 -адренорецептора характеризуется изменением формы Тц, секрецией гранул, активацией рецептора фибриногена (гликопротеина IIb/IIIa), поддерживающего агрегацию Тц и экстернализацией отрицательно заряженных аминокислот, способствующих прокоагулянтной активности Тц. Развитие тромбоцитарного прокоагулянтного ответа адреналина, основано на взаимодействии с коллагеном, проявляется образованием более плотных тромбоцитарно-фибриновых ассоциаций и снижением скорости фибринолиза [133]. Анализ молекулярных механизмов усиления функциональной

активности Тц на фоне ингибирования ЦОГ при нефролитиазе не получил должного освещения в литературе.

Через 48ч после КЛТ выявлена гиперреактивность α_2 -адренорецептора, нормореактивность ФАТ-рецептора и $P2X_1$ -рецептора, а также гипореактивность пуриновых $P2Y$ -рецепторов, AT_1 -рецептора, $GPVI$ -рецептора и $A2A$ -рецептора. Таким образом, потенциальными индукторами активации клеток крови были адреналин, ФАТ и АТФ. Наличие гиперреактивности α_2 -адренорецептора отражает роль физических и психических стрессоров в активации Тц [192]. Стимуляция α_2 -адренорецептора сопровождается увеличением экспрессии селектина CD62P, повышением уровня внутриклеточного Ca^{2+} и фосфатидилсерина [146]. Реактивность α_2 -адренорецептора сохраняется при длительном назначении блокаторов ЦОГ [332]. Повышение адреналина является фактором риска развития острой воспалительной реакции при мочекаменной болезни [4].

Анализ множественной корреляции выявил отрицательную связь между выраженностью гематурии и активностью α_2 -адренорецептора ($r_{ГТ-\alpha_2AP} = -0,784$; $p < 0,05$), $P2X_1$ -рецептора ($r_{ГТ-P2X} = -0,593$; $p < 0,05$) и ФАТ-рецептора ($r_{ГТ-ФАТ} = -0,572$; $p < 0,05$). Следовательно, на фоне ингибирования участка сигнализации ЦОГ-ТхА2 в Тц снижение выраженности микрогематурии может быть связано с активацией САС и повышением уровня катехоламинов, при этом имеет место взаимодействие α_2 -адренорецептора с пуриновым $P2X_1$ -рецептором и ФАТ-рецептором. В этом контексте следует признать, что ведущим фактором компенсаторной реакции Тц является активация САС, которая усиливается через 48ч после оперативного вмешательства, вероятно, в силу недостаточной анальгезии и механического раздражения слизистой оболочки при дренировании МВП. Выявленная положительная корреляционная связь между активностью α_2 -адренорецептора и $GPVI$ -рецептора ($r_{\alpha_2AP-GPVI} = 0,390$; $p < 0,05$) (Таблица 4.1) позволяет рассматривать активацию САС и развитие артериальной гипертензии (АГ), как фактор риска диапедеза эритроцитов.

Таблица 4.1

**Корреляционная матрица активности рецепторов Тц
через 48ч после КЛТ при сохранении введения НПВП.**

Показа- тель	GPVIR	α_2 AR	TxA2R	ФАТR	AT ₁ R	P2YR	P2XR	A2AR
GPVIR		0,390						
α_2 AR	0,390			0,567		0,473	0,594	
TxA2R								
ФАТR		0,567				0,514		
AT ₁ R								
P2YR		0,473					0,455	0,536
P2XR		0,594		0,514		0,455		
A2AR						0,536		

Примечания: GPVIR – функциональная активность GPVIRецепторов к коллагену IV типа; α_2 AR– функциональная активность α_2 -адренорецептора; TxA2R–функциональная активность TxA2-рецептора; AT₁R-функциональная активность ангиотензиновых AT₁-рецепторов; P2YR – функциональная активность пуриновых P2Y-рецепторов; P2XR – функциональная активность пуриновых P2X-рецепторов; A2A2R функциональная активность A2A-рецептора к аденозину. Приведены значения показателей ранговой корреляции Спирмена, которые имеют статистически значимую разницу от 0 ($p < 0,05$).

В основе данного механизма может лежать: (а) повышение капиллярного гидростатического давления в микроциркуляторном русле и

развитие stiffening (жесткость) эндотелия [162; 236] ; (б) ремоделирование стенки сосудов с изменением архитектоники коллагена IV типа в БМ [168], что может быть причиной повышения проницаемости гистогематического барьера, включающего эндотелий венул и уротелий МВП. Взаимодействие α_2 -адренорецептора и ФАТ-рецептора ($r_{\alpha_2\text{AP-ФАТ}}=0,567$; $p<0,05$) представляет интерес, поскольку конвергенция сигналов модулирует различную конфигурацию внутриклеточных событий в Тц и лейкоцитах, экспрессирующих данные рецепторы [202]. Важным с точки зрения регуляции тромбогенеза представляется кооперация адреналина и ФАТ в регуляции количества циркулирующих Тц [74]. Известно, что агрегация Тц человека с АДФ, ФАТ и адреналином зависит от поверхностных мембранных комплексов GrIIb/IIIa [387]. Эффект ФАТ-индуцированной агрегации усиливается (синергизм) при добавлении к суспензии Тц адреналина [341]. Синергический эффект адреналина и ФАТ на агрегацию Тц опосредован активацией сигнальных путей фосфолипаза C – Ca^{2+} – MAP киназа [305] независимо от активности ЦОГ [368]; а также стимуляцией Na^+/H^+ антипорта [264]. Обсуждается также возможность участия TxA_2 в механизмах сопряженности α_2 -адренорецептора и ФАТ-рецептора [57].

В рамках разработки концепции регуляции компенсаторных механизмов поддержания гемостаза на фоне применения НПВП заслуживает внимания взаимодействие α_2 -адренорецептора и P2X_1 -рецептора ($r_{\alpha_2\text{AP-ФАТ}}=0,594$; $p<0,05$). В семействе пуринергических рецепторов P2X_1 -рецептор представляет собой управляемый лигандом ионный канал, который при связывании с АДФ обеспечивает повышение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} , активацию $\alpha\text{IIb}\beta_3$ интегрина и усиление агрегации Тц [51]. Пуриновые P2X_1 - и P2X_7 -рецепторы локализованные в липидных рафтах, индуцируют раннюю стадию апоптоза Тц [390]. Установлено, что P2X_1 -рецептор усиливает агрегацию Тц, возникающую при стимуляции $\text{Fc}\gamma\text{RIIa}$ -рецептора, GPVI -рецептора и Toll-like рецептора, за счет увеличения уровня

внутриклеточного Ca^{2+} после начальных событий фосфорилирования тирозина и раннего высвобождения плотных гранул [163].

АТФ-управляемые катионные каналы Тц могут способствовать развитию иммунных ответов на бактериальные инфекции [179]. АТФ также модулирует секрецию провоспалительных цитокинов Тц [154, 393]. Активация P2X_1 -рецептора сопровождается секрецией АТФ тромбоцитами, что способствует гликолитическому метаболизму нейтрофилов и образованию нейтрофильных внеклеточных ловушек (Neutrophil extracellular traps, NET) [159, 413]. При этом P2X_1 -рецептор, экспрессируемый на нейтрофилах, может играть защитную роль в тромбогенезе, связанном с воспалением [275]. P2X_1 –рецептор может взаимодействовать с другими рецепторами для усиления сигнальных и функциональных событий в Тц. Во время гемостаза и тромбоза АТФ-зависимые каналы P2X_1 -рецептора и АДФ-стимулируемые рецепторы P2Y_1 и P2Y_{12} , связанные с G-белком, играют важную роль в активации Тц. Ко-стимуляция рецепторов P2X_1 и P2Y_1 приводит к супераддитивному увеличению концентрации Ca^{2+} в Тц человека в результате потенцирования инозитол 1,4,5-трисфосфатных рецепторов и/или фосфолипазы С [174]. Для агрегации, индуцированной адреналином/тромбином, требуется АТФ [138]. Адреналин вызывал секрецию из плотных гранул, а последующая передача сигналов от АТФ-зависимого P2X_1 -рецептора и α_2 -адренорецептора индуцировала агрегацию. В этой связи АТФ может рассматриваться в качестве ключевого элемента, позволяющего обходить действие аспирина на стимулируемую адреналином PAR_4 -опосредованную активацию Тц. Считается, что при активации рецептора из плотных гранул высвобождается АТФ, что способствует усилению агрегационной реакции на низкие уровни коллагена и тромбина [175]. Вероятно, эффективность компенсаторной реакции гемостаза, формирующейся при взаимодействии P2X_1 -рецептора и ФАТ-рецептора в Тц,

ограничивается назначением НПВП, ингибирующих лейкоциты, вследствие чего снижается синтез и продукция ФАТ [150].

В контексте анализа причин различной эффективности синергизма α_2 -адренорецептора, P2X₁-рецептора и ФАТ-рецептора представляет интерес исследование [306], которые доказали: (а) возможность синергизма в агрегации Тц при одновременном введении адреналина и ФАТ; (б) нивелирование эффекта при использовании не только ингибиторов ЦОГ-1,2 и блокаторов Ca²⁺-каналов, но и антагонистов адренорецептора и ФАТ-рецептора; ингибиторов фосфолипазы С и MAP-киназы. В этой связи можно предположить, что эффективность компенсаторной реакции гемостаза при ингибировании синтеза ТхА2 в Тц зависит от сопряженности внутриклеточных сигнальных систем, которые являются ЦОГ-независимыми. Стимуляция P2X₁-рецептора необходима для фосфорилирования белка p38, модулирующего сигнализацию индуцированную ТхА2 [160]. Экзогенный АТФ может увеличивать экспрессию фермента ЦОГ-2 и синтез простаноидов [28]. Приведенные факты позволяют рассматривать синергизм P2X₁-рецептора и ТР-рецептора как возможную причину резистентности к НПВП.

Таким образом, через 48ч после КЛТ на фоне длительного ингибирования ЦОГ в клетках крови компенсаторные механизмы гемостаза, ограничивающие выраженность гематурии, основаны на активации и взаимодействии α_2 -адренорецептора, P2X₁-рецептора, ФАТ-рецептора и P2Y-рецепторов. В контексте полученных нами результатов и разрозненных литературных данных о биологических эффектах воспроизводимых α_2 -адренорецептором, P2X₁-рецептором, ФАТ-рецептором и P2Y-рецепторами разработана концепция усиления компенсаторных механизмов Тц, в основе которой лежит сопряженность путей сигнализации при синергизме указанных рецепторов (Таблица 4.2).

Таблица 4.2

Синергизм α_2 -адренорецептора с P2X₁-рецептором, ФАТ-рецептором и P2Y-рецепторами при компенсаторных реакциях гемостаза после КЛТ

α_2 -адренорецептор	P2X ₁ -рецептор	ФАТ-рецептор	P2Y-рецепторы
-сигнализация связана с Gi- белком → повышает концентрацию Ca²⁺ в Тц и лейкоцитах; -ЦОГ-независимая сигнализация; -повышает экспрессию селектина CD62P и уровень фосфатидилсерина; -ко-активация с P2X₁-рецептором, ФАТ-рецептором и P2Y₁₂-рецептором обеспечивает усиление агрегации Тц; -модулирует изменение количества и состав тромбоцитарно-лейкоцитарных агрегатов (ТЛА), обеспечивающих реализацию воспаления.	-управляемый АТФ ионный канал, который обеспечивает повышение внутриклеточной концентрации Ca²⁺ и активацию αIIbβ3 интегрина; -индуцирует <i>апоптоз</i> Тц; - взаимодействует с FcγRIIa- и TLR рецепторами при бактериальной инфекции в МВП; -участвует в образовании нейтрофильных внеклеточных ловушек (NET); -фосфорилирование белка p38, модулирующего сигнализацию индуцированную ТхА2; -ко-стимуляция с α_2-адренорецепторлм при блокаде ЦОГ поддерживает агрегацию; -ко-стимуляция P2Y₁-рецепторов повышает уровень Ca²⁺ в Тц. Синергизм: воспроизводится вследствие повышения уровня Ca²⁺ при одновременном функционировании АТФ-зависимого Ca²⁺-канала (P2X₁- рецептор) и сигнализации связанной с ингибированием Gs-белка (α_2-адренорецептор).	-сигнализация связана с Gq-белком; повышает внутриклеточную концентрацию Ca²⁺ в Тц и лейкоцитах; -обеспечивает усиление функциональной активности Тц и лейкоцитов; –увеличивает проницаемость монослоя эндотелия; -снижает экспрессию ZO-1-белка → расширение парацеллюлярного пути транспорта веществ→миграция клеток крови в ткань. Синергизм: ФАТ и α_2-адренорецептора: -зависит от поверхностного мембранного комплекса GpIIb/IIIa;; -опосредован активацией сигнальных путей фосфолипаза С –Ca²⁺– MAP киназа; -усиливает агрегацию Тц; -увеличивает риск острого воспаления вследствие повышения реактивности Тц и лейкоцитов.	-сигнализация связана с Gi- и Gq-белком → повышение концентрации Ca²⁺ в Тц → агрегация; -активация лейкоцитов, усиление продукции пцитокинов и фагоцитоза; -паракринная связь, обеспечивает взаимодействие Тц-лейкоцитов с формированием ТЛА. Синергизм α_2-адренорецептора и P2Y-рецепторов воспроизводится вследствие сопряженности активации Gi-белка (P2Y₁₂), достигается усиление агрегации Тц.

4.4. Регуляция адаптационных механизмов агрегации Тц после КЛТ в верхней трети мочеточника при отмене НПВП.

Через 72ч после КЛТ (24ч после отмены ЛКТ, формирование ранней фазы адаптационной реакции гемостаза) установлено наличие отрицательной связи между выраженностью гематурии и активностью GP VI-рецептора ($r_{ГТ-GPVI-R} = -0,825$; $p < 0,05$), α_2 -адренорецептора ($r_{ГТ-\alpha_2AP} = -0,784$; $p < 0,05$), AT_1 -рецептора ($r_{ГТ-AT_1R} = -0,450$; $p < 0,05$) и TxA_2 -рецептора ($r_{ГТ-TxA_2} = -0,682$; $p < 0,05$) (Таблица 4.3). Не обнаружена корреляционная связь между гематурией и активностью пуриновых P_2X_1 -рецептора и P_2Y -рецепторов, ФАТ-рецептора. Судя по силе корреляционной связи, ведущую роль в адгезии и АТц играет локальный фактор – коллаген IV-типа БМ стенки сосудов. Таким образом, через 24ч после отмены ЛКТ реализация адаптационной реакции гемостаза обусловлена изменением функциональной активности Тц вследствие: (а) усиления влияния α_2 -адренорецептора, сигнализация которого связана с Gi-белком; (б) нивелирования роли P_2X_1 -рецептора и ФАТ-рецептора в индукции Тц; (в) стимуляции GP VI-рецептора, AT_1 -рецептора и TxA_2 -рецептора, сопряженных с участком сигнализации фосфолипаза $C\beta$ –ФИ-3К, что предполагает возможность синергизма эффектов при взаимодействии данных рецепторов [353].

Через 7 суток после КЛТ (120ч после отмены ЛКТ, поздняя фаза адаптационной реакции гемостаза) обнаружена отрицательная корреляционная связь между выраженностью гематурии и активностью GP VI-рецептора ($r_{ГТ-GPVI-R} = -0,778$; $p < 0,05$), AT_1 -рецептора ($r_{ГТ-AT_1} = -0,606$; $p < 0,05$), TxA_2 -рецептора ($r_{ГТ-TxA_2} = -0,444$; $p < 0,05$); P_2Y -рецепторов ($r_{ГТ-P_2Y} = -0,710$; $p < 0,05$), α_2 -адренорецептора ($r_{ГТ-\alpha_2AP} = -0,511$; $p < 0,05$), P_2X_1 -рецептора ($r_{ГТ-P_2X} = -0,377$; $p < 0,05$) и ФАТ-рецептора ($r_{ГТ-ФАТ} = -0,440$; $p < 0,05$) (Таблица 4.4). Положительная корреляционная связь присутствовала между выраженностью гематурии и активностью A_2A -рецептора ($r_{ГТ-A_2A} = 0,524$; $p < 0,05$).

Таблица 4.3

**Корреляционная матрица патогенетических факторов микрогематурии
через 72ч после КЛТ в верхней трети мочеточника**

Показатель	ГТ	В	РК	GPVI-R	α_2 -AR	ТхА2-R	ФАТ- R	АТ ₁ -R	P2Y-R	P2X-R	A2A -R
ГТ		0,540	0,488	-0,725	-0,684	-0,682		-0,450		0,408	-0,414
В	0,540		0,354		0,317			0,515			
РК	0,488	0,354						0,410			-0,438
GPVI-R	-0,725				0,577			0,390		0,490	-0,393
α_2 -AR	0,684	0,317		0,577				0,437			-0,571
ТхА2-R	-0,682							-0,595			0,357
ФАТ- R				0,632							
АТ ₁ - R	-0,450	0,515	0,550	0,410	0,437	-0,595					
P2Y-R											
P2X- R	0,408			0,490							-0,417
A2A-R	-0,414		-0,438	-0,393	-0,571	0,357				-0,417	

Примечания: ГТ-гематурия; В-возраст; РК-размер конкремента; GPVI-R – функциональная активность GPVI-рецепторов к коллагену IV типа; α_2 -R–активность α_2 -адренорецептора; ТхА2-R–активность ТхА2-рецептора;; АТ₁-R- активность ангиотензиновых АТ₁-рецепторов; P2Y-R –активность пуриновых P2Y-рецепторов; P2X-R –активность пуриновых P2X-рецепторов; A2A-2R активность A2A-рецептора к аденозину.

Приведены значения показателей ранговой корреляции Спирмена, которые имеют статистически значимую разницу от 0 (p <0,05).

Таблица 4.4

**Корреляционная матрица патогенетических факторов микрогематурии через 7 суток
после КЛТ в верхней трети мочеточника**

Показатель	ГТ	В	GPVI-R	α_2 -AR	TxA2-R	ФАТ- R	AT ₁ -R	P2Y-R	P2X-R	A2A -R
ГТ		0,609	-0,778	-0.511	-0.444	0,431	-0,606	-0.710	-0.377	0,524
В	0,609		0,500	0,403			0,736			-0,405
GPVI-R	-0,778	0,500			0,422	0,632	0,535	0,636	0,490	
α_2 -AR	-0,511	0,403	-0,571			0,393	0,730			-0,571
TxA2-R	-0.444		0,422			0,543	-0,595			0,357
ФАТ- R	0,431		0,632	0,393	0,543					
AT ₁ - R	-0,606	0,736	0,535	0,730	-0,595			0,401		
P2Y-R	-0.710		0,636				0,401			
P2X- R	-0.377									-0,417
A2A-R	0,524	-0,405		-0,571	0,357				-0,417	

Примечания: ГТ-гематурия; В-возраст; GPVI-R – функциональная активность GPVI-рецепторов к коллагену IV типа; α_2 -R–активность α_2 -адренорецептора; TxA2-R–активность TxA2-рецептора; ФАТ- R–активность ФАТ-рецептора; AT₁-R- активность ангиотензиновых AT₁-рецепторов; P2Y-R –активность пуриновых P2Y-рецепторов; P2X-R –активность пуриновых P2X-рецепторов; A2A-2R активность A2A-рецептора к аденозину. Приведены значения показателей ранговой корреляции Спирмена, которые имеют статистически значимую разницу от 0 (p <0,05).

Следовательно, через 120ч после отмены НПВП механизмы регуляции адаптационной реакции гемостаза претерпевали следующие изменения: (а) сохранялось участие GP VI-рецептора, AT_1 -рецептора, TxA_2 -рецептора и α_2 -адренорецептора. При этом сила связи GP VI-рецептора с выраженностью гематурии – на изменилась, с AT_1 -рецептором увеличивалась, а TxA_2 -рецептором и α_2 -адренорецептором – понижалась; (б) проявлялось влияние на агрегацию Тц пуриновых РY-рецепторов и $P2X_1$ -рецептора, а также ФАТ-рецептора, участие которых в гемостазе на предыдущем сроке исследования – не прослеживалось. Таким образом, ведущую роль в восстановлении адаптационной реакции тромбоцитарного звена гемостаза играет локальный фактор – коллаген IV-типа базальной мембраны (БМ) стенки сосудов. Значимость данного факта является предсказуемой, поскольку свидетельствует, что для реализации гемостаза включался эффективный механизм физиологического тромбогенеза с использованием фибрина. При этом формирующиеся фибриновые волокна, действуют как консолидирующая поверхность в образовании микротромбов за счет связывания как с GP VI-рецептором Тц, так и интегрином $\alpha IIb\beta 3$ [281]. Взаимодействие GPVI-рецепторов с другими рецепторами представляет интерес в контексте развития адаптационных механизмов, ограничивающих гематурию. Через 48 ч после КЛТ при функционировании компенсаторных механизмов гемостаза на фоне назначения НПВП выявлена корреляционная связь между активностью GPVI-рецепторов и ФАТ-рецептора ($r_{GPVI-ФАТ}=0,424$; $p<0,05$). Через 72 ч при становлении адаптационных механизмов гемостаза на фоне отмены НПВП спектр рецепторов, взаимодействующих с GPVI-рецептором, существенно расширился (Таблица 4.5). Множественный корреляционный анализ позволил установить значимые связи между активностью GPVI-рецептора и α_2 -адренорецептора ($r_{GPVI-\alpha_2AP}=0,577$; $p<0,05$), AT_1 -рецептора ($r_{GPVI-AT}=0,410$; $p<0,05$), ФАТ-рецептора ($r_{GPVI-ФАТ}=0,532$; $p<0,05$), $P2X_1$ -рецептором ($r_{GPVI-P2X_1}=0,490$; $p<0,05$). Выявлена отрицательная

корреляционная связь между активностью A2A-рецептора и GPVI-рецептора ($r_{A2A-GPVI} = -0,393$; $p < 0,05$).

Таблица 4.5

**Корреляционная матрица активности рецепторов Тц через 72ч после
КЛТ и отмены введения НПВП.**

Показа- тель	GPVIR	α_2AR	TxA2R	ФАТR	AT ₁ R	P2YR	P2XR	A2AR
GPVIR		0,577		0,532	0,390		0,490	-0,393
α_2AR	0,577				0,437			-0,571
TxA-R					-0,595			0,357
ФАТ R	0,532							
AT ₁ R	0,410	0,437	-0,595			-0,401		
P2YR					-0,401			
P2XR	0,490							-0,417
A2AR	-0,393	-0,571	0,357				-0,417	

Примечания: GPVIR – функциональная активность GPVI-рецепторов к коллагену IV типа; α_2AR –активность α_2 -адренорецептора; TxA2R–активность TxA2-рецептора; ФАТR–активность ФАТ-рецептора; AT₁R- активность ангиотензиновых AT₁-рецепторов; P2YR –активность пуриновых P2Y-рецепторов; P2XR –активность пуриновых P2X-рецепторов; A2A2R активность A2A-рецептора к аденозину. Приведены значения показателей ранговой корреляции Спирмена, которые имеют статистически значимую разницу от 0 ($p < 0,05$).

Через 7 суток после КЛТ (120 ч после отмены НПВП) установлено (Таблица 4.6) появление связи GPVI-рецептора с TxA2-рецептором ($r_{GPVI-TxA2} = 0,571$; $p < 0,05$), а также – между активностью ФАТ-рецептора и TxA2-рецептора ($r_{ФАТ-TxA2} = 0,632$; $p < 0,05$). Выявлена новая корреляционная связь между активностью GPVI-рецептора и PY-рецепторов ($r_{GPVI-P2Y} = 0,636$; $p < 0,05$). Взаимосвязь между активностью GPVI-рецептора и AT₁-рецептора

усилилась ($r_{\text{GPVI-AT}}=0,535$; $p<0,05$), а с α_2 -адренорецептором снизилась ($r_{\text{GPVI-}\alpha_2\text{AR}}=0,462$; $p<0,05$).

Таблица 4.6

Корреляционная матрица активности рецепторов Тц через 7 суток после КЛТ и отмены введения НПВП.

Показатель	GPVIR	$\alpha_2\text{AR}$	TxA2R	ФАТ ₁ R	АТ ₁ R	P2YR	P2XR	A2AR
GPVIR		0,462	0,571	-0,700	0,535	0,636	0,490	-0,636
$\alpha_2\text{AR}$	0,462		0,533		0,736	0,393	0,305	-0,571
TxA2R	0,571	0,533		0,632		0,422	-0,595	-0,493
ФАТ ₁ R	-0,700		0,632		-0,569	0,533	0,518	-0,460
АТ ₁ R	0,535	0,736		-0,569		0,401		0,357
P2YR	0,636	0,393	0,422	0,533	0,401			-0,555
P2X-R	0,490	0,305	-0,595	0,518				
A2AR	-0,636	-0,571	-0,493	-0,460	0,357	-0,555		

Примечания: GPVIR – функциональная активность GPVI-рецепторов к коллагену IV типа; $\alpha_2\text{AR}$ –активность α_2 -адренорецептора; TxA2R–активность TxA2-рецептора; ФАТ₁R –активность ФАТ-рецептора; АТ₁R- активность ангиотензиновых АТ₁-рецепторов; P2YR –активность пуриновых P2Y-рецепторов; P2XR –активность пуриновых P2X-рецепторов; A2AR активность A2A-рецептора к аденозину. Приведены значения показателей ранговой корреляции Спирмена, которые имеют статистически значимую разницу от 0 ($p < 0,05$).

Отрицательная корреляционная связь между активностью GPVI-рецептора и ФАТ-рецептора ($r_{\text{GPVI-ФАТ}}=-0,700$; $p<0,05$) может свидетельствовать об уменьшении фиброобразования в стенке МВП через 7 суток после устранения обструкции мочеточника [89]. Таким образом, повышение эффективности адаптационных механизмов гемостаза, связано не

только со стимуляцией GPVI-рецептора, но и расширением спектра взаимодействующих с ним рецепторов.

Тем не менее сохранение средней степени выраженности микрогематурии через 7 суток после КЛТ свидетельствует, что сопряженность сигнализации при взаимодействии GPVI-рецептора с другими рецепторами не является достаточной для прекращения микрогематурии. Причины этого явления требуют комментариев. Известно, что в местах повреждения сосудов Тц контактируют с субэндотелиальным коллагеном IV типа, что вызывает их активацию и образование тромба [61]. Помимо гликопротеина Ib (GPIb) и интегрин $\alpha IIb\beta 3$ (GPIIb/IIIa), которые взаимодействуют с коллагеном через фактор фон Виллебранда, на Тц идентифицированы несколько рецепторов непосредственно распознающих коллаген, в частности интегрин $\alpha 2\beta 1$ и член суперсемейства иммуноглобулинов GP VI-рецептор [165]. В настоящее время признано, что адгезия Тц к коллагену требует предварительной активации интегринов посредством сигналов «inside-out», которые генерируются GP VI-рецептором и усиливаются высвобождаемыми из Тц медиаторами второй волны агрегации – АДФ и ТхА2. Вероятно, при длительном назначении НПВП в Тц сохраняется низкая продукция ТхА2 и снижается секреция АДФ (ограничивается аутокринная стимуляция Тц), что, вероятно, лимитирует активацию интегрин. Данный механизм может быть причиной снижения эффективности тромбогенеза при взаимодействии Тц с коллагеном. Подтверждение этой концепции можно найти у [208]. Авторы показали, что комбинированная блокада GPVI и P2Y рецепторов, а также ингибирование образования ТхА2 отменяли активацию интегрин, но позволяли поддерживать адгезию Тц. Экзогенный АДФ частично отменял эффект блокады GPVI-рецепторов, связанный с активацией интегрин $\alpha 2\beta 1$ и $\alpha IIb\beta 3$. Адгезия полностью подавлялась только при одновременном блокировании GPVI-рецептора и интегрин $\alpha 2\beta 1$; следовательно, интегрин может

поддерживать связывание Тц с коллагеном даже в отсутствие своей активации.

Таким образом, GPVI-рецептор и АДФ, высвобождаемый из плотных гранул Тц, индуцируют изменения аффинности интегринов $\alpha 2\beta 1$ и $\alpha IIb\beta 3$ во время образования тромба на коллагене. Эти изменения интегринов являются незаменимыми для адгезии, поскольку усиливают взаимодействия Тц с коллагеном. Блокада GPVI-рецептора или P2Y-рецепторов снижает активацию интегрин, образование агрегатов и связывание фибриногена, причем данные процессы не зависят от $\alpha 2\beta 1$ -зависимой адгезии (56). Известно, что рецепторы GPVI, интегрин $\alpha 2\beta 1$ и GP Ib / V / IX опосредуют адгезию и активацию Тц во время тромбообразования. Оказалось, что совместное взаимодействие молекул $\alpha 2\beta 1$ и GPIb / V / IX генерирует повышение внутриклеточного Ca^{2+} , которое усиливает GPVI-зависимую передачу Ca^{2+} сигналов [288]. Поэтому нельзя исключить, что причиной восстановления тромбогенеза, индуцированного коллагеном, при отмене НПВП может быть взаимодействие молекул ассоциированных $\alpha 2\beta 1$, GPIb / V / IX и GPVI, которое связано с модуляцией Ca^{2+} сигналов. Взаимосвязь AT₁-рецептора и GPVI-рецептора может отражать наличие компенсаторного механизма способного потенцировать коллаген-индуцированную АТц, поскольку ангиотензин-2 поддерживает кластеризацию GPVI-рецептора [270].

Анализ взаимосвязи других рецепторов представляет интерес с точки зрения возможного участия механизмов участвующих в репаративных процессах МВП после оперативного вмешательства [259]. Так, наличие корреляционной связи между α_2 -адренорецептором и P2-пуриновыми рецепторами, соответственно, $r_{\alpha 2AP-P2X1}=0,730$ ($p<0,05$) и $r_{\alpha 2AP-P2Y}=0,393$ ($p<0,05$), подтверждает участие адренорецепторов в регуляции активности митохондриальных и цитоплазматических ферментов [358]. Вероятно, на этапе репарации слизистой оболочки МВП адреналин (а) обеспечивает усиление процессов тканевого дыхания переводя митохондрии в состояние

«loose» фосфорилирования; (б) повышает активность цитозольных ферментов, катализирующих метаболизм пуриновых нуклеотидов (аденозиндезаминаза и АМФ-дезаминаза), благодаря чему запускаются защитные реакции связанные с аденозином; (в) ограничивает перекисное окисление липидов связанное с реперфузией ишемизированных тканей путем активации ферментов антиоксидантной защиты (глутатионпероксидаза и каталаза).

Обращает на себя внимание наличие связи ТхА2-рецептора с α_2 -адренорецептором и P2-пуриновыми рецепторами, соответственно $r_{\text{ТхА2-}\alpha_2\text{AP}} = 0,533$ ($p < 0,05$), $r_{\text{ТхА2-P2Y}} = 0,442$ ($p < 0,05$) и $r_{\text{ТхА2-P2X1}} = -0,595$ ($p < 0,05$). Эффект взаимодействия ТхА2 и адреналина с целью повышения агрегации Тц обработанных ингибитором ЦОГ подтвержден [250] и связан с фосфорилированием тирозина и активацией пути Rho/Rho-киназа. Нельзя исключить, что АТФ снижает агрегацию Тц, индуцированную ТхА2, путем ингибирования Rho-ассоциированной киназы (ROCK) и снижению ROCK-зависимого фосфорилирования субъединицы-мишени МΥРТ-1 (myosin phosphatase target subunit) [181]. Наличие корреляционной связи между активностью ТхА2-рецептора и ФАТ-рецептора ($r_{\text{ТхА2-ФАТ}} = 0,632$; $p < 0,05$) свидетельствует, что эти агонисты находятся на пересечении сигнальных путей, что позволяет модулировать процессы коагуляции крови и развитие воспаления [223]. Появление этой связи через 7 суток после КЛТ и отсутствие таковой через 72ч после оперативного вмешательства может отражать как усиление роли активированных лейкоцитов (при наличии воспаления в МВП) в индукции тромбогенеза, так и участие Тц в развитии острого пиелонефрита.

В тоже время наличие отрицательной корреляции между активностью ФАТ-рецептора и АТ₁-рецептора ($r_{\text{ФАТ-АТ1}} = -0,569$; $p < 0,05$) доказывает возможность ограничения воспалительной реакции индуцированной ФАТ путем связывания Ан-2 с ФАТ и lyso-PAF [314]. Вероятно, взаимодействие ТхА2-

рецептора, ФАТ-рецептора и АТ₁-рецептора представляет собой важный механизм контроля развития воспаления после отмены НПВП.

Ангиотензиновый АТ₁-рецептор представлен на плазмалемме Тц и может индуцировать их агрегацию посредством активации протеинкиназы С (ПКС), стимулируемой через G_q-белок сигнальный путь. Наличие отрицательной корреляционной связи между активностью АТ₁-рецептора и выраженностью гематурии через 72ч и 7 суток после КЛТ, соответственно, $r_{72ч} = -0,450$ ($p < 0,05$) и $r_{7сут} = -0,606$ ($p < 0,05$) позволяет рассматривать как прямое так и опосредованное влияние Анг-2 на тромбогенез. В настоящее время считается доказанным существование функциональной перекрестной связи между сигнальным путем АТ₁-рецептора и другими путями сигнализации [183], отражением чего может быть корреляционная связь между активностью АТ₁-рецептора, α_2 -адренорецептора и GPVI-рецептора. Через 72ч после КЛТ сила связи составила, соответственно, $r_{AT1-P-\alpha2AP} = 0,437$ ($p < 0,05$) и $r_{AT1-GPVI} = 0,390$ ($p < 0,05$); через 7 суток коэффициенты корреляции возросли, соответственно до $r_{AT1-P-\alpha2AP} = 0,736$ ($p < 0,05$), ($r_{AT1-GPVI} = 0,535$; $p < 0,05$). Взаимосвязь АТ₁-рецептора и α_2 -адренорецептора может (а) свидетельствовать о синергизме проагрегатных эффектов адреналина и Анг-2, направленных на стимуляцию Тц и ограничение гематурии; (б) сопровождаться повышением уровня Ca²⁺ в ГМК и усилением перистальтики мочеточника [103]. Взаимосвязь АТ₁-рецептора и GPVI-рецептора может отражать наличие компенсаторного механизма способного потенцировать коллаген-индуцированную АТц, поскольку ангиотензин-2 поддерживает кластеризацию GPVI-рецептора [270]. Представляет интерес и корреляционная связь между активностью АТ₁-рецептора и пуриновых P2Y-рецепторов которая появилась через 7 суток после КЛТ ($r_{AT1-P-P2Y} = 0,401$; $p < 0,05$), поскольку подтверждается возможность гетеродимеризации между этими рецепторами, следствием чего является появление «crosstalk» между путями сигнализации [265]. При наличии микрогематурии данный феномен свидетельствует о разнообразии молекулярных механизмов участвующих в

повышении агрегации Тц. Наличие связи между активностью АТ₁-рецептора и аденозинового А₂А-рецептора через 7 суток после КЛТ ($r_{\text{AT1-P-A2A}}=0,357$; $p<0,05$), отражает включение защитного механизма связанного с усилением продукции аденозина при повышении активности РАС. Одним из проявлений данного механизма может быть накопление макрофагов в рыхлой волокнистой соединительной ткани при стимуляции А₂А-рецептора [149], что может обеспечивать деградацию БМ эндотелия и уротелия и усиление проницаемости гисто-гематического барьера [188,153]. В физиологических условиях увеличение продукции цАМФ в клетках ЮГА почки может быть связано с (а) повышением в канальцевой жидкости содержания ПГЕ₂ и простациклина; (б) стимуляцией β_1 адренорецепторов; (в) активацией аденозиновых А₂А-рецепторов и синтезом NO [272]. При назначении пациентам в послеоперационном периоде НПВП уровень ПГЕ₂ и простациклина снижается и на первый план выходит индуцирующая роль катехоламинов в активации РАС. Вероятно, после стресс-реакции, которой является КЛТ, повышается секреция адреналина из нервных терминалей симпатического отдела ВНС, что сопровождается стимуляцией β_2 -адренорецептора АТФ на пресинаптической мембране. При этом усиливается освобождение норадреналина в синаптическую щель, как результат возрастает стимуляция β_1 -адренорецепторов на постсинаптической мембране, т.е. воспроизводится эффект стимуляции ЮГА и повышение секреции ренина. Поддержание секреции ренина в почке может быть связано с влиянием самого Анг-2 на синаптическую передачу вследствие усиления синтеза норадреналина, облегчения высвобождения и ингибирования захвата медиатора. Таким образом, при нормореактивном состоянии АТ₁-рецептора возможно взаимодействие с разными подтипами адренорецепторов, что позволяет потенцировать гемостатические эффекты других агонистов и регулировать моторику мочеточника после КЛТ направленную на элиминацию фрагментов разрушенного камня.

Через 72ч после КЛТ выявлена отрицательная корреляционная связь между активностью пуриновых P2Y-рецепторов и АТ₁-рецептора ($r_{P2Y-GPVI} = -0,401$; $p < 0,05$), что, вероятно, отражает участие данного типа пуринового рецептора в механизмах защиты эндотелия от активных форм кислорода в процессе ишемии/реоксигенации, который регулируется АТФ и Ан-2 [396, 284]. Через 7 суток имело место повышение активности пуриновых P2X₁-рецептора и P2Y-рецептора. Одной из причин этого явления может быть влияние лейкоцитов, секретирующих ФАТ, на функцию Тц. Об этом свидетельствует появление связи между P2Y-рецепторами и ФАТ-рецептором ($r_{P2Y-GPVI} = 0,533$; $p < 0,05$), что отражает роль «cross-talk» механизма в реактивации десенситизированных рецепторов на клетках крови. Доказано, восстановление функции нейтрофилов за счет системы рецепторов связанных с G-белком [125]. Выявленная положительная корреляционная связь между активностью пуриновых P2Y-рецепторов и GPVI-рецептора ($r_{P2Y-GPVI} = 0,636$; $p < 0,05$) свидетельствует о синергизме, обеспечивающем восстановление функциональной активности Тц после отмены ингибирования ЦОГ. Ранее [208] доказали, что АДФ способен усиливать тромбогенный эффект коллагена, связанный с активацией интегринов $\alpha_2\beta_1$ и $\alpha IIb\beta_3$. Обращает на себя внимание отсутствие взаимосвязи данных рецепторов через 72ч после КЛТ. Восстановление гемостаза может воспроизводиться и путем взаимодействия P2Y-рецепторов и α_2 -адренорецептора ($r_{P2Y-GPVI} = 0,393$; $p < 0,05$). В основе данного механизма может лежать ингибирование пути связанного с цАМФ сигнализацией и активация пути ФИ-3K/Akt [237]. Причинно-следственная связь между P2Y-рецепторами и ФАТ-рецептором ($r_{P2Y-GPVI} = 0,533$; $p < 0,05$) отражает роль «cross-talk» механизма в реактивации десенситизированных рецепторов на клетках крови. Восстановление функции нейтрофилов происходит за счет системы рецепторов, связанных с G-белком [125]. Наличие данной взаимосвязи может объяснить восстановление активности P2Y-рецепторов в течение 7 суток после КЛТ.

Рецепторы P2X принадлежат к семейству белков катионных каналов, которые связываются с внеклеточным аденозин 5'-трифосфатом (АТФ). Эти рецепторы привлекают все большее внимание в фундаментальных и прикладных исследованиях, поскольку играют центральную роль во многих важных патофизиологических процессах, таких как модуляция функции висцеральных систем, ноцицепции, активации Тц и макрофагов, тромбовоспалении [295]. Выявленная корреляционная связь между активностью P2X-рецептора и выраженностью гематурии ($r_{P2X-GT} = -0,377$; $p < 0,05$) через 7 суток после КЛТ, отражает возможность участия данного типа пуриновых рецепторов в адаптационной реакции направленной на ограничение гематурии.

Селективная активация P2X₁ рецепторов вызывает быстрое и обратимое изменение формы Тц, транзиторную централизацию гранул, низкий уровень inside-out активации $\alpha_{IIb}\beta_3$ интегрин, который приводит к слабой обратимой агрегации и формированию малых микроагрегатов [248]. Основная роль активации P2X₁ рецепторов, связана с амплификацией ответа Тц, вызванного низкими концентрациями других агонистов. Наибольшее влияние P2X₁ рецепторов на функцию Тц выявлено при инкубации Тц с низкой концентрацией коллагена. Селективная стимуляция P2X₁ рецепторов вызывает транзиторное фосфорилирование ERK2 члена семейства MAPK с участием ПКС. Основная роль ERK2 в активации P2X₁ рецепторов, заключается в повышении агрегации при низких и умеренных концентрациях коллагена [166]. Вклад P2X₁ рецептора в вызванные коллагеном Ca²⁺ ответы Тц как высокоэффективный механизм активации тромбогенеза подтверждают [123]. Наличие значимой корреляционной связи активации GPVI-рецептора и P2X₁-рецептора ($r_{GP-VI-P2X} = 0,490$; $p < 0,05$) подтверждает, что повышение уровня внутриклеточного Ca²⁺ при стимуляции P2X₁-рецептора может потенцировать проагрегантный эффект коллагена. Известно, что рецепторы GPVI, интегрин $\alpha_2\beta_1$ и GP Ib / V / IX опосредуют адгезию и активацию Тц во время тромбообразования. Поэтому нельзя исключить, что

причиной восстановления тромбогенеза, индуцированного коллагеном, при отмене НПВП может быть взаимодействие сигнальных путей связанных с GPVI-рецептором и P2X₁-рецептором, обеспечивающее модуляцию Ca²⁺ сигналов. Наличие связи P2X₁-рецепторов и α_2 -адренорецептора ($r_{P2X-GPVI}=0,305$; $p<0,05$) подтверждает факт взаимодействия между АТФ и катехоламинами в усилении агрегации Тц, что предполагает протромботическую роль АТФ при стрессе [54]. Через 7 суток после КЛТ проявлялась взаимосвязь между активностью P2X₁-рецепторов и ФАТ-рецептора ($r_{P2X-ФАТ}=0,518$; $p<0,05$). Связь данных рецепторов представляет интерес поскольку может быть индикатором активации и рекрутирования нейтрофилов при микробной инвазии [289].

Установлено, что ФАТ индуцировал гиперполяризацию митохондрий и запускал внеклеточное высвобождение АТФ через паннексин-1, последующая пуринаргическая передача сигналов через P2X₁-рецепторы обеспечивала образование внеклеточной ловушки нейтрофилов (NET).

Аденозиновый A2A-рецептор, связанный с G-белком, передает сигнализацию через стимулирующий G-белок (Gs-) в Тц, что приводит к активации аденилилциклазы и повышению уровня циклического аденозинмонофосфата (цАМФ), следствием чего является ингибирование агрегации [85]. Через 7 суток после КЛТ выявлено повышение активности A2A-рецептора ($P<0,001$) до уровня нореактивности, что возможно при сохранении активности эктонуклеозидтрифосфатдефосфорилазы (CD39) и экто-5'-нуклеотидазы (CD73), участвующих в образовании аденозина [132]. Такая трансформация пуриновых нуклеотидов представляется логичной, поскольку поддержание внеклеточного аденозина на физиологическом уровне преследует цель поддержание реперфузии и ограничение воспаления в ишемизированных тканях МВП при нефролитиазе. Подтверждение этой гипотезы можно найти в исследованиях [70], которые доказали защитный эффект стимуляции аденозиновых рецепторов от ишемического повреждения и воспаления в почках. Более того, в настоящее время активность A2-

рецепторов рассматривается как чувствительный индикатор гипоксии/ишемии и воспаления в тканях [371]. В этой связи можно заключить, что при наличии нормореактивности A2A-рецептора через 72 ч после оперативного вмешательства отсутствуют значимые признаки ишемии тканей МВП. Такой эффект может быть достигнут, если в стенке мочеточника функционируют механизмы ишемического preconditionирования, вызванного длительным пребыванием конкрементов в полости МВП. Одним из таких механизмов может быть повышение активности экто-5'-нуклеотидазы, обеспечивающей преобразование внеклеточного АМФ в аденозин.

Так, [366] приводят убедительные доказательства, что активация аденозин-опосредованной стимуляции A2-рецептора является основным механизмом ишемического preconditionирования. Включение данного компенсаторного механизма представляется крайне важным, поскольку повышение толерантности тканей к ишемии позволяет снизить риск ишемического повреждения в процессе КЛТ и создает условия для эффективной репарации в стенке мочеточника после оперативного вмешательства. Наличие корреляционной связи между активностью A2A-рецептора и выраженностью гематурии ($r_{A2A-GT}=0,524$; $p<0,05$), вероятно, связано с поддержанием физиологического уровня внутриклеточного цАМФ, следствием чего может быть ингибирование агрегации Тц и вазодилатация [389]. Негативное влияние нуклеозидной сигнализации на адаптационные механизмы гемостаза проявляется наличием отрицательной корреляционной связи между (а) активностью A2A-рецептора и GPVI-рецептора ($r_{A2A-GPVI}=-0,636$; $p<0,05$). Ингибирующее влияние A2A-рецептора на передачу сигналов с GPVI-рецептора в Тц, частично опосредуется за счет подавления действия TxA₂; эффект отменяется при высоких концентрациях коллагена [85]; (б) активностью A2A-рецептора и P2Y-рецептора ($r_{A2A-GPVI}=-0,555$; $p<0,05$). Мощный антиагрегантный эффект возникающий при стимуляции A2A-рецептора может быть связан со снижением экспрессии тромбоспондина

(TSP-1) в эндотелиальных клетках [127]. К позитивным эффектам возможной стимуляции аденозиновых A₂-рецепторов на клетках крови можно отнести снижение активности нейтрофилов, секретирующих ФАТ, что может рассматриваться как функциональная обратная связь ограничивающая взаимодействие Тц и лейкоцитов (формирование ТЛА) в процессе воспаления [202,119]. Подтверждением этой гипотезы может быть наличие отрицательной корреляционной связи между активностью A_{2A}-рецептора и ФАТ-рецептора ($r_{A_{2A}-ФАТ} = -0,460$; $p < 0,05$).

Таким образом, через 24ч после отмены НПВП ранняя фаза адаптационной реакции гемостаза обеспечивается GP VI-рецептором, АТ₁-рецептором и ТхА₂-рецептором, эффект которых в Тц сопряжен с участком сигнализации фосфолипаза С β –ФИ-3К, что обеспечивает усиление агрегации при взаимодействии рецепторов. Поздняя фаза адаптационной реакции (120ч после отмены НПВП, 7 суток после КЛТ) характеризовалась восстановлением активности пуриновых РY-рецепторов, взаимодействие которых с GP VI-рецептором и АТ₁-рецептором Тц обеспечивало ограничение гематурии. Синергизм индуцированной агрегации обусловлен сопряженностью сигнальных путей, связанных с участком фосфолипаза С β – ФИ-3К (GPVI-рецептор) и сигнализации ассоциированной с Gi- и Gq-белками (P2Y-рецепторы, АТ₁-рецептор). В контексте полученных нами результатов и разрозненных литературных данных о биологических эффектах воспроизводимых GPVI-рецептором, АТ₁-рецептором, P2Y-рецепторами, ФАТ-рецептором и ТхА₂-рецептором разработана концепция усиления адаптационных механизмов Тц, в основе которой лежит сопряженность путей сигнализации при синергизме указанных рецепторов (Таблица 4.7).

В перспективе анализ сенситивности рецепторов Тц позволит прогнозировать риск развития макрогематурии и наметить пути совершенствования консервативной терапии после выполнения КЛТ в верхней трети мочеточника при неэффективной литокинетической терапии.

Таблица 4.7

Синергизм GP-VI-рецептора с AT₁-рецептором, P2Y-рецепторами, ФАТ-рецептором и TxA₂-рецептором в процессе регуляции гемостаза после КЛТ

GP-VI-рецептор	AT ₁ -рецептор	P2Y-рецепторы	ФАТ-рецептор	TxA ₂ -рецептор
-сигнализация связана с участком S_{YK}-ФИ-3K →ФИ-3K-фосфолипазаC в Тц; -индуцирует агрегацию Тц; -активность рецептора повышается при деградации БМ сосудов и уротелия; -индикатор повышения проницаемости гистогематического барьера (ГГБ); -ко-активация с AT₁-, P2Y₁₂, ФАТ- и TxA₂-рецепторами обеспечивает усиление агрегации Тц.	-сигнализация связана с Gq-белком, повышает концентрацию Ca²⁺ в Тц и лейкоцитах; -индуцирует агрегацию Тц; -поддерживает кластеризацию GPVI-рецептора; -модулирует активацию MMP-2 и MMP-9 при деградации белков БМ в процессе ремоделирования сосудистой стенки и слизистой мочеточника; –усиливает парацеллюлярный транспорт клеток крови в ткань; Синергизм с GPVI-рецептором воспроизводится вследствие сопряженности на участке сигнализации фосфолипаза Cβ –ФИ-3K/Akt; достигается усиление агрегации Тц.	- сигнализация связана с Gi- и Gq-белком → повышение концентрации Ca²⁺ в Тц; -активация лейкоцитов, усиление продукции пцитокинов и фагоцитоза; -паракринная связь, обеспечивает взаимодействие Тц-лейкоцитов с формированием ТЛА. Синергизм с GPVI-рецептором воспроизводится вследствие сопряженности на участке сигнализации фосфолипаза Cβ –ФИ-3K/Akt; достигается усиление агрегации Тц.	-сигнализация связана с Gq-белком; повышает внутриклеточную концентрацию Ca²⁺ в Тц и лейкоцитах; -обеспечивает усиление функциональной активности Тц (паракринная стимуляция) и лейкоцитов; –увеличивает проницаемость монослоя эндотелия, диапедез эритроцитов. Синергизм с GPVI-рецептором воспроизводится вследствие сопряженности на участке сигнализации фосфолипаза Cβ –ФИ-3K/Akt; достигается усиление агрегации Тц	–сигнализация связана с Gq- и G₁₃- белками повышает внутриклеточную концентрацию Ca²⁺ в Тц и лейкоцитах; - индуцирует агрегацию Тц Синергизм с GPVI-рецептором воспроизводится вследствие сопряженности на участке сигнализации фосфолипаза Cβ –ФИ-3K/Akt; достигается усиление агрегации Тц

ГЛАВА 5

ПАТОГЕНЕЗ ПИЕЛОНЕФРИТА ПОСЛЕ КЛТ В ВЕРХНЕЙ ТРЕТИ МОЧЕТОЧНИКА ПРИ НЕЭФФЕКТИВНОЙ ЛКТ.

Считается, что назначение антибиотиков и НПВП сводит на нет риск развития острого воспаления в слизистой оболочке МВП. Однако, оказалось, что у 96,1% пациентов эрадикация уропатогенов из мочи происходит в течение 6 месяцев после стандартной антибактериальной терапии, при этом лейкоцитурия сохраняется у 23,5% пациентов [258]. После уретролитотрипсии отмечается длительное (до 4 недель) сохранение лейкоцитурии и микрогематурии [287]. Возникает вопрос- не связано ли сохранение осложнений после КЛТ с длительным назначением противовоспалительной терапии у пациентов с нефролитиазом? Такая ситуация складывается в случае неэффективной элиминации конкрементов из МВП с последующим проведением литотрипсии, поскольку в состав стандартной ЛКТ, а также с целью анальгезии после оперативного вмешательства, включаются НПВП. Совершенствование тактики управления воспалительным процессом в стенке МВП сдерживается отсутствием теоретических знаний касающихся механизмов трансэндотелиальной миграции лейкоцитов, трафика клеток крови в рыхлой волокнистой соединительной ткани (РВСТ) слизистой оболочки мочеточника при инфекции МВП. В литературе отсутствует анализ механизмов трафика лейкоцитов в строме почки и слизистой оболочке МВП. Одним из методических подходов позволяющих решить эту задачу может быть анализ механизмов, контролирующих функциональную активность клеток крови. Известно, что на мембране лейкоцитов присутствуют разнообразные рецепторы, модулирующие процесс миграции клеток [145, 382, 99]. Установлено, что в циркулирующей крови Тц взаимодействуют с различными видами лейкоцитов во время воспалительного процесса [292]. Это взаимодействие обеспечивает рекрутирование лейкоцитов в ткани

органов, регулирует автономные функции лейкоцитов, включая образование и освобождение внеклеточных ловушек нейтрофилов, а также поддерживают обратную связь, позволяющую ограничить распространение воспаления и защитить орган от побочного повреждения, вызванного чрезмерной активацией иммунной системы [302]. Циркулирующие ТЛА обнаружены у пациентов с различными заболеваниями сердечно-сосудистой системы и считаются чувствительным индикатором воспаления [399]. Для оценки количества ТЛА циркулирующих в крови применяются проточные цитометрические и микроскопические методы [117, 403].

Гипотеза. Одной из причин поддержания острого воспаления в МВП при нефролитиазе может быть длительное назначение НПВП пациентам при неэффективной ЛКТ, поскольку функциональная активность лейкоцитов настолько снижена, что не обеспечивается эффективный фагоцитоз. Ситуация усугубляется после КЛТ поскольку разрушается уротелий и развивается инфекция в слизистой оболочке мочеточника. В этом случае сохранение введения НПВП должно сопровождаться усилением компенсаторной реакции лейкоцитов, призванных выполнять защитную функцию в организме. Регуляция компенсаторной и адаптационной реакции клеток крови при введении и отмене НПВП не изучена. Можно предположить, что анализ активности рецепторов на Тц и лейкоцитах, модулирующих миграцию клеток при воспалительной реакции, позволит воссоздать картину патогенеза пиелонефрита на этапах консервативного и оперативного лечения пациентов с нефролитиазом.

5.1 Численность циркулирующих ТЛА, выраженность лейкоцитурии и функциональная активность рецепторов Тц после КЛТ.

Цель исследования – проанализировать динамику индикаторов пиелонефрита (количество циркулирующих ТЛА и выраженность

лейкоцитурии) на этапе госпитализации, а также через 24ч, 48ч, 72ч и 7 суток после КЛТ в верхней трети мочеточника при неэффективной ЛКТ.

У здоровых лиц количество циркулирующих в крови ТЛА, составило $5,5 \pm 0,3\%$ (95%ДИ 4,7-6,3%), тогда как у пациентов с МКБ на момент госпитализации после ЛКТ численность клеточных агрегатов возросла в 2,2 раза ($P < 0,001$) до $12,1 \pm 0,3\%$ (95%ДИ 11,5-12,8%). Через 24 ч после КЛТ количество ТЛА существенно не изменилось и составило $11,2 \pm 0,6\%$ (95% ДИ 9,8-12,6%). Снижение количества ТЛА обнаружено через 48 ч (первая волна) – на 25,0% ($p < 0,05$) по сравнению с предыдущим сроком наблюдения (Рисунок 5.1); данная точка обследования соответствует 9 суткам ЛКТ и соответствует длительному стабильному ингибированию ЦОГ в клетках крови. Через 72 ч количество циркулирующих ТЛА увеличилось до $10,5 \pm 0,4\%$ (95%ДИ 9,8-11,3%). ($p < 0,05$), т.е. восстанавливалось до предшествующего уровня. Данная точка обследования приходится на 24ч после отмены ЛКТ и соответствует ранней фазе восстановления активности ЦОГ в клетках крови. Через 7 суток наблюдалась вторая волна снижения количества ТЛА – на 15,2% ($P < 0,001$) по сравнению со сроком наблюдения 72ч. Данная точка обследования приходится на 120ч после отмены ЛКТ и соответствует поздней фазе восстановления активности ЦОГ в клетках крови. Таким образом, на фоне длительного применения НПВП малоинвазивное оперативное вмешательство сопровождалось снижением количества циркулирующих ТЛА, следствием чего может быть ограничение количества лейкоцитов рекрутированных из сосудистого русла в слизистую оболочку мочеточника для поддержания воспаления в стенке МВП. В ранние сроки после восстановления активности ЦОГ наблюдалась компенсаторная реакция клеток крови, что может индуцировать воспалительную реакцию в МВП и лейкоцитурию. В отдаленные сроки включение адаптационных реакций Тц и лейкоцитов ограничивало самоподдержание чрезмерной активации клеток крови (снижалось количество ТЛА), что ограничивало развитие пиелонефрита.

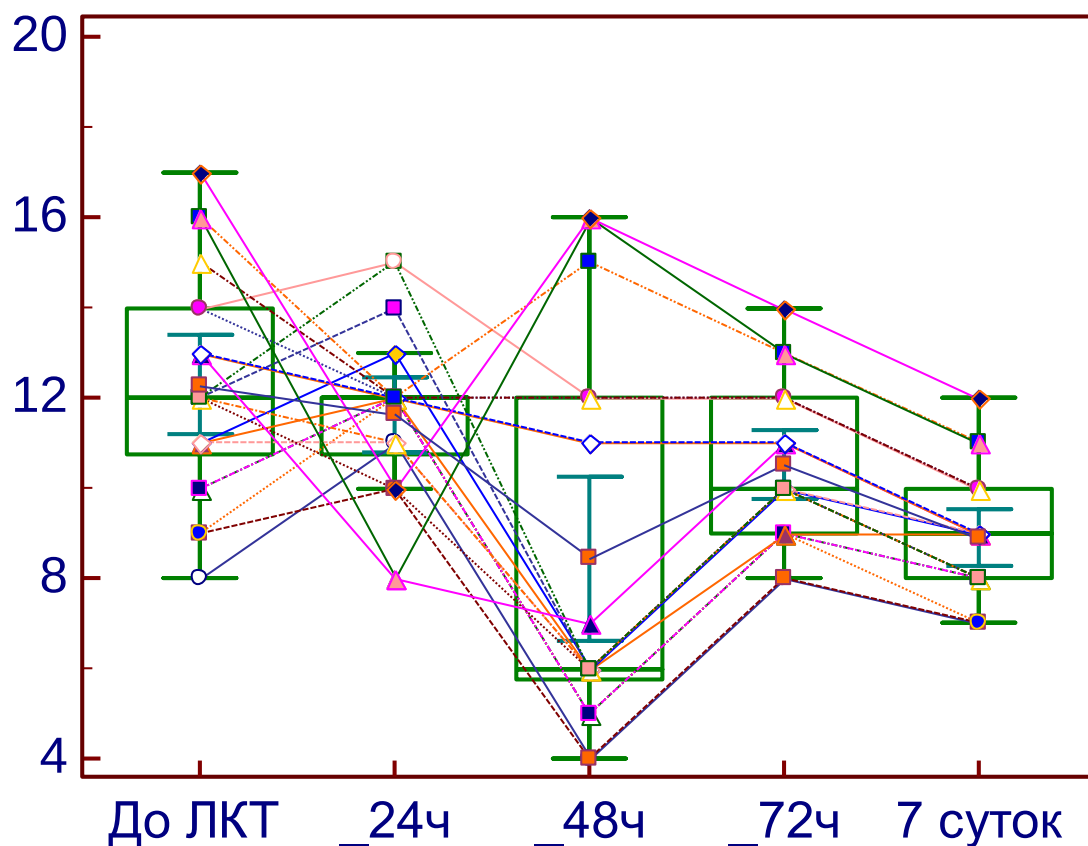


Рис. 5.1 Динамика циркулирующих ТЛА после КЛТ.

По оси ординат – количество ТЛА (%); по оси абсцисс – срок наблюдения.

Тем не менее, сохранение повышенного количества циркулирующих ТЛА (на уровне $8,9 \pm 0,3\%$) позволяет предположить, что: (а) факторы риска рецидива пиелонефрита, воздействие которых проявляется стимуляцией клеток крови, могут спровоцировать формирование ТЛА и лейкоцитурию; (б) возникшие адаптационные механизмы ограничивают, но не ликвидируют воспаление. В этой связи представляет интерес анализ лейкоцитурии отражающей выраженность воспалительного процесса в МВП и трафик лейкоцитов из слизистой оболочки (СО) в мочу через гисто-уринальный барьер (включающий многослойный переходный эпителий) (Рисунок 5.2).

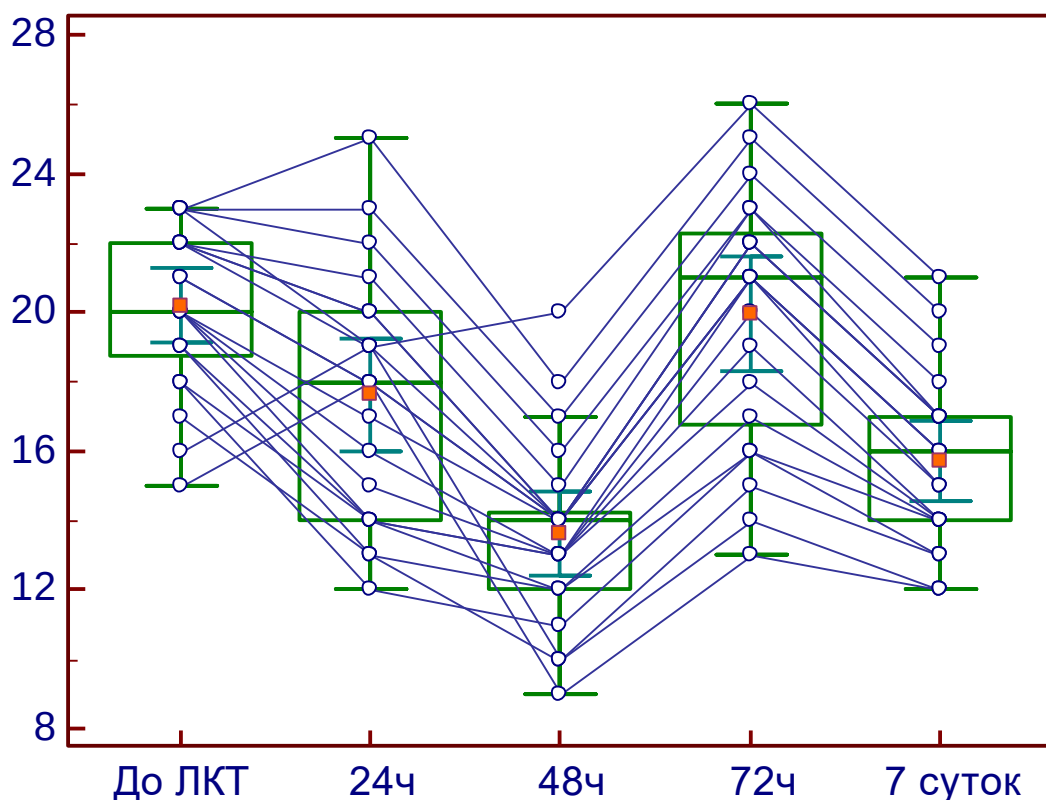


Рис. 5.2 Динамика лейкоцитурии после КЛТ в верхней трети мочеточника.

По оси ординат – выраженность лейкоцитурии (п/з); по оси абсцисс – срок наблюдения.

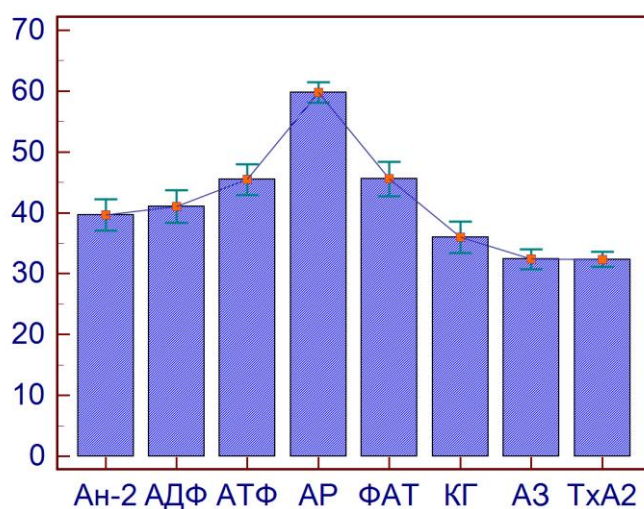
Через 24 ч после КЛТ уровень лейкоцитурии уменьшился на 19,4% ($p < 0,001$) по сравнению с таковой на момент госпитализации и соответствовал средней степени выраженности ($17,5 \pm 0,8$ п/з; 95% ДИ 15,8-19,3 п/з). Сопоставление динамики процессов рекрутирования лейкоцитов из сосудистого русла (количества ТЛА), а также тяжести воспалительной реакции/трафика клеток крови в СО (лейкоцитурия) позволяет оценить участие молекулярных механизмов, модулирующих разные этапы воспалительной реакции. Поскольку прирост лейкоцитурии, отражающий динамику развития воспаления в СО, через 24ч после КЛТ происходит на фоне стабильного уровня ТЛА в циркулирующей крови, то можно предположить, что спектр механизмов модулирующих воспалительную

реакцию на фоне назначения НПВП направлен на усиление защитной реакции (острого воспаления) в тканях МВП, что проявляется повышением тяжести локального воспаления. Эффект может достигаться за счет стимуляции лейкоцитов инфильтрата (т.е. поступивших в зону воспаления) и автоматически сопровождается повышением их трафика в мочу, т.е. преследуется цель усиления локальной воспалительной реакции. Таким образом, через 24ч после КЛТ морфологические изменения развивающиеся в СО (в частности, нарушение целостности уротелия) создают условия для инвазии микроорганизмов. При этом на фоне длительного ингибирования активности лейкоцитов, связанного с назначением НПВП, включается защитная реакция организма, которая характеризуется активацией регуляторных механизмов направленных на стимуляцию лейкоцитов имеющихся в инфильтратах, тогда как рекрутирование клеток крови из сосудистого русла остается неизменным. Такой механизм управления локальным воспалением, вероятно, позволяет избежать излишнего наращивания количества активированных лейкоцитов в СО мочеточника.

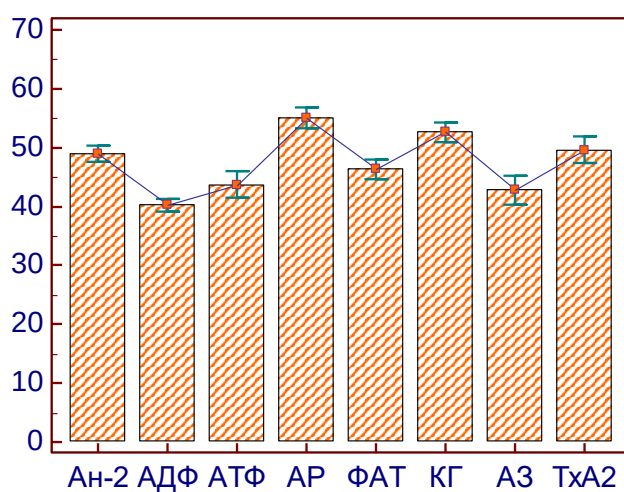
Через 48 ч после КЛТ лейкоцитурия уменьшилась еще на 22,3% ($p < 0,05$) по сравнению с предыдущим сроком наблюдения и соответствовала *легкой* степени выраженности. Поскольку тяжесть лейкоцитоза в СО мочеточника снижается параллельно с уменьшением количества рекрутируемых лейкоцитов, то вероятно, ингибирование ЦОГ в Тц и лейкоцитах обеспечивает поддержание оптимального баланса количества клеток крови, участвующих в реализации острого воспаления. Через 72ч после КЛТ имело место повышение выраженности лейкоцитурии на 46,3% ($p < 0,001$), т.е. происходило восстановление тяжести пиелонефрита, связанное с отменой НПВП. Процесс развивался на фоне увеличения количества циркулирующих ТЛА, что свидетельствует о низкой эффективности адаптационных процессов призванных ограничить воспалительную реакцию в МВП. Через 7 суток после КЛТ наблюдалось одновременное снижение лейкоцитурии и количества, соответственно, на 21,5% ($p < 0,05$) и 15,2%

($P < 0,001$) по сравнению с предыдущим сроком наблюдения. Поскольку выраженность лейкоцитоза снижалась параллельно с уменьшением количества рекрутируемых лейкоцитов, то вероятно, при восстановлении активности ЦОГ в Тц и лейкоцитах адаптационные процессы обеспечивают ограничение лейкоцитурии до легкой степени выраженности после КЛТ, но не позволяют ликвидировать воспалительную реакцию в МВП. Как известно, системная регуляция воспаления проявляется изменением активности клеток крови посредством стимуляции рецепторов, ассоциированных с различными внутриклеточными сигнальными путями [281]. Логично изучить состояние рецепторов на Тц и лейкоцитах, которые принимают участие в их активации и взаимодействии при развитии воспаления.

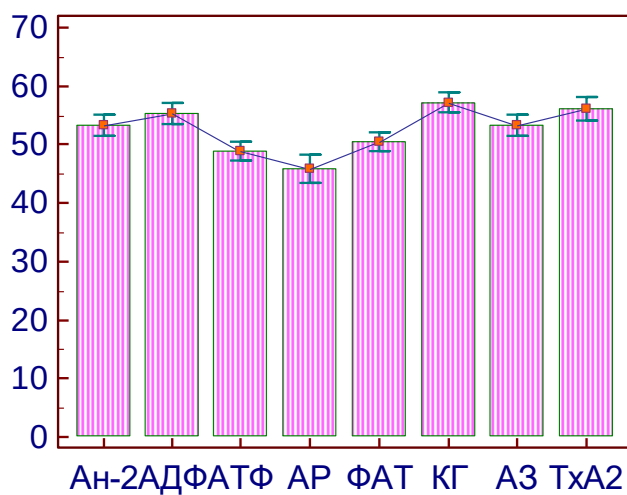
Проведенное исследование активности рецепторов Тц показало, что через 48ч после КЛТ на фоне длительного назначения пациентам НПВП потенциальными индукторами воспаления могут быть адреналин, ФАТ и АТФ, поскольку сохранялась гиперреактивность α_2 -адренорецептора, нормореактивность ФАТ-рецептора и $P2X_1$ -рецептора (Рисунок 5.3 а). Если сопоставить активность рецепторов между двумя точками исследования (через 72ч и 48 ч после КЛТ), то следует отметить снижение активности α_2 -адренорецептора на 7,9% ($p < 0,001$), повышение активности $GPVI$ -рецептора на 46,1% ($p < 0,001$), AT_1 -рецептора на 23,4% ($p < 0,001$) и $A2A$ -рецептора на 53,6% ($p < 0,001$); активность других рецепторов не претерпевала значимых изменений (Рисунок 5.3б). Выявленная нормореактивность α_2 -адренорецептора, $GPVI$ -рецептора, AT_1 -рецептора, TxA_2 -рецептора, ФАТ-рецептора и $P2X_1$ -рецептора может быть основой усиления функциональной активности Тц и лейкоцитов. Таким образом, в раннем периоде после отмены НПВП повышение количества ТЛА и усиление лейкоцитурии может быть обусловлено сохраняющимся нарушением целостности уротелия и инвазией микроорганизмов в слизистую оболочку мочеточника вследствие трафика фрагментов конкремента, наличие дренажей и стентов в МВП.



а



б



в

Рис. 5.3. Кластер активности рецепторов Тц через 48ч(а), 72ч (б), 7 суток (в) после КЛТ в верхней трети мочеточника.

По оси ординат – индуцированная агрегация Тц (%); по оси абсцисс – агонисты.

При устранении ингибирования ЦОГ в клетках крови происходит восстановление их активности и развитие воспаления, которое является защитной реакцией организма.

Через 7 суток после КЛТ обнаружено увеличение активности P2X₁-рецептора, GPVI-рецептора, АТ₁-рецептора, ФАТ-рецептора, ТхА2-рецептора, А2А-рецептора и P2Y-рецепторов ($P < 0,001$) по сравнению со сроком наблюдения 72ч (Рисунок 5.3в). При этом имела место гиперреактивность GPVI-рецептора и ТхА2-рецептора, а также нормореактивность P2Y-рецепторов, АТ₁-рецептора, ФАТ-рецептора и P2X₁-рецептора, α_2 -адренорецептора и А2А-рецептора. На этом фоне снижение количества ТЛА и выраженности лейкоцитурии позволяет предположить участие этих рецепторов в торможении воспалительной реакции. Можно рассчитывать, что установление фактов взаимодействия рецепторов на клетках крови позволит приблизиться к установлению молекулярных механизмов патогенеза пиелонефрита в различные сроки после КЛТ и защитных реакций ограничивающих воспаление в МВП.

5.2. Молекулярные механизмы, регулирующие формирование ТЛА после КЛТ.

Цель исследования – верифицировать механизмы формирования ТЛА и рекрутирования лейкоцитов из сосудистого русла в слизистую мочевыводящих путей (МВП) после КЛТ в верхней трети мочеточника при назначении и отмене НПВП на фоне длительного ингибирования участка сигнализации ЦОГ-ТхА2 в клетках крови. При анализе механизмов ранней фазы воспаления, связанной с рекрутированием лейкоцитов из сосудистого русла необходимо учитывать наличие гематурии и включение механизмов поддержания гемостаза, связанных с функцией Тц. Ингибирование синтеза ТхА2 в Тц и лейкоцитах сопровождается включением компенсаторных механизмы направленные на стимуляцию Тц, что может проявляться

изменением количества сформированных ТЛА. Установлено, что через 48ч после КЛТ имеется положительная связь между количеством ТЛА и активностью α_2 -адренорецептора ($r_{\text{ТЛА}-\alpha_2\text{АР}}=0,531$; $p<0,05$), ФАТ-рецептора ($r_{\text{ТЛА}-\text{ФАТ}}=0,400$; $p<0,05$) и P2X₁-рецептора ($r_{\text{ТЛА}-\text{P2X}_1}=0,480$; $p<0,05$) (Таблица 5.1).

Таблица 5.1

Корреляционная матрица патогенетических факторов пиелонефрита при нефролитиазе через 48ч после КЛТ при локализации конкремента в верхней трети мочеточника

Показатель	ГТ	В	ЛУ	ТЛА	α_2 -АР	ФАТР	P2X ₁ R
ГТ			0,455		-0,784	-0,519	-0,363
В					0,317	0,411	
ЛУ	0,455			0,442	0,383	0,341	0,502
ТЛА			0,442		0,531	0,400	0,480
α_2 АР	-0,784	0,317	0,383	0,531		0,645	0,466
ФАТР	-0,519	0,411	0,341	0,400	0,645		0,429
P2X ₁ R	-0,363		0,502	0,480	0,466	0,429	

Примечания: ГТ-гематурия; В-возраст; ЛУ-лейкоцитурия; ТЛА-тромбоцитарно-лейкоцитарные агрегаты; α_2 АР–активность α_2 -адренорецептора; ФАТР –активность ФАТ-рецепторов; P2XR –активность пуриновых P2X-рецепторов. Приведены значения показателей ранговой корреляции Спирмена, которые имеют статистически значимую разницу от 0 ($p < 0,05$).

Следовательно, на фоне длительного ингибирования участка сигнализации ЦОГ-ТхА₂ в Тц, возможно формирование ТЛА для рекрутирования лейкоцитов в ткани МВП и этот процесс связан с активацией САС и повышением уровня циркулирующих катехоламинов. Связь между активностью α_2 -адренорецептора и возрастом пациентов, выраженностью гематурии и лейкоцитурии, соответственно, $r_{\alpha_2\text{АР}-\text{В}}=0,317$ ($p<0,05$), $r_{\alpha_2\text{АР}-\text{ГТ}}=-0,784$ ($p<0,05$) и $r_{\alpha_2\text{АР}-\text{ЛУ}}=0,383$ ($p<0,05$) отражает влияние возраста пациента на активацию САС, а также – участие адренорецепторов в механизмах тромбогенеза и воспаления. Выявленная положительная корреляционная связь между активностью α_2 -адренорецептора и ФАТ-рецептора, P2X₁-

рецептора, соответственно $r_{\alpha_2AP-ФАТ}=0,645$ ($p<0,05$) и $r_{\alpha_2AP-P2X1}=0,466$ ($p<0,05$) позволяет рассматривать активацию САС как фактор риска активации лейкоцитов в результате как прямой стимуляции адренорецепторов на лейкоцитах, так и посредством паракринной стимуляции (АТФ) активированными Тц. Подтверждением этой гипотезы может быть наличие корреляции между активностью ФАТ-рецептора и $P2X_1$ -рецептора $r_{ФАТ-P2X1}=0,429$ ($p<0,05$), т.е. по сути на данном этапе имеет место взаимная паракринная индукция Тц и лейкоцитов. Следовательно, ведущим механизмом формирования ТЛА и рекрутирования лейкоцитов при введении НПВП является активация α_2 -адренорецептора, который поддерживает внутриклеточную сигнализацию независимую от активности ЦОГ.

Через 72ч после КЛТ выявлена положительная корреляционная связь между количеством ТЛА и активностью α_2 -адренорецептора ($r_{ТЛА-\alpha_2AP}=0,754$; $p<0,05$), $GPVI$ -рецептора ($r_{ТЛА-GPVI}=0,513$; $p<0,05$), пуринового $P2X_1$ -рецептора ($r_{ТЛА-P2X1}=0,404$; $p<0,05$), активностью AT_1 -рецептора ($r_{ТЛА-AT1}=0,640$; $p<0,05$) и ФАТ-рецептора ($r_{ТЛА-ФАТ}=0,712$; $p<0,05$) (Таблица 5.2). Не обнаружена корреляционная связь между количеством ТЛА и активностью TxA_2 -рецептора, $P2Y$ -рецепторов. Следовательно, после отмены НПВП: (а) расширяется спектр рецепторов ($GPVI$ -рецептор, $P2X_1$ -рецептор, AT_1 -рецептор и ФАТ-рецептор) принимающих участие в формировании ТЛА; (б) усиливается влияние α_2 -адренорецептора и нивелируется роль TxA_2 во взаимодействии клеток крови. В первом случае, причиной усиления активности клеток крови может быть ко-активация с AT_1 -рецептором ($r_{\alpha_2AP-AT1}=0,730$; $p<0,05$), $GPVI$ -рецептором ($r_{\alpha_2AP-GPVI}=0,577$; $p<0,05$) и ФАТ-рецептором ($r_{\alpha_2AP-ФАТ}=0,428$; $p<0,05$); во-втором случае, проявляется низкая эффективность аутокринной стимуляции ($r_{TxA_2-P2Y}=-0,513$; $p<0,05$).

Таблица 5.2

**Корреляционная матрица патогенетических факторов пиелонефрита при нефролитиазе через 72ч после КЛТ
при локализации конкремента в верхней трети мочеточника**

Показатель	ГТ	В	ЛУ	ТЛА	GPVIR	α_2 AR	ТхА2R	ФАТR	АТ ₁ R	P2X-R
ГТ		0,540	0,737	0,488	-0,725	-0,484			-0,450	-0,408
В	0,540		0,619						0,515	
ЛУ	0,737	0,619		0,822	0,455	0,461	0,330	0,509	0,440	0,620
ТЛА	0,488		0,822		0,513	0,754		0,712	0,640	0,404
GPVIR	-0,725		0,455	0,513		0,577			0,558	0,490
α_2 AR	-0,484		0,461	0,754	0,577			0,428	0,730	
ТхА2			0,330					0,467	-0,595	
ФАТR			0,509	0,712		0,428	0,467			0,753
АТ ₁ R	-0,450	0,515	0,440	0,640	0,558	0,730	-0,595			
P2XR	-0,408		0,620	0,404	0,490			0,753		

Примечания: ГТ-гематурия; В-возраст; ЛУ-лейкоцитурия; ТЛА-тромбоцитарно-лейкоцитарные агрегаты; GPVI-R – активность GPVI-рецепторов к коллагену IV типа; α_2 -R–активность α_2 -адренорецептора; ТхА2-R –активность ТхА2-рецептора; АТ₁-R- активность ангиотензиновых АТ₁-рецепторов; P2X-R –активность пуриновых P2X-рецепторов; А2А-2R – активность А2А-рецептора к аденозину. Приведены значения показателей ранговой корреляции Спирмена, которые имеют статистически значимую разницу от 0 ($p < 0,05$).

Таким образом, триггерами формирования ТЛА, обеспечивающих поддержание воспалительной реакции после КЛТ, являются как системные регуляторы – адреналин и ангиотензин-2, так и локальные модуляторы функциональной активности клеток крови – ФАТ, АТФ и коллаген IV-типа БМ стенки сосудов. Наличие с одной стороны нормореактивности α_2 -адренорецептора, GPVI-рецептора, пуриновых P2-рецепторов, АТ₁-рецептора и ФАТ-рецептора, а с другой – связь активности рецепторов с количеством циркулирующих ТЛА означает, что через 24ч после отмены НПВП возможна индукция воспалительной реакции за счет рекрутирования клеток крови в МВП. Если судить по силе корреляционных связей, то доминирующую роль в формировании ТЛА играют, системные механизмы регуляции воспаления. Вероятно, в связи с наличием стента в просвете лоханки или мочеточника эпизодически возникающая афферентация нервных окончаний в СО, сопровождается активацией САС и РАС, нарушением микроциркуляции и развитием гипоксии/ишемии тканей МВП. При наличии нормореактивности рецепторов, возникающее повышение содержания адреналина, ангиотензина -2 и АТФ провоцирует стимуляцию клеток крови и формирование ТЛА. В свою очередь, активированные лейкоциты (а) секретируют ФАТ, который может стимулировать Тц посредством, так называемой локальной (паракринной) стимуляции; (б) вызывают деградацию коллагена IV-типа БМ стенки сосудов. В сущности, проявляется стереотипный механизм регуляции воспаления, согласно которому активированные лейкоциты воспроизводят «запрос» на восполнение количества и состава клеток крови участвующих в воспалении.

Участие САС в рекрутировании лейкоцитов представляется логичным, поскольку экспрессия α_2 -адренорецепторов на Тц, лейкоцитах и эндотелии [332; 214] создает оптимальные условия для формирования ТЛА при развитии пиелонефрита. Что касается ангиотензинового АТ₁-рецептора, то его присутствие на эндотелии, Тц и лейкоцитах [229; 406] обеспечивает их взаимодействие в процессе миграции клеток крови. Данное утверждение

базируется на следующих известных эффектах ангиотензина-2: (а) вызывает активацию и агрегацию Тц [351]; (б) способствует адгезии лейкоцитов к эндотелию и увеличивает проницаемость стенки сосудов микроциркуляторного русла [86, 311]; (в) является триггером воспалительной реакции в эндотелии [75]; (г) участвует в активации Т-клеток и продукции ИЛ-2; данный эффект воспроизводится через ERK-зависимый механизм (extracellular signal-regulated kinase $\frac{1}{2}$) [360]. Внеклеточный аденозинтрифосфат (АТФ), считается молекулой DAMP (danger-associated molecular pattern DAMP), которая выделяется во внеклеточную среду во время воспаления поврежденными клетками, лейкоцитами и активированными Тц [356]. В этой связи представляет интерес пуринергическая передача сигналов в регулировании функции нейтрофилов [383]. Установлено, что АТФ непосредственно активирует рецептор P2X7 канала плазматической мембраны (P2X7R), что приводит к внутриклеточному притоку K^+ , индуцирующего активацию инфламماسомы NLRP3 [382]. Ключевую роль в АТФ-индуцированной активации P2X7 рецептора и инфламماسомы NLRP3, играет паксиллин, который облегчает образование комплекса P2X7R–паксиллин–NLRP3. Представляется важной роль АТФ в рекрутировании Тц и лейкоцитов, учитывая развитие воспаления на фоне сохраняющейся гематурии после КЛТ. Интегративную роль во взаимодействии клеток крови может играть АТФ-управляемый ионный канал P2X₁, экспрессируемый как на Тц, так и на нейтрофилах [275]. Этот ионный канал способствует активации Тц и гемостазу, тогда как на нейтрофилах – участвует в хемотаксисе и снижении активации циркулирующих клеток. Стимуляция пуринового P2X7-рецептора опосредует взаимодействие лейкоцитов и эндотелия [87]. Участие ФАТ в рекрутировании лейкоцитов представляется оправданным, поскольку (а) активация соответствующего рецептора на Тц сопровождается повышением экспрессии Р- и L-селектинов, обеспечивающих взаимодействие с различными клетками крови [142]; (б) ФАТ-рецепторы на эндотелиальных клетках регулируют проницаемость

эндотелия и адгезию лейкоцитов [252; 277], причем воспаление повышает чувствительность данного рецептора [408].

Через 7 суток после КЛТ сохранялась положительная корреляционная связь между количеством ТЛА и лейкоцитурией ($r_{\text{ТЛА-}\alpha_2\text{AP}}=0,768$; $p<0,05$). Проявлялись новые корреляционные связи между количеством ТЛА и активностью GPVI-рецептора ($r_{\text{ТЛА-GPVI}}=0,546$; $p<0,05$), P2Y-рецепторов ($r_{\text{ТЛА-P2Y}}=0,624$; $p<0,05$) и TxA2-рецептора ($r_{\text{ТЛА-P2Y}}=0,517$; $p<0,05$); отрицательная связь имела место между ТЛА и активностью аденозинового A2A-рецептора ($r_{\text{ТЛА-ФАТ}}=-0,539$; $p<0,05$). Не обнаружена корреляционная связь между количеством ТЛА и активностью P2X₁-рецептора и АТ₁-рецептора. Уменьшалась сила связи между количеством ТЛА и активностью α_2 -адренорецептора, не изменялась связь ТЛА с ФАТ-рецептором. Таким образом, через 7 суток после КЛТ: (а) формирование ТЛА связано с активацией GPVI-рецептора, P2Y-рецепторов, TxA2-рецептора и ФАТ-рецептора, лимитировалось стимуляцией аденозинового A2A-рецептора; (б) защитная реакция, направленная на ограничение количества циркулирующих ТЛА, обусловлена снижением активности α_2 -адренорецептора и нивелированием влияния P2X₁-рецептора, АТ₁-рецептора на функцию клеток крови. В случае с α_2 -адренорецептором причиной десенситизации рецептора на клетках крови может быть влияние A2A-рецептора ($r_{\alpha_2\text{AP-A2A}}=-0,600$; $p<0,05$). Роль GP VI-рецептора в рекрутировании клеток крови из сосудистого русла прослеживается в связи с модулирующим влиянием коллагена IV-типа БМ сосудов на функциональную активность и взаимодействие Тц, лейкоцитов и эндотелия. Известно, что в местах повреждения сосудистой стенки Тц контактируют с субэндотелиальным коллагеном IV типа, следствием чего является активация и агрегация Тц. В распознавании коллагена принимают участие гликопротеин Ib (GPIb) и интегрин $\alpha\text{IIb}\beta_3$ (GPIIb/IIIa), которые взаимодействуют с коллагеном через фактор фон Виллебранда. На Тц также идентифицировано несколько рецепторов непосредственно распознающих коллаген, в частности интегрин

$\alpha 2\beta 1$ и член суперсемейства иммуноглобулинов – GP-VI-рецептор [61]. На лейкоцитах экспрессированы интегрины $\alpha L\beta 2$, $\alpha M\beta 2$ и $\alpha X\beta 2$, позволяющие распознавать разные типы коллагенов, что необходимо для их трансмиграции через БМ стенки сосудов МЦР [381; 199]. Установлено, что внутриклеточная сигнализация, связанная с активацией GP VI-рецептора, регулирует функцию эндотелиальных клеток и перицитов в стенке капилляров и венул [231].

Наличие отрицательной связи между количеством ТЛА и активностью аденозинового A2A-рецептора ($r_{\text{ТЛА-A2A}} = -0,539$; $p < 0,05$) отражает участие данного типа рецепторов на Тц, лейкоцитах и эндотелии в ограничении рекрутирования клеток крови из сосудистого русла в МВП. При наличии нормореактивности A2A-рецептора важно оценивать возможные причины повышения уровня внеклеточного аденозина. Возвращаясь к концепции сопряженности гематурии и воспаления после КЛТ, можно предположить, что именно Тц играют ведущую роль в пиковых повышениях уровня аденозина. При наличии гематурии активированные Тц выделяют из плотных гранул АТФ и АДФ, которые, связываясь с P2-рецепторами на клетках крови, вовлекают в процесс агрегации новый пул циркулирующих Тц и активируют лейкоциты. Снижение выраженности гематурии будет сопровождаться активацией эктонуклеозид-трифосфатдифосфогидролазы-1 (NTPDase1)/CD39, экспрессированной на поверхности Тц, которая дефосфорилирует АТФ до АДФ и АМФ. Последний, в свою очередь, гидролизруется экто-5'-нуклеотидазой (CD73) до аденозина; который ограничивает функциональную активность как Тц, так лейкоцитов. Стимуляция A2-рецепторов приводит к повышению внутриклеточного уровня цАМФ и ингибированию активации Тц [389], что может быть причиной снижения количества циркулирующих ТЛА. Если снижение функциональной активности лейкоцитов (противовоспалительный эффект аденозина) через 72ч после КЛТ представляется оправданным, то возникающая дизагрегация Тц (антиагрегантный эффект аденозина) может спровоцировать усиление

гематурии [85]. Нельзя исключить увеличение секреции аденозина эндотелием сосудов во время эпизодически возникающей гипоксии/ишемии органов [291]. Данный механизм может быть связан с рефлекторным нарушением микроциркуляции в СО при перемещении фрагментов конкрементов или стента дренирующего МВП. Одновременное воздействие АТФ и аденозина на эндотелий может сопровождаться индукцией разных внутриклеточных сигнальных путей, следствием чего будет изменение проницаемости эндотелиального барьера [39].

Таким образом, у пациентов с нефролитиазом при длительном введении высоких доз НПВП малоинвазивное оперативное вмешательство выполнялось на фоне снижения количества циркулирующих ТЛА. Следствием данного процесса было ограничение количества лейкоцитов рекрутированных из сосудистого русла в слизистую оболочку мочеточника для поддержания воспаления в стенке МВП. Ведущим механизмом формирования ТЛА и рекрутирования лейкоцитов из сосудистого русла при введении НПВП являлась активация α_2 -адренорецептора, который поддерживает внутриклеточную сигнализацию независимую от активности ЦОГ. Активация САС является фактором риска развития воспаления после оперативного вмешательства. Через 72ч после КЛТ воспалительная реакция в МВП, связанная с проведением КЛТ, обеспечивалась увеличением количества циркулирующих ТЛА. Триггерами формирования ТЛА, являются как системные регуляторы – адреналин и ангиотензин-2, так и локальные модуляторы функциональной активности клеток крови – ФАТ, АТФ и коллаген IV-типа БМ стенки сосудов. Ограничение формирования в циркулирующей крови ТЛА обеспечивалось аденозинергической регуляцией. Через 7 суток после КЛТ воспалительная реакция в МВП характеризовалась формированием ТЛА с участием GPVI-рецептора, P2Y-рецепторов, TxA2-рецептора и ФАТ-рецептора. Ограничение количества циркулирующих ТЛА обусловлено снижением активности α_2 -адренорецептора и нивелированием влияния P2X₁-рецептора, АТ₁-рецептора на клетки крови.

5.3. Молекулярные механизмы, регулирующие лейкоцитурию после КЛТ.

Цель исследования изучить механизмы регуляции лейкоцитурии у пациентов с неэффективной ЛКТ после КЛТ в верхней трети мочеточника при назначении и отмене НПВП

Результирующее влияние КЛТ на выраженность лейкоцитурии после отмены НПВП определяется: (а) предсуществующей ишемией/реперфузией почки и МВП, связанной с возникновением эпизодов обструкции мочеточника при нефролитиазе [104]; (б) альтерацией тканей МВП, почки и надпочечника связанной с воздействием «ударной» волны. Тщательные экспериментальные исследования позволили выявить апоптоз клеток [128] и развитие воспаления [212; 84] в зоне оперативного вмешательства; (в) низкой резистентностью верхнего отдела мочеточника к механической деформации [336]. Через 48ч после КЛТ обнаружена положительная связь между выраженностью лейкоцитурии и активностью α_2 -адренорецептора ($r_{\text{ЛУ-}\alpha_2\text{AP}} = 0,383$; $p < 0,05$), ФАТ-рецептора ($r_{\text{ЛУ-ФАТ}} = 0,341$; $p < 0,05$) и $P2X_1$ -рецептора ($r_{\text{ЛУ-P2X1}} = 0,502$; $p < 0,05$). Имелась корреляция между возрастом и активностью ФАТ-рецептора, α_2 -адренорецептора, соответственно, $r_{\text{В-ФАТ}} = 0,411$ ($p < 0,05$) и $r_{\text{В-}\alpha_2\text{AP}} = 0,317$ ($p < 0,05$), а также – между активностью ФАТ-рецептора и $P2X_1$ -рецептора ($r_{\text{ФАТ-P2X1}} = 0,429$; $p < 0,05$). Следовательно, на фоне длительного ингибирования ЦОГ в клетках крови, формирование ТЛА для рекрутирования лейкоцитов в ткани МВП и лейкоцитурия контролируются одними и тем же патогенетическим фактором – активацией САС и повышением уровня циркулирующих катехоламинов. Сохранение нормореактивности ФАТ-рецептора и $P2X_1$ -рецептора, их связь с лейкоцитурией в этот срок наблюдения отражают «остаточную» реактивность ЦОГ лейкоцитов и Тц при длительном назначении НПВП,

позволяющую клеткам крови взаимодействовать паракринными механизмами.

Через 72ч после КЛТ усиливается связь между лейкоцитурией и гематурией ($r_{72}=0,737$; $r_{48}=0,455$; $p<0,05$), что отражает (а) повышение выраженности лейкоцитурии через 24ч после отмены НПВП, следствием чего может быть возрастание диапедеза эритроцитов; (б) взаимодействие двух патологических процессов (геморрагии и воспаления), которые могут сопровождаться их взаимной индукцией, связанной с повышением проницаемости сосудов и рекрутированием лейкоцитов [274; 254]. Наличие связи между выраженностью лейкоцитурии и количеством ТЛА ($r_{\text{ЛТ-ТЛА}}=0,488$; $p<0,05$) свидетельствует о синхронизации морфологического обеспечения обоих процессов, т.е. для увеличения эффективности защитной реакции при инвазии микроорганизмов в СО мочеточника необходимо восполнять пул лейкоцитов в периваскулярном инфильтрате [197]. Механизм взаимодействия лейкоцитов и Тц в процессе реализации воспалительной реакции после отмены НПВП – недостаточно изучен. В исследовании выявлена положительная связь между выраженностью лейкоцитурии, активностью GPVI-рецептора, ФАТ рецептора, пуринового ионотропного $P2X_1$ -рецептора и α_2 -адренорецептора (соответственно, $r_{\text{ЛУ-GPVI}}=0,455$; $r_{\text{ЛУ-ФАТ}}=0,509$; $r_{\text{ЛУ-P2X1}}=0,620$ и $r_{\text{ЛУ-}\alpha_2\text{AP}}=0,461$; $p<0,05$), что позволяет конкретизировать спектр рецепторов и внутриклеточных сигнальных путей, индуцирующих лейкоцитурию после КЛТ на фоне восстановления активности ЦОГ. Доказательства влияния коллагена на функцию лейкоцитов впервые представили [115], хотя мотивы и механизмы этого явления остаются не понятными. Лейкоциты имеют рецепторы к коллагену [199], что, вероятно, позволяет функциональному ансамблю тромбоциты-эндотелий сосудов регулировать экстравазацию лейкоцитов и модулировать их активность во время воспалительной реакции [304].

В ряде исследований [372] ФАТ рассматривается как системный липидный воспалительный медиатор, способный вызывать увеличение

проницаемости сосудов, выработку цитокинов эндотелиальными клетками и лейкоцитами. Влияние ФАТ на функциональную активность нейтрофилов проявляется высвобождением содержимого гранул (миелопероксидазы, лактатдегидрогеназы, лактоферрина, эластазы и матриксной металлопротеиназы-9), следствием чего является не только разрушение микроорганизмов, но и деградация внеклеточного матрикса в слизистой мочеточника [156; 170]. Важным эффектом ФАТ является высвобождение внеклеточной ловушки нейтрофилов (NET), которое зависит от гликолиза, митохондриального синтеза АТФ и пуринергической передачи сигналов [289]. В этой связи, взаимодействие ФАТ-рецептора и P2X-рецептора может потенцировать функциональную активность нейтрофилов.

Внеклеточный аденозин-5'-трифосфат (АТФ) является провоспалительной молекулой, которая высвобождается во время гипоксии/ишемии тканей, а также поврежденными клетками, активированными лимфоцитами и эндотелием [112]. Передача нуклеотидных сигналов является ключевым элементом активации нейтрофилов [303]. Ключевую роль в синхронизации процессов активации и функции нейтрофилов играют изменения внутриклеточного уровня Ca^{2+} , вызванные истощением их цитозольного запаса и притоком внеклеточного Ca^{2+} через ионные каналы; процесс включает взаимодействие различных рецепторов и ассоциированных с ними сигнальных путей [164]. Экспрессия P2X-рецепторов подтверждена на моноцитах и макрофагах человека [369]; повышенная экспрессия P2X7-рецепторов на моноцитах рассматривается как индикатор хронического воспаления [200]. Фармакологические, а также генетические подходы предоставляют достаточно доказательств того, что при остром воспалении эндотелиальные коннексин 43 (Cx43)-гемиканалы и паннексин 1 (Panx1)-каналы высвобождают сигнальные молекулы, включая АТФ, которые регулируют проницаемость сосудов и рекрутирование лейкоцитов [180]. Аналогичные каналы в лейкоцитах могут опосредовать их активацию и функцию посредством аутокринного механизма.

Провоспалительный эффект адреналина может быть связан с тем, что (а) цитокины могут влиять на экспрессию адренергических рецепторов лейкоцитов; последние, в свою очередь, способны самостоятельно синтезировать катехоламины при развитии воспалительной реакции [178, 46]; (б) стимуляция α - и β -адренорецепторов сопровождается увеличением фагоцитарной способности макрофагов, экспрессией индуцибельной синтазы оксида азота (iNOS) и повышением продукции NO; в основе данных процессов, вероятно, лежит активация ядерного фактора каппа В (NF- κ B) [92]. В этой связи, Sud R. et al. [366] предлагают рассматривать стимуляцию α_2 -адренорецептора макрофагов как триггер воспалительной реакции, поскольку его лиганды индуцируют продукцию фактора некроза опухоли (ФНО α).

Таким образом, через 72 ч после КЛТ в случае отмены НПВП:

(а) развитие воспалительной реакции происходит на фоне нормореактивности α_2 -адренорецептора, GPVI-рецептора, АТ₁-рецептора, ТхА₂-рецептора, ФАТ-рецептора и P2X₁-рецептора. При этом выраженность лейкоцитурии коррелирует с активностью α_2 -адренорецептора, GPVI-рецептора, ФАТ-рецептора и P2X₁-рецептора; количество циркулирующих ТЛА модулируется α_2 -адренорецептором, GPVI-рецептором, P2X₁-рецептором, АТ₁-рецептором и ФАТ-рецептором;

(б) активация α_2 -адренорецептора, GPVI-рецептора, P2X₁-рецептора и ФАТ-рецептора на клетках крови является стереотипной реакцией обеспечивающей как формирование ТЛА, так и трафик активированных лейкоцитов из сосудистого русла в просвет МВП; (в) специфическим индуктором формирования ТЛА является Ан-2; специфическими индукторами лейкоцитурии являются адреналин и внеклеточный уровень АТФ. Фактором риска усиления формирования ТЛА является активация

РАС, тогда как лейкоцитурии – активация САС и гипоксия/ишемия тканей МВП.

Через 7 суток после КЛТ отмечено снижение лейкоцитурии ($p < 0,05$), что проявлялось уменьшением силы корреляционной связи между выраженностью лейкоцитурии и гематурии ($r_{\text{ЛУ-ГТ}} = 0,447$; $p < 0,05$) (Таблица 5.3). Сохранялась корреляционная связь между выраженностью лейкоцитурии, возрастом ($r_{\text{ЛУ-В}} = 0,622$; $p < 0,05$) и количеством циркулирующих ТЛА ($r_{\text{ЛУ-ТЛА}} = 0,768$; $p < 0,05$). Таким образом, у лиц пожилого возраста следует ожидать более высокие значения лейкоцитурии, а трафик лейкоцитов определяется степенью функциональной активностью клеток крови. Сохранялись корреляционные связи между выраженностью лейкоцитурии и активностью GPVI ($r_{\text{ЛУ-GPVI}} = 0,588$; $p < 0,05$), ТхА2-рецептора ($r_{\text{ЛУ-ТхА2}} = 0,640$; $p < 0,05$), ФАТ-рецептора ($r_{\text{ЛУ-ФАТ}} = 0,707$; $p < 0,05$) и P2X₁-рецептора ($r_{\text{ЛУ-P2X1}} = 0,490$; $p < 0,05$); отрицательная связь имела место между лейкоцитурией и активностью аденозинового А2А-рецептора ($r_{\text{ТЛА-А2А}} = -0,654$; $p < 0,05$). Не обнаружена корреляционная связь между выраженностью лейкоцитурии и активностью α_2 -адренорецептора, АТ₁-рецептора и P2Y-рецепторов. Анализ силы корреляции свидетельствует об увеличении связи выраженности лейкоцитурии с активностью ТхА2-рецептора, уменьшении таковой с активностью α_2 -адренорецептора и P2X₁-рецептора; не изменялась связь лейкоцитурии с активностью GPVI-рецептора, ФАТ-рецептора и А2А-рецептора. Ограничение воспалительной реакции в МВП обеспечивалось аденозином; стимуляция аденозиновых А2А-рецепторов может быть перспективной тактикой ограничения тяжести лейкоцитурии после КЛТ. Что касается аденозина, то его противовоспалительное действие описано в литературе и обусловлено активностью подтипов А2-рецепторов [112, 102]. Повышение уровня внеклеточного аденозина после КЛТ может быть связано с гипоксией/ишемией тканей [70], выделением нуклеотидов

активированными лейкоцитами во время воспаления [91]. Лейкоциты имеют рецепторы к коллагену [199], что, вероятно, позволяет функциональному ансамблю тромбоциты-эндотелий сосудов регулировать экстравазацию лейкоцитов и модулировать их активность во время воспалительной реакции [304].

Таким образом, через 7 суток после КЛТ: (а) развитие воспалительной реакции происходит на фоне гиперреактивности GPVI-рецептора и TxA₂-рецептора; нормореактивности P2Y-рецепторов, АТ₁-рецептора, ФАТ-рецептора и P2X₁-рецептора, α₂-адренорецептора и A2A-рецептора. При этом выраженность лейкоцитурии коррелирует с активностью GPVI-рецептора, TxA₂-рецептора, ФАТ-рецептора и P2X₁-рецептором, тогда как количество циркулирующих ТЛА модулируется активацией GPVI-рецептора, P2Y-рецепторов, TxA₂-рецептора и ФАТ-рецептора, лимитировалось стимуляцией аденозинового A2A-рецептора;

(б) активация GPVI-рецептора, TxA₂-рецептора, ФАТ-рецептора на клетках крови является стереотипной реакцией обеспечивающей как формирование ТЛА, так и трафик активированных лейкоцитов из сосудистого русла в просвет МВП; (в) специфическим индуктором формирования ТЛА является АДФ; а лейкоцитурии внеклеточный уровень АТФ. Таким образом, факторами риска усиления формирования ТЛА и лейкоцитурии являются интенсификация пуринового метаболизма. Нельзя исключить участие других рецепторов в модуляции воспалительной реакции после КЛТ, если будет доказано, что их взаимодействие связано с формированием ТЛА и тяжестью воспаления.

Можно рассчитывать, что установление фактов взаимодействия рецепторов на клетках крови позволит приблизиться к установлению молекулярных механизмов патогенеза пиелонефрита после КЛТ и формирующихся защитных реакций в слизистой оболочке МВП.

Таблица 5.3.

Корреляционная матрица патогенетических факторов пиелонефрита при нефролитиазе через 7 суток после КЛТ при локализации конкремента в верхней трети мочеточника

Показатель	ГТ	В	ЛУ	ТЛА	GPVIR	α_2 AR	ТхА2R	ФАТR	АТ ₁ R	P2YR	P2XR	A2AR
ГТ			0,447		-0,716		-0,570	-0,515		-0,680	-0,385	0,501
В			0,622						0,606			
РК												
ЛУ	0,447	0,622		0,768	0,588		0,640	0,707		0,509	0,498	-0,654
ТЛА			0,768		0,546	0,385	0,517	0,488		0,624		-0,539
GPVI-R	-0,716		0,588	0,546					0,581	0,569		-0,393
α_2 -AR				0,385								-0,600
ТхА2	-0,570		0,640	0,517				0,543		0,492		
ФАТ-R	-0,515		0,707	0,488			0,543			0,692	0,534	-0,682
АТ ₁ -R		0,606			0,581					0,610		
P2YR	-0,680			0,624	0,569		0,492	0,692	0,610			
P2X	-0,385		0,498					0,534				
A2A-R	0,501		-0,654	-0,539	-0,393	-0,600		-0,682				

Примечания: ГТ-гематурия; В-возраст; ЛУ-лейкоцитурия; ТЛА-тромбоцитарно-лейкоцитарные агрегаты; GPVI-R – активность GPVI-рецепторов к коллагену IV типа; α_2 -R–активность α_2 -адренорецептора; ФАТ-R –активность ФАТ-рецептора; АТ₁-R- активность ангиотензиновых АТ₁-рецепторов; P2X-R –активность пуриновых P2X-рецепторов; P2Y-R –активность пуриновых P2Y-рецепторов; A2A-2R –активность A2A-рецептора к аденозину.

Приведены значения показателей ранговой корреляции Спирмена, которые имеют статистически значимую разницу от 0 ($p < 0,05$).

5.4. Взаимодействие рецепторов на клетках крови, модулирующее развитие пиелонефрита после КЛТ.

Цель исследования –на основании анализа рецепторного аппарата Тц выявить причинно-следственные связи, отражающие участие факторов риска нефролитиаза в реактивности клеток крови; установить молекулярные механизмы, модулирующие развитие воспалительной реакции в МВП при неэффективной ЛКТ и после КЛТ.

Если сопоставить корреляционные связи между активностью GPVI-рецептора, количеством ТЛА и выраженностью лейкоцитурии (соответственно $r_{\text{GPVI-ТЛА}}=0,513$ и $r_{\text{GPVI-ЛТ}}=0,455$; $p<0,05$) через 72ч после КЛТ, то можно прийти к заключению, что контакт клеток крови с субэндотелиальным коллагеном стимулирует рекрутирование клеток из сосудистого русла для поддержания воспалительной (защитной) реакции и модулирует тяжесть лейкоцитурии. Роль GP VI-рецептора в рекрутировании клеток крови из сосудистого русла прослеживается в связи с *модулирующим* влиянием коллагена IV-типа базальной мембраны сосудов на функциональную активность и взаимодействие Тц, лейкоцитов и эндотелия. Данный эффект может быть связан с: активацией Тц и секрецией ими пуринов, цитокинов [42, 238]; ингибированием функции лейкоцитов [115]; повышением проницаемости эндотелия [231]; трансмиграцией лейкоцитов через базальную мембрану стенки сосудов МЦР [381; 199]. Выявлена положительная корреляционная связь между активностью GPVI-рецептора, α_2 -адренорецептора ($r_{\text{GP-VI-}\alpha\text{AP}}=0,577$; $p<0,05$), AT_1 -рецептора ($r_{\text{GP-VI-AT}_1}=0,558$; $p<0,05$) и P2X_1 -рецептора ($r_{\text{GP-VI-P2X}}=0,490$; $p<0,05$). Через 7 суток после КЛТ сохранялась корреляционная связь между активностью GPVI и AT_1 -рецептора ($r_{\text{GPVI-AT}_1}=0,581$; $p<0,05$); появлялась новая связь с активностью P2Y -рецептора ($r_{\text{GPVI-P2Y}}=0,569$; $p<0,05$). Не обнаружена корреляционная связь между активностью GPVI-рецептора и активностью α_2 -адренорецептора, AT_1 -рецептора и P2X_1 -рецептора. Следовательно, (а) формирование ТЛА и

усиление лейкоцитурии возможно вследствие ко-стимуляции активности GPVI-рецептора, α_2 -адренорецептора, АТ₁-рецептора, пуриновых P2X₁- и P2Y-рецепторов на клетках участвующих в формировании ТЛА; ограничение сосудистого этапа реализации воспаления может обеспечиваться взаимодействием GPVI-рецептора и аденозинового А2А-рецептора; (б) активация САС и РАС, развитие гипоксии/ишемии тканей МВП и ремоделирование стенки сосудов активированными лейкоцитами после оперативного вмешательства являются факторами риска поддержания воспалительного процесса в мочеточнике.

Выявленная через 48ч после КЛТ корреляционная связь между активностью α_2 -адренорецептора, выраженностью гематурии и возрастом (соответственно, $r_{\alpha_2AP-ГТ}=-0,784$ и $r_{\alpha_2AP-B}=0,317$; $p<0,05$), а также через 72ч ($r_{\alpha_2AP-ГТ}=-0,482$; $p<0,05$) позволяет уточнить возможные факторы риска активации САС после КЛТ. Вероятно, стресс-реакция, связанная с оперативным вмешательством на мочеточнике активирует симпатoadреналовую систему и провоцирует развитие артериальной гипертензии [41], что проявляется выраженностью гематурии. Установлено наличие связи между активностью α_2 -адренорецептора, выраженностью лейкоцитурии и количеством ТЛА. Через 48ч после КЛТ соответствующие коэффициенты корреляции составили $r_{\alpha_2AP-ЛУ}=0,383$ ($p<0,05$) и $r_{\alpha_2AP-ТЛА}=0,531$ ($p<0,05$); через 72ч $r_{\alpha_2AP-ЛУ}=0,461$ ($p<0,05$) и $r_{\alpha_2AP-ТЛА}=0,754$; $p<0,05$). Через 7 суток после КЛТ сохранилась только связь между активностью α_2 -адренорецептора и количеством ТЛА ($r_{\alpha_2AP-ТЛА}=0,385$; $p<0,05$). На основании оценки силы корреляционной связи можно прийти к заключению, что провоспалительный эффект адреналина в большей степени проявляется рекрутированием клеток крови в стенку МВП (количеством ТЛА), чем выраженностью лейкоцитурии. В этом контексте представляет интерес возможное взаимодействие α_2 -адренорецепторов с другими рецепторами. Через 48ч после КЛТ установлена корреляционная связь между активностью α_2 -адренорецептора и ФАТ-рецептора ($r_{\alpha_2AP-ФАТ}=0,645$; $p<0,05$) и P2X₁-рецептора ($r_{\alpha_2AP-P2X1}=0,466$;

$p < 0,05$). Через 72 ч снижалась сила взаимосвязи α_2 -адренорецептора и ФАТ-рецептора ($r_{\alpha_2AP-ФАТ} = 0,428$; $p < 0,05$), проявлялась связь с активностью AT_1 -рецептора ($r_{\alpha_2AP-AT_1} = 0,730$; $p < 0,05$). Через 7 суток выявлена отрицательная корреляционная связь между активностью α_2 -адренорецептора и A2A-рецептора ($r_{\alpha_2AP-A2A} = -0,600$; $p < 0,05$). Наличие корреляционной связи с высокой силой между активностью α_2 -адренорецептора, AT_1 -рецептора и ФАТ-рецептора свидетельствует о сопряженности сигнальных путей, связанных с Gi-белком (α_2 -адренорецептор) и Gq-белком (ФАТ-рецептор, AT_1 -рецептор), обеспечивающей повышение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} в Тц и лейкоцитах. Можно рассчитывать, что блокада этих рецепторов после КЛТ позволит снизить количество рекрутируемых лейкоцитов в СО мочеточника и, тем самым, ограничить тяжесть воспаления. В этом контексте, обращает на себя внимание появление отрицательной связи между активностью α_2 -адренорецептора и A2A-рецептора на 7 сутки после КЛТ.

Взаимодействие AT_1 -рецептора с другими рецепторами, принимающими участие в регуляции воспаления после КЛТ не получило должного отражения в литературе. На первом этапе анализа необходимо было выяснить – связана ли активность ангиотензинового AT_1 -рецептора с формированием ТЛА и лейкоцитурией? Выявленная через 72ч после КЛТ корреляционная связь между активностью AT_1 -рецептора, выраженностью лейкоцитурии ($r_{AT_1-Л\gamma} = 0,440$; $p < 0,05$) и количеством циркулирующих ТЛА ($r_{AT_1-ТЛА} = 0,640$; $p < 0,05$) свидетельствуют, что активация РАС является фактором риска поддержания воспаления в МВП через 72 ч после КЛТ. Причем в большей степени провоспалительный эффект Ан-2 связан с формированием ТЛА. Аналогичный эффект воспроизводил адреналин, что позволяет прийти к заключению, что гуморальные регуляторы при активации САС и РАС модулируют один и тот же этап воспалительной реакции, а именно рекрутирование клеток крови из сосудистого русла. Более того наличие корреляционной связи между активностью AT_1 -рецептора и α_2 -адренорецептор ($r_{AT_1-\alpha_2AP} = 0,730$; $p < 0,05$) подтверждает возможность их

взаимодействия на раннем этапе стимуляции клеток крови и формирования ТЛА. В настоящее время считается доказанным существование функциональной перекрестной связи между сигнальным путем AT_1 -рецептора и другими сигнальными путями, отражением чего может быть корреляционная связь между активностью AT_1 -рецептора и α_2 -адренорецептора (72ч после КЛТ), а также между активностью AT_1 -рецептора, $GPVI$ -рецептора и $P2Y$ -рецепторов (7 суток после КЛТ), соответственно, $r_{AT_1-GPVI}=0,581$ ($p<0,05$) и $r_{AT_1-P2Y}=0,610$ ($p<0,05$). Наличие взаимосвязи AT_1 -рецептора и α_2 -адренорецептора может свидетельствовать об усилении провоспалительных эффектов при активации РАС и САС, направленных на стимуляцию клеток крови и поддержание воспаления. Взаимосвязь AT_1 -рецептора и $GPVI$ -рецептора является свидетельством функционирования компенсаторного механизма, направленного на ограничение послеоперационной гематурии, поскольку Ан-2 способен потенцировать коллаген-индуцированную АТц. Логично предположить, что следствием активации Тц является секреция ими пуриновых нуклеотидов и селектинов, обеспечивающих стимуляцию $P2$ –рецепторов на лейкоцитах, адгезию клеток крови и формирование ТЛА.

Через 48ч после КЛТ на фоне ингибирования ЦОГ обнаружена корреляционная связь между активностью $P2X_1$ -рецептора, выраженностью лейкоцитурии ($r_{P2X-ЛУ}=0,502$; $p<0,05$) и количеством циркулирующих ТЛА ($r_{P2X-ТЛА}=0,480$; $p<0,05$). Через 72ч после КЛТ данная взаимосвязь сохранялась на прежнем уровне: $r_{P2X-ЛУ}=0,620$ ($p<0,05$) и $r_{P2X-ТЛА}=0,404$ ($p<0,05$). Отличия в индуцирующем влиянии АТФ на развитие воспаления проявлялись через 120ч после прекращения введения НПВП (7 суток после КЛТ), поскольку снижалась сила связи между активностью $P2X_1$ -рецептора и выраженностью лейкоцитурии ($r_{P2X-ЛУ}=0,498$; $p<0,05$) и отсутствовала значимая корреляция между активностью $P2X_1$ -рецептора и количеством ТЛА. Таким образом, повышение внеклеточного содержания АТФ является фактором риска развития острого пиелонефрита после КЛТ независимо от

назначения НПВП. Причем в большей степени провоспалительный эффект АТФ связан с лейкоцитурией [39, 352]. Через 48ч после КЛТ имела место корреляционная связь между активностью P2X₁-рецептора, ФАТ-рецептора ($r_{P2X1-ФАТ} = 0,429$; $p < 0,05$) и α_2 -адренорецептора ($r_{P2X1-\alpha_2AP} = 0,466$; $p < 0,05$). Через 72 ч сила взаимосвязи P2X₁-рецептора и ФАТ-рецептора увеличилась ($r_{P2X1-ФАТ} = 0,753$; $p < 0,05$) и появлялась связь с активностью GPVI-рецептора ($r_{\alpha_2AP-AT1} = 0,490$; $p < 0,05$). Наличие корреляционной связи между активностью P2X-рецептора и GPVI-рецептора подтверждает, что лейкоциты принимают участие в ремоделировании БМ и повышении проницаемости стенки сосудов МЦР и уротелия МВП. При наличии нормореактивности P2X-рецепторов выявленная связь может отражать специфическое влияние АТФ на трафик лейкоцитов в слизистой мочеточника. Подтверждением такой гипотезы могут быть следующие факты: (а) P2X-рецепторы влияют на экспрессию белков и сульфатированных протеогликанов БМ [230]; (б) АТФ индуцирует высвобождение ИЛ-1 β , что усиливает активность матриксной металлопротеиназы-9 (ММР-9), следствием чего может быть деградация белков плотных контактов (ZO-1 и окклюдина) [397, 410]. Вероятно, в процессе воспалительной реакции лейкоциты секретируют АТФ для стимуляции и вовлечения в процесс новых генераций клеток крови; возможность активации эктонуклеотидаз позволяет трансформировать АТФ в аденозин, который стимулирует A2A-рецепторы способные ингибировать функциональную активность лейкоцитов и Тц.

Доказано, что активность A2-рецепторов является чувствительным индикатором гипоксии/ишемии, а также воспаления в тканях вследствие значительного увеличения внеклеточной концентрации аденозина [371]. Поскольку нормореактивность аденозинового A2A-рецептора проявляется только через 7суток после КЛТ, то можно предположить что: (а) при назначении НПВП имеет место снижение активности A2A-рецептора; (б) при отмене НПВП отсутствуют признаки ишемии и альтерации тканей МВП и восстанавливается активность A2A-рецептора.

Наиболее вероятной причиной накопления аденозина может быть ишемическое прекондиционирование в стенке мочеточника, связанное с длительным пребыванием конкрементов в полости МВП и влиянием НПВП на метаболизм арахидоновой кислоты. На такую возможность указывают [366], при этом стимуляция A2-рецептора рассматривается как основной механизм прекондиционирования. Выключение данного адаптационного механизма представляется крайне важным, поскольку возрастает риск ишемического повреждения тканей в процессе КЛТ. В литературе отсутствуют данные касающиеся роли лейкоцитов в повреждении СО мочеточника после ишемии/реперфузии и возможных механизмов ограничения тяжести воспаления. Логично предположить, что сохранение нуклеозидной сигнализации в клетках крови может обеспечить контроль за развитием воспалительной реакции. Проведенный анализ через 7 суток после КЛТ выявил наличие отрицательной корреляционной связи между активностью A2A-рецептора, выраженностью лейкоцитурии ($r_{A2A-ЛУ} = -0,654$; $p < 0,05$) и количеством циркулирующих ТЛА ($r_{A2A-ТЛА} = -0,539$; $p < 0,05$). Следовательно, аденозин действительно принимает участие в ингибировании воспаления, причем в равной степени противовоспалительный эффект проявляется в отношении механизмов формирования ТЛА и трафика лейкоцитов в рыхлой волокнистой соединительной ткани. Наличие отрицательной корреляционной связи между активностью A2A-рецептора и GPVI-рецептора ($r_{A2A-GPVI} = -0,393$; $p < 0,05$), подтверждает ингибирующее влияние аденозина на функциональную активность лейкоцитов, поскольку в этом случае снижается деградация коллагена БМ. Отрицательная корреляция между активностью A2A-рецептора и выраженностью лейкоцитурии, а также положительная корреляция между активностью P2X-рецептора и лейкоцитурией отражает роль пуринергической сигнализации в регуляции острого воспаления после КЛТ. В этом контексте оценка активности эктонуклеотидаз, в частности, CD39 и CD73, которые гидролизуют провоспалительный АТФ с образованием аденозина [105] и чувствительности

A₂-рецептора представляются перспективными индикаторами для прогнозирования риска хронизации воспаления в МВП после КЛТ. Изменение баланса между передачей сигналов пуриnergических P₂-рецепторов и аденозиновых A₂-рецепторов является критичным для функции нейтрофилов, поскольку позволяет лейкоцитам должным образом проявлять свою иммунологическую активность [383]. В настоящее время доказано, что аденозиновый 2A-рецептор может ингибировать ЛПС-индуцированный апоптоз нейтрофилов путем подавления аутофагии [218]. Активация A_{2A}-рецептора подавляла аутофагию путем ингибирования пути ROS-JNK, а также стимулирования передачи сигналов Akt субъединицы GPCR $\beta\gamma$ (anti-inflammatory G protein-coupled receptor). Аутофагия, ингибируемая A_{2A}-рецептором, подавляла апоптоз нейтрофилов за счет блокирования передачи сигналов каспазы 8, каспазы 3 и PAR-рецептора. На фоне ингибирования ЦОГ через 48ч после КЛТ обнаружена корреляционная связь между активностью ФАТ-рецептора, выраженностью лейкоцитурии ($r_{\text{ФАТ-ЛУ}}=0,341$; $p<0,05$) и количеством циркулирующих ТЛА ($r_{\text{ФАТ-ТЛА}}=0,400$; $p<0,05$). Через 24ч после прекращения введения НПВП (72ч после КЛТ) данная взаимосвязь усиливалась: $r_{\text{P2X-ЛУ}}=0,509$ ($p<0,05$) и $r_{\text{P2X-ТЛА}}=0,715$ ($p<0,05$).

Через 7 суток после КЛТ (связь между активностью ФАТ-рецептора и выраженностью лейкоцитурии усиливалась ($r_{\text{P2X-ЛУ}}=0,707$ ($p<0,05$), но снижалась с количеством ТЛAc $r_{\text{P2X-ТЛА}}=0,488$ ($p<0,05$). Выявленная корреляционная связь между активностью ФАТ-рецептора, выраженностью лейкоцитурии и количеством циркулирующих ТЛА свидетельствует, что повышение содержания ФАТ является фактором риска поддержания воспаления в МВП через 72 ч после КЛТ. Причем провоспалительный эффект ФАТ в большей степени проявляется после отмены НПВП и связан с рекрутированием лейкоцитов из сосудистого русла. Данное утверждение подтверждается следующими фактами. Во-первых. ФАТ является одним из самых мощных эндогенных медиаторов воспаления [266]. Связываясь с

рецептором, агонист инициирует множество клеточных провоспалительных эффектов при хронических заболеваниях, к которым относится МКБ.

Так, ФАТ-зависимая передача сигналов в лейкоцитах контролирует высвобождение эластазы, миелопероксидазы, лактоферрина и матриксной металлопротеиназы-9 [319]. Причем гипоксия усиливает дегрануляцию нейтрофилов и увеличивает вероятность альтерации эпителиальных клеток [156]; данный факт применительно к развитию воспаления после КЛТ может трактоваться как возможность потенцирования эффектов гипоксии/ишемии и ФАТ в усилении тяжести воспаления. Негативные последствия повышения уровня ФАТ при обструкции МВП оценили [89], что позволило рекомендовать раннюю блокаду ФАТ-рецептора для защиты почки при обструктивной нефропатии. Одним из адаптационных механизмов, контролирующих тяжесть воспаления, считается циркулирующая форма ацетилгидролазы [315], экспрессия которой регулируется медиаторами воспаления на уровне транскрипции [340]. В последнее время было показано, что ФАТ модулирует продукцию лактатдегидрогеназы нейтрофилами, тем самым запускает механизм разрушения нейтрофилов и ограничения воспаления [170]. Во-вторых. ФАТ: (а) играет важную роль в агрегации Тц и нейтрофилов, проницаемости сосудов, микроваскулярной утечке, формировании тромбов, адгезии лейкоцитов к эндотелиальным клеткам [277]; (б) является триггером острой воспалительной реакции, поскольку стимулирует активность нейтрофилов [348]; считается специфическим регулятором защитного механизма, который обеспечивает защиту от бактериальных инфекций [339]. Ранее было показано [215], что микроорганизмы могут снижать рекрутирование нейтрофилов за счет воздействия на молекулу ФАТ. В-третьих, ФАТ-рецепторы экспрессируются на поверхности активированного эндотелия и обеспечивают трансэндотелиальную миграцию клеток крови [189]; при воспалении эндотелий может секретировать ФАТ и продуцировать цитокины [372, 252].

Установлено, что ФАТ повышает проницаемость сосудов и экстравазацию лейкоцитов действуя на кадгерин межклеточных соединений эндотелия [66].

В-четвертых, ФАТ способствует отложению внеклеточного матрикса за счет активации пути протеинкиназы C в фибробластоподобных клетках [394], а следовательно, может принимать участие в ремоделировании соединительной ткани слизистой мочеочника.

Наличие корреляционной связи между активностью ФАТ-рецептора и P2X-рецептора через 48ч после КЛТ ($r_{\text{ФАТ-P2X}}=0,429$; $p<0,05$), через 72ч ($r_{\text{ФАТ-P2X}}=0,753$; $p<0,05$) и 7 суток ($r_{\text{ФАТ-P2X}}=0,534$; $p<0,05$) может отражать: (а) функционирование межклеточного провоспалительного каскада, в котором активные нейтрофилы секретируют ФАТ и обеспечивают стимуляцию Тц; последние в свою очередь, продуцируют селектины и АТФ, что обеспечивает активацию лейкоцитов, формирование ТЛА и рекрутирование клеток крови из сосудистого русла [383]; (б) зависимость ФАТ-зависимого образования внеклеточной ловушки нейтрофилов (Neutrophil extracellular trap, NET) от митохондриального синтеза АТФ и пуринаргической передачи сигналов [289]. В плане поиска механизмов ограничения воспаления представляет интерес выявленная через 7 суток после КЛТ отрицательная корреляционная связь между активностью ФАТ-рецептора и A2A-рецептора, β_2 -рецептора ($r_{\text{ФАТ-A2AR}}=-0,682$; $p<0,05$). В сущности, данная связь отражает ингибирующее влияние внутриклеточных сигнальных путей на синтез ФАТ в лейкоцитах.

На такую возможность указывают [120, 346], связывая увеличение внутриклеточного уровня цАМФ и ингибирование биосинтеза ФАТ, за счет регуляции активности фосфолипазы A2. Сходной точки зрения придерживаются [119], причем эффект связывают с блокадой цитозольной фосфолипазы A2 α и снижением высвобождения лизо-ФАТ. Таким образом, исследование молекулярных механизмов разных этапов воспалительной реакции в МВП после КЛТ позволит усовершенствовать профилактику и лечение пациентов с острым пиелонефритом.

ГЛАВА 6

ПАТОГЕНЕЗ ГЕМАТУРИИ ПОСЛЕ КЛТ В СРЕДНЕЙ ТРЕТИ МОЧЕТОЧНИКА ПРИ НЕЭФФЕКТИВНОЙ ЛКТ.

До настоящего времени отсутствует концепция формирования и не изучены компенсаторные механизмы гемостаза после малоинвазивных оперативных вмешательств в средней трети мочеточника. Вероятно, реактивность Тц после КЛТ предопределяется формированием компенсаторных механизмов гемостаза в процессе нефролитиаза, наличием воспаления в МВП и воздействием фармакологических препаратов входящих в состав ЛКТ. Назначение НПВП в составе ЛКТ может провоцировать геморрагию вследствие ингибирования ЦОГ и снижения синтеза ТхА2 в тромбоцитах, поскольку нарушается их адгезия и агрегация [261,131]. Нет ясности в вопросе –как влияет длительное введение НПВП в составе ЛКТ на развитие гематурии после малоинвазивного оперативного вмешательства в разных отделах мочеточника. *Гипотеза.* Можно предположить, что при прочих равных условиях (фаза ремиссии ХОПН, продолжительность неэффективной ЛКТ, методика КЛТ) выраженность гематурии после операции не отличается, в силу сходства строения, иннервации и кровоснабжения верхнего и среднего отделов мочеточника [405, 336]. Различия гематурии могут проявляться при наличии особенностей регуляции компенсаторных реакций, обеспечивающих элиминацию конкрементов из разных отделов мочеточника. В этом случае функциональная активность Тц (эффективность гемостаза) будет зависеть от спектра агонистов, участвующих в механизмах локальной (органной) и системной регуляции трафика конкремента в верхней и средней трети мочеточника.

Цель исследования – у пациентов с неэффективной ЛКТ при локализации конкрементов размерами $11,8 \pm 1,3$ мм (min-max 6,0-28,0 мм) в средней трети мочеточника сопоставить активность рецепторов Тц и выраженность гематурии через 24ч, 48ч после КЛТ при сохранении введения НПВП и через 72ч, 7 суток после отмены НПВП.

6.1 Молекулярные механизмы регуляции тромбоцитарного звена гемостаза на этапе госпитализации.

Исследовательские вопросы – сопровождается ли обструкция средней трети мочеточника развитием гематурии; проявляется ли влияние длительной ЛКТ, включающей НПВП, изменением функциональной активности рецепторов тромбоцитов? На этапе госпитализации выявлена средняя степень микрогематурии $-32,7 \pm 1,0$ э/пз (95%ДИ 30,5-38,9 э/пз); лейкоцитурия соответствовала среднему уровню тяжести $-16,1 \pm 0,6$ л/пз (95%ДИ 14,9-17,2 л/пз). Наличие корреляционной связи высокой силы между лейкоцитурией и гематурией ($r_{\text{ЛГ-ГТ}}=0,758$; $p<0,05$) подтверждает взаимную индукцию двух патологических процессов связанных с повышением проницаемости стенки сосудов микроциркуляторного русла, диapedезом и рекрутированием лейкоцитов в рыхлую волокнистую соединительную ткань слизистой мочеточника. При анализе функциональной активности Тц выявлена гиперреактивность АТ₁-рецептора, P2Y-рецепторов, ТхA2-рецептора, α_2 -адренорецептора, GPVI-рецептора, P2X₁-рецептора и ФАТ-рецептора, а также гипореактивность A2A-рецептора (Таблица 6.1). Активность АТ₁-рецептора, P2Y-рецепторов и ТхA2-рецептора была сопоставимой ($p>0,05$) и превышала на 5,0-9,0% ($p<0,05$) активность других исследованных рецепторов. Следовательно, факторами стимуляции клеток крови при длительной ЛКТ у пациентов с наличием конкрементов средних размеров в средней трети мочеточника являются: активация РАС и САС, что проявляется увеличением уровня катехоламинов и Ан-2 в крови; ишемия/гипоксия, связанная с вазоконстрикцией и повышением внеклеточного уровня пуриновых нуклеотидов; микробная инвазия слизистой оболочки МВП. Низкая активность A2A-рецептора по сравнению с такой пуриновых P2-рецепторов (на 35,5%; $P<0,001$), может свидетельствовать об ингибировании 5'-нуклеотидазы и/или активации аденозиндезаминазы. Причины этого феномена при нарушении элиминации конкрементов средних размеров предстоит еще выяснить, однако, низкое содержание аденозина, не обеспечивает достаточную релаксацию мышечной оболочки мочеточника.

Таблица 6.1

**Индукцированная агрегация Тц на этапе госпитализации при
неэффективной ЛКТ у пациентов с локализацией конкрементов в
средней трети мочеточника.**

Агонист ЕС ₅₀	Среднее значение АТц (%), $\bar{X} \pm SD$	Min – Max	Левый (95% ДИ)	Правый (95% ДИ)
Ан-2	65,6±0,9	58,0-71,0	63,7	67,6
АДФ	64,7±1,0	56,0-70,0	62,6	66,7
ТхА2	64,5±0,9	56,0-70,0	62,5	66,5
Адреналин	62,0±0,9 P=0,010	55,0-68,0	60,0	64,0
Коллаген	62,0±1,0 P=0,010	56,0-69,0	59,9	
АТФ	61,3±0,7 P<0,001	56,0-67,0	59,9	62,8
ФАТ	60,0±0,8 P<0,001	55,0-67,0	58,2	61,8
Аденозин	41,7±1,1 P<0,001	36,0-49,0	39,4	44,0

Примечание. P – вероятность различий АТц относительно эффекта Ангиотензина-2 (Ан-2).

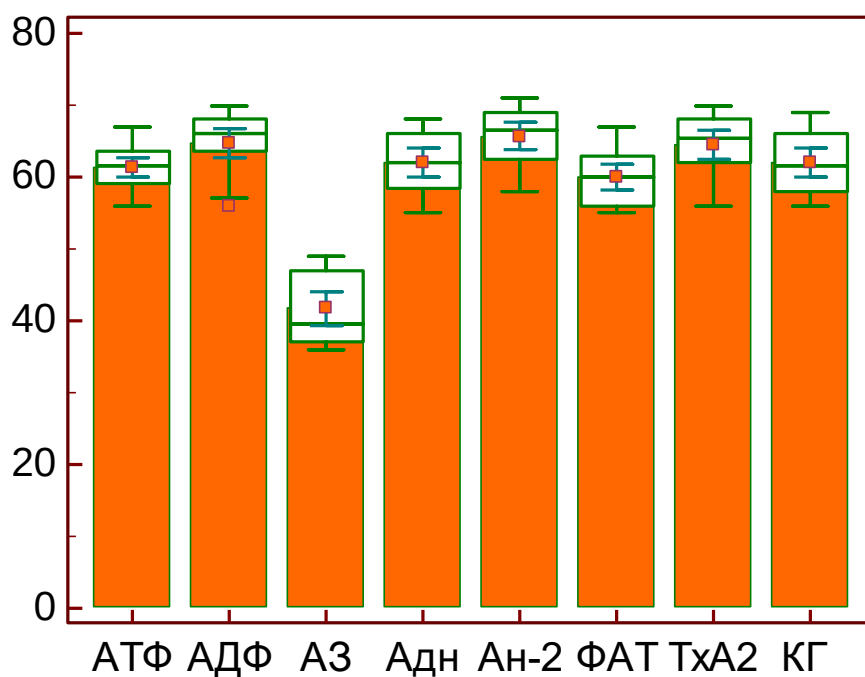
Таким образом, на этапе госпитализации при длительной неэффективной ЛКТ имеет место дисрегуляция моторики мочеточника, связанная с функционированием защитных механизмов, направленных на выведение конкрементов путем повышения активности рецепторов, способных модулировать сокращение ГМК. По сути, механизм оправданный при элиминации мелких конкрементов становится нецелесообразным применительно к выведению конкрементов средних размеров, поскольку поддерживается гипертонус мышечной оболочки. В этих условиях, низкая активность аденозинергической сигнализации, обеспечивающей релаксацию ГМК, является фактором, препятствующим трафику конкрементов, размер которых превышает диаметр просвета мочеточника.

Возникает вопрос – влияют ли компенсаторные механизмы, модулирующие моторику мочеточника на тромбогенез? Анализ множественной корреляции выявил отрицательную связь между выраженностью гематурии и активностью P2Y-рецепторов, GP VI-рецептора, AT₁-рецептора и TxA₂-рецептора (соответственно, $r_{ГТ-АДФ} = -0,520$; $r_{ГТ-GPVI-R} = -0,641$; $r_{ГТ-AT1} = -0,511$; $r_{ГТ-TxA2} = -0,520$; $p < 0,05$), что отражает участие сигнальных путей, связанных с активацией ФИ-3К посредством Gi-, Gq-, G₁₃-белков, в стимуляции тромбогенеза. Наличие высокой активности TxA₂-рецептора на этапе госпитализации отражает сохранение активности ЦОГ в клетках крови и свидетельствует о низкой эффективности НПВП. Таким образом, триггерами компенсаторной реакции гемостаза, ограничивающими гематурию у данного контингента больных, являются как системный регулятор – ангиотензин-2, так и локальные модуляторы функциональной активности клеток крови – TxA₂, АДФ и коллаген IV-типа БМ стенки сосудов. Приведенная динамика гематурии и лейкоцитурии на этапе госпитализации свидетельствует, что при нефролитиазе (а) в слизистой мочеточника одновременно присутствует два процесса: индукция тромбогенеза и модуляция острой воспалительной реакции; (б) повышение активности P2Y-рецепторов, GP VI-рецептора, AT₁-рецептора и TxA₂-рецептора предотвращает макрогематурию и ограничивает микрогематурию до уровня средней степени тяжести.

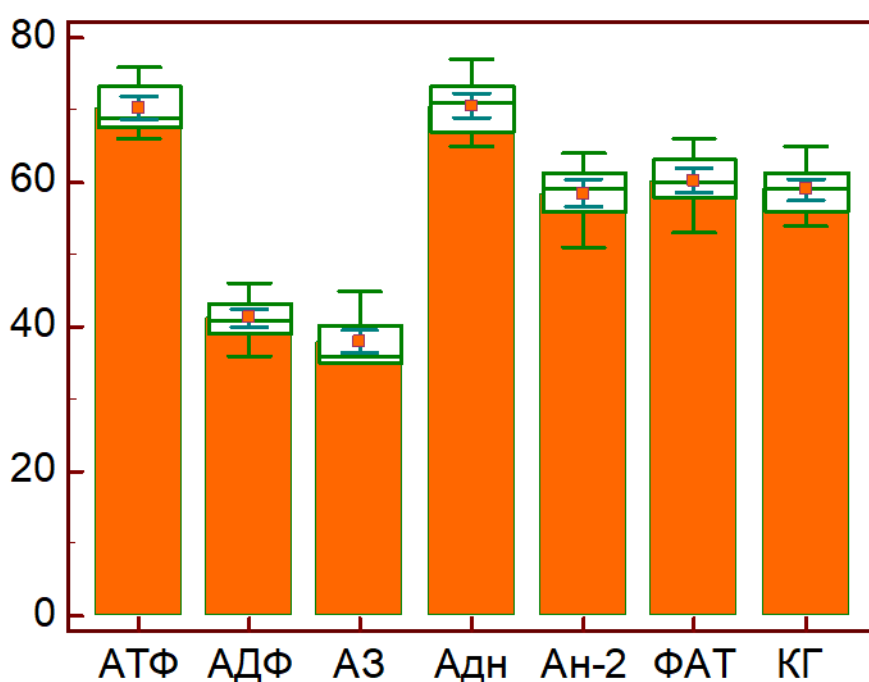
В контексте выяснения причин недостаточной эффективности внутриклеточной сигнализации в Тц, представляет интерес взаимодействие рецепторов. Так, установлена положительная корреляционная связь между активностью GPVI-рецептора, ФАТ-рецептора ($r_{GPVI-ФАТ} = 0,519$; $p < 0,05$) и AT₁-рецепторов ($r_{GPVI-AT1} = 0,490$; $p < 0,05$). Данные причинно-следственные связи свидетельствуют, что ограничение выраженности гематурии связано с провоспалительной деградацией коллагена БМ эндотелия активными лейкоцитами и последующей стимуляцией GPVI-рецептора Тц; эффект может потенцироваться Ан-2. Поскольку у пациентов сохраняется микрогематурия средней степени тяжести, то можно прийти к заключению, что компенсаторный механизм гемостаза с участием GPVI-рецептора не

является наиболее эффективным. Одной из причин этого явления может быть наличие гиперреактивности нескольких рецепторов, конкурирующих за активацию ФИЗК. В этой связи, обращает на себя внимание, более высокая сила связи между активностью α_2 -адренорецептора и P2Y-рецептора ($r_{\alpha_2AP-P2Y}=0,650$; $p<0,05$), которые ассоциированы с тем же сигнальным участком SFK-ФИЗК, что и GPVI-рецептор. Такое взаимодействие α_2 -адренорецептора и P2Y-рецептора, вероятно, ограничивает возможности усиления внутриклеточной сигнализации через GPVI-рецептор.

В литературе отсутствует информация, касающаяся компенсаторных механизмов регуляции моторики мочеточника при локализации конкрементов в разных отделах МВП. В этой связи представляет интерес анализ кластера активности рецепторов Тц на этапе госпитализации у пациентов с наличием конкрементов сходных размеров в верхней (группа сравнения, ГС) и средней трети мочеточника (основная группа, ОГ). Установлено, что в обеих группах пациентов имела место гиперреактивность P2X₁-рецептора, α_2 -адренорецептора, AT₁-рецептора, TxA₂-рецептора, GPVI-рецептора и ФАТ-рецептора, а также гипореактивность A_{2A}-рецептора (Рисунок 6.1). Основное отличие касалось пуриновых P2Y-рецепторов, активность которых в ОГ была на 56,6% ($P<0,001$) выше, чем в ГС; при расположении конкремента в ГС выявлена гипореактивность P2Y-рецепторов (Рисунок 6.2). С точки зрения влияния АДФ на сократительную активность ГМК можно констатировать, что гипореактивность P2Y-рецепторов при локализации средних конкрементов в верхней трети является более оправданной, чем гиперреактивность данных рецепторов при расположении таких же по размерам конкрементов в средней трети мочеточника. Базис этой гипотезы основывается на утверждении, что чрезмерная стимуляция пуриновых P2Y-рецепторов связана с развитием гипертонуса гладкой мышечной ткани мочеточника [4, 284, 374]. Можно предположить, что компенсаторный механизм, сформировавшийся в процессе нефролитиаза и направленный на снижение тонуса ГМК, является рациональным, если размер конкремента превышает диаметр мочеточника (т.е. в случае средних конкрементов).



а



б

Рис. 6.1. Индуцированная агрегация Тц у пациентов на этапе госпитализации при локализации конкремента в средней (а) и верхней (б) трети мочеточника.

По оси ординат – значения индуцированной АТц (%); по оси абсцисс – название агониста.

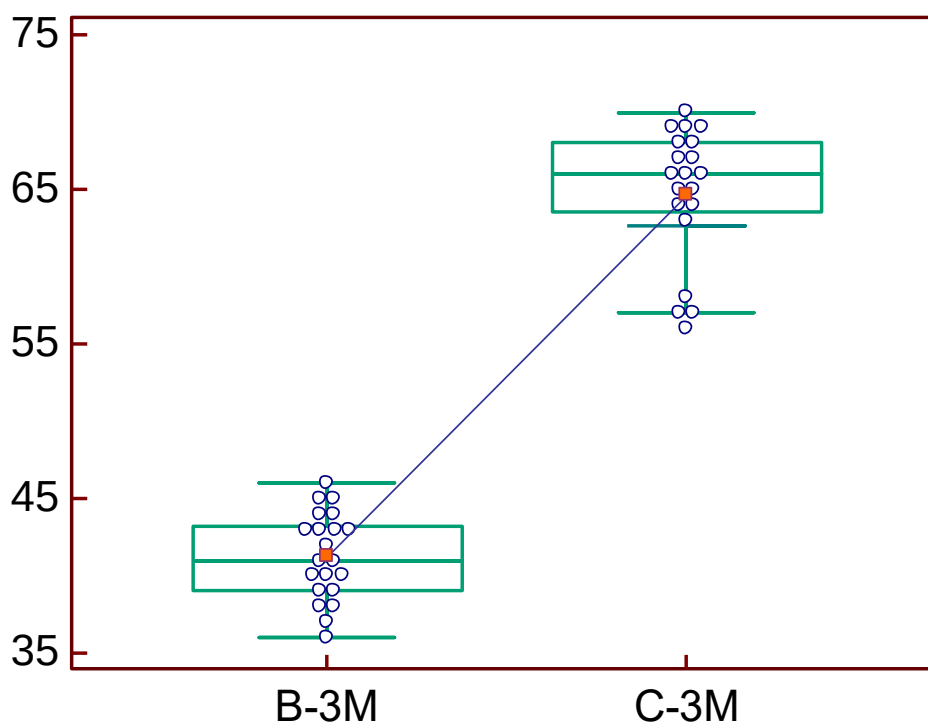


Рис. 6.2. Реактивность пуриновых P2Y-рецепторов тромбоцитов при локализации конкрементов в верхней и средней трети мочеточника.

По оси ординат – значения индуцированной АТц (%); по оси абсцисс – локализация конкремента в верхней (В-3М) и средней (С-3М) трети мочеточника.

В этом контексте, нарушение трафика средних конкрементов в верхней трети мочеточника может быть связано с дискоординацией перистальтики, поскольку (а) не воспроизводится максимальная релаксация ГМК при гипореактивности аденозинового A2A-рецептора; более эффективным было бы усиление аденозинергической сигнализации; (б) поддерживается чрезмерная стимуляция сокращения ГМК, направленная на изгнание конкремента. При наличии сходных по размерам конкрементов в средней трети мочеточника нарушение их трафика также связано с (а) наличием неэффективного механизма релаксации ГМК (десенситизация A2A-рецептора);

(б) чрезмерной стимуляцией рецепторов, способных усиливать сокращение ГМК (AT_1 -рецептор, TxA_2 -рецептор, α_2 -адренорецептор, P_2X_1 -рецептор и $ФАТ$ -рецептор) и поддерживать гипертонус мышечной оболочки (P_2Y -рецепторы). Следовательно, при наличии в разных отделах МВП конкрементов средних размеров выявлены стереотипные молекулярные механизмы нарушения перистальтики мочеточника; таковыми являются гиперреактивность P_2X_1 -рецептора, α_2 -адренорецептора, AT_1 -рецептора, TxA_2 -рецептора, $GPVI$ -рецептора и $ФАТ$ -рецептора, а также гипореактивность A_2A -рецептора.

Остается вопрос – отличается ли микрогематурия при локализации средних конкрементов в верхнем и среднем отделе мочеточника? В обеих ситуациях обнаружена средняя степень тяжести микрогематурии, хотя у пациентов с локализацией конкрементов в среднем отделе мочеточника микрогематурия была на 46,6% ($P < 0,001$) больше, чем в верхней трети мочеточника (Рисунок 6.3). Причинами этого явления могут быть различия активности рецепторов, принимающих участие в адгезии и агрегации Тц. Установлено, что при локализации конкрементов в среднем отделе мочеточника имеет место более низкая активность α_2 -адренорецептора (на 12,3%; $p < 0,05$), P_2X_1 -рецептора (на 12,8% $p < 0,05$) и TxA_2 -рецептора (на 6,8%; $p < 0,05$) по сравнению с таковыми при локализации конкрементов в верхней трети мочеточника) и/или более высокая активность аденозинового A_2A -рецептора (на 10,0% $p < 0,01$) (Рисунок 6.4). Поскольку активность A_2A -рецептора при разной локализации конкрементов соответствует уровню гипореактивности, то можно предположить, что в случае расположения конкрементов в среднем отделе мочеточника сохраняется *пороговый* уровень активности рецептора, обеспечивающий дезагрегацию Тц. Подтверждением этой гипотезы может быть наличие отрицательной корреляционной связи между выраженностью гематурии и активностью A_2A -рецептора ($r_{ГТ-A_2A} = -0,438$; $p < 0,05$) у данного контингента больных и отсутствие таковой при расположении конкрементов в верхнем отделе мочеточника.

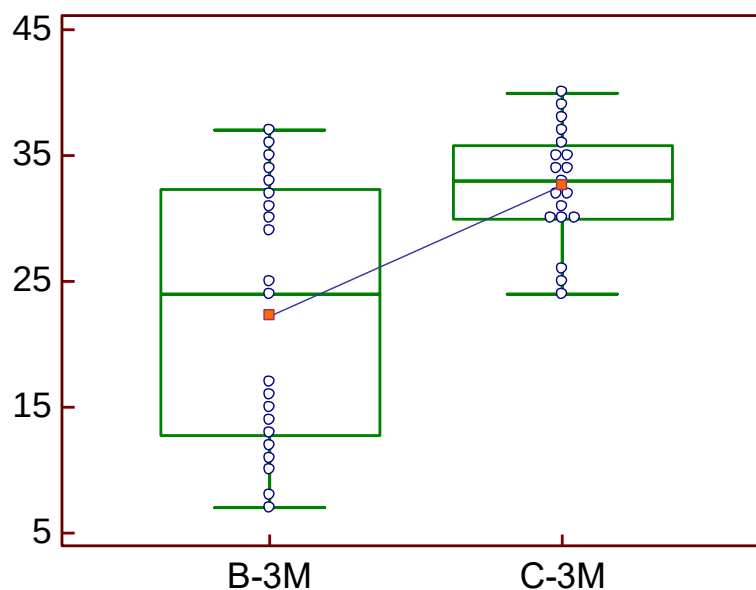


Рис.6.3. Выраженность микрогематурии при локализации конкрементов в верхней и средней трети мочеточника.

По оси ординат – количество эритроцитов в поле зрения (э/пз); по оси абсцисс – локализация конкремента: В-3М и С-3М, соответственно, верхняя и средняя треть мочеточника.

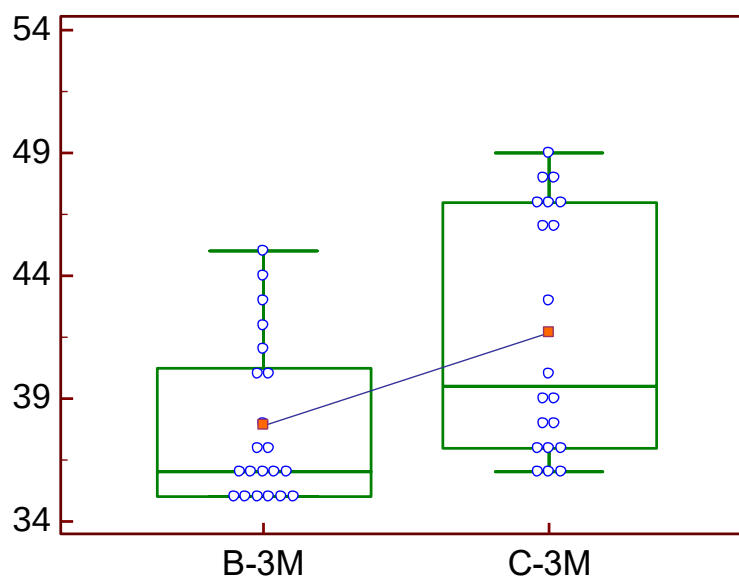


Рис.6.4. Реактивность аденозинового A2A-рецептора Тц при локализации конкрементов в верхней и средней трети мочеточника.

По оси ординат – значения индуцированной АТц (%); по оси абсцисс – локализация конкремента: В-3М и С-3М, соответственно, верхняя и средняя треть мочеточника.

Таким образом, при локализации в средней трети мочеточника конкремента, обтурирующего его просвет, включаются как системные, так и локальные механизмы регуляции функции ГМК, направленные на устранение пассажа мочи. При этом внутриклеточная сигнализация, обусловленная гиперреактивностью пуриновых P2X₁- и P2Y рецепторов, α_2 -адренорецептора, AT₁-рецептора, TxA₂-рецептора, GPVI-рецептора и ФАТ-рецептора, а –гипореактивностью A_{2A}-рецептора не обеспечивает элиминацию конкремента средних размеров из мочеточника, однако модулирует проагрегантную активность Тц, следствием чего является ограничение выраженности гематурии.

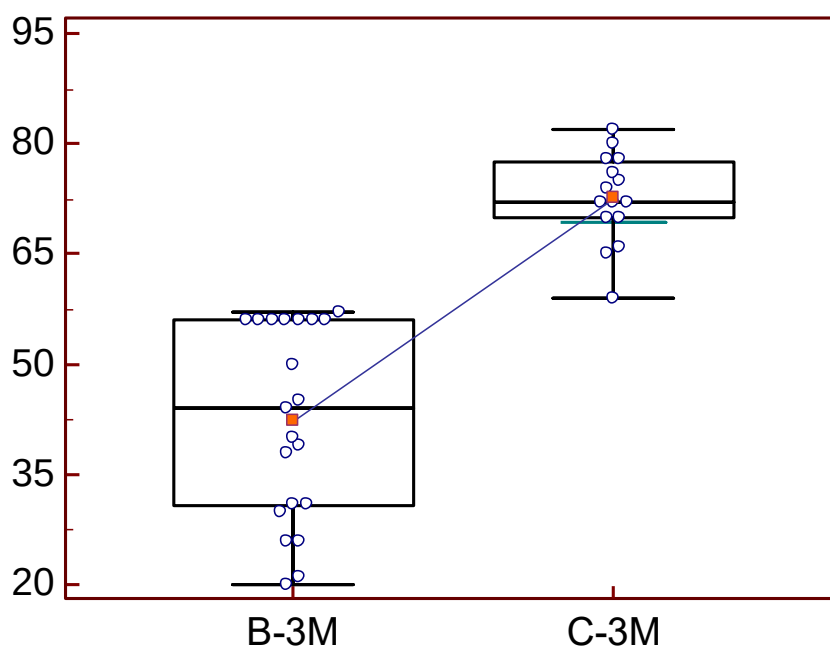
6.2. Механизмы нарушения тромбогенеза в течение первых суток после КЛТ в средней трети мочеточника при сохранении введения НПВП.

Гипотеза—длительное назначение ЛКТ (9 суток), которое не завершилось элиминацией конкремента средних размеров из мочеточника, может повлиять на компенсаторные механизмы тромбоцитарного звена гемостаза, что создает риски геморрагии и макрогематурии после КЛТ. Особого внимания заслуживают первые сутки после оперативного вмешательства, поскольку ингибирование ЦОГ в Тц при сохранении введения НПВП может привести к значительной кровопотере, а возможности фармакологической коррекции функциональной активности Тц являются весьма ограниченными. Введение НПВП после оперативного вмешательства продиктовано необходимостью анальгезии.

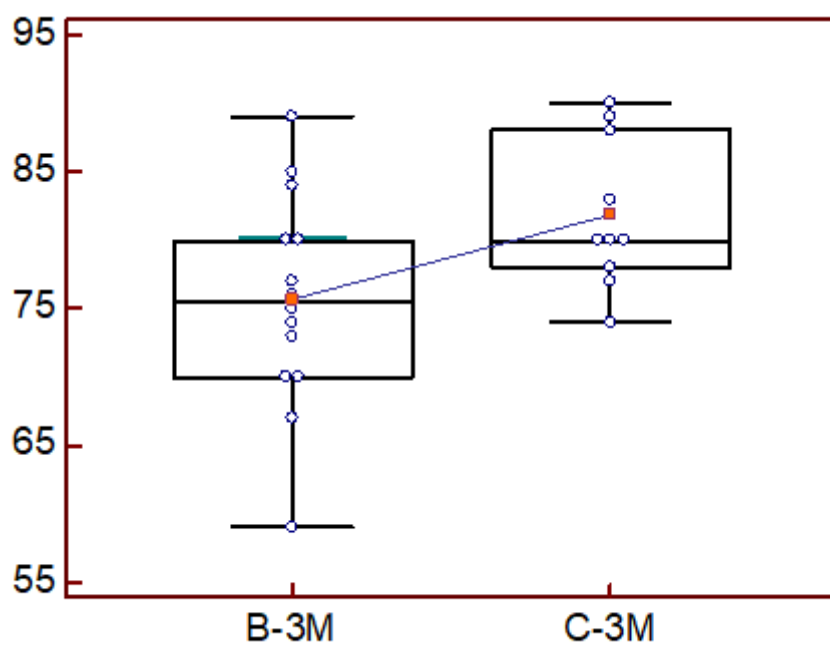
Цель исследования —оценить выраженность гематурии после КЛТ в средней трети мочеточника при неэффективной ЛКТ и установить молекулярные механизмы, модулирующие гемостаз в течение первых суток после малоинвазивного оперативного вмешательства, при сохранении введения НПВП.

Исследовательский вопрос – изменяется ли выраженность гематурии в ранние сроки после КЛТ на фоне предшествующего длительного назначения ЛКТ? В течение первых суток после КЛТ в средней трети мочеточника выявлено увеличение выраженности микрогематурии от средней до тяжелой степени тяжести. Так, через 1-3 ч после оперативного вмешательства у 4 (20%) пациентов имела место макрогематурия; микрогематурия возросла в 2,2 раза – до $72,6 \pm 1,6$ э/пз ($P < 0,001$; 95% ДИ 69,2-76,0 э/пз) по сравнению с таковой до начала ЛКТ. Через 24ч макрогематурия обнаружена у 10 (50%) больных; выраженность микрогематурии увеличилась в 2,5 раза – до $81,9 \pm 1,7$ э/пз ($P < 0,001$; 95% ДИ 78,0-85,8 э/пз) по сравнению со значениями до начала ЛКТ и на 12,8% ($P < 0,001$) по сравнению со сроком наблюдения 1-3ч после КЛТ. Для сравнения, микрогематурия через 1-3ч и 24ч после КЛТ в верхней трети мочеточника была меньше, соответственно, на 41,6% ($P < 0,001$) и 7,6% ($P < 0,05$) по сравнению с таковой после КЛТ в средней трети мочеточника (Рисунок 6.5). Таким образом, компенсаторные механизмы гемостаза после КЛТ в средней трети мочеточника менее эффективны, чем после аналогичного вмешательства в верхней трети мочеточника. Связан ли данный факт с дисрегуляцией Тц и какие сигнальные пути участвуют в тромбогенезе?

Исследовательский вопрос – изменяется ли функциональная активность рецепторов Тц в ранние сроки после КЛТ в среднем отделе мочеточника на фоне длительного назначения ЛКТ? Через 1-3ч после КЛТ выявлена сопоставимая гиперреактивность двух рецепторов – α_2 -адренорецептора и GPVI-рецептора (Таблица 6.2). Два рецептора (AT_1 -рецептор, $P2X_1$ -рецептор) характеризовались нормореактивностью и оставшиеся четыре рецептора имели низкую активность ($P2Y$ -рецепторы, $A2A$ -рецептор, $ThA2$ -рецептор и ФАТ-рецептор). Следовательно, потенциальными индукторами активации клеток крови были адреналин и коллаген IV типа БМ. Причины более высокой микрогематурии после оперативного вмешательства в среднем отделе мочеточника следует искать в кластере активности рецепторов.



а



б

Рис. 6.5. Динамика микрогематурии через 1-3ч (а) и 24ч (б) после КЛТ в верхней и средней трети мочеточника.

По оси ординат – количество эритроцитов в поле зрения (э/пз); по оси абсцисс – локализация конкремента: В-3М и С-3М, соответственно, верхняя и средняя треть мочеточника.

Таблица 6.2

**Индукцированная агрегация Тц у пациентов через 1-3ч после КЛТ при
неэффективной ЛКТ у пациентов с локализацией конкрементов в
средней трети мочеточника**

Агонист EC ₅₀	Среднее значение АТц (%), $\bar{X} \pm SD$	Min – Max	Левый (95% ДИ)	Правый (95% ДИ)
Адреналин	57,8±0,7	52,0-62,0	56,4	59,2
Коллаген	57,5±1,1	51,0-65,0	55,2	59,7
Ан-2	54,4±0,7* P < 0,05	50,0-62,0	52,8	56,0
АТФ	45,6±0,8*** P < 0,001	39,0-53,0	44,0	47,3
АДФ	40,6±0,5*** P < 0,001	37,0-45,0	39,5	41,6
ТхА2	30,4±0,6*** P < 0,001	24,0-35,0	29,1	31,8
ФАТ	24,7±0,6 *** P < 0,001	30,0-41,0	33,3	36,0
Аденозин	39,3±0,6 P < 0,001	35,0-43,0	38,1	40,4

Примечание. Р – достоверность различий индуцированной агрегации тромбоцитов (АТц) относительно эффекта адреналина. *– достоверность различий показателей на уровне $p < 0,05$ и *** – $p < 0,001$, по сравнению со значениями предыдущего агониста.

Если сопоставить активность рецепторов с таковой через 1-3ч после КЛТ в верхнем отделе мочеточника, то следует отметить гиперреактивность шести рецепторов (ФАТ-рецептора, ТхА2-рецептора, АТ₁-рецептора, GPVI-рецептора, пуриновых P2X₁- и P2Y-рецепторов), каждый из которых мог самостоятельно или в результате синергизма индуцировать АТц и, тем самым, ограничивать степень гематурии. При этом активность GPVI-рецептора была на 8,0% больше ($p < 0,01$), α₂-адренорецептора на 32,4% ($p < 0,001$) меньше по сравнению с их активностью после КЛТ в средней трети

мочеточника. Логично предположить, что протромбогенная активность этих двух рецепторов обладала меньшими потенциальными возможностями, чем шесть рецепторов, находящихся в состоянии гиперреактивности после КЛТ в верхней трети мочеточника.

Как уже отмечалось через 24ч после КЛТ в средней трети мочеточника микрогематурия усиливалась, что связано с реанжировкой кластера рецепторов Тц (Таблица 6.3). Если сопоставить активность рецепторов между двумя точками исследования (через 1-3ч и 24 ч после КЛТ), то следует отметить нормореактивность четырех рецепторов (пуриновых P2X₁- и P2Y-рецепторов, α_2 -адренорецептора и A2A-рецептора). При этом активность P2X₁-рецептора не изменилась; P2Y-рецепторов, A2A-рецептора возросла, соответственно, на 21,4% и 15,0% ($p<0,001$) и активность α_2 -адренорецептора снизилась на 20,9% ($p<0,001$) по сравнению со сроком наблюдения 1-3ч после КЛТ. Функциональная активность GPVI-рецептора и АТ₁-рецептора уменьшилась до уровня гипореактивности, соответственно, на 46,6% и 27,0% ($p<0,001$), тогда как – провоспалительных индукторов ФАТ-рецептора и ТхА2-рецептора не изменилась ($p>0,05$) по сравнению с предыдущим сроком наблюдения. Таким образом, через 24ч после КЛТ в средней трети мочеточника *усиление* микрогематурии связано с (а) ингибированием ЦОГ и снижением паракринной стимуляции ФАТ-рецепторов Тц, вследствие сохранения выраженного противовоспалительного воздействия НПВП на клетки крови; (б) десенситизацией α_2 -адренорецептора, GPVI-рецептора и АТ₁-рецептора; (в) восстановлением до физиологических значений активности А2А-рецептора, модулирующего антиагрегантный эффект. На этом фоне повышение активности пуриновых P2Y-рецепторов не обеспечивало эффективное ограничение гематурии.

Таблица 6.3

**Индукцированная агрегация Тц через 24ч после КЛТ при неэффективной
ЛКТ у пациентов с локализацией конкрементов
в средней трети мочеточника**

Агонист ЕС ₅₀	Среднее значение АТц (%), $\bar{X} \pm SD$	Min – Max	Левый (95% ДИ)	Правый (95% ДИ)
АДФ (5 мкМ)	49,3±0,5***	47,0-54,0	48,3	50,2
АТФ (100мкМ)	47,2±0,8* P<0,05	41,0-52,0	45,5	48,9
Адреналин (5,0 мкМ)	45,7±0,9 P<0,001	40,0-52,0	43,8	47,5
Ан-2 (1,0 мкМ)	39,7±0,7*** P<0,001	33,0-46,0	38,3	41,2
Коллаген (1,0 мг/мл)	30,7±0,9*** P<0,001	26,0-40,0	28,8	32,5
ФАТ (150,0 мкМ)	29,4±0,8 P<0,001	26,0-40,0	27,6	31,1
ТхА2	29,1±0,6 P<0,001	25,0-35,0	27,8	30,4
Аденозин (1мкМ)	45,2±0,4	42,0-49,0	44,3	46,1

Примечание. P – вероятность различий индуцированной АТц относительно эффекта АДФ. *– достоверность различий показателей на уровне p<0,05 и *** – p<0,001 по сравнению со значениями предыдущего агониста.

Для проверки гипотезы патогенеза послеоперационной гематурии целесообразно было использовать метод моделирования взаимодействия рецепторов Тц *in vitro* с использованием субпороговой дозы агонистов. При сравнении параметров агрегации установлено, что стимуляция пуриновых P2X₁-, P2Y-рецепторов и α₂-адренорецептора воспроизводили сходные (p>0,05) значения амплитуды агрегации и наклона (*Slope*); площадь под кривой (AUC) была выше при АДФ-индуцированной АТц (Таблица 6.4).

Таблица 6.4.

**Характеристика показателей функциональной активности Тц через 24ч
после КЛТ при неэффективной ЛКТ у пациентов с локализацией
конкрементов в средней трети мочеточника**

Агонисты ЕС ₁₀	Показатели агрегатограммы		
	Амплитуда агрегации (%)	Slope (% мин)	AUC (U)
АДФ	11,4±0,5 (95% ДИ 10,2-12,6)	15,8±0,8 (95% ДИ 13,9-17,7)	20,9±0,6 (95% ДИ 18,9-22,9)
АТФ	11,0±0,5 (95% ДИ 9,9-12,1)	15,4±0,6 (95% ДИ 13,9-16,9)	17,7±0,8# (95% ДИ 15,9-19,5)
Адреналин	10,8±0,3 (95% ДИ 10,1-11,5)	13,4±0,5 (95% ДИ 12,2-14,6)	16,6±0,7 (95% ДИ 15,0-18,25)
АДФ + АТФ	12,7±0,4 (95% ДИ 12,0-113,5)	17,2±0,6 (95% ДИ 15,9-18,5)	23,9±1,0 (95% ДИ 21,7-26,1)
АДФ + Адреналин	10,9±0,6* (95% ДИ 9,8-12,1)	13,3±1,0** (95% ДИ 11,3-15,4)	18,7±1,2** (95% ДИ 16,1-21,2)
АТФ + Адреналин	10,0±0,3 (95% ДИ 9,3-10,8)	12,2±0,5 (95% ДИ 11,0-13,3)	14,2±0,8** (95% ДИ 12,4-15,9)

Примечание: # – статистически значимое различие значений показателя агрегатограммы при изолированном воздействии агониста на уровне $p < 0,05$ по сравнению со значениями предыдущего агониста. * – различие значений показателя агрегатограммы при комбинации воздействия агонистов на уровне $p < 0,05$ по сравнению со значениями предыдущей комбинации агонистов; ** – на уровне $p < 0,01$.

При сравнении значений параметров агрегации, индуцированной субпороговой дозой агонистов у пациентов и здоровых лиц, можно прийти к заключению, что через 24ч после КЛТ агонисты АТФ, АДФ и адреналин вызывали менее выраженную АТц. Так, после КЛТ амплитуда АДФ-индуцированной агрегации была на 30,0% ($p < 0,001$), Slope на 27,9% (

$p < 0,001$) и AUC на 21,4% ($p < 0,001$) меньше таковых у здоровых лиц. Амплитуда АТФ-индуцированной агрегации была на 18,5% ($p < 0,05$), Slope на 14,4% ($p < 0,05$) и AUC на 26,3% ($p < 0,01$) меньше таковых у здоровых лиц. Амплитуда Адреналин-индуцированной агрегации была на 12,9% ($p < 0,05$), Slope на 13,0% ($p < 0,05$) и AUC на 15,7% ($p < 0,01$) меньше таковых у здоровых лиц. Таким образом, при длительном назначении НПВП реактивность рецепторов экспрессированных на Тц не различается, однако была ниже, чем у здоровых лиц. В большей степени это проявляется на сигнализации пуриновых P2Y-рецепторов, которые в физиологических условиях играют ведущую роль в агрегации Тц. Демонстративным показателем является величина AUC, отражающая снижение количества тромбоцитов, участвующих в агрегации. Данный факт объясняет почему стимуляция пуриновых P2Y-рецепторов не обеспечивала эффективное ограничение гематурии через 24ч после КЛТ в средней трети мочеточника.

Исследовательский вопрос – может ли сохранение нормореактивности рецепторов на фоне ЛКТ быть основой для становления компенсаторных механизмов гемостаза? Установлено, что максимальный эффект агрегации Тц воспроизводился при взаимодействии пуриновых P2X₁- и P2Y-рецепторов, связывающих субпороговую дозу агонистов (см. табл. 6.4). В основе данного эффекта может лежать ко-активации внутриклеточных сигнальных систем, связанных с повышением уровня Ca^{2+} и функционированием трансдукторов расположенных ниже Gq -белка. Амплитуда и скорость агрегации (Slope) при одновременной стимуляции двух рецепторов не отличались ($p > 0,05$) от таковых при изолированной стимуляции P2Y-рецепторов, тогда как значения AUC превышали– на 14,3% ($P < 0,05$). Таким образом, стимуляция двух пуриновых рецепторов (активность которых соответствует нормореактивности) может обеспечить увеличение количества Тц участвующих в агрегации посредством аутокринной стимуляции при длительной ЛКТ.

Амплитуда, скорость агрегации (*Slope*) и AUC при одновременной стимуляции P2Y-рецепторов и α_2 -адренорецептора были ниже, соответственно, на 14,2%, 22,7% и 21,8% ($P<0,05$) таковых при взаимодействии P2Y-рецепторов и P2X₁-рецептора. Основные параметры агрегатограмм при одновременной стимуляции P2Y-рецепторов и α_2 -адренорецептора ($p>0,05$) не отличались от таковых при изолированной стимуляции этих рецепторов. Поскольку оба рецептора связаны с Gi- белком, то, потенцирование эффектов не воспроизводилось, вероятно, вследствие нарушения данного пути сигнализации при блокаде ЦОГ. Минимальный эффект агрегации Тц воспроизводился при взаимодействии P2X₁-рецептора и α_2 -адренорецептора. Показатели агрегации Тц при одновременной стимуляции этих рецепторов были сопоставимы с эффектом изолированной стимуляции α_2 -адренорецептора ($p>0,05$), но были ниже значений при изолированной стимуляции P2X₁-рецептора, в частности, значения AUC были на 18,7% ($P<0,05$) меньше. Следовательно, нормореактивность α_2 -адренорецептора не позволяет усилить гемостаз. Вероятно, потенцирующий эффект при одновременной стимуляции P2X₁-рецептора и α_2 -адренорецептора не воспроизводится, поскольку в обоих случаях поддерживается базальный уровень Ca^{2+} в Тц. Скорость агрегации (*Slope*) и AUC при одновременной стимуляции P2X₁-рецептора и α_2 -адренорецептора были ниже, соответственно, на 20,1% ($P<0,01$) и 40,6% ($P<0,001$) по сравнению с эффектом взаимодействия пуриновых P2X₁- и P2Y-рецепторов, и оказались сопоставимы с эффектом одновременной стимуляции P2Y-рецепторов и α_2 -адренорецептора. Можно констатировать, что взаимодействие пуриновых P2Y-рецепторов и P2X₁-рецептора оказывает более выраженный потенцирующий эффект, чем одновременная стимуляция P2Y-рецепторов и α_2 -адренорецептора или P2X₁-рецептора и α_2 -адренорецептора. Моделирование взаимодействия других рецепторов не сопровождалось значимой стимуляцией клеток крови, позволяющей

запускать компенсаторные механизмы гемостаза, по сравнению с изолированным эффектом агонистов.

Таким образом, при неэффективной ЛКТ через 24ч после КЛТ сохранение введения НПВП проявлялось: снижением активности α_2 -адренорецептора, GPVI-рецептора и AT_1 -рецептора; сохранением активности $P2X_1$ -рецептора, ФАТ-рецептора и TxA_2 -рецептора и повышением активности $P2Y$ -рецепторов. При этом установившаяся нормореактивность пуриновых $P2X_1$ - $P2Y$ -рецепторов и α_2 -адренорецептора обеспечивала повышение агрегации Тц, однако, данный уровень компенсаторных механизмов гемостаза не обеспечивал эффективное ограничение гематурии.

6.3 Механизмы нарушения тромбогенеза через 48ч после КЛТ в средней трети мочеточника при сохранении введения НПВП.

Интерес к указанному периоду наблюдения за пациентами после малоинвазивного оперативного вмешательства связан с двумя критическими моментами, определяющими тяжесть гематурии. В течение 2-х суток после КЛТ продолжалось введение НПВП, а, следовательно, сохранялся риск усиления тяжести геморрагии, связанной с ингибированием синтеза TxA_2 в Тц. Поддержание гемостаза в этот срок наблюдения обеспечивается *компенсаторными* реакциями клеток крови, которые формируются при ингибировании ЦОГ. Значение третьих суток наблюдения определяется прекращением ЛКТ (первые 24ч после завершения введения НПВП); при этом выраженность послеоперационной гематурии будет зависеть от адаптационных механизмов тромбогенеза после восстановления активности ЦОГ тромбоцитов.

Цель исследования –оценить выраженность гематурии и выяснить молекулярные механизмы, модулирующие гемостаз через 48ч после КЛТ в средней трети мочеточника, при сохранении введения НПВП пациентам.

Учитывая возможность негативного влияния НПВП на тромбоцитарное звено гемостаза имело смысл сопоставить выраженность гематурии после КЛТ в верхней и средней трети мочеточника. Установлено, что выраженность микрогематурия через 48ч после КЛТ в разных отделах МВП является сопоставимой (Рисунок 6.6); после оперативного вмешательства в верхней трети мочеточника более часто выявлялась макрогематурия – 8 (38,1%) пациентов. Следовательно, назначение НПВП после оперативного вмешательства с целью анальгезии и профилактики воспаления содержит в себе риски геморагии, независимо от уровня оперативного вмешательства на мочеточнике.

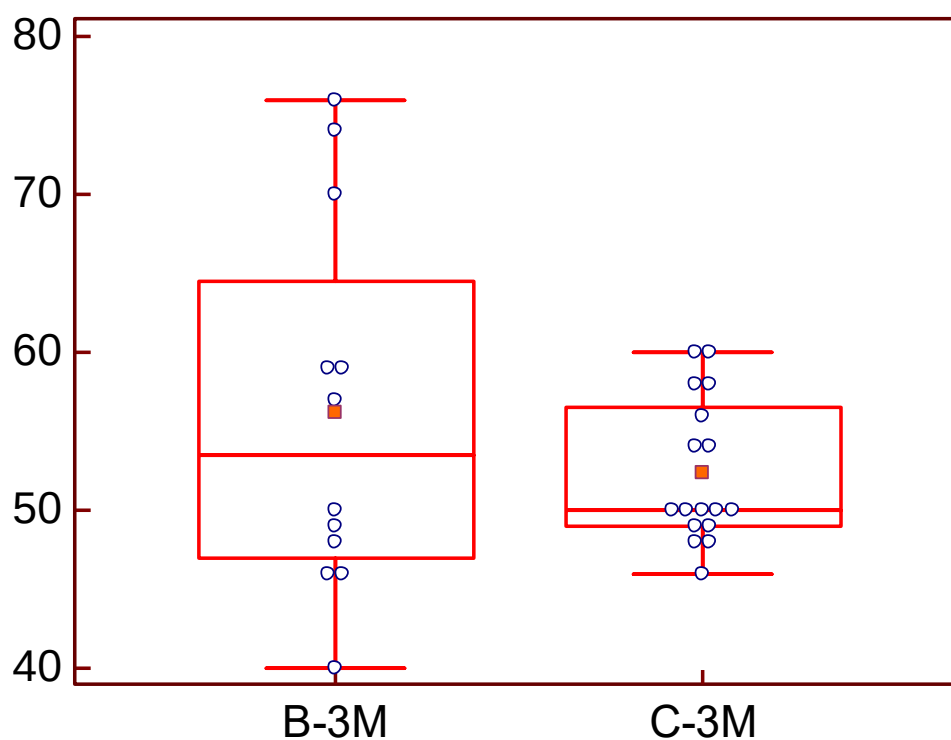


Рис. 6.6. Динамика микрогематурии через 48ч после КЛТ в верхней и средней трети мочеточника при введении пациентам НПВП.

По оси ординат – количество эритроцитов в поле зрения (э/пз); по оси абсцисс – локализация конкремента: В-3М и С-3М, соответственно, верхняя и средняя треть мочеточника.

Через 48ч после КЛТ в средней трети мочеточника выявлено снижение выраженности микрогематурии на 36,1% – до $52,3 \pm 1,1$ п/з ($P < 0,001$; 95% ДИ 50,0-54,7 э/пз) по сравнению с таковой через 24ч после оперативного вмешательства; у 3 (15%) пациентов сохранялась макрогематурия. Таким образом, на фоне введения НПВП эффективность компенсаторных механизмов гемостаза не претерпевала существенных изменений. В этой связи возникает вопрос – изменяется ли спектр рецепторов Тц способных усилить тромбогенез? Ответ на данный вопрос позволит приблизиться к пониманию направления разработки возможной фармакологической коррекции функции Тц для профилактики послеоперационной геморрагии. Через 48ч после КЛТ обнаружена гиперреактивность $P2X_1$ -рецептора и AT_1 -рецептора, нормореактивность α_2 -адренорецептора, пуриновых $P2Y$ -рецепторов и аденозинового $A2A$ -рецептора, активность $GPVI$ -рецептора, ФАТ-рецептора и TxA_2 -рецептора соответствовала диапазону гипореактивности (Таблица 6.5). По сравнению с предыдущим сроком наблюдения, не выявлено статистически значимых изменений активности $P2Y$ -рецепторов, ФАТ-рецептора, TxA_2 -рецептора и $GPVI$ -рецептора. Активность α_2 -адренорецептора, AT_1 -рецептора и $P2X_1$ -рецептора возросла, соответственно, на 16,1%, 41,3% и 25,8% ($p < 0,05$) по сравнению со сроком наблюдения 24ч после КЛТ. Также повысилась на 14,1% ($p < 0,05$) активность $A2A$ -рецептора, при этом достигался уровень нормореактивности. Повышение активности ряда рецепторов Тц при ингибировании ЦОГ укладывается в картину индуцированной вазоконстрикции, сопровождающейся гипоксией/ишемией тканей МВП. Как следствие, усиливается продукция аденозина, направленная на ограничение дефицита кислорода в тканях мочеточнике. Таким образом, через 48ч после КЛТ в средней трети мочеточника снижение выраженности микрогематурии может быть связано с гиперреактивностью АТФ и AT_1 -рецептора.

Таблица 6.5.

**Индукцированная агрегация тромбоцитов у пациентов при
неэффективной ЛКТ через 48ч после КЛТ у пациентов с локализацией
конкрементов в средней трети мочеточника**

Агонист EC ₅₀	Среднее значение АТц (%), $\bar{X} \pm SD$	Min –Max	Левый (95% ДИ)	Правый (95% ДИ)
АТФ	59,4±0,7	54,0-65,0	58,0	60,9
Ан-2	56,1±0,6*** P<0,001	51,0-62,0	55,0	57,3
Адреналин	51,0±0,7*** P<0,001	45,0-55,0	48,7	51,4
АДФ	50,3±0,6 P<0,001	47,0-57,0	49,0	51,6
Коллаген IV типа	33,9±1,2*** P<0,001	25,0-41,0	31,4	36,4
ФАТ	30,2±0,9* P<0,001	24,0-37,0	28,3	32,1
ТхА2	30,0±0,7 P<0,001	25,0-37,0	28,5	31,5
Аденозин	51,6±0,7*** P<0,001	48,0-58,0	50,1	53,1

Примечание. Р – вероятность различий индуцированной АТц относительно эффекта АТФ. * – достоверность различий показателей на уровне $p < 0,05$ и *** – $p < 0,001$ по сравнению с значениями предыдущего агониста.

Множественный корреляционный анализ позволил выявить значимые связи активности рецепторов Тц. Так, обнаружена связь между активностью P2X₁-рецепторов и АТ₁-рецептора, α_2 -адренорецептора (соответственно, $r_{P2X_1-AT} = 0,556$; $r_{P2X_1-\alpha_2AP} = 0,502$; $p < 0,05$), а также между активностью АТ₁-рецептора и α_2 -адренорецептора ($r_{AT-\alpha_2AP} = 0,445$; $p < 0,05$). Можно предположить, что данный кластер рецепторов участвует в реализации компенсаторных реакций Тц через 48ч после КЛТ, при сохраняющемся ингибировании ЦОГ.

Моделирование *in vitro* взаимодействия рецепторов подтвердило данную гипотезу. При сравнении параметров агрегации установлено, что селективная стимуляция P2X₁-рецептора и АТ₁-рецептора вызывала сходные ($p>0,05$) значения амплитуды АТц, наклона (Slope) и площади под кривой (AUC) (Таблица 6.6). Менее выраженный эффект агрегации воспроизводился при стимуляции α_2 -адренорецептора. Так, при сходстве амплитуды АТц, значение Slope было на 22,0% и AUC на 32,6% меньше ($p<0,001$), чем при стимуляции P2X₁-рецептора. Можно прийти к заключению, что при ингибировании ЦОГ: (а) скорость агрегации Тц при функционировании сигнального пути, связанного с Gi-белком (α_2 -адренорецептор) значительно меньше, чем при открытии ионного-канала (P2X₁-рецептор); (б) низкая скорость внутриклеточной сигнализации предопределяет уменьшение количества Тц, участвующих в агрегации.

Возможно ли потенцирование эффектов при одновременной стимуляции P2X₁-рецептора, АТ₁-рецептора α_2 -адренорецептора; сочетание каких рецепторов обеспечивает наиболее эффективное ограничение гематурии через 48ч после КЛТ при введении НПВП? Установлено, что максимальный эффект агрегации Тц воспроизводился при взаимодействии пуриновых P2X₁-рецептора и α_2 -адренорецептора, связывающих субпороговую дозу агонистов. В основе данного эффекта может лежать ко-активации внутриклеточных сигнальных систем, связанных с повышением уровня Ca^{2+} . Обращает на себя внимание, что амплитуда и скорость агрегации (Slope) при одновременной стимуляции указанных рецепторов не отличались ($p>0,05$) от таковых при изолированной стимуляции P2X₁-рецептора, тогда как значения AUC превышали— на 23,2% ($P<0,01$). При одновременной стимуляции P2X₁-рецептора и АТ₁-рецептора амплитуда, скорость агрегации (Slope) и AUC не отличались от таковых при изолированной стимуляции P2X₁-рецептора. Вероятно, в данном случае активация соответствующих сигнальных путей не обеспечивала потенцирования механизмов агрегации Тц.

Таблица 6.6.

**Характеристика агрегации тромбоцитов через 48ч после КЛТ при
неэффективной ЛКТ у пациентов с локализацией конкрементов в
средней трети мочеточника**

Агонисты ЕС ₁₀	Показатели агрегатограммы		
	Амплитуда агрегации (%)	Slope (% мин)	AUC (U)
АТФ	12,8±0,8 (95% ДИ 10,9-14,7)	17,3±1,0 (95% ДИ 14,9-19,7)	23,3±1,6 (95% ДИ 19,7-26,9)
Ангиотензин-2	11,7±0,6 (95% ДИ 10,4-13,0)	16,5±1,0 (95% ДИ 14,3-18,7)	21,7±1,1 (95% ДИ 19,1-24,2)
Адреналин	11,6±0,5 (95% ДИ 10,6-12,6)	13,5±0,5# (95% ДИ 12,5-14,5)	15,7±0,8#### (95% ДИ 14,0-17,4)
АТФ +Адреналин	13,6±0,5 (95% ДИ 12,5-14,7)	19,4±1,1 (95% ДИ 17,2-21,6)	28,7±1,0 (95% ДИ 26,6-30,7)
АТФ + Ангиотензин-2	12,4±0,4 (95% ДИ 11,5-13,3)	16,8±1,1 (95% ДИ 14,4-19,2)	24,8±1,3* (95% ДИ 22,1-27,7)
Адреналин + Ангиотензин-2	12,3±0,6 (95% ДИ 11,2-13,5)	16,5±0,7* (95% ДИ 15,1-18,0)	21,1±1,1* (95% ДИ 18,8-23,3)

Примечание: #– статистически значимое различие значений показателя агрегатограммы при изолированном воздействии агониста на уровне $p<0,05$; ####– на уровне $p<0,001$ по сравнению со значениями предыдущего агониста. *–различие значений показателя агрегатограммы при комбинации воздействия агонистов на уровне $p<0,05$ по сравнению со значениями предыдущей комбинации агонистов.

При одновременной стимуляции P2X₁-рецептора и АТ₁-рецептора амплитуда и скорость агрегации (Slope) были идентичны таковым ($p>0,05$) при одновременной стимуляции P2X₁-рецептора и α_2 -адренорецептора; несоответствие касалось показателя AUC, значения которого были на 13,6% ($P<0,05$) меньше такого при стимуляции P2X₁-рецептора и α_2 -адренорецептора. Различия потенцирования агрегации при двух рассмотренных комбинаций рецепторов вероятно, обусловлены тем, что сигнализация связанная с Gi-белком (α_2 -адренорецептор) менее эффективна, чем сигнализация опосредованная Gq-белком (АТ₁-рецептор). Следовательно, стимуляция двух рецепторов при котором активность одного (P2X₁-рецептора) соответствует гиперреактивности, а второго (α_2 -адренорецептора) – нормореактивности, может обеспечить большее увеличение количества Тц участвующих в агрегации, чем два рецептора (P2X₁-рецептора, АТ₁-рецептора), которые находятся в состоянии гиперреактивности. Данный феномен свидетельствует, что решающее значение в потенцировании агрегации Тц имеет эффективность ко-стимуляции сигнальных путей, а не исходная сенситивность. Минимальный эффект потенцирования агрегации Тц воспроизводился при взаимодействии АТ₁-рецептора и α_2 -адренорецептора. Показатели агрегации Тц при одновременной стимуляции этих рецепторов были сопоставимы с эффектом изолированной стимуляции АТ₁-рецептора ($p>0,05$). Не выявлены различия амплитуды и скорости агрегации (Slope) при одновременной стимуляции АТ₁-рецептора и α_2 -адренорецептора, а также P2X₁-рецептора и АТ₁-рецептора ($p>0,05$). Однако, значения AUC были примерно на 15,0% ($P<0,05$) меньше при стимуляции АТ₁-рецептора и α_2 -адренорецептора, что, вероятно, связано с меньшей эффективностью сигнализации связанной с Gi-белком (α_2 -адренорецептор) по сравнению с сигнализацией опосредованной P2X₁-рецептором, следствием чего является открытие Ca²⁺-канала.

Таким образом, через 48ч после КЛТ при введении НПВП имела место: гиперреактивность $P2X_1$ -рецептора и AT_1 -рецептора, нормореактивность α_2 -адренорецептора, пуриновых $P2Y$ -рецепторов и аденозинового $A2A$ -рецептора, гипореактивность $GPVI$ -рецептора, ФАТ-рецептора и TxA_2 -рецептора. При этом повышение активности α_2 -адренорецептора, AT_1 -рецептора и $P2X_1$ -рецептора обеспечивало усиление агрегации Тц по сравнению с предыдущим сроком наблюдения. Взаимодействие $P2X_1$ -рецептора, α_2 -адренорецептора и AT_1 -рецептора, оказывало потенцирующий эффект на агрегацию Тц вследствие сопряженности внутриклеточных сигнальных путей. Реализация компенсаторных механизмов гемостаза с участием $P2X_1$ -рецептора, α_2 -адренорецептора и AT_1 -рецептора повышала функциональную активность Тц, тем не менее не обеспечивала прекращение гематурии.

6.4. Механизмы нарушения тромбогенеза через 72ч после КЛТ в средней трети мочеточника и отмены НПВП.

Гипотеза. Можно предположить, что через 72ч после КЛТ (24ч после отмены НПВП) восстанавливается синтез TxA_2 и модифицируется сеть внутриклеточной сигнализации, регулирующей адаптационную реакцию клеток крови.

Исследовательские вопросы – влияет ли зона оперативного вмешательства на мочеточнике на послеоперационную гематурию; изменяется ли выраженность гематурии после КЛТ в средней трети мочеточника при отмене НПВП. Установлено, что микрогематурия через 72ч после КЛТ в верхнем и среднем отделах мочеточника соответствует средней степени тяжести (Рисунок 6.7) и, следовательно, отмена НПВП не гарантирует прекращение геморрагии. По сравнению со сроком наблюдения 48ч после КЛТ в средней трети мочеточника выявлено снижение выраженности микрогематурии. на 32,7% – до $35,2 \pm 0,9$ п/з ($P < 0,001$; 95% ДИ 33,4-37,0 п/з).

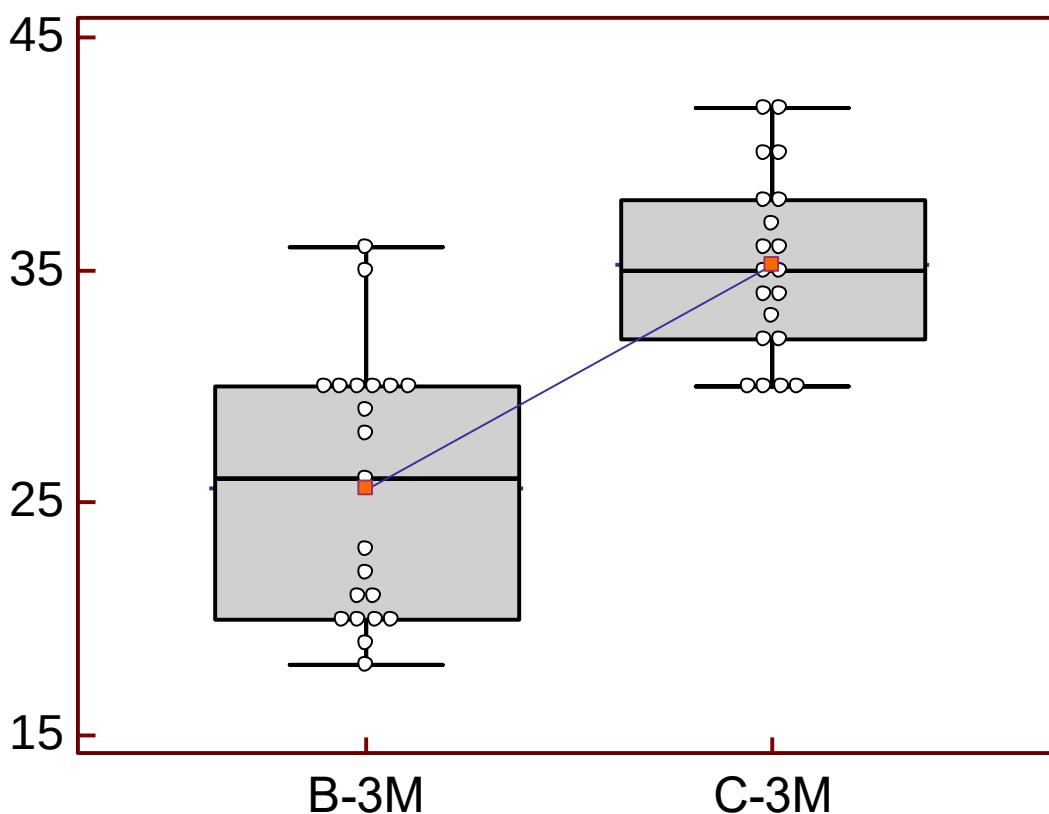


Рис. 6.7. Динамика микрогематурии через 72ч после КЛТ в верхней и средней трети мочеточника при отмене НПВП.

По оси ординат – количество эритроцитов в поле зрения (э/пз); по оси абсцисс – локализация конкремента: В-3М и С-3М, соответственно, верхняя и средняя треть мочеточника.

Исследовательские вопросы –восстанавливается ли активность ЦОГ через 24ч после прекращения введения НПВП; является ли ТхА2 агонистом способным усилить гемостаз и снизить микрогематурию в данный срок наблюдения. Через 72ч после КЛТ в средней трети выявлена гиперреактивность пуриновых Р2Y-рецепторов, ТхА2-рецептора и α_2 -адренорецептора; нормореактивность АТ₁-рецептора, ФАТ-рецептора Р2Х₁-рецептора, GPVI-рецептора и аденозинового А2А-рецептора (Таблица 6.7).

Таблица 6.7.

**Индукцированная агрегация тромбоцитов у пациентов через 72ч после
КЛТ при неэффективной ЛКТ у пациентов с локализацией
конкрементов в средней трети мочеточника.**

Агонисты EC ₅₀	Среднее значение $\bar{x} \pm SD$	Min – Max	Левый (95% ДИ)	Правый (95% ДИ)
АДФ	57,8±0,8	53,0-64,0	56,1	59,4
ТхА2	57,2±0,8	51,0-63,0	55,7	58,8
Адреналин	56,9±0,8	51,0-63,0	55,1	58,7
Ангиотензин-2	53,9±0,6** P=0,002	50,0-60,0	52,6	55,3
ФАТ	52,0±0,6 P <0,001	48,0-59,0	50,7	53,2
АТФ	51,3±0,7 P <0,001	45,0-57,0	49,8	52,8
Коллаген IV типа	50,1±0,7 P <0,001	46,0-56,0	48,7	51,5
Аденозин	55,3±0,7	51,0-61,0	53,9	56,7

Примечание. P – вероятность различий индуцированной АТц относительно эффекта АДФ. * – достоверность различий показателей на уровне $p < 0,05$ и *** – $p < 0,001$ по сравнению с значениями предыдущего агониста.

Наличие отрицательной корреляционной связи между выраженностью гематурии и активностью ТхА2-рецептора ($r_{ГТ-ТхА2} = -0,605$; $p < 0,05$), свидетельствует об участии сигнальных путей, связанных с Gq- и G₁₃-белками, в стимуляции тромбогенеза после восстановления активности ЦОГ. По сравнению с предыдущим сроком наблюдения, выявлено снижение активности P2X₁-рецептора и АТ₁-рецептора, соответственно, на 13,6% и 3,9% ($p < 0,05$), что может трактоваться как механизм отрицательной обратной связи с ТхА2-сигнализацией, направленной на оптимизацию содержания Ca²⁺. Подтверждением этой гипотезы может быть наличие отрицательной

корреляции между активностью ТхА2-рецептора и P2X₁-рецептора, АТ₁-рецептора (соответственно, $r_{\text{ТхА2-P2X1}} = -0,433$; $r_{\text{ТхА2-AT1}} = -0,340$; $p < 0,05$). По сравнению с предыдущим сроком наблюдения, выявлено повышение активности P2Y-рецепторов на 14,9% ($P < 0,001$), α_2 -адренорецептора на 12,1% ($P < 0,001$), ФАТ-рецептора – на 72,2% ($P < 0,001$), ТхА2-рецептора – на 90,0% ($P < 0,001$) и GPVI-рецептора на 47,8% ($P < 0,001$) и А2А-рецептора на 7,2% ($P < 0,05$). Приведенная динамика активности рецепторов позволяет предположить, что выявленный кластер рецепторов участвует в регуляции адаптационных механизмов гемостаза после прекращения ингибирования ЦОГ. Сопоставление кластера рецепторов, участвующих в поддержании гемостаза при ингибировании и восстановлении ЦОГ позволяет прийти к нескольким выводам.

Во-первых, снижение выраженности гематурии обеспечивается динамичным изменением активности рецепторов Тц, которое модулируется НПВП. Так, если через 48ч после КЛТ на фоне ингибирования ЦОГ ограничение гематурии связано с активацией и взаимодействием P2X₁-рецепторов и АТ₁-рецептора, α_2 -адренорецептора, то через 72ч после КЛТ в случае восстановления активности ЦОГ функционировал кластер, включающий P2Y-рецепторы, ТхА2-рецептор и α_2 -адренорецептор. Отмеченное снижение степени микрогематурии после отмены НПВП подтверждает возможность трансдукции сигнальных путей, направленной на повышение функциональной активности Тц.

Во-вторых, стереотипным механизмом, обеспечивающим взаимодействие рецепторов в разные сроки после КЛТ, является активация α_2 -адренорецептора, что укладывается в картину участия стресс-реакции в тромбогенезе (Рисунок 6.8). Таким образом, через 72ч после КЛТ в средней трети мочеточника снижение выраженности микрогематурии может быть связано с гиперреактивностью P2Y-рецепторов, ТхА2-рецептора и α_2 -адренорецептора.

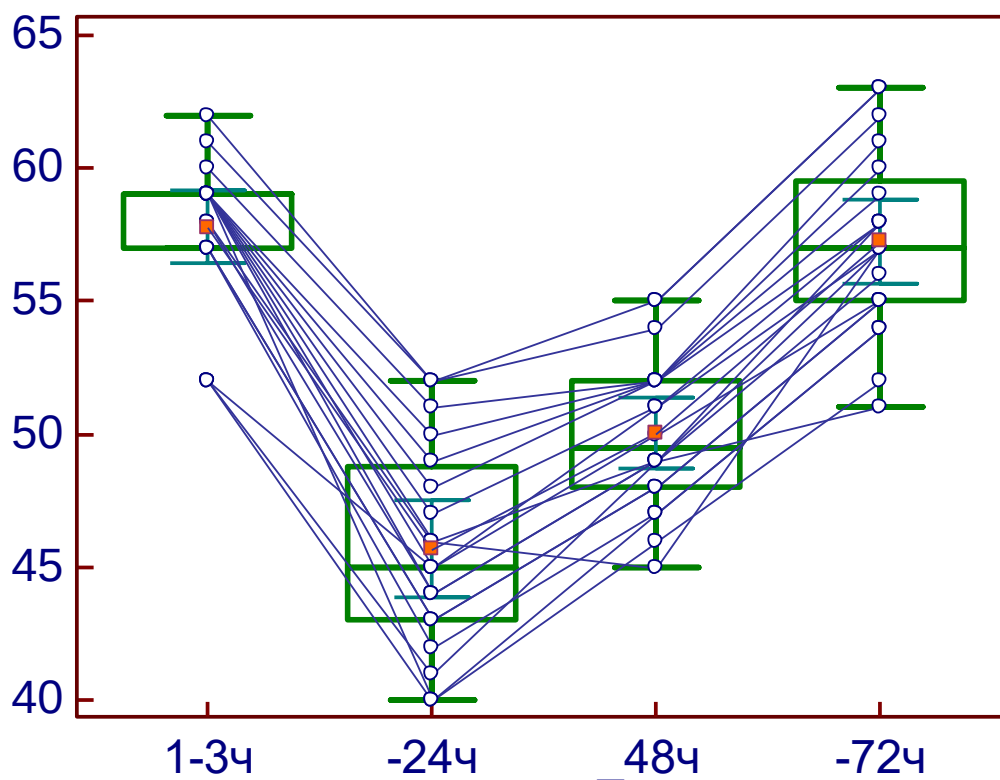


Рис. 6.8. Динамика активности α_2 -адренорецептора Тц после КЛТ при неэффективной ЛКТ у пациентов с локализацией конкрементов в средней трети мочеточника.

По оси ординат – значения индуцированной АТц (%);) по оси абсцисс – срок наблюдения.

Анализ множественной корреляции продемонстрировал наличие связи между активностью P2Y-рецепторов и TxA2-рецептора, α_2 -адренорецептора (соответственно, $r_{P2Y-TxA2}=0,533$; $r_{P2Y-\alpha_2AP}=0,641$; $p<0,05$), а также между активностью TxA2-рецептора и α_2 -адренорецептора ($r_{TxA2-\alpha_2AP}=0,546$; $p<0,05$). Выявленная взаимосвязь P2Y-рецепторов, TxA2-рецептора и α_2 -адренорецептора позволяет предположить их участие в регуляции адаптационных реакций Тц после КЛТ на фоне восстановления активности ЦОГ.

Моделирование *in vitro* взаимодействия рецепторов Тц подтвердило данную гипотезу. При сравнении параметров агрегации установлено, что

селективная стимуляция P2Y-рецепторов и TxA2-рецептора воспроизводила сходные ($p > 0,05$) значения амплитуды АТц, наклона (Slope) и площади под кривой (AUC) (Таблица 6.8). Менее выраженный эффект агрегации воспроизводился при стимуляции α_2 -адренорецептора. Так, при сходстве амплитуды адреналин-индуцированной АТц, значение Slope было на 24,5% и AUC на 27,6% меньше ($p < 0,05$), чем при стимуляции P2Y-рецепторов. Логично, что (а) скорость агрегации Тц при функционировании сигнального пути, связанного с Gi-белком (α_2 -адренорецептор) значительно меньше, чем при одновременной сигнализации через Gi-белок и Gq-белок (соответственно, P2Y₁₂-рецептор и P2Y₁ рецептор). В тоже время, сходство показателей агрегатограммы при стимуляции P2Y-рецепторов и TxA2-рецептора (связанного с Gq-белком) отражает доминирующую роль внутриклеточной сигнализации, связанной с одновременным функционированием фосфолипазы C β и ФИ-3К в агрегации Тц.

Взаимодействие каких рецепторов обеспечивает наиболее эффективную АТц через 24ч после отмены НПВП? Установлено, что максимальный эффект агрегации Тц воспроизводился при взаимодействии пуриновых P2Y-рецепторов и α_2 -адренорецептора. В основе данного эффекта может лежать ко-активация Gi-белка связанного как с P2Y₁₂-рецептором, так и α_2 -адренорецептором. Подтверждением этой гипотезы может быть увеличение значений скорости агрегации (Slope) и AUC, соответственно, на 50,5% и 47,9% ($P < 0,001$ при одновременной стимуляции указанных рецепторов, по сравнению с изолированной стимуляцией P2Y-рецепторов. При одновременной стимуляции следующей пары агонистов P2Y-рецепторов и TxA2-рецептора, а также TxA2-рецептора и α_2 -адренорецептора амплитуда, скорость агрегации (Slope) и AUC статистически значимо не отличались от таковых при изолированной стимуляции P2Y-рецепторов.

Таблица 6.8.

**Характеристика показателей функциональной активности Тц
через 72ч после КЛТ при неэффективной ЛКТ у пациентов с
локализацией конкрементов в средней трети мочеточника**

Агонисты EC ₁₀	Показатели агрегатограммы		
	Амплитуда агрегации (%)	Slope (% мин)	AUC (U)
АДФ	15,6±0,9 (95% ДИ 13,5-17,7)	19,6±1,0 (95% ДИ 17,3-21,9)	26,1±1,2 (95% ДИ 23,2-29,0)
ТхА2	13,5±0,9 (95% ДИ 11,4-15,6)	18,0±1,0 (95% ДИ 15,8-20,2)	24,0±1,8 (95% ДИ 19,9-28,1)
Адреналин	12,2±0,5 (95% ДИ 11,1-13,3)	14,8 ±0,7# (95% ДИ 13,3-16,3)	18,9±1,1# (95% ДИ 16,4 -21,4)
АДФ + Адреналин	20,7±0,7 (95% ДИ 19,3-22,2)	29,5±1,0 (95% ДИ 27,4-31,6)	38,6±0,9 (95% ДИ 36,8-40,4)
АДФ + ТхА2	16,6±0,3*** (95% ДИ 16,0-17,2)	21,1±0,4*** (95% ДИ 20,2-21,9)	27,0±0,8*** (95% ДИ 25,2-28,7)
ТхА2 + Адреналин	15,3±0,6 (95% ДИ 14,0-16,7)	20,0±0,8 (95% ДИ 18,4-21,6)	25,2±1,0 (95% ДИ 23,3-27,2)

Примечание: #— статистически значимое различие значений показателя агрегатограммы при изолированном воздействии агониста на уровне $p<0,05$ по сравнению со значениями предыдущего агониста.

***—различие значений показателя агрегатограммы при комбинации воздействия агонистов на уровне $p<0,001$ по сравнению со значениями предыдущей комбинации агонистов.

Такая ситуация объясняется тем, что при стимуляции указанных комбинаций рецепторов задействованы одни и те же сигнальные пути, связанные с Gi- и Gq-белками, как при изолированной стимуляции P2Y-рецепторов. В этом случае сопоставимость параметров агрегации отражает отсутствие потенцирования сигнализации при одновременной стимуляции P2Y-рецепторов и TxA2-рецептора, а также TxA2-рецептора и α_2 -адренорецептора. Требуют осмысления и более низкие значения параметров агрегации при стимуляции указанных комбинаций рецепторов относительно таковых при стимуляции пары P2Y-рецепторы и α_2 -адренорецептор. Так, при одновременной стимуляции P2Y-рецепторов и TxA2-рецептора амплитуда, скорость агрегации (Slope) и AUC были, соответственно, на 9,8%, 28,5% и 30,0% меньше ($P < 0,001$), чем при одновременной стимуляции P2Y-рецепторов и α_2 -адренорецептора. Различия потенцирования агрегации при двух рассмотренных комбинациях рецепторов, вероятно, обусловлены, тем, что сигнализация, связанная с ко-активацией Gq-белка (P2Y-рецепторы и TxA2-рецептора) и/или ко-активация Gq-белка и Gi- белка (TxA2-рецептора и α_2 -адренорецептор) менее эффективна, чем сигнализация, опосредованная Gi- и Gq-белками ассоциированными с P2Y-рецепторами. В этом контексте перспективы разработки фармакологических методов коррекции гемостаза после отмены НПВП должны быть связаны с поиском мишеней внутриклеточной сигнализации, обеспечивающих потенцирование эффектов P2Y-рецепторов с ЦОГ-независимыми рецепторами.

Представляют интерес основные характеристики агрегации при стимуляции рецепторов на фоне ингибирования (48ч после КЛТ) и восстановления активности ЦОГ (72ч после КЛТ). Как уже отмечалось стереотипным механизмом усиления АТц после КЛТ в средней трети мочеточника, независимо от активности ЦОГ в случае неэффективной ЛКТ, являлась активация α_2 -адренорецептора.

Однако, при ингибировании ЦОГ потенцирование сигнализации в Тц обеспечивалось взаимодействием α_2 -адренорецептора и P2X₁-рецептора,

тогда как через 24ч после восстановления активности ЦОГ – взаимодействием α_2 -адренорецептора и P2Y-рецепторов. Установлено, что при одновременной стимуляции P2Y-рецепторов и α_2 -адренорецептора амплитуда, скорость агрегации (Slope) и AUC были, соответственно, на 52,2%, 52,1% и 34,5% больше ($P < 0,001$), чем при одновременной стимуляции P2X₁-рецептора и α_2 -адренорецептора. Полученные результаты свидетельствуют, что (а) при возобновлении функционирования системы ЦОГ-ТхА2 восстанавливается внутриклеточная сигнализация АДФ, который является более сильным агонистом, чем АТФ; (б) устанавливается взаимодействие рецепторов, позволяющих обеспечить потенцирование проагрегантного эффекта; (в) потенцирование достигается благодаря увеличению скорости процессов «outside-inside» и «inside- outside» (показатель Slope), обеспечивающих аутокринную стимуляцию Тц, вследствие чего возрастало количество Тц, вовлечённых в процесс агрегации (AUC).

Таким образом, через 72ч после КЛТ имело место: гиперреактивность пуриновых P2Y-рецепторов, ТхА2-рецептора и α_2 -адренорецептора; нормореактивность АТ₁-рецептора, ФАТ-рецептора P2X₁-рецептора, GPVI-рецептора и аденозинового А2А-рецептора. Через 24ч после отмены НПВП установлено взаимодействие P2Y-рецепторов, ТхА2-рецептора и α_2 -адренорецептора, что проявлялось повышением функциональной активности Тц. Восстановление конститутивной сигнализации, опосредованной Gi- и Gq-белками, которые ассоциированы с P2Y-рецепторами является более значимым, чем индуцибельная сигнализация связанная с ко-активацией Gq-белка (P2Y-рецепторы и ТхА2-рецептора) и/или ко-активацией Gq-белка и Gi- белка (ТхА2-рецептора и α_2 -адренорецептор). Реализация адаптационных механизмов гемостаза с участием P2Y-рецепторов, ТхА2-рецептора и α_2 -адренорецептора повышала функциональную активность Тц, что способствовало существенному ограничению микрогематурии.

6.5. Механизмы нарушения тромбогенеза через 7 суток после КЛТ в средней трети мочеточника и отмены НПВП.

Прикладной аспект исследования тромбоцитарного звена гемостаза через 7 суток после КЛТ связан с процессами репарации уротелия и ремоделирования слизистой МВП, рисками поддержания гематурии и развития острого пиелонефрита. Механизмы регуляции адаптационной реакции Тц в отдаленные сроки после отмены НПВП не установлены, что ограничивает возможность профилактики послеоперационных осложнений.

Исследовательские вопросы – сохраняется ли микрогематурия; восстанавливается ли физиологическая активность рецепторов Тц; какие рецепторы могут модулировать функцию Тц через 7 суток после КЛТ в средней трети мочеточника и отмены НПВП? Установлено, что через 7 суток после КЛТ сохраняется микрогематурия, которая соответствует легкой степени тяжести. По сравнению со сроком наблюдения 72ч после КЛТ выявлено снижение выраженности микрогематурии в 6,9раза ($P < 0,001$) до $5,1 \pm 0,4$ п/з (95% ДИ 4,3-6,0 п/з). Через 7 суток после КЛТ в средней трети выявлена гиперреактивность ФАТ-рецептора, ТхА2-рецептора, пуриновых P2Y-рецепторов и GPVI-рецептора, и нормореактивность P2X₁-рецептора, АТ₁-рецептора, α_2 -адренорецептора и аденозинового А2А-рецептора (Таблица 6.9). Наличие положительной корреляционной связи между выраженностью гематурии и активностью ФАТ-рецептора ($r_{ГТ-ФАТ} = 0,737$; $p < 0,05$), свидетельствует об участии активированных лейкоцитов в патогенезе диapedеза. По сравнению со сроком наблюдения 72ч после КЛТ имело место снижение активности АТ₁-рецептора на 5,9% ($p < 0,05$) и α_2 -адренорецептора на 12,0% ($P < 0,001$), а также А2А-рецептора на 15,0% ($P < 0,001$). Не выявлено статистически значимых изменений активности P2X₁-рецептора P2Y-рецепторов и ТхА2-рецептора. Активность ФАТ-рецептора и GPVI-рецептора возросла, соответственно, на 12,9% и 12,6% ($P < 0,001$).

Функциональная активность рецепторов Тц у пациентов через 7 суток после КЛТ и отмены НПВП у пациентов с локализацией конкрементов в средней трети мочеточника

Тип рецепторов	Среднее значение $\bar{X} \pm SD$	Min – Max	Левый (95% ДИ)	Правый (95% ДИ)
ФАТ-рецептор	58,7±0,6	55,0-65,0	57,4	60,1
ТхА2	57,9±0,7	52,0-63,0	56,4	58,0
P2Y-рецепторы	57,2±0,6	53,0-63,0	55,8	58,5
GP VI-рецептор	56,4±1,2	47,0-64,0	54,0	59,0
P2X ₁ -рецептор	53,2±0,8 P < 0,05	48,0-60,0	51,5	54,8
AT ₁ -рецептор	50,9±1,2 P < 0,001	43,0-60,0	48,5	53,3
α ₂ -адренорецептор	50,1±1,1 P < 0,001	40,0-59,0	47,8	52,3
A2A-рецептор	47,0±0,7* P < 0,001	42,0-52,0	45,5	48,6

Примечание. P – вероятность различий активности рецептора относительно таковой ФАТ-рецептора. *– достоверность различий показателей на уровне $p < 0,05$ по сравнению со значениями активности предыдущего рецептора.

Множественный корреляционный анализ связей между активностью рецепторов Тц позволяет заключить, что через 7 суток после КЛТ: (а) поддерживается взаимодействие P2Y-рецепторов и ТхА2-рецептора ($r_{P2Y-\alpha 2AR} = 0,575$; $p < 0,05$), следствием которого может быть не только ограничение гематурии, но и сохранение гипертонуса гладкой мышечной ткани. Эффект взаимодействия данных рецепторов связан с ко-активацией Gq-белка и нижерасположенной сигнализацией; (б) возникает взаимосвязь функционирования GPVI-рецептора и P2Y-рецепторов, ТхА2-рецептора ($r_{GPVI-P2Y} = 0,483$; $r_{GPVI-TxA2} = 0,601$; $p < 0,05$), что свидетельствует о возможности дополнительной «загрузки» сигнального участка связанного с ФИ-3К; следствием данной взаимосвязи может быть повышение секреции гранул из

Тц посредством митоген-активируемой протеинкиназы (МАРК) и усиление тромбогенеза через участок сигнальной системы $RAP1 - RIAM$ [3]. Повышение активности GPVI-рецептора может рассматриваться как адаптационный механизм, направленный на ограничение гематурии. Наличие связи между активностью GPVI-рецептора и P2Y-рецепторов, вероятно, отражает причинно-следственные связи патогенеза отсроченных осложнений после КЛТ. Так, функционально активные Тц, секретирующие АДФ в процессе аутокринной стимуляции, вызывают стимуляцию лейкоцитов посредством P2Y-рецепторов. В свою очередь, лейкоциты вызывают деградацию коллагена, в том числе коллагена IV-типа; (в) устанавливается связь между активностью GP VI-рецептора и ФАТ-рецептора ($r_{GPVI-ФАТ} = 0,712$; $p < 0,05$), а также между активностью ФАТ-рецептора и ТхА2-рецептора ($r_{ФАТ - ТхА2} = 0,681$; $p < 0,05$), что свидетельствует о наличии воспалительного процесса в стенке МВП после КЛТ. Аргументами в подтверждение этой гипотезы может быть гиперреактивность ТХА2-рецептора в клетках крови и циркуляции в кровотоке активированных фенотипов лейкоцитов, секретирующих ФАТ. Наличие активированных лейкоцитов является ключевым звеном патогенеза послеоперационных осложнений, поскольку продукция ММР вызывает ремоделирование БМ эндотелия и многослойного переходного эпителия МВП. Возникающее при этом повышение проницаемости эндотелиального монослоя сопровождается диапедезом эритроцитов (механизм микрогематурии), а нарушение гистофизиологии уротелия – поддерживает инфицирование и развитие воспаления в рыхлой волокнистой соединительной ткани. Выявленная взаимосвязь активности ФАТ-рецепторов, ТхА2-рецептора P2Y-рецепторов и GP VI-рецептора позволяет предположить их участие реализации адаптационных механизмы гемостаза через 7 суток после КЛТ. Моделирование *in vitro* взаимодействия рецепторов Тц позволило уточнить оптимальные комбинации рецепторов, которые могут увеличить АТц. При сравнении параметров агрегации установлено, что селективная стимуляция

GP VI-рецептора и TxA2-рецептора воспроизводила сходные ($p > 0,05$) значения амплитуды АТц, наклона (*Slope*) и площади под кривой (AUC) (Таблица 6.10). Наименее выраженный эффект агрегации воспроизводился при стимуляции TxA2-рецептора. Так, при тромбоксанА2-индуцированной АТц, значение амплитуды, *Slope* и AUC было, соответственно, на 22,7%, 33,7% и 35,0% меньше ($p < 0,05$), чем при стимуляции GPVI-рецептора. Можно констатировать, что скорость агрегации Тц при функционировании сигнальных путей, связанных с Gq-белком и G₁₃-белком (TxA2-рецептор) меньше, чем при активации участка SFK-ФИ-3К (GP VI-рецептор) или при сигнализации ассоциированной с Gi- и Gq-белками (P2Y-рецепторы). В тоже время, сходство показателей агрегатограммы при стимуляции GP VI-рецептора и P2Y-рецепторов отражает ключевую роль внутриклеточной сигнализации, связанной с одновременным функционированием фосфолипазы C β и ФИ-3К, обеспечивающих повышение внутриклеточного содержания Ca²⁺ в Тц. Установлено, что максимальный эффект агрегации Тц воспроизводился при взаимодействии GPVI-рецептора и P2Y-рецепторов; данный эффект может осуществляться вследствие ко-активации фосфолипазы C β и/или ФИ-3К. При одновременной стимуляции GPVI-рецептора и P2Y-рецепторов отмечено увеличение значений амплитуды, *Slope* и AUC, соответственно на 79,1%, 55,9% и 52,3%% ($P < 0,001$), по сравнению с изолированной стимуляцией GPVI рецептора.

При стимуляции следующей пары рецепторов— GPVI-рецептора и TxA2-рецептора основные параметры агрегации Тц превышали ($p < 0,05$) таковые при изолированной стимуляции GPVI-рецепторов. В тоже время, скорость агрегации (*Slope*) и AUC при одновременной стимуляции GPVI-рецептора и TxA2-рецептора были ниже, соответственно, на 10,7% и 17,9% ($P < 0,05$) относительно таковых при взаимодействии GPVI-рецептора и P2Y-рецепторов.

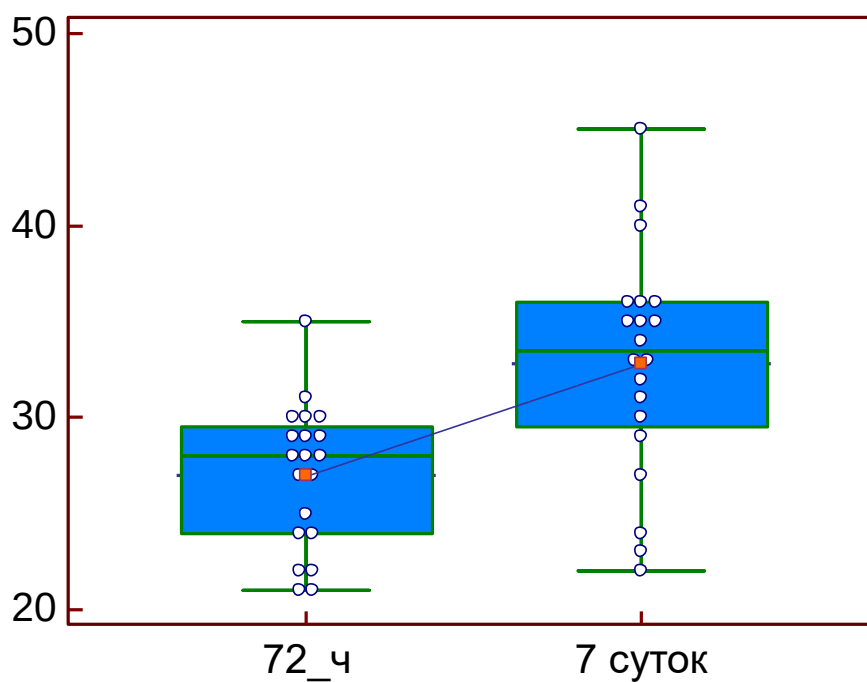
**Характеристика показателей функциональной активности Тц через 7
суток после КЛТ и отмены НПВП у пациентов с локализацией
конкрементов в средней трети мочеточника.**

Агонисты ЕС ₁₀	Показатели агрегатограммы		
	Амплитуда агрегации (%)	Slope (% мин)	AUC (U)
Коллаген	16,3±0,9 (95% ДИ 14,3-18,3)	25,2±1,2 (95% ДИ 22,5-27,8)	33,1±1,3 (95% ДИ 30,0-36,2)
АДФ	15,5±1,0 (95% ДИ 13,03-17,7)	23,0±1,4 (95% ДИ 19,9-26,1)	34,7±1,5 (95% ДИ 31,2-38,2)
ТхА2	12,6±0,5 [#] (95% ДИ 11,4-13,8)	16,7 ±1,3 ^{##} (95% ДИ 13,8-19,6)	21,5±1,6 ^{###} (95% ДИ 17,8 -25,2)
Коллаген IV типа + АДФ	29,2±0,9 (95% ДИ 27,5-30,9)	39,3±1,1 (95% ДИ 36,9-41,7)	50,4±2,3 (95% ДИ 45,5-55,2)
Коллаген IV типа + ТхА2	30,0±0,7 (95% ДИ 28,5-31,6)	35,1±1,1 ^{**} (95% ДИ 33,1-37,2)	41,4±1,2 ^{***} (95% ДИ 38,9-44,0)
АДФ + ТхА2	21,6±0,8 ^{***} (95% ДИ 19,9-23,3)	27,0±1,0 ^{***} (95% ДИ 24,9-29,1)	32,8±1,3 ^{***} (95% ДИ 30,1-35,6)

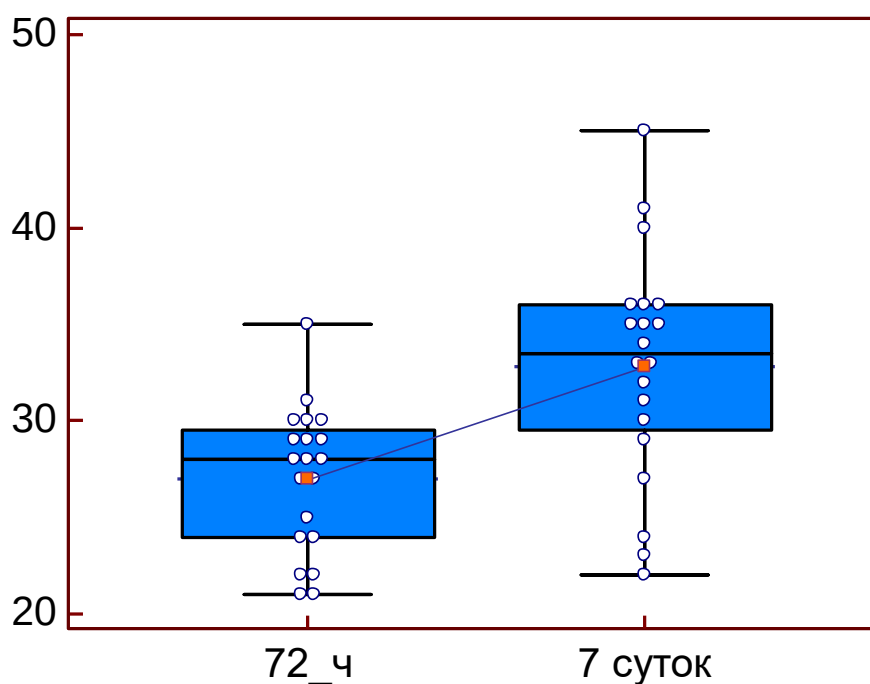
Примечание: #– статистически значимое различие значений показателя агрегатограммы при изолированном воздействии агониста на уровне $p<0,05$; ## – на уровне $p<0,01$ и ### –на уровне $p<0,001$ по сравнению со значениями предыдущего агониста. **–различие значений показателя агрегатограммы при комбинации воздействия агонистов на уровне $p<0,01$ и ***– на уровне на уровне $p<0,001$ по сравнению со значениями предыдущей комбинации агонистов.

Следовательно, при взаимодействии GPVI-рецептора и TxA2-рецептора потенцирование основного пути сигнализации связанного с участком SFK-ФИ-3K (GP VI-рецептор) в случае активации Gq-белка и G₁₃-белка (TxA2-рецептор) менее эффективно, чем при дополнительной сигнализации посредством Gi- и Gq-белков (P2Y-рецепторы). При одновременной стимуляции P2Y-рецепторов и TxA2-рецептора амплитуда, скорость агрегации (Slope) и AUC были, соответственно, на 28,0%, 23,1% и 20,8% меньше ($P < 0,001$), чем при одновременной стимуляции GPVI-рецептора и TxA2-рецептора. Различия потенцирования двух рассмотренных комбинаций рецепторов, вероятно, обусловлены, тем, что сигнализация посредством Gq-белка и G₁₃-белка (TxA2-рецептор) менее эффективная, чем активация Gi- и Gq-белков (P2Y-рецепторы).

Исследовательский вопрос – можно ли рассматривать сохранение путей внутриклеточной сигнализации после КЛТ доказательством оптимальной регуляции функций Тц? В этой связи представляет интерес анализ взаимодействия P2Y-рецепторов и TxA2-рецептора, которое сохранялось с 3-х по 7-е сутки после КЛТ. Установлено, что через 7 суток после КЛТ при одновременной стимуляции P2Y-рецепторов и TxA2-рецептора амплитуда, скорость агрегации (Slope) и AUC были, соответственно, на 30,1%, 28,0% и 21,5% больше ($P < 0,001$), чем при стимуляции данных рецепторов через 72ч после КЛТ (Рисунок 6.9). Полученные результаты позволяют заключить, что повышение функциональной активности Тц может обеспечиваться (а) путем повышения эффективности сопряженности предсуществующих сигнальных путей, как это было в случае взаимодействия P2Y-рецепторов и TxA2-рецептора, связанных с Gi- и Gq-белками (P2Y-рецепторы) и с Gq-белком и G₁₃-белком (TxA2-рецептор). Результатом такого взаимодействия явилось увеличение скорости сигнализации, обеспечивающей вовлечение большего количества Тц в процесс адгезии и агрегации.



а



б

Рис. 6.9. Динамика значений Slope (а) и AUC (б) агрегатограммы при одновременной стимуляции P2Y-рецепторов и TxA2-рецептора в тесте *in vitro* на Тц после КЛТ в средней трети мочеточника.

По оси ординат – значения Slope (% мин) и AUC (U); по оси абсцисс – срок наблюдения.

(б) включением новых путей сигнализации – как в случае с GPVI-рецептором, обеспечивающим активацию участка SFK– ФИ-3К. Если сопоставить данные агрегатограмм при сохраняющемся взаимодействии P2Y-рецепторов и TxA2-рецептора и включении нового пути сигнализации, связанного с активацией GPVI-рецептором и P2Y-рецепторов, то можно заключить, что основным критерием оптимизации сети внутриклеточной сигнализации является достижение максимального AUC (Рисунок 6.10).

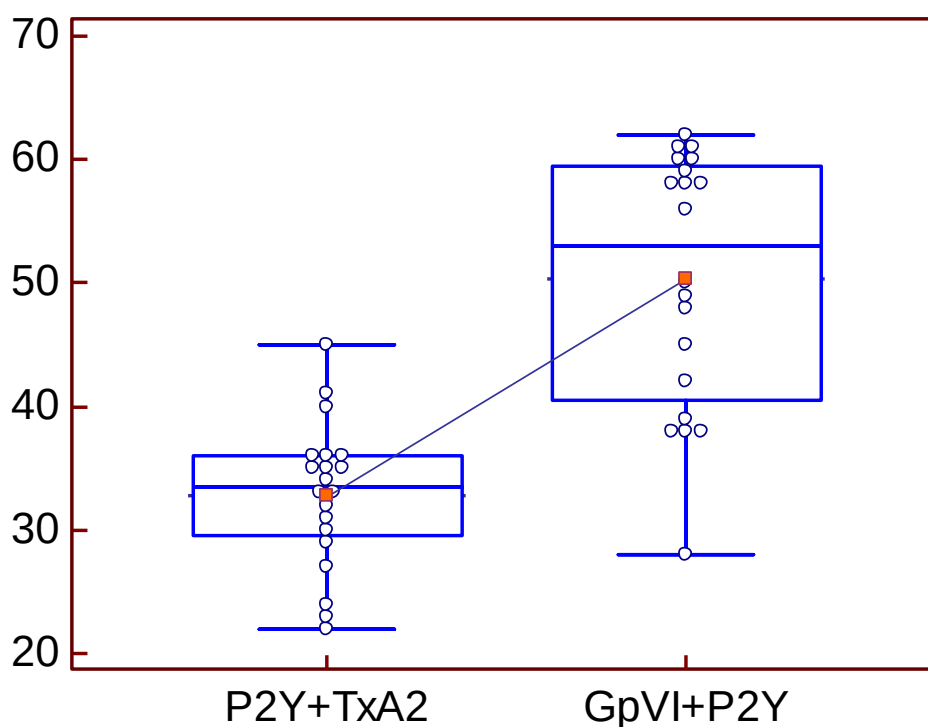


Рис. 6.10. Динамика показателя AUC агрегатограмм через 7 суток после КЛТ при различных путях внутриклеточной сигнализации в Тц.

По оси ординат – значения AUC (U); по оси абсцисс – комбинации взаимодействующих рецепторов.

Таким образом, при неэффективной ЛКТ через 7 суток после КЛТ и отмены НПВП выявлено ограничение микрогематурии до легкой степени выраженности связанное с адаптационной реакцией Тц, в регуляции которой принимали участие P2Y-рецепторы, GPVI-рецептор, ФАТ-рецептор и TxA2-рецептор. Максимальный эффект агрегации Тц воспроизводился при

взаимодействии GPVI-рецептора и P2Y-рецепторов; при этом синергия может достигаться путем ко-активации фосфолипазы C β и/или ФИ-3К. Стереотипным механизмом регуляции адаптационной реакции Тц при восстановлении активности ЦОГ является сигнализация P2Y-рецепторов и ТхA2-рецептора. Вариативным механизмом, повышающими проагрегантную активность Тц, через 24ч после отмены НПВП являлась сигнализация α_2 -адренорецептора, а через 7 суток – сигнализация ФАТ-рецептора и GPVI-рецептора. Расшифровка механизмов регуляции компенсаторных и адаптационных реакций Тц при неэффективной ЛКТ в различные сроки после назначения и отмены НПВП позволит разработать новые методы лечения и профилактики геморрагии и гематурии связанные с КЛТ.

ГЛАВА 7

ПАТОГЕНЕЗ ПИЕЛОНЕФРИТА ПОСЛЕ КЛТ В СРЕДНЕЙ ТРЕТИ МОЧЕТОЧНИКА ПРИ НЕЭФФЕКТИВНОЙ ЛКТ.

Цель исследования – на основании анализа функциональной активности рецепторов Тц изучить компенсаторные и адаптационные реакции организма, контролирующие развитие воспаления после КЛТ в средней трети мочеточника при назначении и отмене НПВП.

7.1. Численность циркулирующих ТЛА, выраженность лейкоцитурии и активность рецепторов Тц на этапе госпитализации у пациентов с конкрементами в средней трети мочеточника.

Исследовательские вопросы – изменяется ли и количество ТЛА, тяжесть лейкоцитурии и активность рецепторов на клетках крови на этапе госпитализации при локализации конкрементов в средней трети мочеточника?

В данной когорте пациентов численность клеточных агрегатов была на 67,3% ($P < 0,001$) больше, чем в контрольной группе. При анализе функциональной активности Тц выявлена гиперреактивность α_2 -адренорецептора, ТхА2-рецептора, GPVI-рецептора, АТ₁-рецептора, ФАТ-рецептора, пуриновых Р2Y-рецепторов, Р2X₁-рецептора и А2А-рецептора (Таблица 7.1). Следовательно, факторами стимуляции клеток крови на этапе госпитализации являются активация РАС и САС, связанная с обструкцией мочеточника; вазоконстрикция сопровождающаяся ишемией/гипоксией тканей и альтерацией клеток; воспаление в МВП; деградация коллагена типа ВМ эндотелия и уротелия. Высокая активность А2А-рецептора свидетельствует о функционировании защитного механизма, ограничивающего воспаление, агрегацию Тц и ишемию тканей мочеточника у данного контингента больных. Выявлена связь между количеством ТЛА и активностью Р2Y-рецепторов ($r_{\text{ТЛА-Р2Y}}=0,743$; $p < 0,05$), ФАТ-рецептора ($r_{\text{ТЛА-ФАТ}}=0,642$; $p < 0,05$), α_2 -адренорецептора ($r_{\text{ТЛА-}\alpha_2\text{AP}}=0,574$; $p < 0,05$), Р2X₁-рецептора ($r_{\text{ТЛА-Р2X1}}=0,469$; $p < 0,05$), ТхА2-рецептора ($r_{\text{ТЛА-ТхА2}}=0,442$; $p < 0,05$).

Таблица 7.1

**Индукцированная агрегация тромбоцитов на этапе госпитализации
пациентов с наличием конкрементов в средней трети мочеточника.**

Агонист EC ₅₀	Среднее значение АТц (%), $\bar{X} \pm SD$	Min – Max	Левый (95% ДИ)	Правый (95% ДИ)
Адреналин	63,4±0,9 P=0,010	57,0-69,0	61,5	65,3
ТхА2	62,25±1,0	57,0-69,0	60,0	64,4
Коллаген	60,0±0,9 P<0,05	54,0-66,0	58,2	61,9
Ан-2	59,3±0,7 P<0,001	54,0-65,0	57,8	60,8
ФАТ	59,0±0,9 P<0,001	53,0-65,0	57,1	61,0
АДФ	58,0±0,9 P<0,001	53,0-65,0	56,2	59,9
АТФ	57,1±0,9 P<0,001	52,0-64,0	55,2	59,0
Аденозин	60,0±1,1	54,0-67,0	58,0	62,0

Примечание. P – вероятность различий агрегации Тц относительно эффекта Адреналина.

Не обнаружена корреляционная связь между количеством ТЛА и активностью GPVI-рецептора и АТ₁-рецептора. Наличие отрицательной связи между количеством ТЛА и активностью аденозинового А2А-рецептора ($r_{\text{ТЛА-А2А}} = -0,487$; $p < 0,05$) отражает участие данного типа рецепторов на Тц, лейкоцитах и эндотелии в механизмах, лимитирующих рекрутирование клеток крови из сосудистого русла в МВП.

Таким образом, формирование ТЛА регулируется системным регулятором воспалительной реакции – адреналином, локальными паракринными модуляторами функции клеток крови – АДФ, АТФ, ФАТ.

Наличие гиперреактивности α_2 -адренорецептора, пуриновых P2Y-рецепторов, P2X₁-рецепторов, и A2A-рецептора, ФАТ-рецептора. ТхA2-рецептора, а также связь активности указанных рецепторов с количеством ТЛА позволяет констатировать, что на этапе госпитализации обеспечивается рекрутирование лейкоцитов в ткани для реализации воспалительной реакции в МВП. При этом функционирует аденозинергическая система ограничения воспаления. Если судить по силе корреляционных связей, то ключевую роль в формировании ТЛА играют пуриновые P2Y-рецепторы, тогда как ФАТ-рецептор, α_2 -адренорецептор, P2X₁-рецептор и ТхA2-рецептор могут участвовать в ко-активации сигнальных путей, ассоциированных с Gi- и Gq-белками. Данная внутриклеточная сигнализация лежит в основе реакции клеток крови, обеспечивающей рекрутирование необходимого количества лейкоцитов для реализации воспалительной реакции в МВП.

7.2. Молекулярные механизмы развития пиелонефрита в течение первых суток после КЛТ при сохранении введения НПВП.

Гипотеза. Можно предположить, что компенсаторные реакции клеток крови в течение первых суток при прочих равных условиях претерпевают изменения, связанные с сохраняющимся влиянием механизмов регуляции перистальтики мочеточника при локализации конкрементов в средней трети мочеточника.

Цель исследования – изучить молекулярные механизмы регуляции компенсаторных реакций Тц и лейкоцитов в течение первых суток после КЛТ в средней трети мочеточника.

В течение 1-3ч после КЛТ на фоне введения НПВП количество ТЛА увеличилось на 13,0% ($P<0,05$), лейкоцитурия возросла на 37,7% ($P<0,001$) по сравнению с этапом госпитализации (Рисунок 7.1).

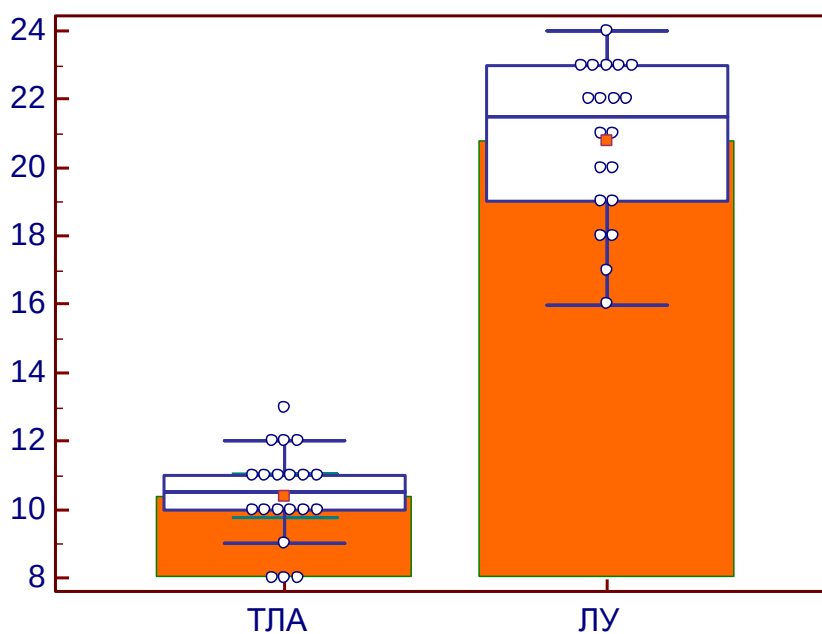


Рис. 7.1. Индикаторы воспалительной реакции через 1-3ч после КЛТ в средней трети мочеточника.

По оси ординат – значения индикаторов: количество циркулирующих ТЛА и количество лейкоцитов в моче (ЛУ); по оси абсцисс – название индикатора.

Через 24 ч после КЛТ количество ТЛА возросло -на 16,3% ($P<0,001$) и лейкоцитурия на 12,0% ($P<0,001$) по сравнению с предыдущим сроком наблюдения (Рисунок 7.2, 7.3). Следовательно, сохраняющееся ингибирование ЦОГ в Тц и лейкоцитах (а) не препятствовало их взаимодействию, а формирование ТЛА являлось результатом компенсаторной реакции клеток крови, принимающих участие в воспалительной реакции на фоне введения НПВП; (б) не сопровождалось ограничением лейкоцитурии. Необходимо отметить, что прирост лейкоцитурии, отражающий динамику развития воспаления в СО через 24ч после КЛТ, происходит одновременно с увеличением количества циркулирующих ТЛА. Можно предположить, что спектр регуляторов воспалительной реакции на фоне НПВП, преследует цель усиления защитной реакции в тканях МВП.

Через 1-3ч после КЛТ и введения НПВП выявлена гиперреактивность—ФАТ-рецептора, ТхА2-рецептора и АТ₁-рецептора (Таблица 7.2). Три рецептора (α_2 -адренорецептор, P2Y-рецепторы и А2А-рецептор) характеризовались нормореактивностью и оставшиеся два рецептора имели низкую активность (P2X₁-рецептор и GPVI-рецептор).

Таблица 7.2

**Индукцированная агрегация тромбоцитов через 1-3ч после КЛТ
в средней трети мочеточника**

Агонист (EC ₅₀)	Среднее значение АТц (%), $\bar{X} \pm SD$	Min –Max	Левый (95% ДИ)	Правый (95% ДИ)
ФАТ	64,8±0,9	59,0-71,0	62,9	66,7
ТхА2	58,1±0,8 P < 0,001	53,0-64,0	56,3	59,8
Ан-2	56,1±0,9 P < 0,001	51,0-64,0	54,1	58,1
Адреналин	50,8±1,3 P < 0,001	42,0-61,0	48,1	53,4
АДФ	47,2±0,6 P < 0,001	42,0-53,0	45,8	48,6
АТФ	44,2±1,2 P < 0,001	39,0-54,0	41,6	46,8
Коллаген	43,1±0,8 P < 0,001	38,0-50,0	41,4	44,8
Аденозин	49,3±0,5 P < 0,001	44,0-53,0	48,	50,4

Примечание. P – вероятность различий АТц относительно эффекта ФАТ

Таким образом, потенциальными индукторами активации клеток крови могут быть: провоспалительный липидный медиатор ФАТ, повышенная активность ЦОГ, обеспечивающая синтез ТхА2; ангиотензин -2, уровень которого повышается после КЛТ. По сравнению с предыдущим сроком наблюдения активность ФАТ-рецептора возросла на 9,8% (P<0,001).

Снизилась активность АТ₁-рецептора и ТхА2-рецептора, соответственно, на 5,6% и на 6,4% ($P<0,05$); пуриновых Р2Y-рецепторов, Р2X₁-рецептора и А2А-рецептора, соответственно на 19,6% ($P<0,001$), 22,6% ($P<0,001$) и 17,8% ($P<0,001$); α_2 -адренорецептора – на 19,9% ($P<0,001$) и GPVI-рецептор на 28,2% ($P<0,001$). Указанная динамика активности рецепторов отражает снижающееся влияние хирургического стресса и устранение обструкции мочеточника. Возвращаясь к концепции трансформации регуляции компенсаторной реакции клеток крови в ранние сроки после КЛТ можно констатировать (а) усиление роли ФАТ-рецептора в формировании ТЛА; (б) сохранение влияния ТхА2-рецептора и АТ₁-рецептора на функциональную активность Тц и лейкоцитов; (в) нивелирование стимуляции, связанной с GPVI-рецептором и Р2X₁-рецептором; (г) снижение активности А2А-рецептора, модулирующего взаимодействие клеток крови.

Через 1-3ч после КЛТ установлено сохранение сильной связи ТЛА с активностью ФАТ-рецептора ($r_{\text{ТЛА-ФАТ}}=0,671$; $p<0,05$), усиление связи между количеством ТЛА и активностью ТхА2-рецептора ($r_{\text{ТЛА-ТхА2}}=0,569$; $p<0,05$) и АТ₁-рецептора ($r_{\text{ТЛА-АТ1}}=0,525$; $p<0,05$), а также снижение зависимости от активности Р2Y-рецепторов ($r_{\text{ТЛА-Р2Y}}=0,488$; $p<0,05$). Поддерживалась отрицательная связь между количеством ТЛА и активностью аденозинового А2А-рецептора ($r_{\text{ТЛА-А2А}}=-0,457$; $p<0,05$). Обнаружена положительная связь между выраженностью лейкоцитурии, активностью ФАТ-рецептора ($r_{\text{ЛУ-ФАТ}}=0,712$; $p<0,05$) и α_2 -адренорецептора ($r_{\text{ЛУ-}\alpha_2\text{АР}}=0,522$; $p<0,05$). Таким образом, стимуляция ФАТ-рецептора (следствие активации лейкоцитов) является универсальным механизмом обеспечивающим формирование ТЛА и трафик лейкоцитов в слизистой МВП. Факторами риска усиления формирования ТЛА являлась стимуляция ТхА2-рецептора и АТ₁-рецептора, тогда как тяжесть лейкоцитурия зависила от активности α_2 -адренорецептора.

Через 24ч после КЛТ выявлена гиперреактивность–ФАТ-рецептора и α_2 -адренорецептора (Таблица 7.3). Остальные рецепторы (Р2X₁-рецептор,

P2Y-рецепторы, АТ₁-рецептор, ТхА2-рецептора GPVI-рецептор и А2А-рецептор) характеризовались нормореактивностью. Таким образом, потенциальными индукторами компенсаторной реакции клеток крови могут быть ФАТ и повышенный уровень катехоламинов через 24ч после КЛТ.

Таблица 7.3.

**Индукцированная агрегация тромбоцитов через 24ч после КЛТ
в средней трети мочеточника**

Агонист (EC ₅₀)	Среднее значение АТц (%), $\bar{X} \pm SD$	Min –Max	Левый (95% ДИ)	Правый (95% ДИ)
ФАТ	58,3±0,8	52,0-64,0	56,7	60,0
Адреналин	57,1±0,9	50,0-63,0	55,2	59,0
АДФ	54,3±0,8* P<0,001	48,0-60,0	52,7	55,9
АТФ	51,2±0,8** P<0,001	44,0-56,0	49,5	52,9
Ан-2	49,1±0,9 P<0,001	43,0-55,0	47,2	51,0
ТхА2	48,9±0,9	44,0-55,0	47,0	50,8
Коллаген	45,7±1,0* P<0,001	39,0-55,0	43,5	47,9
Аденозин	56,3±0,7	51,0-62,0	54,8	57,9

Примечание. P – вероятность различий АТц относительно эффекта ФАТ

По сравнению с предыдущим сроком наблюдения снизилась активность ФАТ-рецептора на 10,0% (P<0,001), АТ₁-рецептора и ТхА2-рецептора, соответственно, на 12,5% и 15,8% (P<0,05); активность GPVI-рецептора значимо не изменилась (p>0,05). Возросла активность пуриновых P2Y-рецепторов, P2X₁-рецептора и А2А-рецептора, соответственно на 15,0% (P<0,001), 15,8% (P<0,001) и 14,2% (P<0,001), а также α₂-адренорецептора – на 14,4% (P<0,001). Обращает на себя внимание, что через 24ч после КЛТ активность ТхА2-рецептора находилась в диапазоне нормореактивности.

Анализ множественной корреляции выявил сохранение сильной связи ТЛА с активностью ФАТ-рецептора ($r_{\text{ТЛА-ФАТ}}=0,559$; $p<0,05$) и α_2 -адренорецептора ($r_{\text{ТЛА-}\alpha_2\text{AP}}=0,531$; $p<0,05$); усиление связи количества ТЛА с активностью P2Y-рецепторов ($r_{\text{ТЛА-P2Y}}=0,694$; $p<0,05$). Поддерживалась отрицательная связь между количеством ТЛА и активностью аденозинового A2A-рецептора ($r_{\text{ТЛА-A2A}}=-0,503$; $p<0,05$). Обнаружена положительная связь между выраженностью лейкоцитурии и активностью P2X₁-рецептора ($r_{\text{ЛУ-P2X}}=0,485$; $p<0,05$); увеличивалась сила связи между лейкоцитурией и активностью α_2 -адренорецептора ($r_{\text{ЛУ-}\alpha_2\text{AP}}=0,618$; $p<0,05$); снижалась связь с активностью ФАТ-рецептора ($r_{\text{ЛУ-ФАТ}}=0,579$; $p<0,05$). Следовательно, в течение суток после КЛТ в средней трети мочеточника происходило изменение регуляции компенсаторных реакций клеток крови. Если через 1-3ч после КЛТ усиление формирования ТЛА регулировалось ФАТ-рецептором, ТхA2-рецептором, АТ₁-рецептором и P2Y-рецепторами, то через 24ч – ФАТ-рецептором, P2Y-рецепторами, и α_2 -адренорецептором. При взаимодействии Тц и лейкоцитов через 24ч после КЛТ нивелировалось влияние ТхA2-рецептора, АТ₁-рецептора и проявлялся эффект стимуляции α_2 -адренорецептора. Лейкоцитурия через 1-3ч после КЛТ регулировалась ФАТ-рецептором и α_2 -адренорецептором, через 24ч – ФАТ-рецептором, α_2 -адренорецептором и P2X₁-рецептором; усиление тяжести лейкоцитурии, модулировалось P2X₁-рецептором.

Таким образом, через 24ч после КЛТ в средней трети мочеточника при сохранении введения НПВП: (а) уменьшалась активность ЦОГ до уровня, обеспечивающего нормореактивность ТхA2-рецептора; (б) имела место гиперреактивность ФАТ-рецептора и α_2 -адренорецептора; нормореактивность P2X₁-рецептора, P2Y-рецепторов, АТ₁-рецептора, ТхA2-рецептора, GPVI-рецептор и A2A-рецептора; (в) регуляция компенсаторных реакций тромбоцитарного звена гемостаза с участием P2Y-рецепторов, α_2 -адренорецептора и ФАТ-рецептора ограничивала выраженность микрогематурии; (г) механизмы, обеспечивающие восстановление гемостаза

модулировали компенсаторные реакции лейкоцитов, направленные на реализацию защитной функции в МВП. Стереотипным механизмом регуляции ранней фазы компенсаторных реакций, обеспечивающих гемостаз, образование ТЛА и трафик лейкоцитов после КЛТ, являлась стимуляция ФАТ-рецептора и α_2 -адренорецептора; в реализации вариативного механизма формирования ТЛА участвовали P2Y-рецепторы, а в поддержании лейкоцитурии – P2X₁-рецептор.

7.3. Молекулярные механизмы поддержания пиелонефрита через 48ч после КЛТ.

Установлено, что в данный срок наблюдения макрогематурия прекращалась, а выраженность микрогематурии сохранялась на уровне средней степени выраженности (Рисунок 7.4). При этом, количество ТЛА уменьшилось на 7,4% ($p < 0,001$), а лейкоцитурия снизилась на 26,2% ($p < 0,001$) по сравнению с предыдущим сроком наблюдения. Следовательно, (а) потенциальные возможности компенсаторных реакций Тц, обеспечивающих восстановление гемостаза, не претерпевали значимых изменений при сохранении введения НПВП; (б) компенсаторные реакции лейкоцитов, направленные на формирование ТЛА и трафик лейкоцитов в стенке МВП, ограничивались, что может быть обусловлено ингибированием функциональной активности клеток крови. Поскольку тяжесть лейкоцитоза снижалась параллельно с уменьшением количества циркулирующих ТЛА, то можно предположить наличие стереотипных механизмов регуляции образования ТЛА и трафика лейкоцитов в тканях МВП.

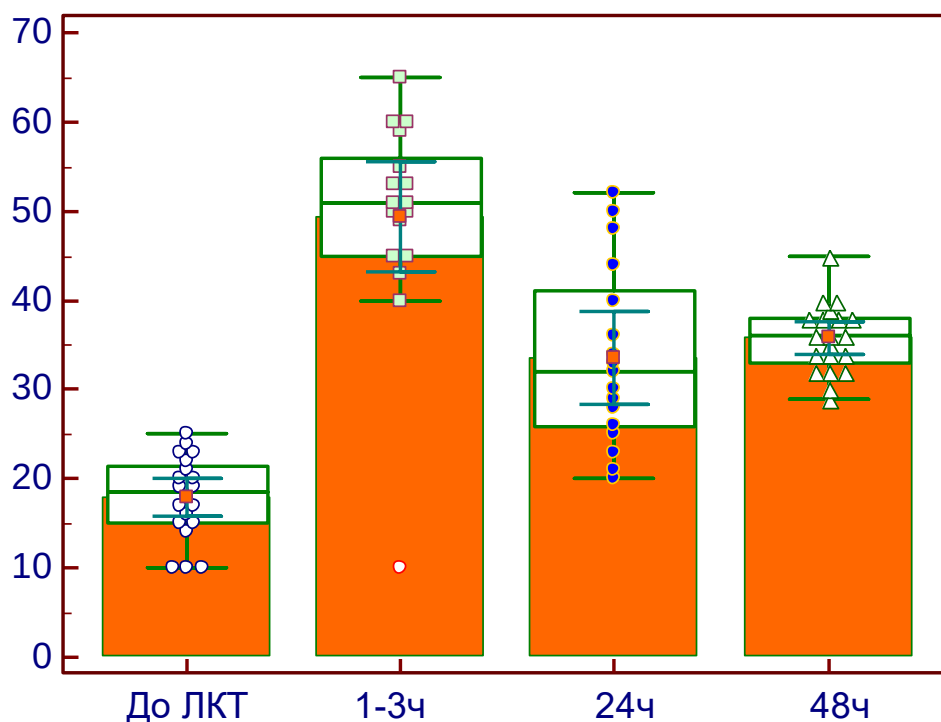


**Рис. 7.4. Динамика микрогематурии после КЛТ
в средней трети мочеточника.**

По оси ординат – количество эритроцитов в поле зрения (э/пз); по оси абсцисс – срок наблюдения.

Через 48ч после КЛТ выявлена гипореактивность ТхА2-рецептора; гиперреактивность– Р2У-рецепторов и А2А-рецептора; нормореактивность Р2Х1-рецептора, АТ1-рецептора, ФАТ-рецептора, GРVI-рецептора и α_2 -адренорецептора (Таблица 7.4). Таким образом, потенциальными модуляторами компенсаторных реакций клеток крови могут быть АДФ и аденозин, повышение внеклеточного уровня которых может быть следствием интенсификации метаболизма пуриновых нуклеотидов. По сравнению с предыдущим сроком наблюдения снизилась активность ТхА2-рецептора на 16,4% ($P<0,001$), ФАТ-рецептора на 10,5% ($P<0,001$) и α_2 -адренорецептора – на 17,0% ($P<0,001$). Возросла активность пуриновых Р2У-рецепторов, Р2Х1-рецептора и А2А-рецептора, соответственно на 5,0% ($P<0,05$), 6,1% ($P<0,05$) и 4,8% ($P<0,05$), АТ1-рецептора на 8,3% ($P<0,01$) и GРVI-рецептора на 9,6% ($P<0,001$).

Таблица 7.4.

**Индукцированная агрегация тромбоцитов через 48ч после КЛТ
в средней трети мочеточника**

Агонист EC ₅₀	Среднее значение АТц (%), $\bar{X} \pm SD$	Min –Max	Левый (95% ДИ)	Правый (95% ДИ)
АДФ	57,0±0,9	49,0-62,0	55,1	58,9
АТФ	54,3±1,0	48,0-62,0	52,2	56,5
Ан-2	53,2±0,9 P<0,001	45,0-60,0	50,4	54,3
ФАТ	52,2±0,9 P<0,001	47,0-59,0	50,4	54,0
Коллаген	50,1±0,8 P<0,001	44,0-56,0	48,5	51,8
Адреналин	47,4±1,2 P<0,001	39,0-55,0	45,0	49,8
ТхА2	40,9±0,8*** P<0,001	35,0-46,0	39,3	42,6
Аденозин	59,0±1,0	52,0-64,0	56,9	61,2

Примечание. P – вероятность различий АТц относительно эффекта АДФ

Следовательно, через 48ч после КЛТ активность ТхА2-рецептора находилась в диапазоне гипореактивности (Рисунок 7.5). Следствием ингибирования ЦОГ в клетках крови было снижение активности лейкоцитов, секретирующих провоспалительный медиатор – ФАТ; уменьшение активности α_2 -адренорецептора может быть обусловлено достижением оптимального анальгетического эффекта НПВП.

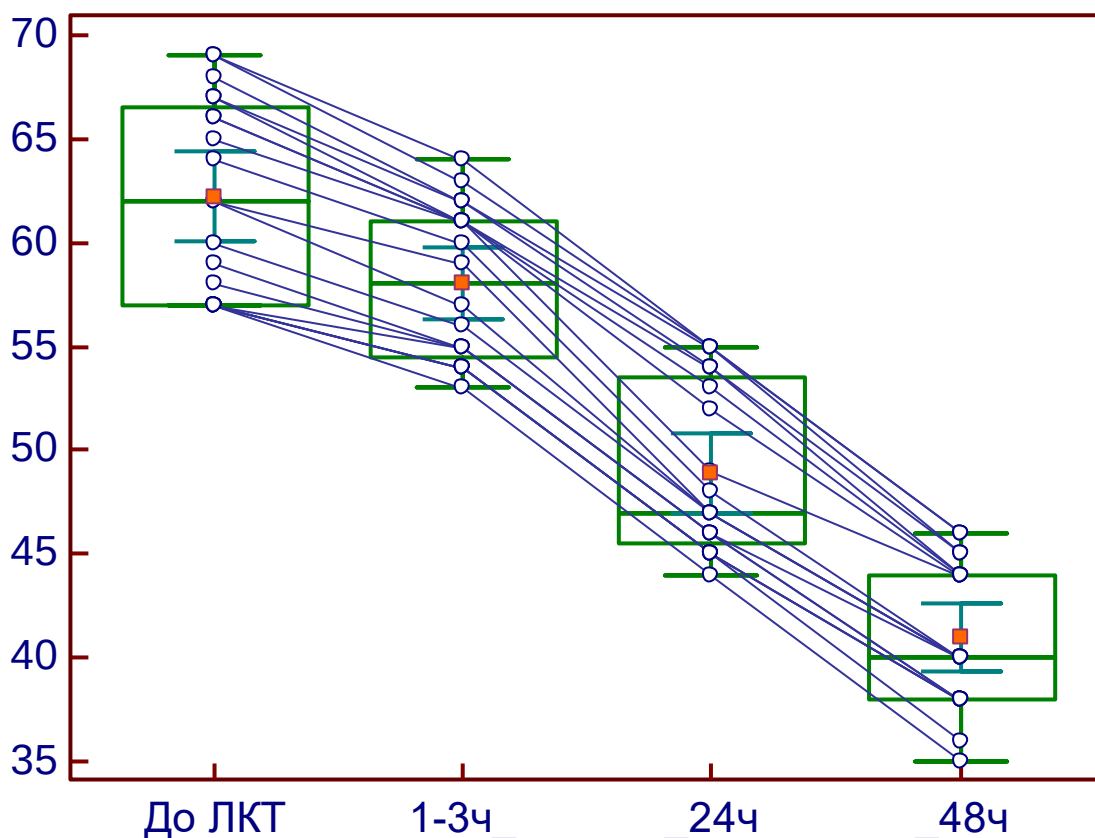


Рис. 7.5. Динамика реактивности ТхА2-рецептора тромбоцитов у пациентов с КЛТ в средней трети мочеточника.

По оси ординат – агрегация тромбоцитов (%); по оси абсцисс – срок наблюдения

Можно констатировать, что через 48ч после КЛТ на фоне введения НПВП достигалось существенное ингибирование ЦОГ, при котором снижалась функциональная активность Тц и лейкоцитов. В этом контексте, восстановление гемостаза и развитие воспаления являются следствием функционирования компенсаторных механизмов клеток крови.

Анализ множественной корреляции свидетельствует о сохранении положительной связи ТЛА с активностью ФАТ-рецептора ($r_{\text{ТЛА-ФАТ}}=0,643$; $p<0,05$), P2Y-рецепторов ($r_{\text{ТЛА-P2Y}}=0,682$; $p<0,05$), а также отрицательной связи между количеством ТЛА и активностью А2А-рецептора ($r_{\text{ТЛА-A2A}}=-0,511$; $p<0,05$).

Устранялась связь формирования ТЛА с активностью α_2 -адренорецептора, но проявлялась корреляция между количеством ТЛА и активностью AT_1 -рецептора ($r_{ТЛА-AT_1}=0,544$; $p<0,05$). Обнаружена положительная связь между выраженностью лейкоцитурии и активностью $GPVI$ -рецептора ($r_{ЛУ-GPVI}=0,521$; $p<0,05$); сохранялась связь трафика лейкоцитов с активностью α_2 -адренорецептора ($r_{ЛУ-\alpha_2AP}=0,673$; $p<0,05$) и $A2A$ -рецептора ($r_{ТЛА-A2A}=-0,605$; $p<0,05$). Следовательно, через 1-3ч и 24ч после КЛТ в средней трети мочеточника развитие воспаления обеспечивалось компенсаторными реакциями клеток крови. Стереотипный механизм регуляции формирования ТЛА в течение 48ч после КЛТ представлен сигнализацией $P2Y$ -рецептора и $ФАТ$ -рецептора; вариативные механизмы регуляции обеспечивались: через 1-3ч стимуляцией TxA_2 -рецептора и AT_1 -рецептора; через 24ч – α_2 -адренорецептора и через 48ч – AT_1 -рецептора. Стереотипным механизмом регуляции лейкоцитурии при ингибировании ЦОГ являлась активация α_2 -адренорецептора. Вариативные механизмы, модулирующие компенсаторные реакции лейкоцитов, связаны с активностью: $ФАТ$ -рецептора через 1-3ч; $ФАТ$ -рецептора и $P2X_1$ -рецептора через 24ч; $GPVI$ -рецептора и $A2A$ -рецептора через 48ч после КЛТ.

Таким образом, через 48ч после КЛТ в средней трети мочеточника на фоне введения НПВП:

(а) сохраняются компенсаторные реакции клеток крови, обеспечивающие поддержание воспалительной реакции в МВП. Ключевую роль в активации лейкоцитов и формировании ТЛА играет $ФАТ$ -рецептор, который при необходимости усиления воспалительной реакции может взаимодействовать с рецепторами, связанными с Gq -белком ($P2Y$ -рецепторами, AT_1 -рецептором). Выявленные различия в регуляции компенсаторных реакций клеток крови, поддерживающих воспаление и гемостаз при ингибировании ЦОГ, вероятно, связаны с конститутивными механизмами, обеспечивающими аутокринную стимуляцию Тц и лейкоцитов.

При агрегации Тц таким механизмом является стимуляция P2Y-рецепторов, обусловленная секрецией АДФ из плотных гранул; при активации лейкоцитов аутокринная стимуляция обеспечивается стимуляцией ФАТ-рецептора;

(б) стимуляция ФАТ-рецептора и P2Y-рецепторов является стереотипным механизмом увеличения количества ТЛА; вариативные механизмы, обеспечивающие рекрутирование лейкоцитов, формируются путем: изменения рецепторов взаимодействующих с ФАТ-рецептором или P2Y-рецепторами; через 24 ч – таковым является α_2 -адренорецептор, через 48ч – AT₁-рецептор.

(в) активация α_2 -адренорецептора являлась стереотипным механизмом регуляции трафика лейкоцитов в слизистой оболочке МВП при ингибировании ЦОГ. Модуляция компенсаторных реакций лейкоцитов, связана с активностью: ФАТ-рецептора через 1-3ч; ФАТ-рецептора и P2X₁-рецептора через 24ч; GPVI-рецептора и A2A-рецептора через 48ч после КЛТ.

Сопоставление механизмов регуляции компенсаторных реакций клеток крови после КЛТ в средней трети мочеточника позволило выявить следующие закономерности. Через 24ч регуляция компенсаторной реакции Тц, направленной на ограничение гематурии, связана с активностью P2Y-рецепторов, α_2 -адренорецептора и ФАТ-рецептора, через 48ч – с активностью P2Y-рецепторов и AT₁-рецептора. Можно констатировать, что после КЛТ сохраняется стереотипный механизм активации Тц, связанный со стимуляцией P2Y-рецепторов; внутриклеточная сигнализация P2Y-рецепторов может усиливаться благодаря синергии с α_2 -адренорецептором и ФАТ-рецептором (через 24ч) и AT₁-рецептора (через 48ч).

В регуляции компенсаторных реакций лейкоцитов и Тц, обеспечивающих формирование ТЛА через 24ч после КЛТ, ключевую роль играет сигнализация P2Y-рецепторов, α_2 -адренорецептора и ФАТ-рецептора; через 48ч стимуляция P2Y-рецепторов, AT₁-рецептора и ФАТ-рецептора

усиливала образование агрегатов, тогда как A2A-рецептор оказывал противоположный эффект.

Стереотипными механизмами, регулирующими формирование ТЛА, независимо от срока ингибирования ЦОГ являлась сигнализация P2Y-рецепторов и ФАТ-рецептора. Внутриклеточная сигнализация P2Y-рецепторов и ФАТ-рецептора, связанная с Gi- Gq-белками, может усиливаться благодаря синергии с α_2 -адренорецептором (через 24ч) и AT₁-рецептором (48ч). Компенсаторные реакции, обеспечивающие трафик лейкоцитов в слизистой МВП через 24ч, регулировались P2X₁-рецептором, α_2 -адренорецептором и ФАТ-рецептором; через 48ч – GPVI-рецептором, α_2 -адренорецептором и A2A-рецептором. Стереотипным механизмом, регулирующим трафик лейкоцитов являлась сигнализация связанная с α_2 -адренорецептором. Внутриклеточная сигнализация α_2 -адренорецептора может усиливаться вследствие синергии с P2X₁-рецептором и ФАТ-рецептором (через 24ч) и GPVI-рецептором (48ч) при компенсаторной реакции клеток крови.

Можно констатировать наличие дифференцированной регуляции компенсаторных реакций Тц и лейкоцитов на разных этапах реализации воспалительной реакции после КЛТ. По сути, можно выделить: (а) неспецифические механизмы регуляции формирования ТЛА, связанные с активацией P2Y-рецепторов (локальная регуляция) и AT₁-рецептора (системная регуляция); (б) специфические механизмы регуляции образования ТЛА, связанные с активацией ФАТ-рецептора и A2A-рецептора, которые функционируют при межклеточной кооперации Тц и лейкоцитов; (в) специфические механизмы, регулирующие трафик лейкоцитов в тканях МВП, которые связаны со стимуляцией GPVI-рецептора, α_2 -адренорецептора и A2A-рецептора на клетках крови. Активация аденозинового A2A-рецептора является компонентом регуляции компенсаторных реакций, ограничивающих активность клеток крови.

7.4. Молекулярные механизмы регуляции воспалительной реакции в МВП через 72ч после КЛТ при отмене НПВП.

Данная точка обследования приходится на 24ч после отмены НПВП и соответствует ранней фазе адаптационной реакции клеток крови, участвующих в воспалении при восстановлении активности ЦОГ в клетках крови. Установлено, что выраженность микрогематурии уменьшилась на 56,2% ($p<0,001$) и соответствовала средней степени выраженности (Рисунок 7.6).

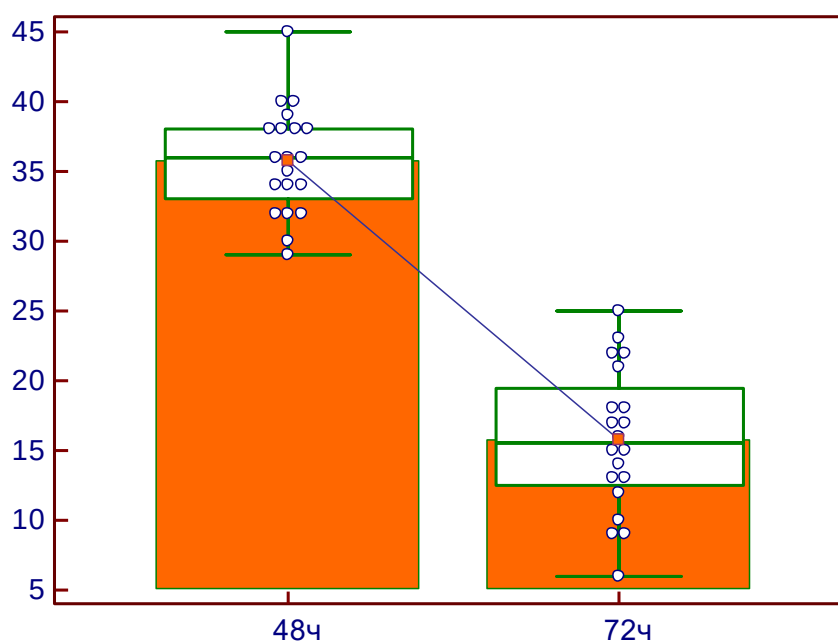
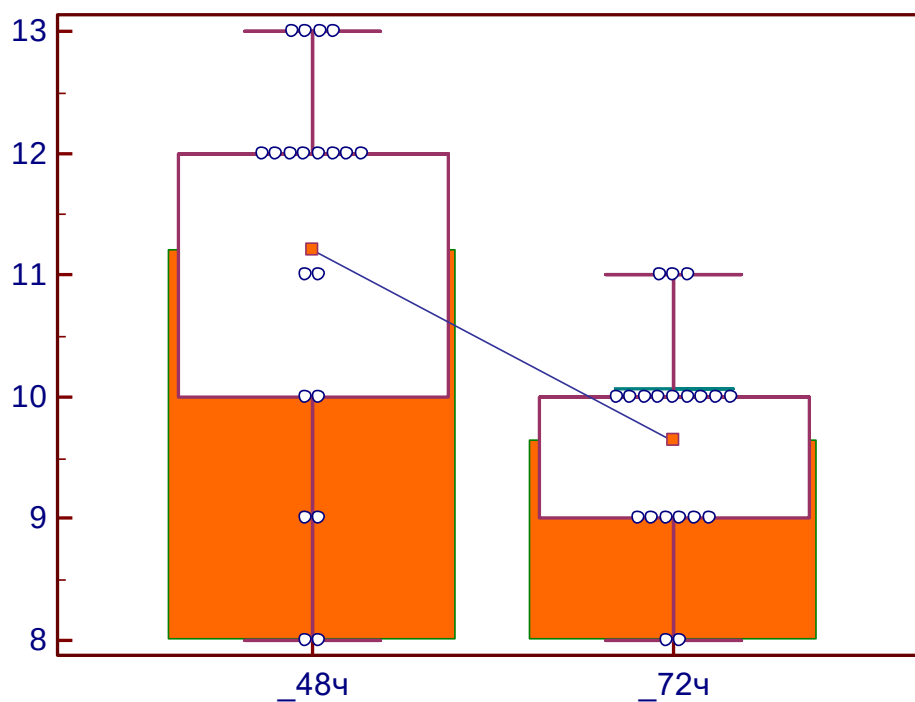


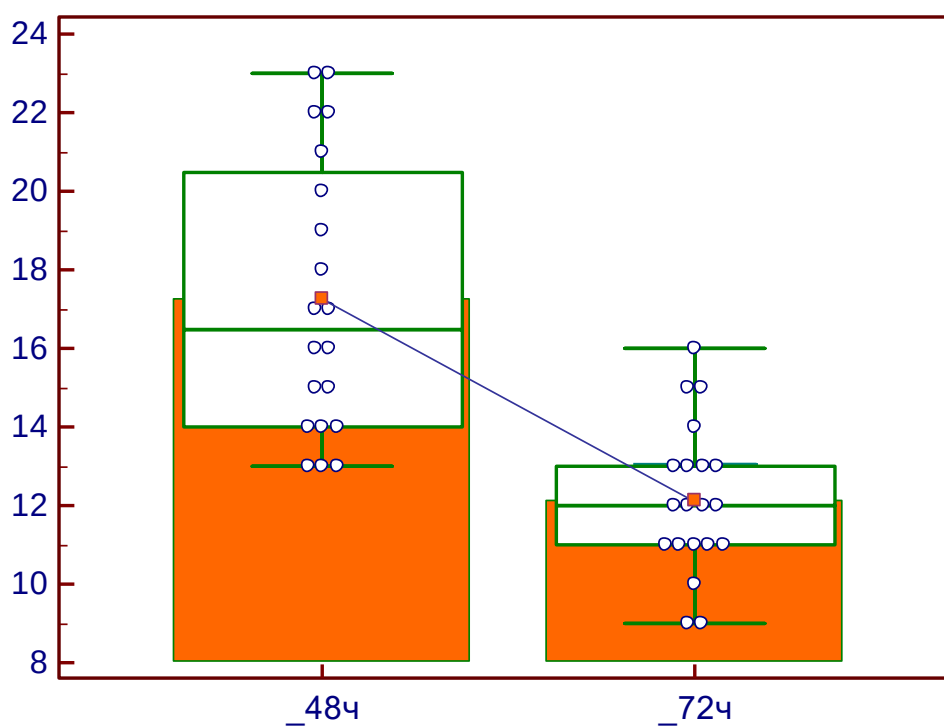
Рис. 7.6. Динамика микрогематурии после КЛТ при введении (48ч) и отмене НПВП (72ч).

По оси ординат – выраженность микрогематурии (э/пз); по оси абсцисс – срок наблюдения.

Количество ТЛА уменьшилось на 13,8% ($p<0,05$) по сравнению с предыдущим сроком наблюдения (Рисунок 7.7а), лейкоцитурия снизилась на 29,7% ($p<0,001$) по сравнению со сроком наблюдения 48ч и соответствовала легкой степени тяжести (Рисунок 7.7б)..



а



б

Рис.7.7. Динамика основных индикаторов воспалительной реакции у пациентов с КЛТ через 24ч после отмены НПВП.

По оси ординат: а-количество циркулирующих ТЛА (%); б– количество лейкоцитов в моче (п/з).

Процесс трафика лейкоцитов в стенке МВП развивался на фоне снижения количества циркулирующих ТЛА, что свидетельствует о синхронизации и эффективности ранней стадии адапционных процессов, призванных оптимизировать разные этапы воспалительной реакции в МВП. Таким образом, восстановление адапционных реакций Тц способствовало более эффективному восстановлению гемостаза, чем компенсаторные реакции, функционирующие при ингибировании ЦОГ; адапционные реакции клеток крови, обеспечивали формирование ТЛА на уровне необходимом для поддержания защитной функции лейкоцитов, однако тяжесть пиелонефрита снижалась, подтверждением чего может быть снижение выраженности лейкоцитурии.

Гипотеза. Можно предположить, что восстановление активности ЦОГ в клетках крови после КЛТ и отмены НПВП (а) способствует включению адапционных реакций Тц, позволяющих ограничить геморрагию и гематурию. (б) повышает функциональную активность лейкоцитов, следствием чего может быть усиление воспаления. Нельзя исключить, что адапционные реакции Тц при отмене НПВП являются более эффективными, чем компенсаторные реакции, функционирующие при назначении НПВП.

Для выяснения механизмов регуляции адапционных реакций организма, контролирующих развитие воспалительной реакции в МВП, исследовали функциональную активность рецепторов на клетках крови (Таблица 7.5). Через 72ч после КЛТ выявлена гиперреактивность α_2 -адренорецептора, ФАТ-рецептора, а также пуриновых P2X₁-рецептора, P2Y-рецепторов и A2A-рецептора; нормореактивность TxA₂-рецептора, AT₁-рецептора и GPVI-рецептора. Следовательно, формирование адапционных реакций клеток крови может быть следствием: активации САС; чрезмерной активации лейкоцитов; интенсификации пуринового метаболизма, направленной по повышению продукции аденозина. При этом нельзя

исключить участие Ан-2, коллагена IV типа и восстановления физиологической активности ЦОГ.

Таблица 7.5.

Активность рецепторов тромбоцитов у пациентов через 72ч после КЛТ в средней трети мочеточника при отмене введения НПВП.

Тип рецепторов	Среднее значение $\bar{X} \pm SD$	Min –Max	Левый (95% ДИ)	Правый (95% ДИ)
α_2 -адренорецептор	57,3 $\pm$ 0,6	53,0-62,0	56,1	58,5
ФАТ-рецептор	57,1 $\pm$ 0,8	50,0-61,0	55,4	58,8
P2X ₁ -рецептор	56,9 $\pm$ 0,9	50,0-63,0	54,9	59,0
P2Y-рецепторы	56,1 $\pm$ 0,8	50,0-62,0	54,5	57,8
AT ₁ -рецептор	54,5 $\pm$ 0,8 P<0,05	49,0-61,0	52,7	56,2
GP VI-рецептор	51,9 $\pm$ 1,1 P <0,001	44,0-60,0	49,7	50,1
TxA ₂ -рецептор	48,9 $\pm$ 0,6 P <0,001	45,0-55,0	47,7	50,1
A ₂ A-рецептор	58,1 $\pm$ 0,8	51,0-64,0	56,3	59,8

Примечание. P – вероятность различий АТц относительно эффекта α_2 -адренорецептора.

По сравнению с предыдущим сроком наблюдения повысилась активность α_2 -адренорецептора – на 20,9%% (P<0,001), ФАТ-рецептора на 9,4% (P<0,001), TxA₂-рецептора на 19,6%%(P<0,001); сохранилась активность P2X₁-рецептора, P2Y-рецепторов, A₂A-рецептора, AT₁-рецептора и GPVI-рецептора. Следовательно, через 72ч после КЛТ активность ЦОГ повышалась до физиологического уровня, при котором активность TxA₂-рецептора находилась в диапазоне нормореактивности. Следствием

восстановления активности ЦОГ в клетках крови было повышение активности лейкоцитов, секретирующих провоспалительный медиатор – ФАТ; увеличение активности α_2 -адренорецептора может быть обусловлено отменой анальгетического эффекта НПВП. Можно констатировать, что через 24ч после отмены НПВП (72ч после КЛТ) достигалось восстановление активности ЦОГ, при котором могла повышаться реактивность клеток крови на «возмущающие» воздействия связанные с особенностями ведения урологических пациентов в послеоперационном периоде. К таковым можно отнести: (а) наличие в просвете МВП стента и дренажей; трафик мелких фрагментов конкрементов; появление фибриновых тромбов и нарушение дренажа по мочеточнику, что провоцирует усиление афферентации по нервным окончаниям вегетативной нервной системы и активирует САС; (б) альтерацию клеток слизистой оболочки, которая сопровождается нарушением целостности гисто-гематического барьера и микробной инвазией рыхлой волокнистой соединительной ткани, что требует усиления неспецифической защиты в стенке мочеточника. В этом контексте, поддержание воспалительной реакции и ограничение микрогематурии являются следствием включения адаптационных реакций клеток крови.

Анализ множественной корреляции свидетельствует о появлении корреляционной связи между количеством ТЛА, активностью α_2 -адренорецептора ($r_{\text{ТЛА}-\alpha_2\text{AP}} = 0,453$; $p < 0,05$), P2X_1 -рецептора ($r_{\text{ТЛА}-\text{P2X}_1} = 0,574$; $p < 0,05$) и TxA_2 -рецептора ($r_{\text{ТЛА}-\text{TxA}_2} = 0,529$; $p < 0,05$); сохранялась положительная связь ТЛА с активностью ФАТ-рецептора ($r_{\text{ТЛА}-\text{ФАТ}} = 0,674$; $p < 0,05$). Обнаружена положительная связь между выраженностью лейкоцитурии и активностью ФАТ-рецептора ($r_{\text{ЛУ}-\text{ФАТ}} = 0,524$; $p < 0,05$), P2Y -рецепторов ($r_{\text{ЛУ}-\text{P2Y}} = 0,420$; $p < 0,05$); сохранялась связь трафика лейкоцитов с активностью α_2 -адренорецептора ($r_{\text{ЛУ}-\alpha_2\text{AP}} = 0,534$; $p < 0,05$) и A_2A -рецептора ($r_{\text{ЛУ}-\text{A}_2\text{A}} = -0,599$; $p < 0,05$). Следовательно, регуляция формирования ТЛА связана со стимуляцией α_2 -адренорецептора, P2X_1 -рецептора, TxA_2 -рецептора и ФАТ-рецептора; тогда как трафик лейкоцитов в стенке МВП

регулировался ФАТ-рецептором α_2 -адренорецептором, пуриновыми P2Y-рецепторами и A2A-рецептором.

Таким образом, через 72ч после КЛТ (24ч после отмены НПВП): (а) реализация адаптационных реакций тромбоцитарного звена гемостаза с участием α_2 -адренорецептора, ФАТ-рецептора и P2X₁-рецептора ограничивала выраженность микрогематурии; (в) увеличение количества ТЛА в крови связано с активностью α_2 -адренорецептора, P2X₁-рецептора, ФАТ-рецептора и TxA₂-рецептора; (в) выраженность лейкоцитурии связана с активностью ФАТ-рецептора, α_2 -адренорецептора, пуриновых P2Y-рецепторов и A2A-рецептора. Стереотипными механизмами регуляции адаптационных реакций клеток крови являлись стимуляция α_2 -адренорецептора и ФАТ-рецептора, поскольку достигалась оптимальная сопряженность путей сигнализации P2X₁-рецептора, P2Y-рецепторов и TxA₂-рецептора.

7.5. Молекулярные механизмы регуляции воспалительной реакции в МВП через 7 суток после КЛТ при отмене НПВП.

Данная точка обследования соответствует поздней фазе адаптационной реакции клеток крови, принимающих участие в воспалительной реакции. Через 7 суток после КЛТ выраженность микрогематурии снижалась на 71,3% ($p<0,001$) (Рисунок 7.8). При этом, количество ТЛА уменьшилось на 17,7% ($p<0,001$), а лейкоцитурия – на 25,6% ($p<0,001$) по сравнению с предыдущим сроком наблюдения. Через 7 суток после КЛТ сохранялась синхронное снижение лейкоцитурии и количества ТЛА (Рисунок 7.9а,б). Таким образом, (адаптационные реакции Тц обеспечивали более эффективное восстановление гемостаза, по сравнению со сроком наблюдения 72ч после КЛТ; реакции клеток крови, обеспечивали формирование ТЛА для поддержания защитной функции лейкоцитов; при этом развитие

воспалительной реакции в МВП ограничивалось, подтверждением чего может быть снижение лейкоцитурии.

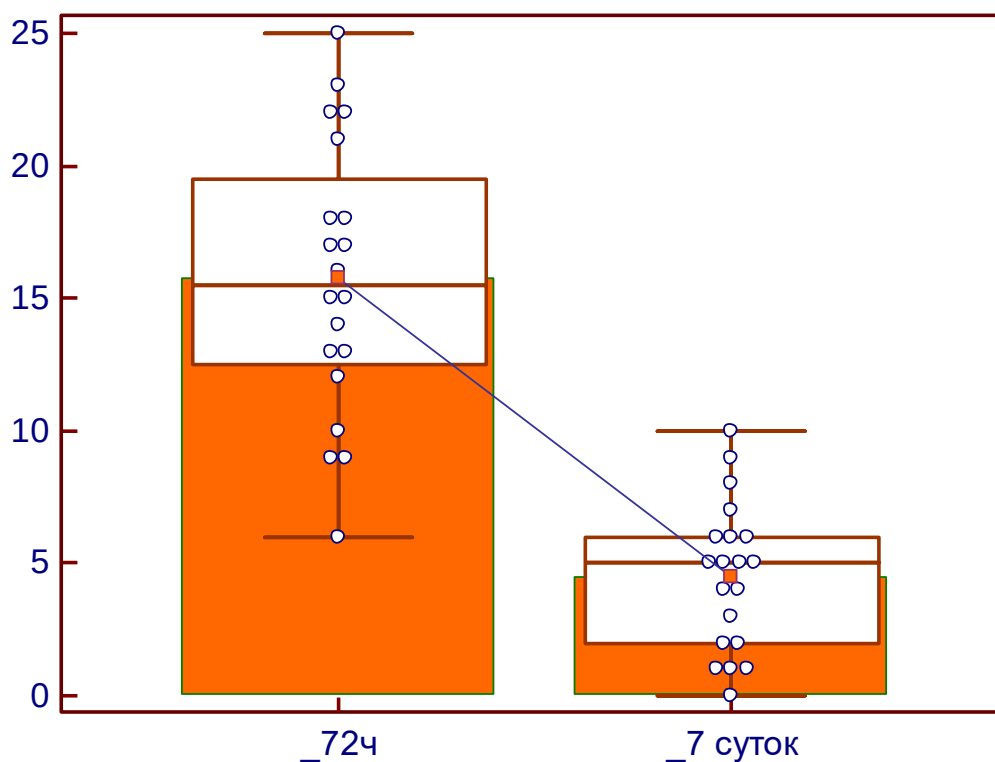
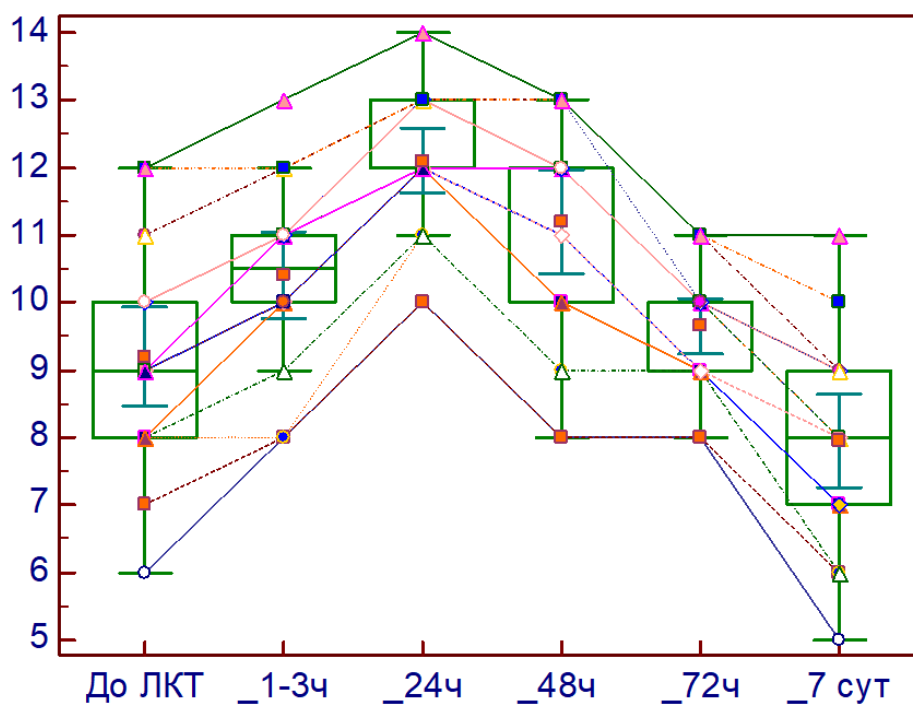


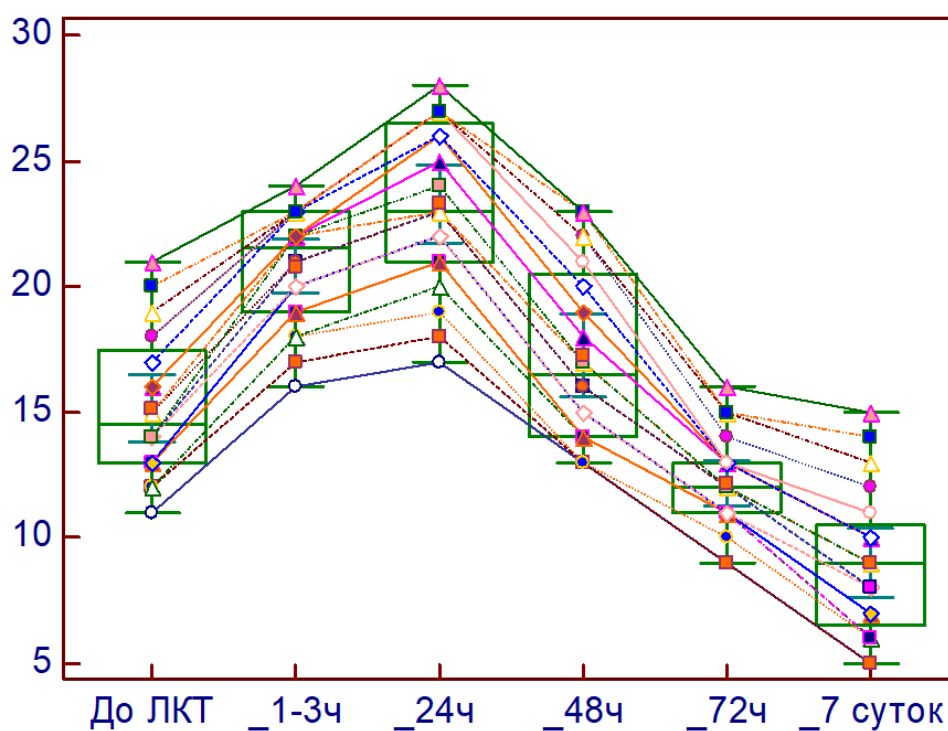
Рис. 7.8. Динамика микрогематурии тромбоцитов у пациентов с КЛТ через 120ч после отмены НПВП.

По оси ординат – выраженность микрогематурии (э/пз); по оси абсцисс – срок наблюдения.

Гипотеза. Можно предположить, что репаративные процессы в слизистой оболочке МВП и ограничение микробной инвазии через 7 суток после КЛТ сопровождаются снижением потребности в активированных лейкоцитах, которые рекрутируются из сосудистого русла в ткани МВП. В тоже время поддержание воспалительной реакции может влиять на восстановление структуры уротелия и ремоделирование слизистой оболочки МВП. Для выяснения механизмов, контролирующих развитие воспалительной реакции исследовали функциональную активность рецепторов на клетках крови.



а



б

Рис. 7.9. Динамика циркулирующих ТЛА и лейкоцитурии после КЛТ в средней трети мочеточника.

По оси ординат а – количество ТЛА (%); б-количество лейкоцитов в моче (п/з); по оси абсцисс – срок наблюдения.

Через 7 суток после КЛТ выявлена гиперреактивность пуриновых P2X₁-рецептора, P2Y-рецепторов и A2A-рецептора; а также нормореактивность GPVI-рецептора, AT₁-рецептора TxA2-рецептора, α₂-адренорецептора, ФАТ-рецептора (Таблица 7.6). Таким образом, адаптационные реакции клеток крови модулируются АТФ, АДФ и аденозином, повышение внеклеточного содержания которых может быть следствием интенсификации пуринового метаболизма на этапе репарации слизистой оболочки МВП.

Таблица 7.6.

**Функциональная активность рецепторов тромбоцитов у пациентов
через 7 суток после КЛТ в средней трети мочеточника.**

Тип рецепторов	Среднее значение $\bar{x} \pm SD$	Min – Max	Левый (95% ДИ)	Правый (95% ДИ)
P2Y-рецепторы	59,4±1,1	50,0-67,0	57,0	61,8
P2X ₁ -рецептор	59,2±0,5	56,0-64,0	58,1	60,3
GP VI-рецептор	55,9±0,6 P <0,05	50,0-61,0	54,7	59,7
AT ₁ -рецептор	55,4±1,0 P <0,05	49,0-62,0	53,2	57,6
TxA2	49,9±1,2 P <0,001	43,0-60,0	47,5	52,4
α ₂ -адренорецептор	48,9±0,8 P <0,001	43,0-55,0	47,2	50,6
ФАТ-рецептор	48,3±1,1 P <0,001	38,0-60,0	45,9	50,8
A2A-рецептор	60,6±0,8	56,0-67,0	58,9	62,3

Примечание. P – вероятность различий активности рецептора относительно активности P2Y-рецепторов.

Обращает на себя внимание индивидуальная вариабельность реактивности пуриновых P2-рецепторов после отмены НПВП (Рисунок 7.10).

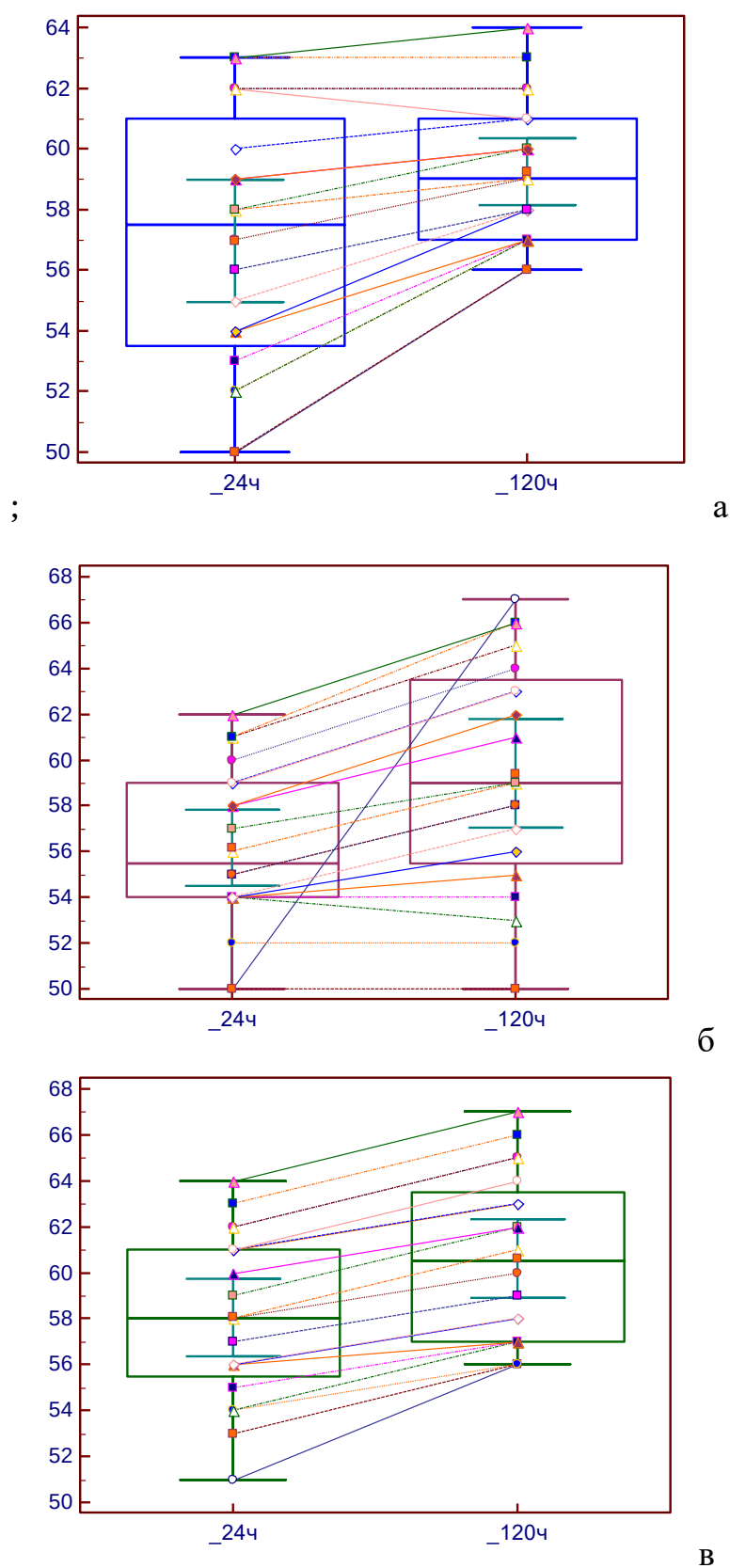


Рис.7.10. Индивидуальная реактивность пуриновых P2-рецепторов после отмены НПВП

По оси ординат агрегация Тц индуцированная: а –АТФ; б–АДФ; в– аденозином (%); по оси абсцисс – срок наблюдения

Доказано, что баланс нуклеотидов/нуклеозидов управляет гомеостазом органов и репарацией тканей, регулируя взаимодействие между резидентными и привлеченными иммунными клетками [380]. Учитывая нормореактивность GPVI-рецептора, AT_1 -рецептора TxA_2 -рецептора, α_2 -адренорецептора, ФАТ-рецептора, нельзя исключить их участие в регуляции адаптационных реакций Тц и лейкоцитов. По сравнению с предыдущим сроком наблюдения, повысилась активность P2Y-рецепторов на 5,9% ($P<0,05$), P2X₁-рецептора – на 4,0% ($P<0,05$) и A2A-рецептора – на 4,3% ($P<0,05$), GPVI-рецептора – на 7,7% ($P=0,003$); сохранилась активность AT_1 -рецептора и TxA_2 -рецептора ($p>0,05$); снизилась активность α_2 -адренорецептора на 14,7% ($P<0,001$) и ФАТ-рецептора на 15,4% ($P<0,001$).

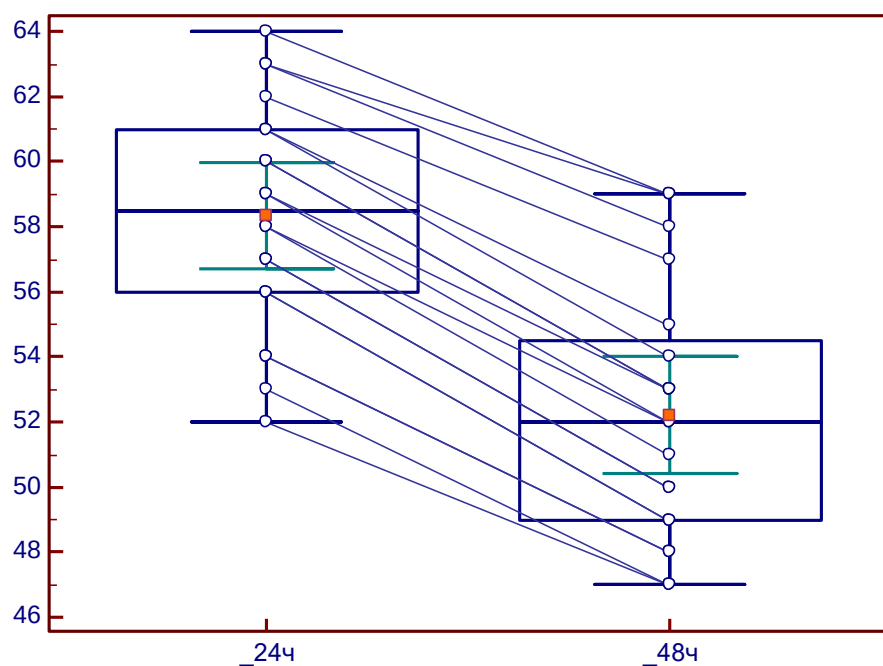
Анализ множественной корреляции позволил выявить положительную корреляционную связь между количеством ТЛА и активностью P2Y-рецепторов ($r_{ТЛА-P2Y}=0,656$; $p<0,05$), GPVI-рецептора ($r_{ТЛА-GPVI}=0,469$; $p<0,05$), а также – отрицательную связь с активностью A2A-рецептора ($r_{ТЛА-A2A}=-0,713$; $p<0,05$). Сохранялась положительная связь количества ТЛА с активностью P2X₁-рецептора ($r_{ТЛА-P2X1}=0,574$; $p<0,05$) и ФАТ-рецептора ($r_{ТЛА-ФАТ}=0,453$; $p<0,05$). Обнаружена положительная связь между выраженностью лейкоцитурии и активностью P2X₁-рецептора ($r_{ЛУ-P2X1}=0,605$; $p<0,05$); сохранялась связь трафика лейкоцитов с активностью TxA_2 -рецептора ($r_{ЛУ-TxA2}=0,386$; $p<0,05$). Следовательно, через 7 суток после КЛТ в средней трети мочеточника: (а) репаративные процессы в слизистой МВП развивались на фоне интенсификации пуринового метаболизма, отражением чего может быть гиперреактивность пуриновых P2X₁-рецептора, P2Y-рецепторов и A2A-рецептора; (б) снижение выраженности микрогематурии обусловлено адаптационными реакциями Тц, которые регулируются посредством P2Y-рецепторов, P2X₁-рецептора и GPVI-рецептора (в) адаптационные реакции клеток крови на этапе формирования ТЛА и рекрутирования лейкоцитов регулировались пуриновыми P2Y-рецепторами и P2X₁-рецептором, ФАТ-рецептором и GPVI-рецептором; тогда как на этапе трафика лейкоцитов в

стенке МВП – P2X₁-рецептором и TxA₂-рецептором; (г) ограничение воспалительной реакции модулировалось A₂A-рецептором и связано с уменьшением количества циркулирующих ТЛА. Стереотипные механизмы регуляции адапционных реакций Тц и лейкоцитов связаны со стимуляцией P2Y-рецепторов, P2X₁-рецептора и GPVI-рецептора. Кластер данных рецепторов может повышать уровень внутриклеточного Ca²⁺ в результате сопряженности сигнальных путей, связанных с активацией ФИ-3К через Gi-, Gq-, G₁₃-белки и открытия управляемого АТФ катионного канала. Вариативным механизмом увеличения количества ТЛА может быть активация ФАТ-рецептора (вследствие сопряженности путей сигнализации, связанных с Gq-белком), а усиления лейкоцитурии – стимуляция TxA₂-рецептора (ко-активация сигнальных путей, связанных с Gq-белком и G₁₃-белком).

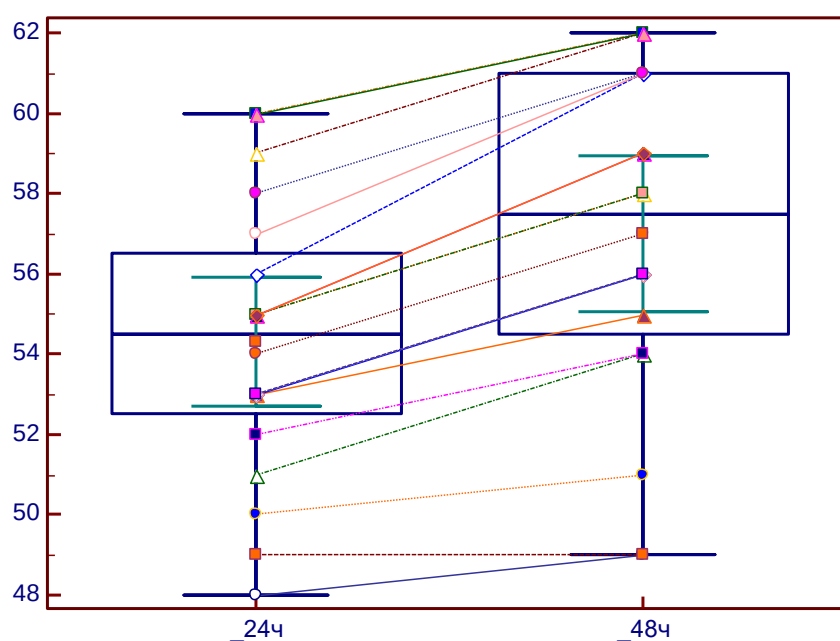
Следовательно, через 7 суток после КЛТ в средней трети мочеточника проявлялись особенности регуляции компенсаторных и адапционных реакций клеток крови. Развитие острого пиелонефрита после КЛТ

(а) связано с нарушением барьерной функции уротелия (незавершенная дифференцировка многослойного переходного эпителия) и поддерживающейся микробной инвазией слизистой МВП;

(б) зависит от активности ЦОГ, при этом компенсаторные реакции, поддерживающие функциональную активность клеток крови, могут быть фактором риска развития острой воспалительной реакции в стенке мочеточника. При ингибировании ЦОГ стимуляция ФАТ-рецептора и P2Y-рецепторов является стереотипным механизмом увеличения количества ТЛА. Разнонаправленная реактивность указанных рецепторов, вероятно, отражает оптимизацию внутриклеточной сигнализации в клетках крови (Рисунок 7.11). Так, если через 48ч после КЛТ активность ФАТ-рецептора снижалась на 5,3% (P<0,001), то P2Y-рецепторов повышалась на 5,0% (P=0,030) по сравнению со сроком наблюдения через 24ч после КЛТ.



а



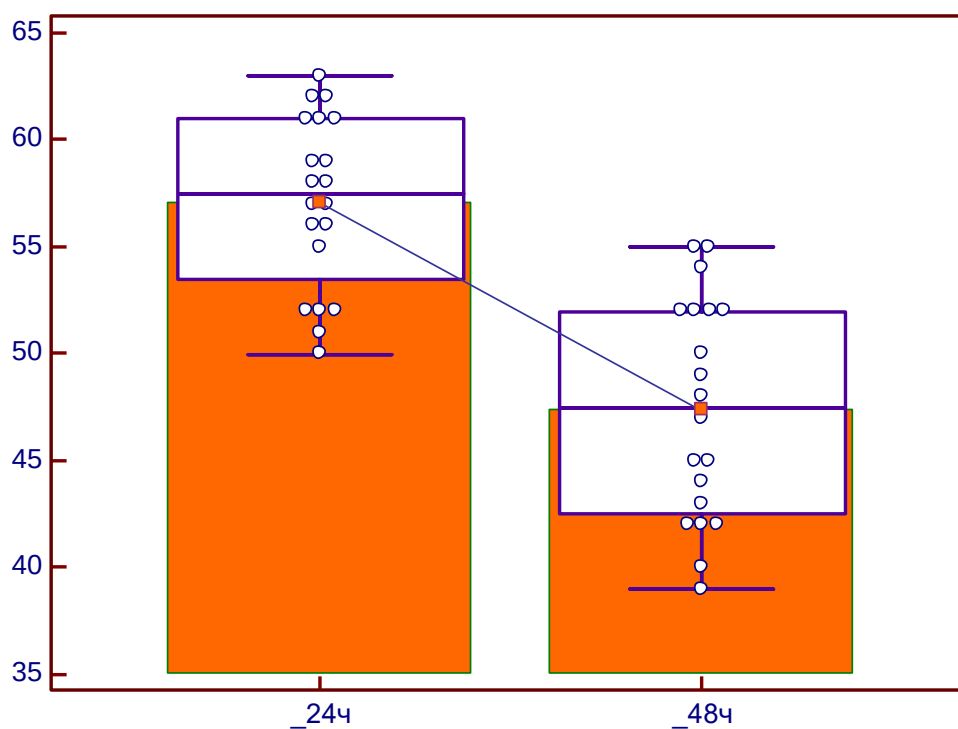
б

Рис.7.11. Динамика активности ФАТ-рецептора (а) и РУ-рецепторов (б) через 24ч и 48ч после КЛТ при сохранении введения НПВП.

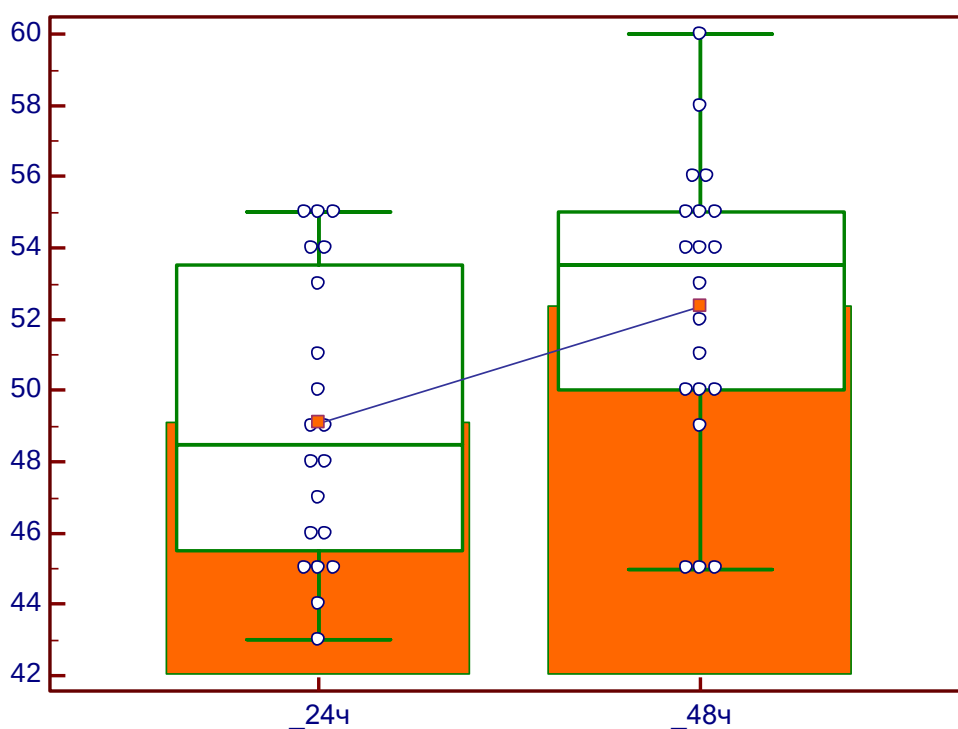
По оси ординат: а- АТц индуцированная агонистами (%); б– срок наблюдения.

Подтверждением оптимизации внутриклеточной сигнализации при компенсаторных реакциях клеток крови является наличие вариативных (дополнительных) механизмов регуляции. Установлено, что рекрутирование и трафик лейкоцитов в стенке МВП связаны с активностью α_2 -адренорецептора, AT_1 -рецептора, $P2X_1$ -рецептора, $GPVI$ -рецептор и $A2A$ -рецептора. Через 48ч после КЛТ активность α_2 -адренорецептора снижалась на 17,0% ($P<0,001$), а AT_1 -рецептора повышалась на 6,5% ($P=0,018$) по сравнению со сроком наблюдения 24ч (Рисунок 7.12). Кажущаяся парадоксальность динамики активности рецепторов объясняется сохранением нормореактивности $P2X_1$ -рецептора, AT_1 -рецептора, ФАТ-рецептора, $GPVI$ -рецептора и α_2 -адренорецептора, позволяющей достигать оптимальной сопряженности путей сигнализации. Наличие вариативных механизмов регуляции компенсаторных механизмов объясняется возможностью достижения сопряженности сигнальных путей;

(в) *модулируется* стереотипными (стимуляция α_2 -адренорецептора и ФАТ-рецептора) и вариативными механизмами (стимуляция TxA_2 -рецептора, α_2 -адренорецептора, $P2Y$ -рецептора и $A2A$ -рецептора), характерными для ранней фазы адаптационных реакций клеток крови после отмены НПВП. Обращает на себя внимание повышение активности α_2 -адренорецептора и ФАТ-рецептора при переходе от компенсаторной реакции (48ч назначения НПВП) к ранней фазе адаптационной реакции клеток крови (24ч после отмены НПВП) (Рисунок 7.13). При восстановлении активности ЦОГ стереотипным механизмом регуляции адаптационной реакции, обеспечивающей формирование ТЛА и рекрутирование лейкоцитов, является стимуляция $P2X_1$ -рецептора; вариативные механизмы – представлены $P2Y$ -рецепторами, ФАТ-рецептором, TxA_2 -рецептором, $GPVI$ -рецептором и $A2A$ -рецептором. Обращает на себя внимание повышение активности $P2X_1$ -рецептора при переходе от ранней (72ч) к поздней фазе (7 суток) адаптационной реакции клеток крови после отмены НПВП, притом, что имеется исходная гиперреактивность данного рецептора (Рисунок. 7.14).



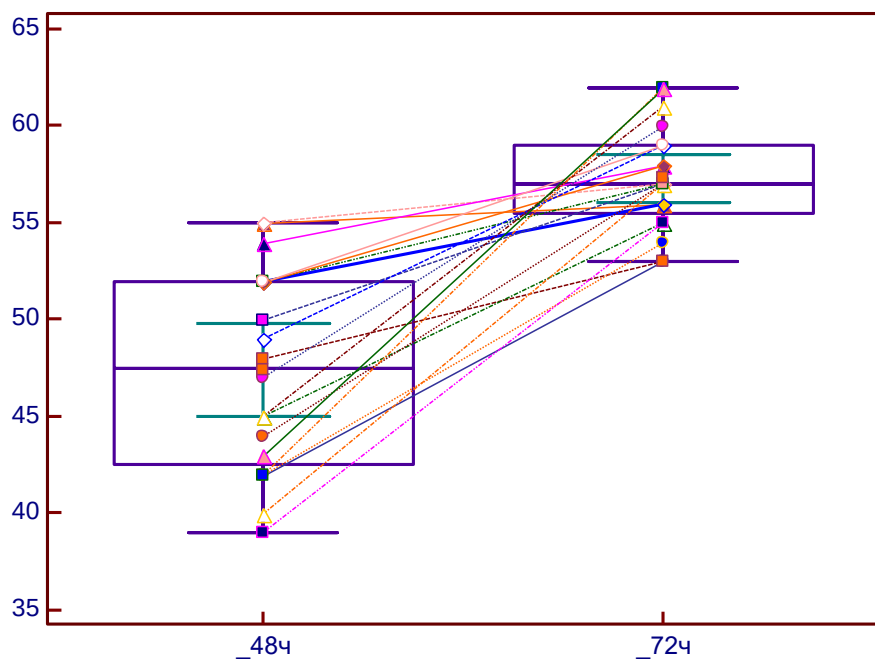
а



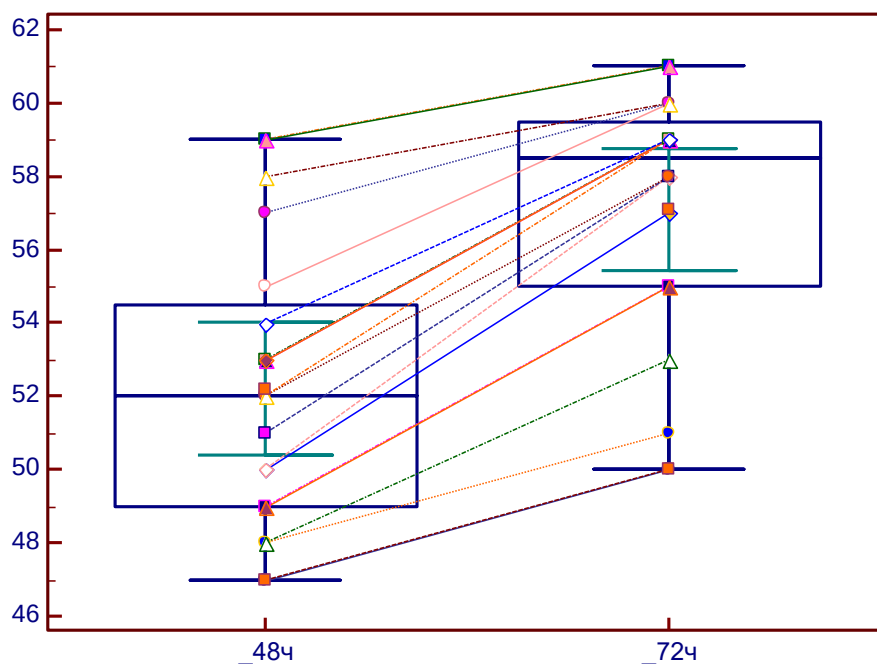
б

Рис.7.12. Динамика активности α_2 -адренорецептора (а) и AT_1 -рецептора (б) в ранней (24ч) и поздней (48ч) фазах компенсаторных реакций клеток крови у пациентов с КЛТ при назначении НПВП.

По оси ординат: а- АТц индуцированная агонистами (%); б– срок наблюдения.



а



б

Рис.7.13. Динамика активности α_2 -адренорецептора (а) и ФАТ-рецептора (б) в поздней (48ч) фазе компенсаторных реакций и ранней (72ч) фазе адаптационных реакций клеток крови у пациентов с КЛТ выполненной без предварительной ЛКТ.

По оси ординат: а- АТц индуцированная агонистами (%); б– срок наблюдения.

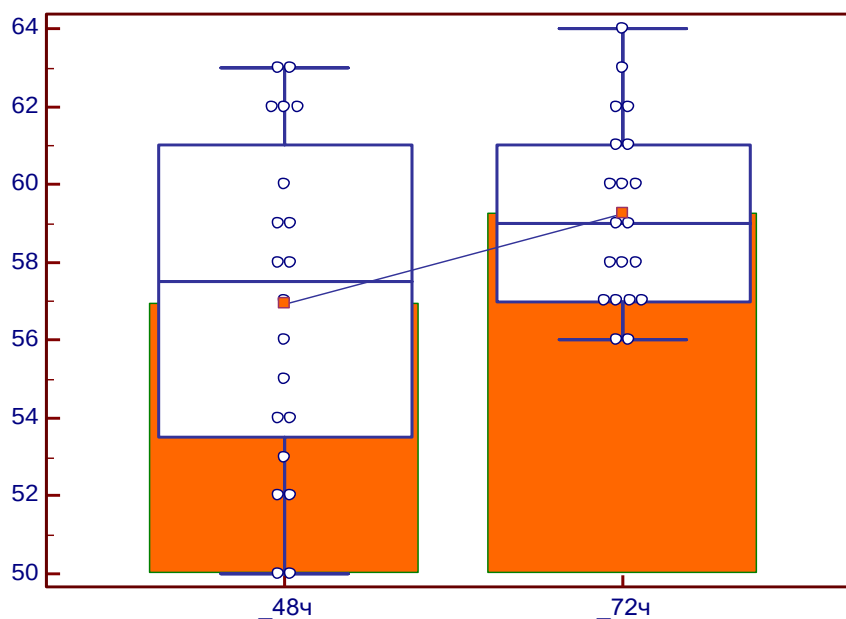
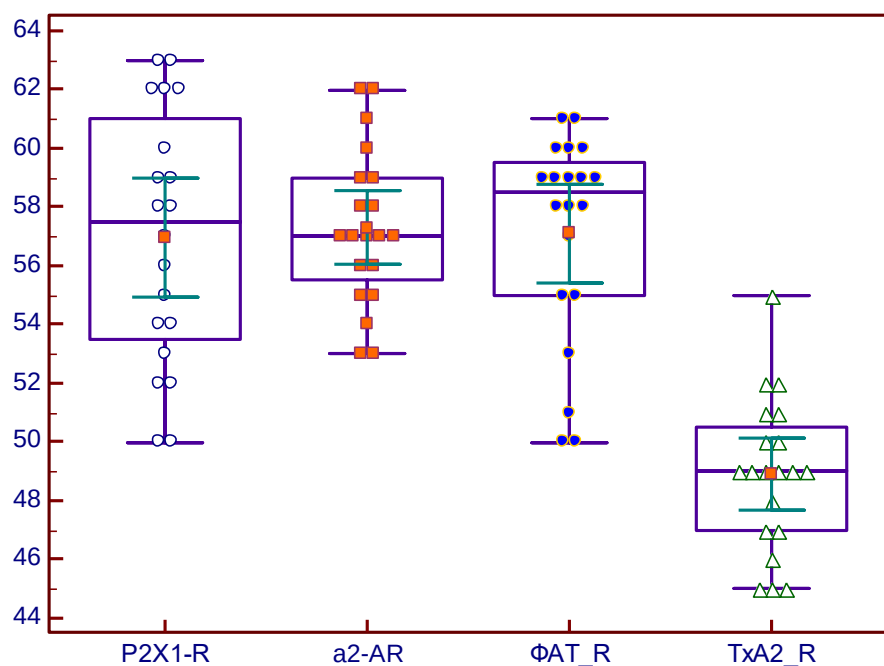


Рис.7.14. Динамика активности P2X₁- рецептора в ранней (72ч) и поздней (7 суток) фазах адапционных реакций клеток крови у пациентов после КЛТ при отмене НПВП.

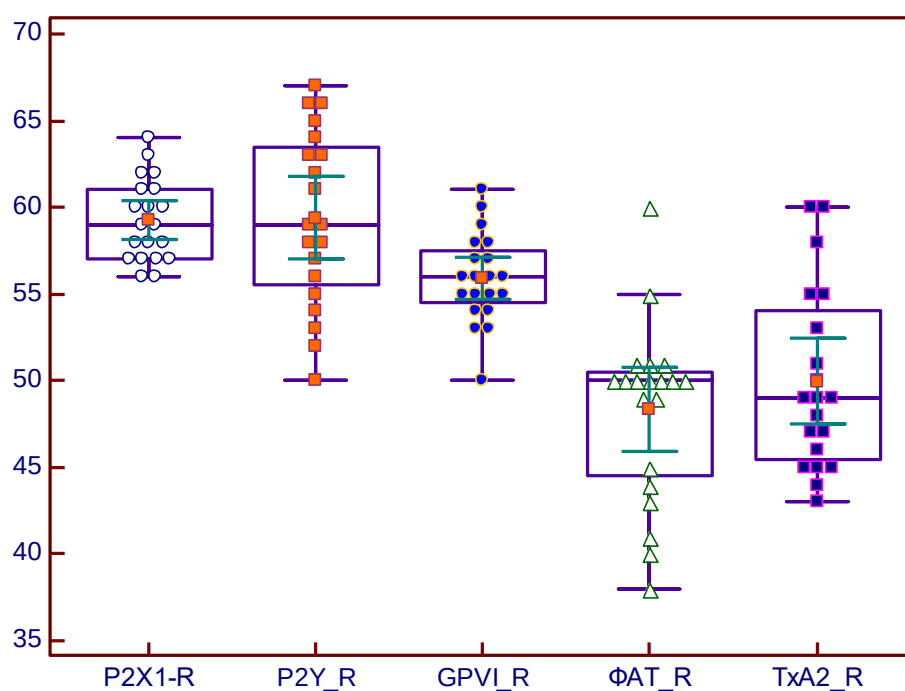
По оси ординат: а- АТц индуцированная агонистами (%); б– срок наблюдения.

Таким образом, если регуляция ранней фазы адапционной реакции Тц, направленной на ограничение гематурии, связана с α_2 -адренорецептора, ФАТ-рецептора и ТхА2-рецептора, то в поздней фазе – с активностью GPVI – рецептора, P2Y-рецепторов и P2X₁-рецептора. Можно констатировать, что в процессе развития адапционной реакции совершенствуется механизм регуляции функции Тц, поскольку воспроизводится сопряженность базовой сигнализации в Тц, ассоциированной с участком Syk-ФИ-3К – ФИ-3К-фосфолипазаС (GPVI-рецептор), пуринергической сигнализации, связанной с Gi- и Gq-белками (P2Y-рецепторы) и работой ионного канала (P2X₁-рецептор). В регуляции ранней фазы адапционных реакций лейкоцитов и Тц, обеспечивающих формирование ТЛА, ключевую роль играет сигнализация связанная с со стимуляцией P2X₁-рецептора, α_2 -адренорецептора, ФАТ-рецептора и ТхА2-рецептора; в поздней фазе– стимуляция пуриновых P2Y-рецепторов и P2X₁-рецептора, а также GPVI-рецептора и ФАТ-рецептора. Внутриклеточная сигнализация А2А-рецептора

оказывал ингибирующий эффект на взаимодействие Тц и лейкоцитов. Следовательно, стереотипными механизмами, регулирующими формирование ТЛА, в процессе адаптационной реакции является сигнализация P2X₁-рецептора и ФАТ-рецептора. Внутриклеточная сигнализация P2X₁-рецептора, связанная с работой управляемого АТФ ионного канала и ФАТ-рецептора, связанная с Gq-белком может усиливаться благодаря синергии с α_2 -адренорецептором и ТхА2-рецептором (в ранней фазе) и GPVI-рецептора (в поздней фазе) адаптационной реакции клеток крови. Ранняя фаза адаптационных реакций, обеспечивающих трафик лейкоцитов в слизистой МВП, регулируется активностью ФАТ-рецептора, P2Y-рецепторов, α_2 -адренорецептора и А2А-рецептора; в поздней – P2X₁-рецепторов и ТхА2-рецептора. Вероятно, в процессе развития компенсаторной реакции лейкоцитов совершенствуется механизм регуляции, поскольку воспроизводится сопряженность путей сигнализации при открытии ионного АТФ-зависимого канала (P2X₁-рецептор) и сигнализации, связанной с G₁₃- и Gq-белками (ТхА2-рецептор). Суммируя приведенные данные можно выявить закономерности регуляции ранней фазы адаптационной реакции клеток крови в сосудистом русле и тканях МВП (Рисунок 8.10а). Так, (а) механизмы активации Тц, ограничивающие гематурию, реализуются посредством P2X₁-рецептора, α_2 -адренорецептора, ФАТ-рецептора и ТхА2-рецептора; (б) формирование ТЛА и активация лейкоцитов обеспечивается механизмами, ассоциированными с P2X₁-рецептора, α_2 -адренорецептора, ФАТ-рецептора и ТхА2-рецептора; (в) трафик лейкоцитов в стенке МВП (лейкоцитурия) осуществляется механизмами с участием ФАТ-рецептора, P2Y-рецепторов, α_2 -адренорецептора и А2А-рецептора. Следовательно, регуляция ранней фазы адаптационных реакций клеток крови после отмены НПВП обеспечивается общими механизмами, в основе которых лежит сигнализация связанная с активацией P2X₁-рецептора, α_2 -адренорецептора, ФАТ-рецептора и ТхА2-рецептора.



а



б

Рис. 8.10. Реактивность рецепторов, регулирующих раннюю (а) и позднюю (б) фазу адаптационных реакций клеток крови после КЛТ и отмены НПВП .

По оси ординат – агрегация тромбоцитов (%); по оси абсцисс – рецепторы.

В тканях МВП регуляция трафика лейкоцитов через гистогематический барьер осуществляется посредством ФАТ-рецептора, P2Y-рецепторов, α_2 -адренорецептора и A2A-рецептора. Появление сигнализации в лейкоцитах, связанной с активацией P2Y-рецепторов и A2A-рецептора позволяет наметить мишени для таргетной терапии при развитии острого пиелонефрита после КЛТ. Выявлены следующие закономерности регуляции поздней фазы компенсаторных реакций клеток крови после отмены НПВП, которые осуществляются как в сосудистом русле, так и в тканях МВП (Рисунок 8.10б): (а) механизмы активации Тц, ограничивающие гематурию, реализуются посредством GPVI –рецептора, P2Y-рецепторов и P2X₁-рецептора; (б) формирование ТЛА и активация лейкоцитов обеспечивается стимуляцией P2Y-рецепторов и P2X₁-рецептора, а также GPVI-рецептора и ФАТ-рецептора; (в) трафик лейкоцитов в стенке МВП (лейкоцитурия) осуществляется механизмами с участием P2X₁-рецепторов и TxA2-рецептора. Можно констатировать наличие дифференцированной регуляции компенсаторных реакций Тц и лейкоцитов в процессе реализации воспалительной реакции. Так, при формировании ТЛА можно выделить неспецифические механизмы регуляции, связанные с активацией P2X₁-рецептора (локальная регуляция) и специфические механизмы – сопряженные с активацией P2Y-рецепторов, GPVI-рецептора, ФАТ-рецептора и A2A-рецептора, которые функционируют при межклеточной кооперации Тц и лейкоцитов. Активация A2A-рецептора является компонентом регуляции компенсаторных и адаптационных реакций, ограничивающих активность клеток крови. Специфические механизмы, регулирующие трафик лейкоцитов в тканях МВП связаны с активацией TxA2-рецептора на клетках крови.

Анализ молекулярных механизмов, контролирующих рекрутирование клеток крови из сосудистого русла и трафик лейкоцитов в стенке МВП открывает новые возможности в разработке таргетной фармакологической коррекции острого пиелонефрита в отдаленные сроки после КЛТ.

ГЛАВА 8

МОДЕЛИРОВАНИЕ IN VITRO МЕХАНИЗМОВ РЕГУЛЯЦИИ КОМПЕНСАТОРНЫХ И АДАПТАЦИОННЫХ РЕАКЦИЙ КЛЕТОК КРОВИ ПОСЛЕ КЛТ В СРЕДНЕЙ ТРЕТИ МОЧЕТОЧНИКА.

Актуальной задачей прогнозирования рисков развития гематурии и острого пиелонефрита после КЛТ является поиск информативных показателей, характеризующих функциональное состояние клеток крови и их реактивность на разнообразные патогенетические факторы. Особый интерес вызывает анализ регуляции компенсаторных и адаптационных реакций клеток крови при назначении и отмене НПВП, модулирующих активность внутриклеточной сигнализации в зависимости от активности ЦОГ. Математическое моделирование рисков развития осложнений при различных заболеваниях является рутинной практикой биостатистики и не нуждается в особом представлении специалистам [378]. К существующим недостаткам можно отнести разве лишь точность диагностики (информативность и специфичность метода). Причем отношения рисков развития осложнения являются тем более значимыми, чем более информативные показатели используются для характеристики самого патологического процесса. По сути, проблема прогнозирования рисков болезни или ее осложнений связана с информативностью клинико-лабораторных методов исследования. Однако, даже при высокой информативности существующих современных методов диагностики математическое прогнозирование является скорее «красивой игрушкой» в руках научных работников, чем – рабочим инструментом в практической медицине. Подтверждением этого утверждения может быть факт низкой эффективности прогнозирования развития осложнений после КЛТ при экстраполяции полученных научных результатов в клиническую практику [140; 228].

Причина сложившейся ситуации видится в выхолащивании фундаментальных знаний цитологии и патофизиологии, желании заменить анализ кинетики механизмов патогенеза расчетом корреляционных связей между показателями на большом массиве данных. Ни в коем случае не умаляя значимость доказательной медицины, нельзя не видеть одну «ахиллесову пяту» такого методического подхода – между фактором риска и частотой возникновения осложнения, часто выпадает теоретическое доказательство того, что исследуемый фактор действительно воспроизводит определенный механизм развития конкретного осложнения. В этой связи, на одном из этапов исследования предшествующем биостатистике, целесообразно прибегать к моделированию *in vitro* общепатологических процессов, лежащих в основе прогнозируемого осложнения. Одним из методических подходов к решению данной задачи может быть исследование внутриклеточной сигнализации на изолированных клетках крови, имеющих рецепторы-«сенсоры», воспринимающие разнообразные эндо- экзогенные воздействия «возмущающие» гомеостаз. Логично предположить, что фактор риска болезни или возникновения осложнения вызывает появление в сосудистом русле или ЦНС каскада молекул, которые связываясь с соответствующими рецепторами вызывают защитную реакцию клеток и тканей в органах. В случае, если биохимический «мессенджер» фактора риска воспроизводит реакцию клетки, то он может быть признан значимым в анализе причинно-следственных связей, а выявленный конкретный патогенетический механизм может быть использован для таргетной оптимизации методов профилактики и лечения пациента.

Для ответа на поставленные вопросы необходимы инновационные биотехнологии, разработка которых ведется по нескольким направлениям. С нашей точки зрения, таковыми являются, во-первых, исследование *in vitro* функциональной активности рецепторов на клетках крови, обеспечивающих «ввод информации» в клетки о патогенетических факторах нарушающих гомеостаз.

Выбор Тц для исследования чувствительности рецепторов открывает возможность анализа механизмов развития воспаления, связанных с активацией эндотелия и лейкоцитов, а также – детекции патогенетических факторов и внутриклеточных сигнальных систем участвующих в стимуляции клеток крови. Во-вторых, моделирование *in vitro* взаимодействия клеток крови, предопределяющего развитие воспалительной реакции. Известно, что на раннем этапе воспаления происходит активация клеток крови и формирование ТЛА [292]. Такое взаимодействие обеспечивает: (а) адгезию лейкоцитов к эндотелию и их рекрутирование из сосудистого русла в ткани органов; (б) регуляцию автономных функций лейкоцитов, включая образование и освобождение внеклеточных ловушек нейтрофилов; (в) поддержание обратной связи, позволяющей ограничивать тяжесть воспаления и защищать орган от вторичной альтерации, вызванной чрезмерной активацией иммунной системы [302].

Цель исследования – смоделировать *in vitro* молекулярные механизмы регуляции компенсаторных и адаптационных реакций клеток крови при развитии пиелонефрита и гематурии через 24ч, 48ч, 72ч и 7 суток после КЛТ при введении и отмене НПВП у пациентов с наличием конкрементов в средней трети мочеточника.

8.1. Анализ *in vitro* механизмов регуляции компенсаторных реакций Тц и лейкоцитов через 24ч после КЛТ при сохранении введения НПВП.

Гипотеза. Можно предположить, что регуляция компенсаторных реакций Тц и лейкоцитов в течение первых суток ингибирования ЦОГ изменяется, что может сказываться на частоте развития и тяжести послеоперационных осложнений. Целью компенсаторных реакций клеток крови после КЛТ является восстановление тромбогенеза в условиях снижения функциональной активности Тц при введении НПВП.

Неизвестно –какие механизмы регуляция Тц сохраняются в ранние сроки после введения НПВП. Логично предположить, что механизмы, контролирующие развитие компенсаторной реакции Тц, оказывают влияние на лейкоциты, и напротив, при усилении воспалительной реакции лейкоциты индуцируют тромбогенез . Как при этом изменяется эффективность компенсаторных реакций клеток крови, обеспечивающая одновременное ограничение воспаления и геморагии – не известно.

Установлено, что в течение первых суток после КЛТ у пациентов выраженность гематурии изменялась неоднозначно. Так, через 1-3ч – выявлено 3 (15,0%) случая и через 24ч – 5 (25,0%) случаев макрогематурии; т.е. статистически значимых различий частоты макрогематурии не обнаружено. В тоже время, микрогематурия уменьшилась на 26,3% ($P < 0,001$) по сравнению со сроком наблюдения 1-3ч после КЛТ, однако оставалась в диапазоне средней степени выраженности (Рисунок 8.1). Можно констатировать, что через 24ч после ингибирования участка сигнализации ЦОГ-ТхА2 компенсаторные реакции Тц способны ограничивать микрогематурию. Усиление АТц обеспечивалось повышением активности пуриновых P2Y-рецепторов, P2X₁-рецептора и α_2 -адренорецептора ($P < 0,001$) (Рисунок 8.2). Формирование ТЛА, для активации и рекрутирования лейкоцитов из сосудистого русла, связано с активностью P2Y-рецепторов, α_2 -адренорецептора и ФАТ-рецептора, тогда как выраженность лейкоцитурии регулировалась активностью P2X₁-рецептора α_2 -адренорецептора и ФАТ-рецептора.

Приведенные выше факты обосновывают необходимость моделирования *in vitro* механизмов регуляции компенсаторных реакций клеток крови с участием P2Y-рецепторов, ФАТ-рецептора и α_2 -адренорецептора субпороговыми дозами агонистов в концентрации EC₁₀.

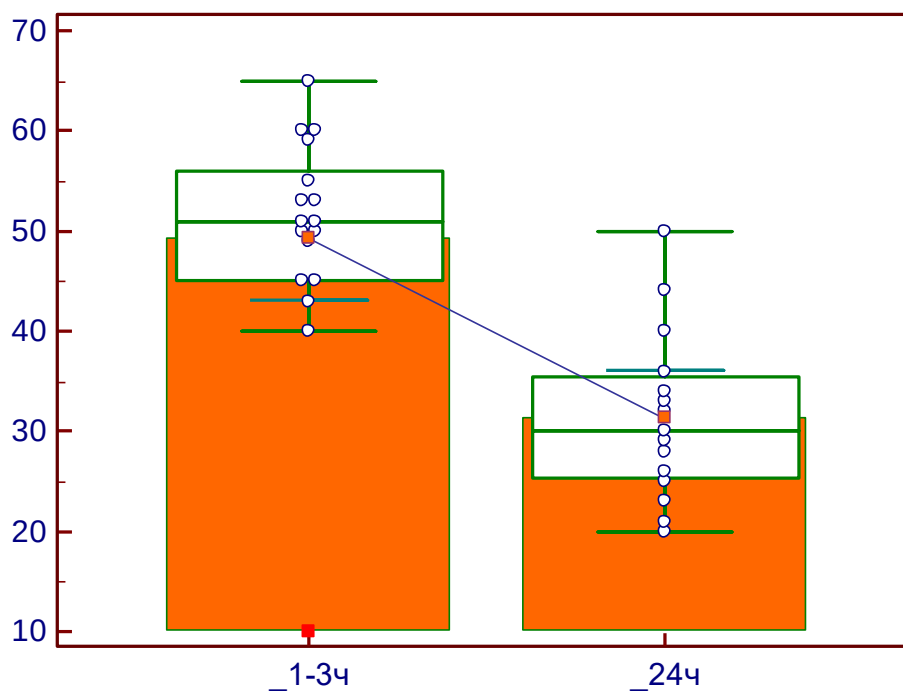


Рис.8.1. Выраженность микрогематурии после КЛТ в средней трети мочеточника.

По оси ординат – количество эритроцитов в поле зрения (э/пз); по оси абсцисс – срок наблюдения.

При сравнении параметров агрегации Тц, установлено, что наиболее выраженный эффект агрегации Тц вызывал АДФ, тогда как максимальное количество ТЛА воспроизводили адреналин и АДФ (Таблица 8.1). Так, амплитуда АТц при изолированной стимуляции P2Y-рецепторов была на 17,8% ($p < 0,05$), Slope на 23,3% ($p < 0,01$) и AUC на 23,9% ($p < 0,001$) больше таковых при стимуляции ФАТ-рецептора. Параметры агрегатометрии при стимуляции ФАТ-рецептора и α_2 -адренорецептора были сопоставимыми. Минимальное количество ТЛА формировалось при стимуляции ФАТ-рецептора, которое было на 22,6% ($p < 0,001$) и 28,3% ($p < 0,001$) меньше, чем при стимуляции, соответственно, P2Y-рецепторов и α_2 -адренорецептора. Таким образом, стереотипным механизмом регуляции компенсаторной реакции Тц и лейкоцитов через 24ч после КЛТ и сохранив введения НПВП являлась стимуляция P2Y-рецепторов.

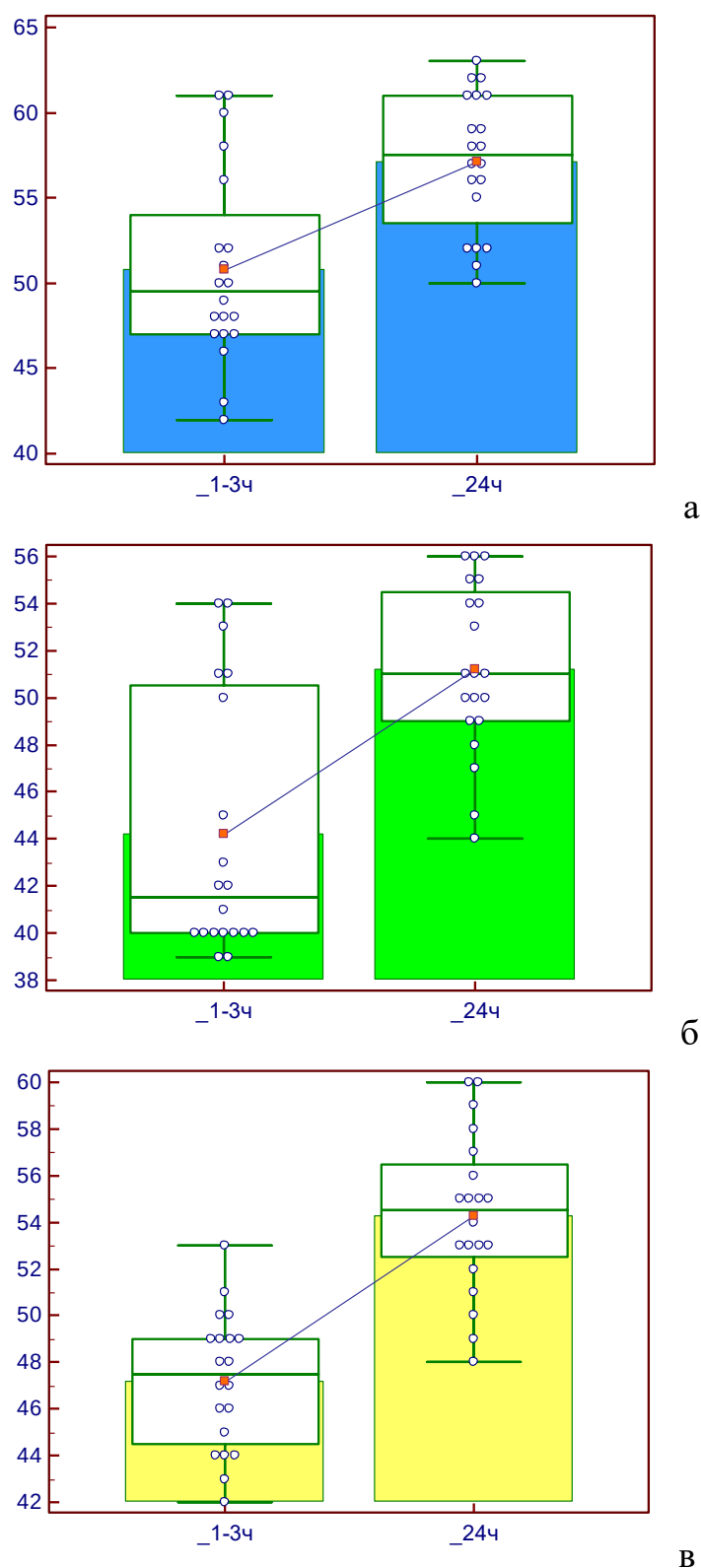


Рис. 8.2. Динамика реактивности рецепторов тромбоцитов после КЛТ при назначении НПВП

По оси ординат активность рецепторов: а – α_2 -адренорецептора; б – $P2X_1$ -рецептора; в – $P2Y$ -рецепторов (%); по оси абсцисс – срок наблюдения.

**Моделирование in vitro механизмов регуляции компенсаторных реакций
клеток крови через 24ч после КЛТ в средней трети мочеточника**

Агонисты ЕС ₁₀	Показатели агрегатограммы			Кол-во ТЛА (%)
	Амплитуда агрегации (%)	Slope (% мин)	AUC (U)	
АДФ	15,2±0,7 (95% ДИ 10,2-12,6)	20,7±1,2 (95% ДИ 13,9-17,7)	28,0±0,6 (95% ДИ 18,9-22,9)	8,5±0,5 (95% ДИ 7,4-9,6)
ФАТ	12,9±0,4 [#] (95% ДИ 11,9-13,9)	16,8±0,6 ^{##} (95% ДИ 15,4-18,2)	22,6±1,6 ^{###} (95% ДИ 20,2-25,0)	6,6±0,5 [#] (95% ДИ 5,5-7,7)
Адреналин	12,7±0,5 (95% ДИ 11,6-13,8)	16,1±0,9 (95% ДИ 14,61-18,0)	20,5±1,2 (95% ДИ 17,8-23,2)	9,2±0,5 ^{###} (95% ДИ 8,1-10,3)
АДФ + Адреналин	19,1±0,5 (95% ДИ 18,0-20,1)	26,2±1,0 (95% ДИ 24,2-28,3)	38,9±1,4 (95% ДИ 36,0-41,8)	12,0±0,3 (95% ДИ 11,3-12,7)
АДФ + ФАТ	18,5±0,4 (95% ДИ 17,6-19,4)	24,1±1,0 (95% ДИ 22,0-26,2)	33,7±0,8 ^{**} (95% ДИ 32,0-35,5)	11,9±0,3 (95% ДИ 11,3-12,5)
Адреналин + ФАТ	14,1±0,4 ^{***} (95% ДИ 13,3-14,9)	17,5±0,5 ^{***} (95% ДИ 16,5-18,5)	25,8±0,7 ^{***} (95% ДИ 24,2-27,3)	14,3±0,4 ^{***} (95% ДИ 13,4-15,2)

Примечание: [#] – статистически значимое различие значений показателя агрегатограммы и количества тромбоцитарно-лейкоцитарных агрегатов (ТЛА) при изолированном воздействии агониста на уровне $p < 0,05$ по сравнению со значениями предыдущего агониста; ^{##} – на уровне $p < 0,01$ и ^{###} – на уровне $p < 0,001$.

^{***} – различие значений показателя агрегатограммы и количества ТЛА при комбинации воздействия агонистов на уровне $p < 0,001$ по сравнению со значениями предыдущей комбинации агонистов.

Исследовательский вопрос – может ли взаимодействие P2Y-рецепторов, ФАТ-рецептора и α_2 -адренорецептора усиливать компенсаторные реакции клеток крови направленные на поддержание гемостаза и реализацию воспаления в МВП в течение первых суток после КЛТ?

Установлено, что максимальный эффект агрегации Тц воспроизводился при взаимодействии P2Y-рецепторов и α_2 -адренорецептора. В основе данного эффекта, вероятно, лежит сопряженность внутриклеточных сигнальных систем, связанных с Gi-белком. Обращает на себя внимание, что значения амплитуды, скорости агрегации (Slope) и AUC при одновременной стимуляции указанных рецепторов превышали таковые при изолированной стимуляции P2Y-рецепторов, соответственно, на 25,6%, 26,6% и 38,9% ($P < 0,001$). Таким образом, стимуляция P2Y-рецепторов и α_2 -адренорецептора может обеспечить увеличение количества Тц участвующих в агрегации, поскольку воспроизводится эффект синергизма. Необходимо подчеркнуть, что амплитуда и скорость агрегации (Slope) при одновременной стимуляции P2Y-рецепторов и ФАТ-рецептора не отличались ($p > 0,05$) от таковых при стимуляции P2Y-рецепторов и α_2 -адренорецептора, хотя значения AUC были ниже – на 13,4% ($P < 0,01$). Минимальный эффект агрегации Тц воспроизводился при взаимодействии ФАТ-рецептора и α_2 -адренорецептора. Показатели агрегации Тц при одновременной стимуляции этих рецепторов были сопоставимы с эффектом изолированной стимуляции ФАТ-рецептора ($p > 0,05$). Значения амплитуды, Slope и AUC при одновременной стимуляции ФАТ-рецептора и α_2 -адренорецептора были меньше таковых при стимуляции P2Y-рецепторов и α_2 -адренорецептора, соответственно, на 26,2%, 33,2% и 33,7% ($P < 0,001$). Следовательно, взаимодействие P2Y-рецепторов и α_2 -адренорецептора оказывало более выраженный индуцирующий эффект на Тц, чем одновременная стимуляция P2Y-рецепторов и ФАТ-рецептора или ФАТ-рецептора и α_2 -адренорецептора.

Моделирование взаимодействия других рецепторов не сопровождалось значимой стимуляцией клеток крови, позволяющей усиливать компенсаторные реакции гемостаза, по сравнению с изолированным эффектом агонистов. Инкубация клеток крови одновременно с несколькими агонистами позволила оценить взаимодействие рецепторов, способное потенцировать формирование ТЛА. Оказалось, что максимальный эффект формирования ТЛА *in vitro* воспроизводился при взаимодействии α_2 -адренорецептора и ФАТ-рецептора. Количество ТЛА образовавшихся при одновременной стимуляции этих рецепторов превышало таковое при изолированной стимуляции α_2 -адренорецептора на 55,4% ($P < 0,001$) и ФАТ-рецептора в 2,17 раза ($P < 0,001$). Одновременная стимуляция P2Y-рецепторов и α_2 -адренорецептора, а также P2Y-рецепторов и ФАТ-рецептора воспроизводила сопоставимое количество ТЛА ($p > 0,05$), которое было на 19,2% ($P < 0,001$) меньше, чем при комбинации α_2 -адренорецептора и ФАТ-рецептора. Таким образом, исследование *in vitro* подтвердило, что через 24ч после КЛТ при введении НПВП: (а) регуляция ранней фазы компенсаторных реакций тромбоцитарного звена гемостаза с участием P2Y-рецепторов, α_2 -адренорецептора и ФАТ-рецептора может обеспечить ограничение выраженности гематурии; (б) максимальный эффект агрегации Тц *in vitro* воспроизводился при взаимодействии P2Y-рецепторов и α_2 -адренорецептора, тогда как – формирования ТЛА при взаимодействии α_2 -адренорецептора и ФАТ-рецептора. Активация α_2 -адренорецептора являлась ключевым механизмом синергии, обеспечивающей усиление компенсаторных реакций Тц и лейкоцитов, вероятно, вследствие оптимальной сопряженности сигнальных путей связанных с Gi и Gq-белком; (в) выявленные различия потенцирования эффектов стимуляции P2Y-рецепторов, α_2 -адренорецептора и ФАТ-рецептора при агрегации Тц и формировании ТЛА отражают возможности дифференцированного ответа клеток крови в зависимости от выраженности геморрагии и воспаления в стенке МВП.

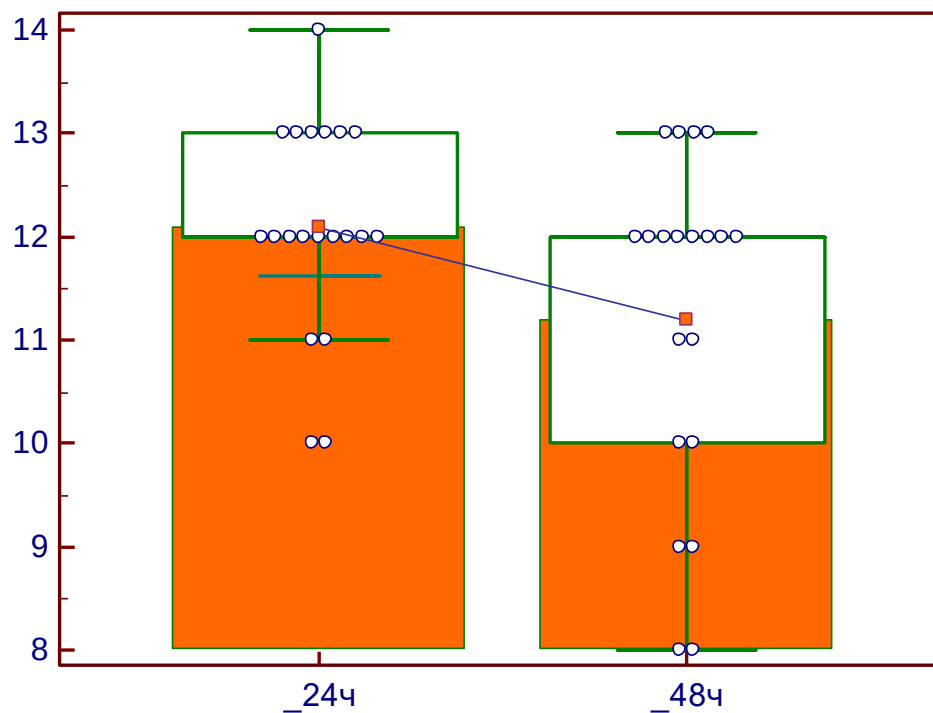
8.2. Анализ *in vitro* механизмов регуляции компенсаторных реакций Тц и лейкоцитов через 48ч после КЛТ при сохранении введения НПВП.

Интерес к точке исследования 48ч после КЛТ обусловлен отсутствием знаний о механизмах регуляции компенсаторных реакций клеток крови и путях сигнализации в Тц и лейкоцитах когда восстанавливается уродинамика и сохраняется остаточный уровень активности ЦОГ, связанный с введением НПВП.

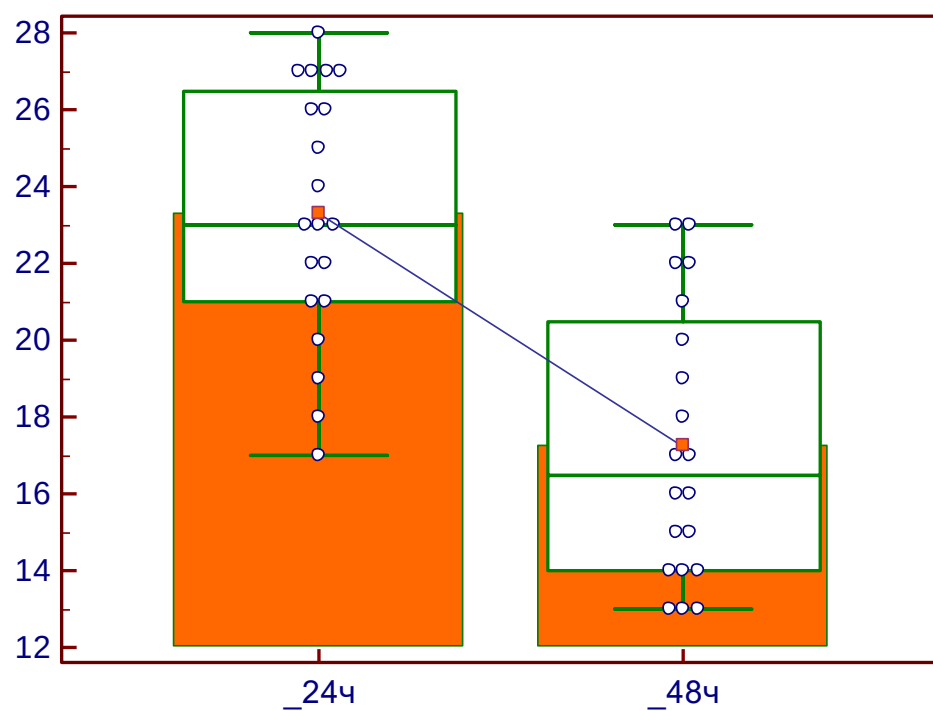
Гипотеза. Судя по наличию гематурии у пациентов в ранние сроки после КЛТ в средней трети мочеточника, можно предположить, что компенсаторные реакции Тц не обеспечивают прекращение геморрагии и гематурии; одной из причин этого явления может быть состояние внутриклеточной сигнализации. При этом лейкоциты становятся «заложниками» регуляции и реализации компенсаторных реакций Тц, направленных на остановку кровопотери? По сути, необходимость усиления функции лейкоцитов для защиты слизистой оболочки МВП от микробной инвазии может модулироваться механизмами, регулирующими функцию Тц.

Через 48ч после начала введения НПВП, макрогематурия прекращалась; *микрогематурия* сохранялась на уровне средней степени выраженности; количество ТЛА уменьшилось на 7,4% ($p < 0,001$), а лейкоцитурия снизилась на 26,2% ($p < 0,001$) по сравнению с предыдущим сроком наблюдения (Рисунок 8.3а,б).

Суммируя приведенные ранее данные, можно сформулировать следующие закономерности регуляции компенсаторной реакции клеток крови через 24ч после КЛТ при сохранении введения НПВП (Рисунок 8.4а). Во-первых, механизмы активации Тц, ограничивающие гематурию, реализуются посредством P2Y-рецепторов, α_2 -адренорецептора и ФАТ-рецептора;



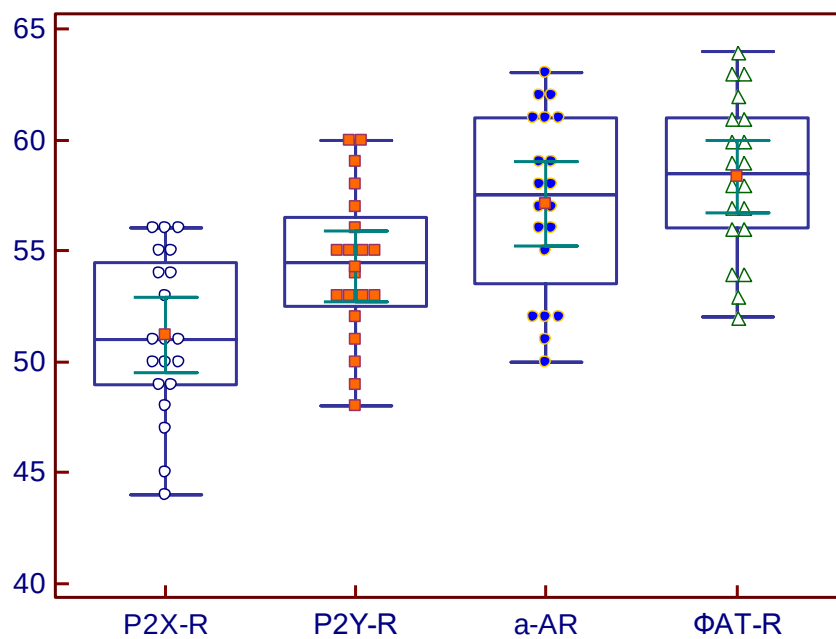
а



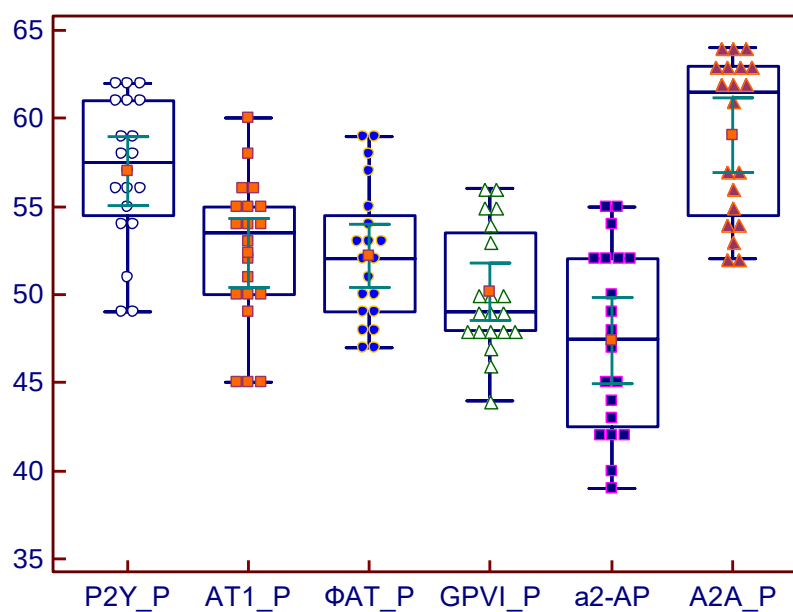
б

Рис. 8.3. Динамика циркулирующих ТЛА и выраженность лейкоцитурии через 48ч ингибирования ЦОГ и проведения КЛТ .

По оси ординат: а-количество ТЛА в крови (%); б-количество лейкоцитов в моче (п/з); по оси абсцисс – срок наблюдения.



а



б

Рис. 8.4. Реактивность рецепторов, регулирующих компенсаторные реакции клеток крови через 24ч (а) и 48ч (б) после КЛТ

По оси ординат – индуцированная агрегация тромбоцитов (%); по оси абсцисс – рецепторы.

Во-вторых, формирование ТЛА и активация лейкоцитов обеспечиваются сигнализацией, ассоциированной с P2Y-рецепторами, α_2 -адренорецептором и ФАТ-рецептором. В третьих, трафик лейкоцитов в стенке МВП (лейкоцитурия) осуществлялся механизмами с участием P2X₁-рецептора, α_2 -адренорецептора и ФАТ-рецептора. Закономерности регуляции компенсаторной реакции клеток крови через 48ч после КЛТ при сохранении введения НПВП связаны со стимуляцией P2Y-рецепторов и АТ₁-рецептора, ФАТ-рецептора, GPVI-рецептора, α_2 -адренорецептора и A2A-рецептора (Рисунок 8.46). При этом (а) механизмы активации Тц, реализовывались посредством P2Y-рецепторов и АТ₁-рецептора; (б) формирование ТЛА и активация лейкоцитов регулировалось P2Y-рецепторами, АТ₁-рецептором и ФАТ-рецептором; (в) трафик лейкоцитов в стенке МВП (лейкоцитурия) осуществлялся механизмами с участием GPVI-рецептора, α_2 -адренорецептора и A2A-рецептора.

Приведенные факты явились основанием для исследования *in vitro* механизмов регуляции компенсаторных реакций клеток крови с участием P2Y-рецепторов, ФАТ-рецептора и АТ₁-рецептора. При сравнении параметров агрегации Тц, индуцированной субпороговой дозой агонистов, установлено, что наиболее выраженный эффект агрегации Тц вызывал АДФ, тогда как максимальное количество ТЛА воспроизводил ФАТ (Таблица 8.2). Так, при изолированной стимуляции P2Y-рецепторов значения Slope были на 23,3% ($p < 0,01$) и AUC на 17,8% ($p < 0,001$) больше таковых при стимуляции АТ₁-рецептора. Параметры агрегатометрии при изолированной стимуляции АТ₁-рецептора и ФАТ-рецептора были сопоставимыми. Максимальное количество ТЛА формировалось при стимуляции ФАТ-рецептора, которое было на 24,6% ($p < 0,01$) ($p < 0,001$) больше, чем при стимуляции АТ₁-рецептора. Различия количества ТЛА при стимуляции ФАТ-рецептора и P2Y-рецепторов статистически значимо не различались. Таким образом, стимуляция P2Y-рецепторов являлась стереотипным механизмом развития компенсаторной реакции Тц и лейкоцитов.

**Моделирование in vitro механизмов регуляции компенсаторных реакций
клеток крови через 48ч после КЛТ в средней трети мочеточника**

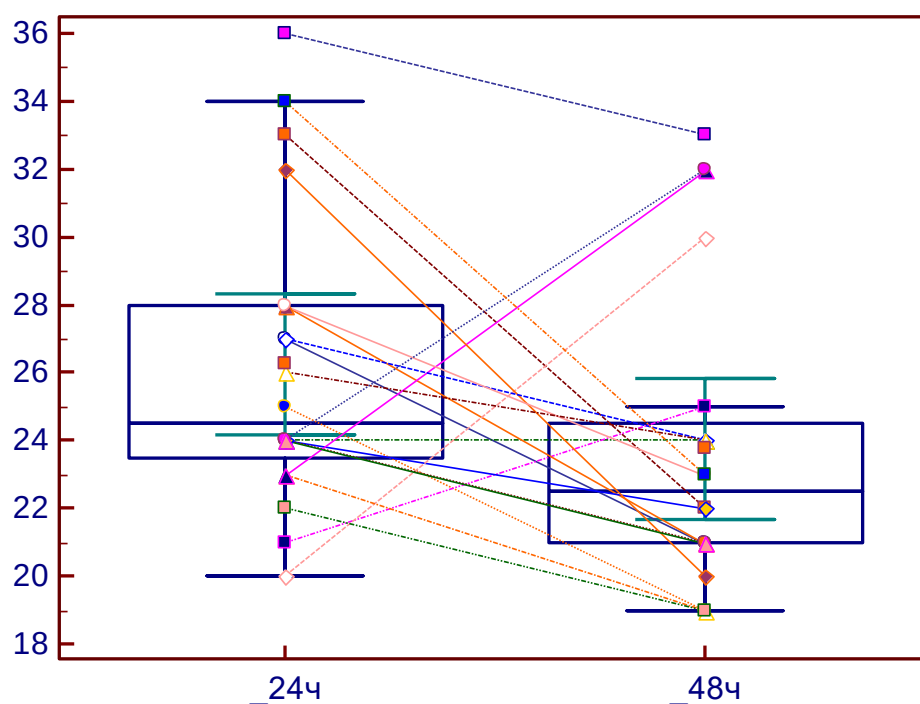
Агонисты EC ₁₀	Показатели агрегатограммы			Кол-во ТЛА (%)
	Амплитуда агрегации (%)	Slope (% мин)	AUC (U)	
АДФ	13,1±0,3 (95% ДИ 12,4-13,8)	20,1±0,9 (95% ДИ 18,0-22,2)	23,8±1,1 (95% ДИ 21,2-26,4)	7,0±0,3 (95%ДИ 6,2-7,7)
Ан-2	12,4±0,4 (95% ДИ 11,5-13,3)	16,3±0,8 ^{##} (95% ДИ 14,6-18,0)	20,2±1,0 ^{##} (95% ДИ 17,9-22,5)	6,1±0,3 (95%ДИ 5,4-6,8)
ФАТ	12,2±0,4 (95% ДИ 11,2-13,2)	16,0±0,8 (95% ДИ 14,1-17,9)	19,2±0,9 (95% ДИ 17,1-21,3)	7,6±0,4 ^{##} (95%ДИ 6,8-8,4)
АДФ + Ан-2	18,2±0,4 (95% ДИ 17,3-19,1)	23,7±1,0 (95% ДИ 21,6-25,8)	37,1±1,0 (95% ДИ 35,0-39,1)	9,2±0,4 (95%ДИ 8,4-10,1)
АДФ + ФАТ	14,8±0,4 ^{***} (95% ДИ 13,9-15,7)	18,1±0,6 ^{***} (95% ДИ 16,9-19,4)	26,2±0,9 ^{***} (95% ДИ 24,2-28,1)	11,5±0,3 ^{***} (95%ДИ 10,9-12,1)
Ан-2 + ФАТ	13,4±0,3 ^{**} (95% ДИ 12,8-14,0)	16,3±0,4 [*] (95% ДИ 15,4-17,1)	21,7±0,7 ^{***} (95% ДИ 20,3-23,2)	12,0±0,3 (95%ДИ 11,4-12,6)

Примечание: ^{##}— статистически значимое различие значений показателя агрегатограммы и количества тромбоцитарно-лейкоцитарных агрегатов (ТЛА) при изолированном воздействии агониста на уровне $p < 0,01$ по сравнению со значениями предыдущего агониста;

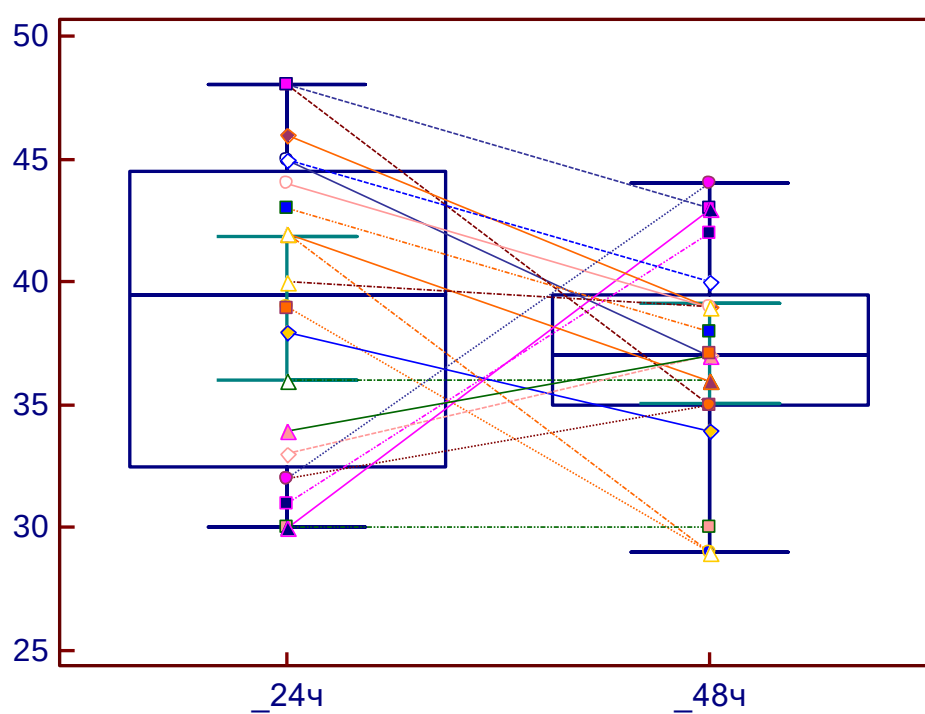
^{*}—различие значений показателя агрегатограммы и количества ТЛА при комбинации воздействия агонистов на уровне $p < 0,05$ по сравнению со значениями предыдущей комбинации агонистов; ^{**}— на уровне $p < 0,01$; ^{***}— на уровне $p < 0,001$.

Исследовательский вопрос – может ли взаимодействие рецепторов *усиливать* компенсаторные реакции клеток крови, направленные на поддержание гемостаза и реализацию воспаления в МВП, при достижении остаточной активности ЦОГ? Установлено, что максимальный эффект агрегации Тц воспроизводился при взаимодействии P2Y-рецепторов и AT₁-рецептора (см. табл. 8.2). В основе данного эффекта, лежит ко-активация внутриклеточных сигнальных систем, связанных с Gq-белком, что представляется логичным при снижении активности α_2 -адренорецептора и уменьшении сигнализации, связанной с Gi-белком. Обращает на себя внимание, что значения амплитуды, скорости агрегации (Slope) и AUC при одновременной стимуляции этих рецепторов превышали таковые при изолированной стимуляции P2Y-рецепторов, соответственно, на 38,9%, 17,9% ($P<0,05$), 55,9% ($P<0,001$). Таким образом, стимуляция P2Y-рецепторов и AT₁-рецептора может обеспечить увеличение количества Тц участвующих в агрегации, поскольку воспроизводился эффект синергизма. Эффект стимуляции P2Y-рецепторов и AT₁-рецептора Тц через 48ч сопоставим с эффектом стимуляции P2Y-рецепторов и α_2 -адренорецептора через 24ч, Данный факт свидетельствует, что в течение 48ч при снижении активности ЦОГ изменяются механизмы регуляции гемостаза, при этом сохраняется эффективность компенсаторных реакций. Подтверждением этого являются сходные значения Slope и количества Тц, участвующих в агрегации (AUC), несмотря на изменение кластера рецепторов воспроизводящих синергию (Рисунок 8.5).

Данный феномен имеет свое объяснение. Через 48ч значения AUC при агрегации Тц, индуцированной АДФ были ниже на 15,0% ($P<0,05$), чем таковые через 24ч; значения AUC при индукции адреналином были сопоставимыми через 24ч и 48ч. В этом случае достижение аналогичных значений параметров АТц является результатом синергии P2Y-рецепторов с α_2 -адренорецептором (через 24ч) и AT₁-рецептором (через 48ч).



а



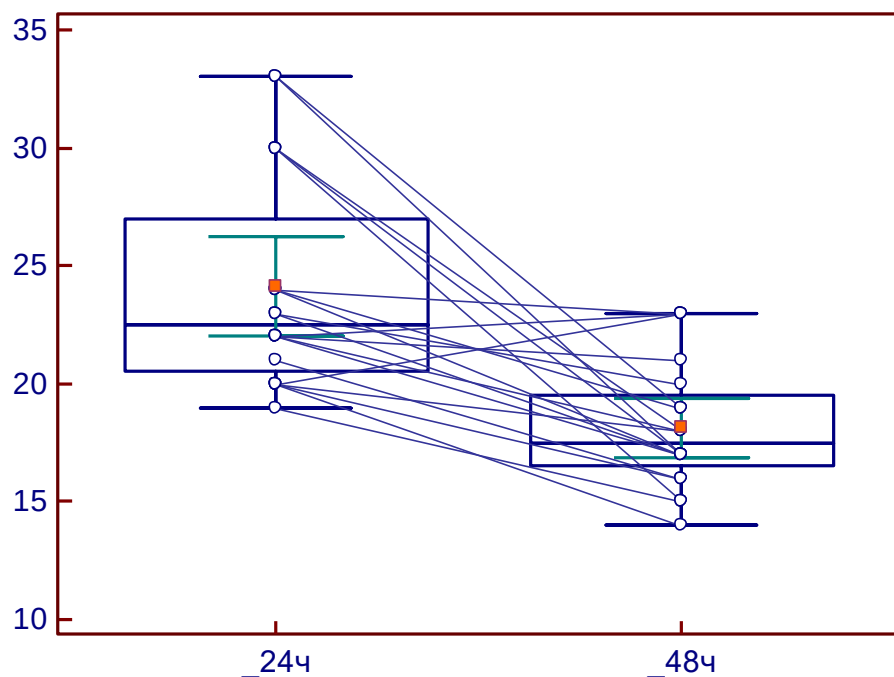
б

Рис. 8.5. Динамика индикаторов агрегации Тц (Slope-а, AUC-б) при взаимодействии P2Y-рецепторов и $\alpha 2$ -адренорецептора (24ч), P2Y-рецепторов и AT₁-рецептора (48ч) после КЛТ

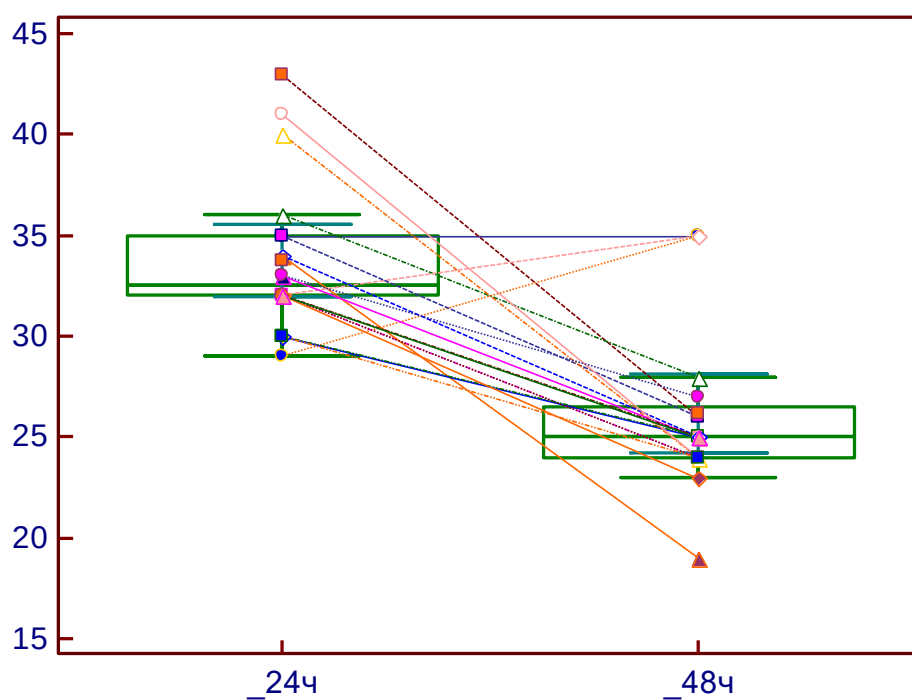
По оси ординат значения: а-Slope (%/мин), б- AUC (U); по оси абсцисс – срок наблюдения

Неизменное участие P2Y-рецепторов в регуляции гемостаза объясняется возможностью взаимодействия как с рецептором, связанным с Gi белком (α_2 -адренорецептор), так и рецептором, связанным с Gq-белком (AT₁-рецептор). Следующая комбинация агонистов АДФ и ФАТ также воспроизводила синергизм. Однако, амплитуда, Slope и AUC при одновременной стимуляции P2Y-рецепторов и ФАТ-рецептора были ниже, соответственно, на 18,7%, 23,6% и 29,4% ($P < 0,001$), чем при стимуляции P2Y-рецепторов и AT₁-рецептора. Поскольку ФАТ-рецептор и AT₁-рецептор сопряжены с Gq-белком, можно предположить, что снижение синергизма связано с участком сигнального пути расположенным выше Gq-белка. Минимальный эффект потенцирования воспроизводился при взаимодействии ФАТ-рецептора и AT₁-рецептора. Значения амплитуды, Slope и AUC при одновременной стимуляции ФАТ-рецептора и AT₁-рецептора были меньше таковых при стимуляции P2Y-рецепторов и ФАТ, соответственно, на 9,5% ($P < 0,01$), 10,0% ($P < 0,05$) и 17,2% ($P < 0,001$). Различия синергизма обусловлены более высокой эффективностью сигнализации в случае активации P2Y-рецепторов.

Остается вопрос – снижается ли эффективность стереотипной регуляции компенсаторной реакции Тц через 48ч после КЛТ? Примером таковой регуляции может быть взаимодействие P2Y-рецепторов и ФАТ, синергизм которых проявлялся через 24ч и 48ч после КЛТ. Установлено, что Slope и AUC через 48ч были меньше, соответственно, на 24,9% и 16,3% ($P < 0,05$), чем таковые через 24ч (Рисунок 8.6). Данный пример свидетельствует, что (а) сигнализация P2Y-рецепторов является ЦОГ-зависимой; (б) при ингибировании ЦОГ устанавливается взаимодействие P2Y-рецепторов с другим рецептором способном восстановить внутриклеточную сигнализацию. Следовательно, взаимодействие P2Y-рецепторов и AT₁-рецептора оказывает более выраженный индуцирующий эффект на Тц, чем одновременная стимуляция P2Y-рецепторов и ФАТ-рецептора или ФАТ-рецептора и AT₁-рецептора.



а



б

Рис. 8.6. Динамика индикаторов агрегации Тц (Slope-а, AUC-б) при моделировании взаимодействия P2Y-рецепторов и ФАТ-рецептора.
По оси ординат агрегация Тц индуцированная агонистами в дозе EC_{10} (%); по оси абсцисс – срок наблюдения

Моделирование взаимодействия других рецепторов не сопровождалось значимой стимуляцией клеток крови, позволяющей запускать

компенсаторные механизмы гомостаза, по сравнению с изолированным эффектом агонистов.

Инкубация клеток крови одновременно с несколькими агонистами позволила оценить взаимодействие рецепторов, способное усиливать компенсаторные реакции, обеспечивающие формирование ТЛА. Установлено, что при взаимодействии P2Y-рецепторов и ФАТ-рецептора, а также ФАТ-рецептора и АТ₁-рецептора воспроизводилось максимальное количество ТЛА.

Обращает на себя внимание, что количество ТЛА при одновременной стимуляции P2Y-рецепторов и ФАТ-рецептора, превышало таковое при изолированной стимуляции P2Y-рецепторов и ФАТ-рецептора, соответственно, на 64,3% и 51,3% ($P < 0,001$). Сопоставление эффективности механизмов, обеспечивающих максимальное формирование ТЛА через 24ч (взаимодействие P2Y-рецепторов и α_2 -адренорецептора) и 48ч (взаимодействие ФАТ-рецептора и АТ₁-рецептора) свидетельствует о влиянии вмешивающихся факторов на функциональную активность Тц и лейкоцитов (в частности, механизмов регуляции сократительной активности мочеточника, обеспечивающих выведение фрагментов разрушенного конкремента). Как результат, через 48ч формировалось ТЛА на 16,1% ($p < 0,05$) меньше, чем через 24ч (Рисунок 8.7). Наименее выраженный эффект формирования агрегатов проявлялся при одновременной стимуляции P2Y-рецепторов и АТ₁-рецептора.

Количество ТЛА, образовавшихся при одновременной стимуляции этих рецепторов, превышало таковое при изолированной стимуляции P2Y-рецепторов на 31,4% ($P < 0,001$) и ФАТ-рецептора 21,1% ($P < 0,01$). Одновременная стимуляция P2Y-рецепторов и АТ₁-рецептора воспроизводила на 20,0% ($P < 0,001$) меньше ТЛА, чем комбинация ФАТ-рецептора и P2Y-рецепторов. Эффект стимуляции ФАТ-рецептора и P2Y-рецепторов в формировании ТЛА через 24ч и 48ч ингибирования ЦОГ являлся сопоставимым, соответственно, $11,9 \pm 0,3\%$ и $11,5 \pm 0,3\%$ ($p > 0,05$).

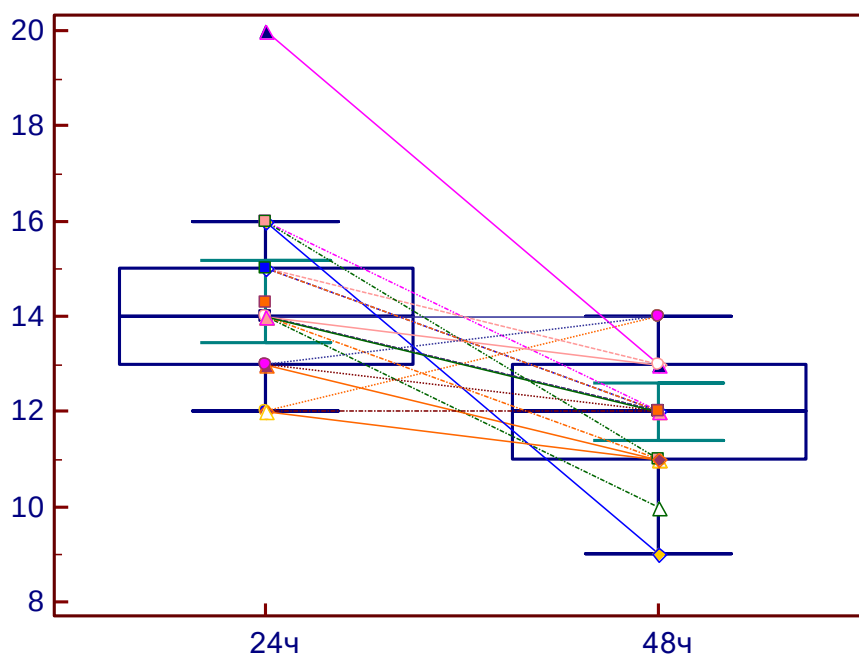


Рис. 8.7. Количество циркулирующих ТЛА при взаимодействии P2Y-рецепторов и $\alpha 2$ -адренорецептора (24ч), P2Y-рецепторов и AT₁-рецептора (48ч) после КЛТ в средней трети мочеточника.

По оси ординат количество ТЛА, образовавшихся при инкубации крови с агонистами в дозе EC₁₀ (%); по оси абсцисс – срок наблюдения

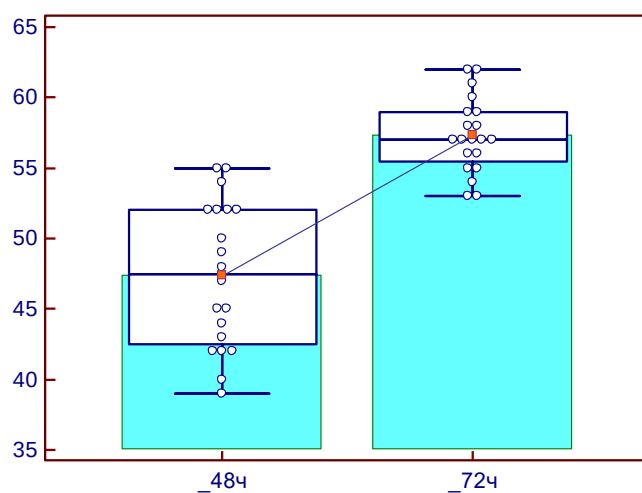
Таким образом, оптимальная регуляция компенсаторных реакций клеток крови обеспечивалась сопряженностью внутриклеточной сигнализации системы рецепторов, связанных с G-белками (GPCR, G-protein [guanine nucleotide-binding protein]-coupled receptors).

8.3. Анализ *in vitro* механизмов регуляции ранней фазы адаптационной реакции Тц и лейкоцитов через 72 ч после КЛТ и отмены НПВП.

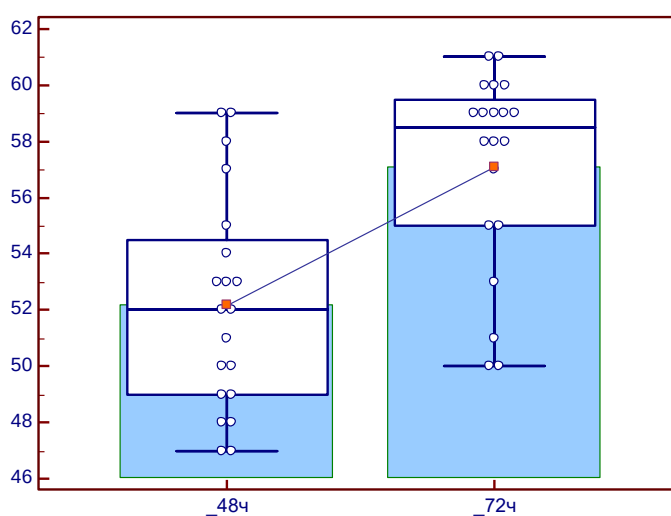
Данная точка исследования 72ч после КЛТ представляет интерес, поскольку включается ранняя фаза *адаптационных* реакций клеток крови в связи с прекращением введения НПВП (24ч после прекращения ингибирования ЦОГ).

Гипотеза. Можно предположить, что адаптационные реакции клеток крови, ориентированные на поддержание гомеостаза, являются более эффективными, чем предшествующие им компенсаторные реакции, поскольку восстанавливается внутриклеточная сигнализация, связанная с восстановлением функционирования участка ЦОГ-ТхА2. Особый интерес представляет регуляция адаптационных реакций Тц и лейкоцитов, которые должны одновременно обеспечить прекращение микрогематурии и поддержание защитной воспалительной реакции в слизистой оболочке МВП после КЛТ. Логично предположить, что функционируют как стереотипные, так дифференцированные механизмы, регулирующие адаптационные реакции Тц и лейкоцитов после КЛТ.

Цель исследования – изучить молекулярные механизмы регуляции и внутриклеточной сигнализации клеток крови в ранней (через 72ч) и поздней (7 суток) фазах адаптационной реакции Тц и лейкоцитов после КЛТ в средней трети при отмене НПВП. Через 72ч после КЛТ микрогематурия снизилась на 56,2% ($p < 0,001$) до $15,7 \pm 1,2$ э/пз (955ДИ 13,3-18,2 э/пз), однако оставалась в диапазоне средней степени выраженности. Через 24ч после прекращения ингибирования ЦОГ повысилась ($P < 0,001$) активность α_2 -адренорецептора, ФАТ-рецептора и ТхА2-рецептора (Рисунок. 8.8). Выявлено снижение количества ТЛА -на 13,8% ($P < 0,05$) и лейкоцитурии – на 29,7% ($P < 0,001$) по сравнению с предыдущим сроком наблюдения. Следовательно, формирование ТЛА, для активации и рекрутирования лейкоцитов в ткани, связано с активностью α_2 -адренорецептора, P2X₁-рецептора, ТхА2-рецептора и ФАТ-рецептора, тогда как выраженность лейкоцитурии связана с активностью ФАТ-рецептора, P2Y-рецепторов, α_2 -адренорецептора и A2A-рецептора. Активация α_2 -адренорецептора и ФАТ-рецептора являлась стереотипным механизмом, регулирующим раннюю фазу адаптационных реакций разных клеток крови при восстановлении активности ЦОГ.



а



б

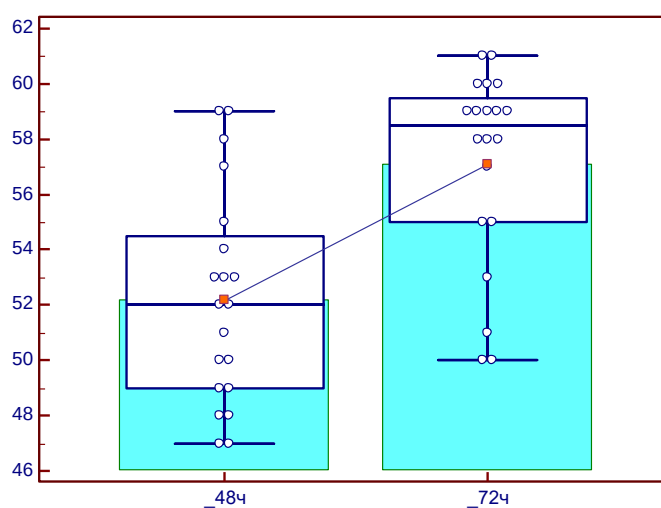


Рис. 8.8. Динамика реактивности рецепторов тромбоцитов через 24ч после отмены НПВП (72ч после КЛТ).

По оси ординат активность рецепторов: а – α_2 -адренорецептора; б – ФАТ-рецептора; в – ТхА₂-рецептора (%); по оси абсцисс – срок наблюдения.

Проведенные выше результаты обосновывают целесообразность моделирования *in vitro* адапционных реакций клеток крови с участием P2X₁-рецептора, ФАТ-рецептора и α_2 -адренорецептора. При сравнении параметров АТц индуцированной субпороговыми дозами агонистов установлено, что АТФ, ФАТ и адреналин воспроизводили сходные значения амплитуды и скорости агрегации Тц (Таблица 8.3). Различия касались количества Тц принимающих участие в агрегации (AUC). Наиболее выраженный эффект агрегации Тц индуцировал АТФ. Так, при изолированной стимуляции P2X₁-рецептора значения AUC были на 16,2% ($p<0,05$) и 40,2% ($p<0,001$) больше таковых при стимуляции, соответственно, α_2 -адренорецептора и ФАТ-рецептора. Активация α_2 -адренорецептора сопровождалась большими значениями AUC, чем ФАТ-рецептора (на 20,6%; $p<0,05$). При стимуляции P2X₁-рецептора и α_2 -адренорецептора формировалось сходное количество ТЛА ($p>0,05$); не было статистически значимых различий между эффектами P2X₁-рецептора и ФАТ-рецептора. Однако, ФАТ-рецептор воспроизводил на 19,3% ($p<0,05$) больше ТЛА, чем α_2 -адренорецептор. Следовательно, через 72ч после КЛТ по данным моделирования *in vitro* доминирующим механизмом регуляции адапционной реакции Тц являлась стимуляция P2X₁-рецептора; адапционная реакция лейкоцитов, обеспечивающая трафик лейкоцитов, в равной степени регулировалась P2X₁-рецептором, α_2 -адренорецептором и ФАТ-рецептором.

Исследовательский вопрос – может ли взаимодействие рецепторов усиливать адапционные реакции клеток крови направленные на поддержание гомостаза и реализацию воспаления в МВП? Установлено, что максимальный эффект агрегации Тц воспроизводился при взаимодействии P2X₁-рецептора и α_2 -адренорецептора (см. табл.8.3).

**Моделирование in vitro механизмов регуляции адаптационных реакций
клеток крови через 72ч после КЛТ в средней трети мочеточника.**

Агонисты EC ₁₀	Показатели агрегатограммы			Кол-во ТЛА (%)
	Амплитуда агрегации (%)	Slope (% мин)	AUC (U)	
АТФ	13,9±0,6 (95% ДИ 12,5-15,3)	17,4±0,8 (95% ДИ 15,5-19,3)	27,2±1,0 (95% ДИ 20,9-25,9)	6,6±0,3 (95%ДИ 5,9-7,3)
Адреналин	13,0±0,6 (95% ДИ 11,7-14,3)	17,1±1,0 (95% ДИ 14,8-19,4)	23,4±1,1 [#] (95% ДИ 20,9-25,9)	6,2±0,4 (95%ДИ 5,4-7,0)
ФАТ	11,5±0,6 (95% ДИ 10,1-12,9)	15,0±0,8 (95% ДИ 13,1-16,9)	19,4±1,1 [#] (95% ДИ 16,8-22,0)	7,4±0,4 [#] (95%ДИ 6,6-8,2)
АТФ + Адреналин	23,5±0,5 (95% ДИ 22,5-24,5)	33,1±0,7 (95% ДИ 31,6-34,6)	44,5±0,8 (95% ДИ 42,9-46,2)	8,8±0,2 (95%ДИ 8,3-9,3)
Адреналин + ФАТ	17,0±0,5*** (95% ДИ 16,0-18,0)	21,9±0,6*** (95% ДИ 20,7-23,1)	32,8±0,8*** (95% ДИ 31,2-34,4)	10,1±0,3*** (95%ДИ 9,6-10,7)
АТФ + ФАТ	13,8±0,5*** (95% ДИ 12,8-14,8)	18,2±0,7*** (95% ДИ 16,8-19,7)	29,1±1,1** (95% ДИ 26,8-31,4)	11,4±0,4* (95%ДИ 10,5-12,4)

Примечание: [#] – статистически значимое различие значений показателя агрегатограммы и количества тромбоцитарно-лейкоцитарных агрегатов (ТЛА) при изолированном воздействии агониста на уровне p<0,05 по сравнению со значениями предыдущего агониста; ^{###} – на уровне p <0,001.

* – различие значений показателя агрегатограммы и количества ТЛА при комбинации воздействия агонистов на уровне p<0,05 по сравнению со значениями предыдущей комбинации агонистов; ** – на уровне p <0,01; *** – на уровне p <0,001.

В основе данного эффекта, вероятно, лежит повышение уровня внутриклеточного Ca^{2+} , вследствие открытия, управляемого АТФ ионного канала и сигнализации, связанной с Gi- белком. Обращает на себя внимание, что значения амплитуды, скорости агрегации (Slope) и AUC при одновременной стимуляции указанных рецепторов превышали таковые при изолированной стимуляции P2X-рецептора, соответственно, на 69,1%, 90,2% и 63,6% ($P < 0,001$). Следовательно, стимуляция P2X₁-рецептора и α_2 -адренорецептора может обеспечить увеличение количества участвующих в агрегации Тц, поскольку воспроизводился эффект синергизма.

При одновременной стимуляции α_2 -адренорецептора и ФАТ-рецептора значения амплитуды, скорости агрегации (Slope) и AUC были меньше, соответственно, на 27,7%, 33,8% и 11,3% ($P < 0,001$) по сравнению с таковыми при взаимодействии P2X-рецептора и α_2 -адренорецептора. Минимальный эффект агрегации Тц имел место при взаимодействии P2X₁-рецептора и ФАТ-рецептора. Значения амплитуды, Slope и AUC при одновременной стимуляции этих рецепторов были меньше таковых при стимуляции α_2 -адренорецептора и ФАТ-рецептора, соответственно, на 18,2%, 16,9% и 33,7% ($P < 0,001$). Следовательно, взаимодействие P2X₁-рецепторов и α_2 -адренорецептора оказывало более выраженный индуцирующий эффект на Тц, чем одновременная стимуляция ФАТ-рецептора и α_2 -адренорецептора или P2X₁-рецептора и ФАТ-рецептора.

Инкубация клеток крови одновременно с несколькими агонистами позволила оценить взаимодействие рецепторов, способное потенцировать формирование ТЛА. Оказалось, что наиболее выраженный эффект формирования ТЛА *in vitro* воспроизводился при взаимодействии ФАТ-рецептора и α_2 -адренорецептора, а также P2X₁-рецептора и ФАТ-рецептора. Количество ТЛА, образовавшихся при одновременной стимуляции P2X₁-рецептора и ФАТ-рецептора, превышало таковое при изолированной стимуляции P2X₁-рецептора на 72,7% ($P < 0,001$) и ФАТ-рецептора на 54,0% ($P < 0,001$).

Одновременная стимуляция P2X₁-рецептора и α_2 -адренорецептора, воспроизводила ТЛА на 22,8% ($P < 0,001$) меньше, чем комбинация P2X₁-рецептора и ФАТ-рецептора.

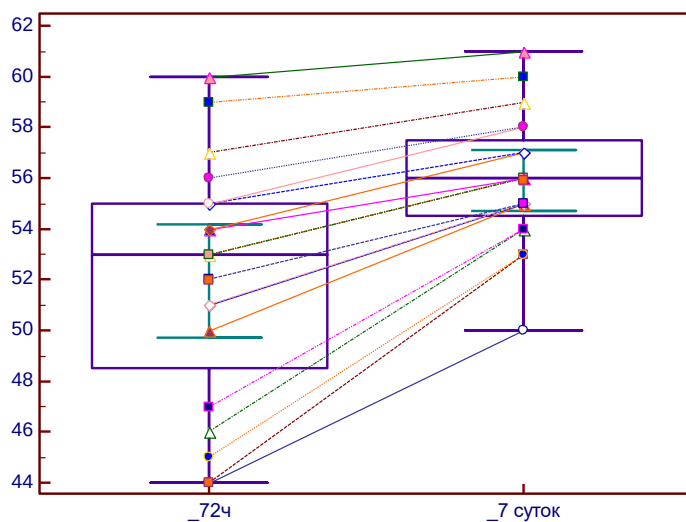
Таким образом, через 72ч после КЛТ в средней трети мочеточника и отмены НПВП исследование *in vitro* подтвердило, что (а) регуляция ранней фазы адаптационных реакций тромбоцитарного звена гемостаза с участием α_2 -адренорецептора, ФАТ-рецептора и P2X₁-рецептора ограничивала выраженность микрогематурии. Максимальные параметры агрегатометрии достигались при одновременной стимуляции P2X₁-рецептора и α_2 -адренорецептора; (б) увеличение количества ТЛА *in vitro* также воспроизводилось посредством α_2 -адренорецептора, ФАТ-рецептора и P2X₁-рецептора, что может быть основой регуляции адаптационной реакции лейкоцитов, обеспечивающей поддержание воспаления после КЛТ. Наиболее выраженный эффект формирования ТЛА *in vitro* отмечен при взаимодействии ФАТ-рецептора и α_2 -адренорецептора, а также P2X₁-рецептора и ФАТ-рецептора; (в) активация P2X₁-рецептора и α_2 -адренорецептора являлась стереотипным механизмом, обеспечивающим регуляцию функции как Тц, так и лейкоцитов. Вероятно, повышение внутриклеточного Ca^{2+} выше порогового уровня при одновременном открытии ионного канала управляемого АТФ и сигнализации, связанной с Gi- белком, является основополагающим механизмом активации клеток крови в ранней фазе восстановления активности ЦОГ.

8.4. Анализ *in vitro* механизмов регуляции поздней фазы адаптационной реакции Тц и лейкоцитов через 7 суток после КЛТ и отмены НПВП.

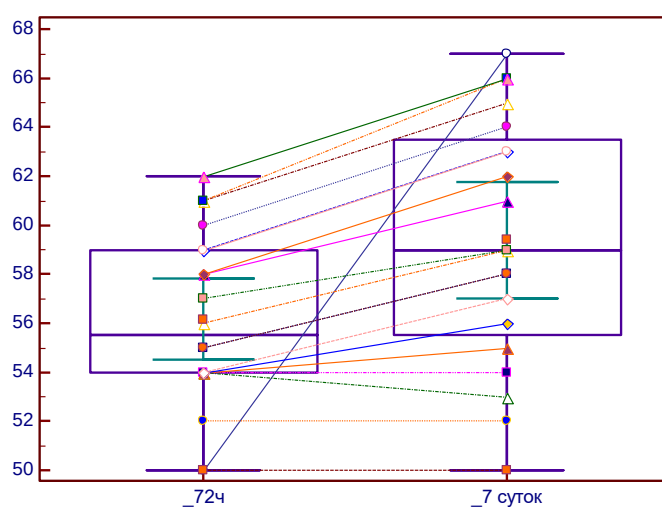
Цель исследования – изучить молекулярные механизмы регуляции и внутриклеточной сигнализации клеток крови в поздней фазе адаптационной реакции Тц и лейкоцитов через 7 суток после КЛТ.

Через 7 суток после КЛТ выраженность микрогематурии снижалась на 71,3% ($p < 0,001$) до $4,5 \pm 0,6$ э/пз (95% ДИ 3,2-5,8 э/пз) и находилась в диапазоне легкой степени выраженности. В этом контексте можно констатировать, что (а) адаптационные реакции Тц в поздней фазе, соответствующей завершению репарации слизистой оболочки МВП, являются более эффективными, чем в ранней фазе на начальном этапе этого процесса; (б) механизмы регулирующие гемостаз становятся более совершенными. Анализ функциональной активности рецепторов показал, что по сравнению с предыдущим сроком наблюдения повысилась активность GPVI-рецептора – на 7,7% ($P = 0,003$), пуриновых P2Y-рецепторов на 5,9% ($P < 0,05$), P2X₁-рецептора – на 4,0% ($P < 0,05$) (Рисунок 8.9) и A2A-рецептора – на 4,3% ($P < 0,05$); снизилась активность α_2 -адренорецептора на 14,7% ($P < 0,001$) и ФАТ-рецептора на 15,4% ($P < 0,001$).

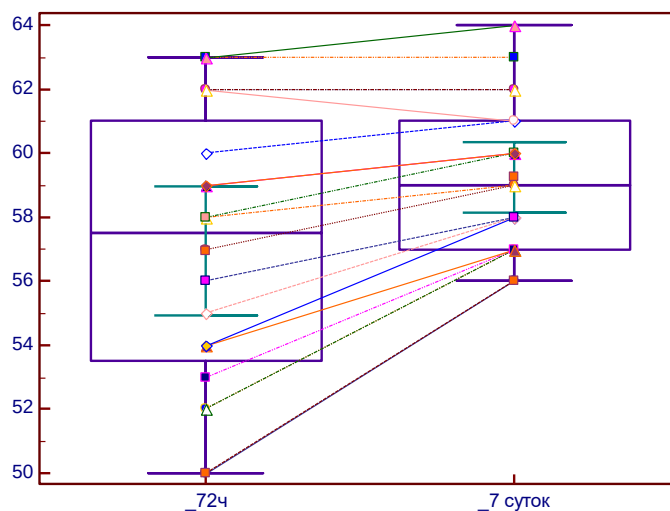
Через 7 суток после КЛТ отмечено снижение количества ТЛА на 17,7% ($p < 0,001$), лейкоцитурии – на 25,6% ($p < 0,001$) по сравнению с предыдущим сроком наблюдения. Таким образом, адаптационные реакции клеток крови, обеспечивали формирование ТЛА для поддержания защитной функции лейкоцитов; при этом развитие воспалительной реакции в МВП существенно ограничивалось, подтверждением чего может быть снижение содержания лейкоцитов в моче. Формирование ТЛА, для активации и рекрутирования лейкоцитов из сосудистого русла, связано с активностью пуриновых P2Y-рецепторов и P2X₁-рецептора, GPVI-рецептора и ФАТ-рецептора; выраженность лейкоцитурии зависила от активности P2X₁-рецепторов и TxA₂-рецептора. Активация P2X₁-рецепторов являлась стереотипным механизмом, регулирующим адаптационные реакции клеток крови, направленные на поддержание воспалительной реакции в слизистой оболочки МВП через 120ч после прекращения ингибирования ЦОГ. Выявленное ограничение лейкоцитурии связано с торможением процесса рекрутирования лейкоцитов из сосудистого русла и регулировалось A2A-рецептором.



а



б



в

Рис. 8.9. Динамика активности рецепторов в процессе адаптационной реакции клеток крови после КЛТ при отмене НПВП.

о оси ординат активность рецепторов: а – GPVI-рецептора; б– P2Y-рецептора; в– P2X₁-рецептора (%); по оси абсцисс – срок наблюдения

Приведенные выше факты обосновывают целесообразность исследования регуляции адаптационных реакций клеток крови *in vitro* при стимуляции GPVI-рецептора, P2Y-рецепторов и P2X₁-рецептора. При сравнении параметров агрегации Тц, индуцированной субпороговой дозой агонистов, установлено, что АДФ и коллаген IV типа воспроизводили сходные параметры амплитуды, скорости агрегации и AUC (Таблица 8.4). Минимальный эффект агрегации Тц индуцировал АТФ. Так, при изолированной стимуляции P2X₁-рецептора значения амплитуды, Slope и AUC были, соответственно, на 22,7% ($p < 0,001$), 33,7% ($p < 0,001$) и 35,0% ($p < 0,001$) меньше таковых при стимуляции P2Y-рецепторов. При стимуляции P2Y-рецепторов и GPVI-рецептора формировалось сходное количество ТЛА ($p > 0,05$); P2X₁-рецептор воспроизводил на 17,5% ($p < 0,05$) меньше ТЛА, чем – P2Y-рецепторы. Таким образом, на этапе репарации слизистой оболочки МВП по данным моделирования *in vitro* сигнализация, связанная с P2Y-рецепторами и GPVI-рецептором являлась стереотипной при адаптационной реакции как Тц, так и лейкоцитов. В сущности, независимо от вида осложнений после КЛТ (наличие воспаления и/или геморрагии) взаимодействие данных рецепторов может обеспечить регуляцию адаптационной реакции клеток крови. При анализе возможностей синергизма P2Y-рецепторов, P2X₁-рецептора и GPVI-рецептора установлено, что максимальный эффект агрегации Тц воспроизводился при взаимодействии P2Y-рецептора и GPVI-рецептора. В основе данного эффекта, вероятно, лежит повышение уровня внутриклеточного Ca²⁺, вследствие сопряженности сигнализации, ассоциированной с участком Syk-ФИ-3К – ФИ-3К-фосфолипазаС (GPVI-рецептор) и сигнализации, связанной с Gi- и Gq-белками (P2Y-рецепторы). При одновременной стимуляции P2Y-рецепторов и GPVI-рецептора значения амплитуды, Slope и AUC превышали таковые при изолированной стимуляции P2Y-рецепторов, соответственно, на 82,2%, 66,3% и 61,6% ($P < 0,001$).

**Моделирование in vitro механизмов регуляции адаптационных реакций
клеток крови через 7 суток после КЛТ в средней трети мочеточника**

Агонисты EC ₁₀	Показатели агрегатограммы			Кол-во ТЛА (%)
	Амплитуда агрегации (%)	Slope (% мин)	AUC (U)	
АДФ	16,3±0,9 (95% ДИ 14,3-18,3)	25,2±1,2 (95% ДИ 22,5-27,8)	33,1±1,3 (95% ДИ 30,0-36,2)	6,3±0,3 (95%ДИ 5,5-7,1)
Коллаген IV типа	15,5±1,0 (95% ДИ 13,03-17,7)	23,0±1,4 (95% ДИ 19,9-26,1)	34,7±1,5 (95% ДИ 31,2-38,2)	6,4±0,4 (95%ДИ 5,6-7,2)
АТФ	12,6±0,5 [#] (95% ДИ 11,4-13,8)	16,7 ±1,3 ^{##} (95% ДИ 13,8-19,6)	21,5±1,6 ^{###} (95% ДИ 17,8 -25,2)	5,2±0,3 [#] (95%ДИ 4,5-5,9)
АДФ + Коллаген IV типа	29,7±0,6 (95% ДИ 28,5-30,9)	41,9±0,7 (95% ДИ 40,5-43,7)	53,5±0,8 (95% ДИ 51,9-55,2)	7,3±0,3 (95%ДИ 6,8-7,9)
АТФ + Коллаген IV типа	15,3±0,5*** (95% ДИ 14,3-16,3)	21,0±0,9*** (95% ДИ 19,1-23,0)	32,2±1,3*** (95% ДИ 29,5-34,9)	7,9±0,3** (95%ДИ 7,2-8,6)
АДФ + АТФ	12,2±0,4*** (95% ДИ 11,3-13,1)	16,0±0,4*** (95% ДИ 15,1-16,9)	22,2±0,7*** (95% ДИ 20,8-23,6)	6,4±0,4* (95%ДИ 5,6-7,2)

Примечание: [#]– статистически значимое различие значений показателя агрегатограммы и количества ТЛА при изолированном воздействии агониста на уровне p<0,05 по сравнению со значениями предыдущего агониста; ^{##}– на уровне p <0,01; ^{###}– на уровне p <0,001.

*–различие значений показателя агрегатограммы и количества ТЛА при комбинации воздействия агонистов на уровне p<0,05 по сравнению со значениями предыдущей комбинации агонистов; ***– на уровне p<0,001.

Таким образом, взаимодействие P2Y-рецепторов и GPVI-рецептора может обеспечить увеличение количества Тц участвующих в агрегации. Необходимо отметить, что при одновременной стимуляции P2Y-рецепторов и GPVI-рецептора через 7 суток после КЛТ значения AUC на 20,2% ($P < 0,001$) превышали таковые при одновременной стимуляции α_2 -адренорецептора и P2X₁-рецептора через 72ч после КЛТ (Рисунок 8.10). Данный факт свидетельствует, что регуляция адаптационных механизмов Тц направлена на совершенствование механизмов, ограничивающих геморрагию и микрогематурию.

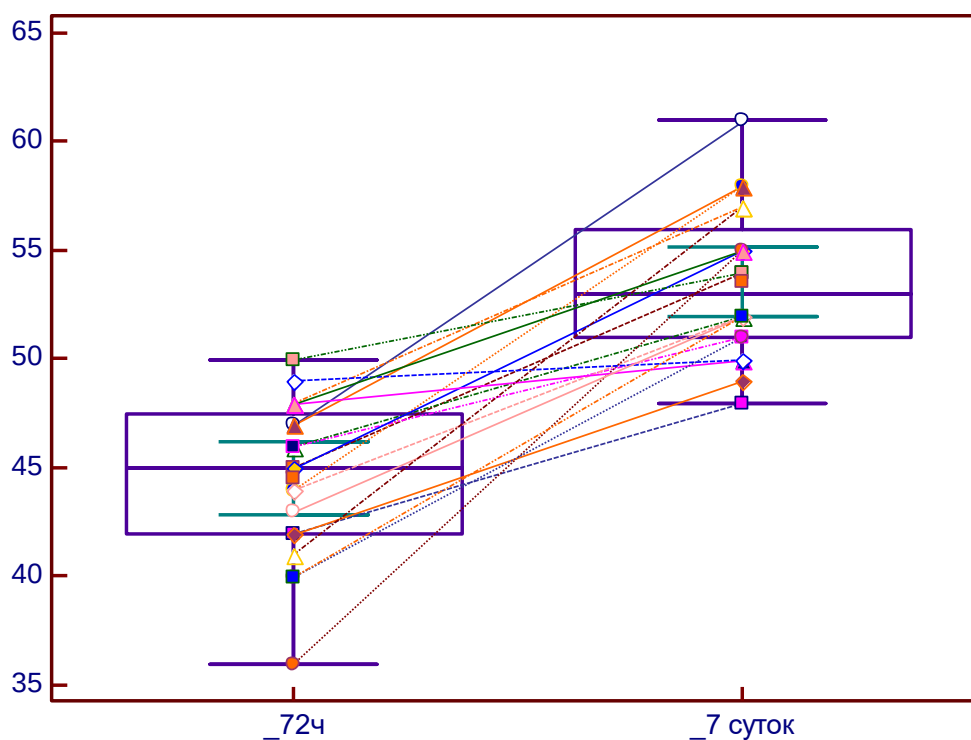


Рис. 8.10. Динамика AUC на ранней и поздней фазах адаптационной реакции при моделировании *in vitro* взаимодействия рецепторов.

По оси ординат – значения AUC (U) при взаимодействии α_2 -адренорецептора и P2X₁-рецептора через 72ч; P2Y-рецепторов и GPVI-рецептора через 7 суток после КЛТ при использовании агонистов в дозе EC₁₀ (%); по оси абсцисс – срок наблюдения.

При одновременной стимуляции P2X₁-рецептора и GPVI-рецептора значения амплитуды, Slope и AUC были меньше, соответственно, на 48,5%, 49,1% и 39,8% ($P < 0,001$) по сравнению с таковыми при взаимодействии P2Y-рецепторов и GPVI-рецептора. Полученные результаты представляются логичными с точки зрения усиления внутриклеточной сигнализации, поскольку при взаимодействии P2Y-рецепторов с GPVI-рецептором, вероятно, воспроизводилась ко-активация сигнальных путей, которая может многократно усиливаться посредством вторичных мессенджеров. При одновременной стимуляции P2X₁-рецептора GPVI-рецептора возможно критическое повышение уровня внутриклеточного Ca²⁺; данный механизм является оптимальным для реализации быстрых реакций клеток (возбуждение, сокращение, секреция и т.п.), однако спектр таких реакций весьма ограничен. Минимальный эффект агрегации Тц воспроизводился при взаимодействии P2Y-рецепторов и P2X₁-рецептора. Значения амплитуды, Slope и AUC при одновременной стимуляции этих рецепторов были меньше таковых при стимуляции P2X₁-рецептора и GPVI-рецептора, соответственно, на 20,3%, 23,8% и 31,1% ($P < 0,001$). Приведенные данные позволяют прийти к заключению, что взаимодействие P2Y-рецепторов и GPVI-рецептора оказывало более выраженный индуцирующий эффект на Тц, чем одновременная стимуляция P2X₁-рецептора и GPVI-рецептора, а также P2Y-рецепторов и P2X₁-рецептора.

Инкубация клеток крови одновременно с несколькими агонистами позволила оценить взаимодействие рецепторов в аспекте возможности усиления образования ТЛА. Оказалось, что наиболее выраженный эффект формирования ТЛА *in vitro* воспроизводился при взаимодействии P2X₁-рецептора и GPVI-рецептора. Так, количество ТЛА, образовавшихся при одновременной стимуляции этих рецепторов, превышало таковое при изолированной стимуляции GPVI-рецептора на 23,4% ($P < 0,01$) и P2X₁-рецептора на 51,9% ($P < 0,001$), т.е. имел место синергизм.

Одновременная стимуляция P2Y-рецепторов и P2X₁-рецептора, воспроизводила ТЛА на 19,0% ($P < 0,001$) меньше, чем комбинация P2X₁-рецептора и GPVI-рецептора, и на 12,3% меньше, чем комбинация P2Y-рецепторов и GPVI-рецептора.

Таким образом, через 7 суток после КЛТ в средней трети мочеточника: (а) снижение выраженности микрогематурии обусловлено адаптационными реакциями Тц, которые реализовывались посредством P2Y-рецепторов, P2X₁-рецептора и GPVI-рецептора. Максимальные параметры агрегации достигались благодаря синергизму P2Y-рецепторов и GPVI-рецептора; в ранней фазе адаптационных реакций Тц синергизм проявлялся при одновременной стимуляции P2X₁-рецептора и α_2 -адренорецептора. Изменение спектра рецепторов, воспроизводящих синергию в процессе ранней и поздней фаз адаптационных реакций Тц связано с необходимостью оптимизации путей внутриклеточной сигнализации; (б) поддержание воспалительной реакции в процессе репарации слизистой оболочки связано с нарушением барьерной функции уротелия (незавершенная дифференцировка многослойного переходного эпителия), при этом микробная инвазия соединительной ткани мочеточника сопровождалась защитной реакцией лейкоцитов. Адаптационная реакция при формировании ТЛА и рекрутировании лейкоцитов регулировалась P2Y-рецепторами, P2X₁-рецептором, ФАТ-рецептором и GPVI-рецептором; тогда как на этапе трафика лейкоцитов в стенке МВП – P2X₁-рецептором и ТхА2-рецептором; (в) ограничение воспалительной реакции модулировалось А2А-рецептором и связано с уменьшением количества формирующихся ТЛА.

Анализ молекулярных механизмов, контролирующих рекрутирование клеток крови из сосудистого русла и трафик лейкоцитов в стенке МВП, открывает новые возможности в разработке таргетной фармакологической коррекции острого пиелонефрита в различные сроки после КЛТ.

АНАЛИЗ И ОБОБЩЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Нефролитиаз является актуальной проблемой урологии [18, 30, 23, 11, 343]. Антеградная контактная литотрипсия (КЛТ) является одним из наиболее эффективных методов лечения уретеролитиаза [83, 15, 16]. Однако, как и другие методы хирургического лечения, КЛТ не лишена недостатков [22]. Риски развития тяжелых осложнений при проведении ЛТ диктуют необходимость определять периоперационную группу риска по гематурии и развитию острого пиелонефрита [357, 116]. До настоящего времени нет показаний к отмене НПВП до- и после КУЛТ, в тоже время недостаточно изучен вопрос о зависимости выраженности гематурии от изменения реактивности Тц при длительном и кратковременном ингибировании ЦОГ [325]. Тромбоциты экспрессируют пуриновые рецепторы трех подтипов - $P2X_1$, $P2Y_1$ и $P2Y_{12}$. Причем $P2X_1$ -рецептор является регулируемым неселективным катионным каналом, тогда как рецепторы $P2Y$, сопряженные с белками G (GPCR), включают различные внутриклеточные сигнальные пути [3]. Инфекционные осложнения после КЛТ могут быть связаны с наличием остаточных конкрементов и их инфицированием, длительным дренажом мочевыводящих путей [114], периоперационным хроническим пиелонефритом [334], пожилым возрастом пациентов [336]. Однако, вопросы ранней диагностики, мониторинга и прогнозирования развития острого пиелонефрита остаются открытыми. Анализ литературных данных, касающихся патогенеза осложнений после литотрипсии, позволил сформулировать актуальную научную проблему – установить механизмы развития геморрагии, гематурии, острого пиелонефрита после контактной уретролитотрипсии, а также молекулярные механизмы восстановления гемостаза и ограничения воспалительной реакции в мочевыводящих путях при длительном и кратковременном назначении НПВП; повысить эффективность диагностики и прогнозирования гематурии и лейкоцитурии после КУЛТ в разных отделах мочеточника при неэффективной ЛКТ. Решение данной проблемы позволит обосновать подходы к

совершенствованию методов профилактики и лечения послеоперационных осложнений при назначении и отмене НПВП у пациентов с нефролитиазом.

На этапе госпитализации пациентов у пациентов с наличием конкрементов в верхней трети мочеточника выявлена средняя степень выраженности микрогематурии – $(26,0 \pm 3,7 \text{ э/пз})$. При анализе механизмов регуляции Тц обнаружена гиперреактивность α_2 -адренорецептора, $P2X_1$ -рецептора, TxA_2 -рецептора, ФАТ-рецептора, $GPVI$ -рецептора и AT_1 -рецептора, а также гипореактивность $P2Y$ -рецепторов и A_2A -рецептора. Выявлена корреляционная связь между выраженностью гематурии и активностью α_2 -адренорецептора, $P2X_1$ -рецептора, TxA_2 -рецептора, ФАТ-рецептора, $GPVI$ -рецептора, AT_1 -рецептора и $P2Y$ -рецепторов. В свете полученных результатов можно заключить, что при локализации конкрементов в верхней трети мочеточника патогенетическими факторами нефролитиаза, которые могут стимулировать клетки крови являются: во-первых, активация САС и РАС. Активация САС может быть следствием недостаточной анальгезии и механического раздражения слизистой оболочки конкрементом [273]. Можно предположить, что если при уролитиазе или после проведения ЛТ происходит активация САС (повышается концентрация катехоламинов в крови), то адренореактивность тромбоцитов усиливается, и это будет проявляться усилением тромбогенеза [185]. В равной степени это положение относится к активации РАС, поскольку Тц экспрессируют на своей поверхности AT_1 -рецептор [151]. Во-вторых, фактором патогенеза нефролитиаза может быть гипоксия/ишемия вследствие перманентно возникающей вазоконстрикции [404]. В третьих – воспалительная реакция в МВП при обструктивном пиелонефрите может сопровождаться паракринной стимуляцией Тц со стороны активированных лейкоцитов, которые выделяют ФАТ и цитокины [137, 196]. В-третьих, при нефролитиазе логичным представляется усиление пуринергической сигнализации в Тц, вследствие повышения внеклеточного содержания АТФ (при альтерации тканей МВП и развитии воспалительной реакции) [356]; при этом стимуляция $P2X$ -

рецептора сопровождается усилением тромбогенеза вследствие активации $\alpha\text{IIb}\beta_3$ интегрина [51]. Что касается гиперреактивности пуриновых P2Y -рецепторов (P2Y_1 -рецептор, P2Y_{12} -рецептор), то данный факт является типичной адаптационной реакцией направленной на повышение агрегации Тц (АДФ-аутокринный стимулятор Тц) при возникновении геморрагии [65, 384]. В-четвертых –ремоделирование (синтез и деградация) молекул внеклеточного матрикса слизистой оболочки МВП связанное активацией лейкоцитов [52,362], сопровождается усилением функциональной активности и взаимодействия Тц, лейкоцитов и эндотелия [177, 129, 238]. Следовательно, при локализации конкрементов в верхней трети мочеточника патогенетические факторы нефролитиаза могут быть потенциальными индукторами усиления проагрегантной активности Тц.

Нет ясности в вопросе –влияет ли локализация конкремента в разных отделах мочеточника на выраженность гематурии. В этом контексте, можно предположить, что различия гематурии связаны с особенностями регуляции компенсаторных реакций, обеспечивающих элиминацию конкрементов из разных отделов мочеточника [4]. В этом случае функциональная активность Тц (эффективность гемостаза) будет зависеть от спектра агонистов, участвующих в механизмах регуляции трафика конкремента в верхней и средней трети мочеточника. На этапе госпитализации (9 суток предшествующей ЛКТ) при локализации конкрементов в верхней трети мочеточника выявлена средняя степень микрогематурии и лейкоцитурии. При анализе функциональной активности Тц отмечена гиперреактивность AT_1 -рецептора, P2Y -рецепторов, TxA_2 -рецептора, α_2 -адренорецептора, GPVI -рецептора, P2X_1 -рецептора и ФАТ-рецептора, а также гипореактивность A_2A -рецептора. При локализации конкремента в средней трети мочеточника выраженность гематурии связана с активностью P2Y -рецепторов, GP VI -рецептора, AT_1 -рецептора и TxA_2 -рецептора, что подтверждает участие как системного регулятора – ангиотензина-2 [406], так и локальных модуляторов Тц (TxA_2 , АДФ и коллагена IV-типа БМ стенки сосудов) в поддержании гемостаза при нефролитиазе [391, 253].

Сопоставление кластеров рецепторов Тц при локализации конкремента в верхней и средней трети мочеточника позволяет (а) идентифицировать стереотипные механизмы тромбогенеза (стимуляция P2Y-рецепторов, GP VI-рецептора, AT₁-рецептора и TxA₂-рецептора), которые проявляются независимо от локализации конкремента; (б) установить специфические механизмы нефролитиаза, связанные с реакцией МВП, направленной на элиминацию конкремента из верхней трети мочеточника (стимуляция α_2 -адренорецептора, P2X₁-рецептора и ФАТ-рецептора), которые могут усиливать агрегацию Тц. Ключевая роль P2Y-рецепторов в повышении функциональной активности Тц объясняет высокую информативность данного показателя для прогнозирования выраженности гематурии при нефролитиазе [410]. Таким образом, при нефролитиазе механизмы тромбогенеза могут варьировать в зависимости от локализации и особенностей регуляции перистальтики в верхней и нижней трети мочеточника.

Через 24ч после КУЛТ в верхней трети мочеточника при неэффективной ЛКТ и сохранении введения НПВП макрогематурия обнаружена у 6 (28,6%) больных; выраженность микрогематурии увеличилась в 1,8 раза по сравнению со сроком наблюдения 1-3ч после КЛТ. Учитывая динамику микрогематурии в течение первых суток после малоинвазивного вмешательства можно констатировать, что эффективность компенсаторных механизмов гемостаза снижалась и данный факт связан с дисрегуляцией Тц. Анализ множественной корреляции позволил установить наличие отрицательной связи между выраженностью гематурии и активностью AT₁-рецептора, P2X₁-рецептора, α_2 -адренорецептора. При этом имела место положительная корреляционная связь между активностью α_2 -адренорецептора и P2X₁-рецептора, AT₁-рецептора; сохранялась положительная связь между выраженностью гематурии и активностью A_{2A}-рецептора; проявилась отрицательная связь между активностью A_{2A}-рецептора и P2Y-рецепторов, TxA₂-рецептора. Выявленная связь между выраженностью микрогематурии и активностью AT₁-рецептора, P2X₁-

рецептора и α_2 -адренорецептора позволяет предположить их участие в регуляции тромбоцитарного звена гемостаза после КЛТ в верхней трети мочеточника [295,185]. При сравнении параметров агрегации установлено, что максимальный эффект наблюдался при взаимодействии $P2X_1$ -рецептора и AT_1 -рецептора. В течение первых суток после КЛТ в средней трети мочеточника при неэффективной ЛКТ выявлено увеличение микрогематурии от средней до тяжелой степени выраженности. Через 24ч после КУТ макрогематурия обнаружена у 10 (50%) больных; выраженность микрогематурии увеличилась на 12,8% ($P<0,001$) по сравнению с предшествующим сроком наблюдения. Патогенез микрогематурии может быть связан с ингибированием ЦОГ и снижением синтеза TxA_2 ; десенситизацией α_2 -адренорецептора, $GPVI$ -рецептора и AT_1 -рецептора при восстановлении активности A_2A -рецептора [371, 365]. С точки зрения регуляции функции Тц представляет интерес нормореактивность пуриновых $P2X_1$ - и $P2Y$ -рецепторов, α_2 -адренорецептора и A_2A -рецептора [71]. Моделирование *in vitro* механизмов регуляции компенсаторных реакций Тц позволило установить, что максимальный эффект агрегации после КЛТ в средней трети мочеточника воспроизводился при взаимодействии пуриновых $P2X_1$ - и $P2Y$ -рецепторов.

Анализ функциональной активности рецепторов Тц при локализации конкремента в верхней и средней трети мочеточника свидетельствует, во-первых, что стереотипными механизмами тромбогенеза через 24ч после КЛТ и сохранении введения НПВП являются стимуляция $P2X_1$ - и α_2 -адренорецептора. Данный факт представляется вполне логичным поскольку на фоне ингибирования ЦОГ повышение сопряженности сигнальных путей может достигаться посредством достижения критического уровня внутриклеточного Ca^{2+} , связанного с ингибированием пути Gi-белка и открытием АТФ-зависимого ионного канала. Доказано, что адреналин может повышать экспрессию Р-селектина и гликопротеина IIb / IIIa на Тц [157], при назначении НПВП проагрегантный эффект адреналина зависит от остаточной

активности ЦОГ [312]. Считается, что α_2 -адренергические рецепторы имеют общие перекрестные механизмы с G_q -сигнальным путем, опосредованные ФИ-3-киназами/Akt. При реализации эффекта синергизма адреналин дополнительно вызывает секрецию плотных гранул, фосфорилирование белка плекстрина протеинкиназы C (ПКС) и усиливает сигнализацию от рецептора $P2X_1$. Добавление адреналина к Тц также может стимулировать активацию Rap-1b [225]. В этом контексте вполне возможен синергизм α_2 -адренорецептора и $P2X_1$ -рецептора [305]. Во-вторых, компенсаторные механизмы агрегации Тц через 24ч после КЛТ в верхней трети мочеочника на фоне ингибирования ЦОГ связаны со стимуляцией пуриновых $P2X_1$ - и $P2Y$ -рецепторов, α_2 -адренорецептора и $A2A$ -рецептора, тогда как в средней трети- — со стимуляцией AT_1 -рецептора, $P2X_1$ -рецептора и α_2 -адренорецептора. Обращает на себя внимание аддитивная роль $P2Y$ -рецепторов в тромбогенезе после оперативного вмешательства на верхней трети мочеочника и AT_1 -рецептора после таковой в средней трети мочеочника.

Через 48ч после КУЛТ в верхней трети мочеочника при сохранении введения НПВП сохранялась частота макрогематурии; выраженность микрогематурии уменьшилась на 25,7% ($p < 0,001$) по сравнению с таковой в предыдущий срок наблюдения. Интерес к указанному периоду наблюдения за пациентами после малоинвазивного оперативного вмешательства связан с продолжающимся введением НПВП и сохранением риска усиления тяжести геморрагии [330]. Поддержание гемостаза в этот срок наблюдения обеспечивается компенсаторными реакциями клеток крови, которые формируются при ингибировании ЦОГ. Реактивность α_2 -адренорецептора повысилась по сравнению со сроком наблюдения 24ч после КЛТ.

Анализ множественной корреляции обнаружил наличие отрицательной связи между выраженностью гематурии и активностью α_2 -адренорецептора, $P2X_1$ -рецептора, FA_1 -рецептора и PY -рецептора. При этом выявлены значимые связи между активностью α_2 -адренорецептора и $P2X_1$ -рецепторов,

ФАТ-рецептора, а также между активностью P2X₁-рецепторов и ФАТ-рецептора. Повышение параметров агрегации Тц регистрировалось при одновременной стимуляции α_2 -адренорецептора и P2X₁-рецептора. Следствием синергизма было увеличение значений площади под кривой AUC на 36,8% ($P < 0,001$) по сравнению с изолированной стимуляцией α_2 -адренорецептора. Таким образом, через 48ч после КЛТ в верхней трети мочеточника на фоне ингибирования ЦОГ возникала гиперреактивность α_2 -адренорецептора, что сопровождалось его взаимодействием с P2X₁-рецептором и ФАТ-рецептором; в результате возрастала проагрегантная активность Тц и уменьшалась выраженность микрогематурии. Через 48ч после КУЛТ в средней трети мочеточника при сохранении введения НПВП выявлено снижение выраженности микрогематурии на 36,1% по сравнению с таковой через 24ч после оперативного вмешательства; у 3 (15%) пациентов сохранялась макрогематурия. Обнаружена гиперреактивность P2X₁-рецептора и АТ₁-рецептора, нормореактивность α_2 -адренорецептора, пуриновых P2Y-рецепторов и аденозинового А2А-рецептора; активность GPVI-рецептора, ФАТ-рецептора и ТхА2-рецептора соответствовала диапазону гипореактивности. Повышение активности α_2 -адренорецептора, АТ₁-рецептора и P2X₁-рецептора обеспечивало усиление агрегации Тц по сравнению с предыдущим сроком наблюдения. Моделирование *in vitro* продемонстрировало, что максимальный эффект агрегации Тц воспроизводился при взаимодействии P2X₁-рецептора и α_2 -адренорецептора.

Таким образом, через 48ч после КЛТ в разных отделах мочеточника на фоне введения НПВП функционировали стереотипные механизмы тромбогенеза, связанные со стимуляцией P2X₁- и α_2 -адренорецептора. В сущности, сохранялись ЦОГ-независимые пути сигнализации, связанные с повышением внутриклеточного Ca^{+2} [206]. Однако, при оперативном вмешательстве в верхней трети мочеточника проявлялась гиперреактивность α_2 -адренорецептора, что сопровождалось его взаимодействием с P2X₁-рецептором и ФАТ-рецептором. В этот же срок наблюдения после КЛТ в

средней трети мочеточника активность α_2 -адренорецептора повышалась до уровня нормореактивности, тогда как AT_1 -рецептора и P2X_1 -рецептора достигала гиперреактивности. По сути, можно констатировать, что после КЛТ в верхней трети мочеточника усиливается активация САС (α_2 -адренорецептор), а в средней трети – возрастает активность РАС (AT_1 -рецептор), ишемия, альтерация и воспаление в тканях МВП (P2X_1 -рецептор). Вероятно, взаимодействие P2X_1 -рецептора и α_2 -адренорецептора является оптимальным вариантом достижения значимого повышения уровня внутриклеточного Ca^{2+} в Тц при ингибировании синтеза TxA_2 [407]. После КЛТ в верхней трети мочеточника аддитивным механизмом усиления агрегации Тц-индуцированной адреналином являлось повышение активности ФАТ-рецептора, что возможно при сохранении функциональной активности лейкоцитов. Такое взаимодействие рецепторов отражает возможность усиления ко-активации сигнальных путей при имеющемся кластере рецепторов Тц, причем ведущую роль играет синергизм α_2 -адренорецептора и ФАТ-рецептора; такой вариант оптимизации сигнализации рассматривали [368]. После КЛТ в средней трети мочеточника аддитивным фактором усиления агрегации Тц являлся синергизм P2X_1 -рецептора и AT_1 -рецептора. Логично, что в случае недостаточной активации α_2 -адренорецептора оптимизация сигнальных путей Тц достигается за счет синергизма P2X_1 -рецептора и AT_1 -рецептора, активность которых находится в диапазоне гиперреактивности. Наличие гиперреактивности P2X_1 -рецептора и AT_1 -рецептора после КЛТ в средней трети мочеточника связано с повышением внеклеточного уровня АТФ и усилением активности РААС; оба процесса взаимосвязаны, поскольку нарушение кровотока при активации AT_1 -рецептора сопровождается ишемией тканей МВП [49].

Известно [106], что активация рецепторов P2X_1 сопровождается входом ионов Ca^{2+} и Na^+ в цитоплазму тромбоцита с последующей активацией сигнальных путей, усиливающих эффекты основных агонистов, регулирующих функцию тромбоцитов: адреналина (адренорецептор $\alpha_2\text{A}$),

тромбина (рецептор PAR-1), тромбопоэтина (рецептор c-Mpl), АДФ (рецептор P2Y₁), коллагена (рецептор GPVI), ангиотензина (AT₁-рецептор), фактора Виллебранда (рецептор GP Iba), ЛПС (рецептор Toll-like 1/2). При этом секреция АТФ из плотных гранул способствует дальнейшему росту концентрации Ca²⁺ в тромбоците [138].

Через 72ч после КЛТ в верхней трети мочеточника (24ч после отмены НПВП) микрогематурия уменьшилась в 2,2 раза ($P<0,001$) по сравнению с предыдущим сроком наблюдения. Выявлена нормореактивность α_2 -адренорецептора, GPVI-рецептора, AT₁-рецептора, TxA₂-рецептора, ФАТ-рецептора и P2X₁-рецептора, а также гипореактивность пуриновых P2Y-рецепторов и A₂A-рецептора. Установлено наличие отрицательной связи между выраженностью гематурии и активностью GP VI-рецептора, α_2 -адренорецептора, AT₁-рецептора и TxA₂-рецептора. Множественный корреляционный анализ позволил установить значимые связи между активностью GPVI-рецептора и α_2 -адренорецептора, AT₁-рецептора, ФАТ-рецептора, P2X₁-рецептора. Снижение выраженности микрогематурии было связано со стимуляцией и взаимодействием GP VI-рецептора, α_2 -адренорецептора и AT₁-рецептора, находящихся в состоянии нормореактивности. Максимальный эффект агрегации Тц воспроизводился при взаимодействии пуриновых GPVI-рецептора и α_2 -адренорецептора, что может быть связано с ко-активацией участка сигнализации SFK–ФИ-3К [235].

Через 72ч после КЛТ в средней трети мочеточника и отмены НПВП микрогематурия снижалась на 32,7% ($P<0,001$) по сравнению со сроком наблюдения 48ч. При этом обнаружена гиперреактивность пуриновых P2Y-рецепторов, TxA₂-рецептора и α_2 -адренорецептора; нормореактивность AT₁-рецептора, ФАТ-рецептора, P2X₁-рецептора, GPVI-рецептора и аденозинового A₂A-рецептора. Наличие отрицательной корреляционной связи между выраженностью гематурии и активностью TxA₂-рецептора свидетельствует об участии сигнальных путей, связанных с Gq- и G₁₃-

белками, в стимуляции тромбогенеза после восстановления активности ЦОГ [308]. Выявленная корреляционная связь P2Y-рецепторов, TxA₂-рецептора и α_2 -адренорецептора позволяет предположить их участие в регуляции функции Тц на фоне восстановления активности ЦОГ в Тц. Наиболее выраженный эффект синергизма воспроизводился при взаимодействии пуриновых P2Y-рецепторов и α_2 -адренорецептора. Полученные результаты свидетельствуют, что (а) при возобновлении функционирования системы ЦОГ-TxA₂ восстанавливается внутриклеточная сигнализация АДФ, который является более сильным агонистом, чем АТФ [72]; (б) устанавливается взаимодействие рецепторов, позволяющих обеспечить усиление проагрегантного эффекта агонистов [384]. Таким образом, при восстановлении активности ЦОГ регуляция адаптационной реакции гемостаза обусловлена изменением функциональной активности Тц вследствие: (а) усиления влияния α_2 -адренорецептора, сигнализация которого связана с Gi-белком [172]; (б) стимуляции GP VI-рецептора, АТ₁-рецептора и TxA₂-рецептора, сопряженных с участком сигнализации фосфолипаза C β – ФИ-3К [262], что предполагает возможность синергизма эффектов при взаимодействии данных рецепторов.

Таким образом, через 72ч после КЛТ в разных отделах мочеточника при отмене НПВП восстанавливались стереотипные механизмы тромбогенеза, связанные со стимуляцией TxA₂-рецептора и α_2 -адренорецептора. Причем, если в случаях с верхней третью мочеточника имела место нормореактивность этих рецепторов, то после КЛТ в средней трети – гиперреактивность. Данный факт подтверждает, что при восстановлении синтеза TxA₂ стимуляция α_2 -адренорецептора может обеспечивать существенное усиление агрегации Тц вследствие повышения внутриклеточного Ca⁺ [251]. После КЛТ в верхней трети мочеточника аддитивным механизмом усиления агрегации Тц-индуцированной адреналином являлась стимуляция GP VI-рецептора и АТ₁-рецептора, что возможно при (а) усилении активности GPVI-рецептора в случае отмены

НПВП [85, 401]; (б) возможности ко-активации сигнальных путей связанных G_i - белком (α_2 -адренорецептор) и G_q -белком (AT_1 -рецептор) [101]. После КЛТ в средней трети мочеточника при восстановлении активности ЦОГ в клетках крови аддитивным механизмом усиления агрегации Тц-индуцированной адреналином являлась стимуляция $P2Y$ -рецепторов и TxA_2 -рецептора, что предопределяется гиперреактивностью данных рецепторов; при этом активность $GPVI$ -рецептора и AT_1 -рецептора находилась в диапазоне нормореактивности. Логично, что восстановление конститутивной сигнализации, опосредованной G_i - и G_q -белками, которые ассоциированы с $P2Y$ -рецепторами является более значимым, чем индуцибельная сигнализация, связанная с ко-активацией G_q -белка ($P2Y$ -рецепторы и TxA_2 -рецептора) и/или ко-активацией G_q -белка и G_i - белка (TxA_2 -рецептора и α_2 -адренорецептор) [374].

Через 7 суток после КЛТ в верхней трети мочеточника макрогематурия отсутствовала; микрогематурия сохранялась на уровне средней степени тяжести, хотя и уменьшилась на 31,2% ($P < 0,001$) по сравнению со сроком наблюдения 72ч после КЛТ (24ч после прекращения введения НПВП). Выявлена гиперреактивность $GPVI$ -рецептора и TxA_2 -рецептора; нормореактивность $P2Y$ -рецепторов, AT_1 -рецептора, $ФАТ$ -рецептора и $P2X_1$ -рецептора, α_2 -адренорецептора и A_2A -рецептора. По сравнению со сроком наблюдения 72ч после КЛТ, реактивность α_2 -адренорецептора снизилась на 16,7% ($P < 0,001$) Активность $P2X_1$ -рецептора увеличилась на 6,5%, $GPVI$ -рецептора – на 8,7%, AT_1 -рецептора – на 8,8%, $ФАТ$ -рецептора –9,3%, активность TxA_2 -рецептора – на 13,1%, A_2A -рецептора –на 24,8% и $P2Y$ -рецепторов –на 37,8% ($P < 0,001$). Анализ множественной корреляции выявил наличие отрицательной связи между выраженностью гематурии и активностью $GP VI$ -рецептора, AT_1 -рецептора, TxA_2 -рецептора, PY -рецепторов, α_2 -адренорецептора, $P2X_1$ -рецептора и $ФАТ$ -рецептора.

В тоже время установлены корреляционные связи между активностью $GPVI$ -рецептора и PY -рецепторов, AT_1 -рецептора, а также между

активностью P_Y-рецепторов и АТ₁-рецептора, что отражает возможности взаимодействия данных рецепторов в адапционных реакциях тромбоцитарного звена гемостаза [76]. При одновременной стимуляции GPVI-рецептора и P_{2Y}-рецепторов отмечено увеличение значений амплитуды, Slope и AUC ($P < 0,001$), по сравнению с изолированной стимуляцией GPVI-рецептора. Данный факт свидетельствует, что в отдаленные сроки после отмены НПВП сигнализация посредством участка фосфолипаза C β –ФИ-3К (GP VI-рецептор) и через Gq-белок (АТ₁-рецептор) лежит в основе синергизма рецепторов при реализации адапционных механизмов гемостаза.

Через 7 суток после КУЛТ в средней трети мочеточника выраженность микрогематурии снижалась в 6,9раза ($P < 0,001$) по сравнению с предыдущим сроком наблюдения. Выявлена гиперреактивность ФАТ-рецептора, ТхА₂-рецептора, пуриновых P_{2Y}-рецепторов и GPVI-рецептора, и нормореактивность P_{2X}₁-рецептора, АТ₁-рецептора, α_2 -адренорецептора и аденозинового А_{2А}-рецептора. По сравнению со сроком наблюдения 72ч после КЛТ, активность ФАТ-рецептора и GPVI-рецептора возросла ($P < 0,001$); АТ₁-рецептора, α_2 -адренорецептора и А_{2А}-рецептора снизилась ($P < 0,05$). Не обнаружено статистически значимых изменений активности P_{2X}₁-рецептора P_{2Y}-рецепторов и ТхА₂-рецептора. Выявленная взаимосвязь активности ТхА₂-рецептора P_{2Y}-рецепторов и GP VI-рецептора свидетельствует об их участии в реализации адапционных механизмов гемостаза. Максимальный эффект агрегации Тц воспроизводился *in vitro* при взаимодействии GPVI-рецептора и P_{2Y}-рецепторов; данный эффект может достигаться благодаря ко-активации фосфолипазы C β и/или ФИ-3К [338].

Таким образом, через 7 суток после КЛТ в разных отделах мочеточника и отмене НПВП восстанавливались стереотипные механизмы тромбогенеза, связанные со стимуляцией GPVI-рецептора и P_Y-рецепторов. Причем, если в случаях с верхней третью мочеточника имела место нормореактивность GPVI-рецептора и гипореактивность P_Y-рецепторов, то после КЛТ в средней

трети –гиперреактивность этих рецепторов. Данный факт подтверждает, что восстановление активности GPVI-рецептора является ключевым механизмом тромбогенеза [81]. Аддитивным механизмом усиления агрегации Тц-индуцированной коллагеном после КЛТ в верхней трети являлась стимуляция AT_1 -рецептора, активность которого соответствовала нормореактивности. Вероятно, при восстановлении физиологической активности GPVI-рецептора и AT_1 -рецептора через 7 суток после КЛТ достигается сопряженность сигнального пути связанного с участком фосфолипаза $C\beta$ –ФИ-3K/Akt (GP VI-рецептор) и сигнализации через Gq-белок (AT_1 -рецептор) [171]. После КЛТ в средней трети мочеточника аддитивным механизмом усиления агрегации Тц-индуцированной коллагеном являлась стимуляция TxA_2 -рецептора, что предопределяется гиперреактивностью данного рецептора. Известно, что взаимодействие GPVI-рецептора со своим лигандом усиливается локально продуцируемым тромбином и вторичными медиаторами тромбоцитов, такими как АДФ и TxA_2 [263]. Данный феномен обусловлен сдвигом интегринов β_1 и β_3 из состояния с низким сродством к состоянию с высоким сродством к их лигандам, посредством передачи сигналов «inside-out», обеспечивающей прочную адгезию и агрегацию тромбоцитов. Можно ожидать, что расшифровка механизмов регуляции компенсаторных и адаптационных реакций Тц в различные сроки после КУЛТ позволит разработать новые методы лечения и профилактики геморрагии и гематурии связанные с КУЛТ в зависимости от назначения и отмены НПВП.

Остаются не выясненными механизмы, контролирующие развитие пиелонефрита после оперативных вмешательств на МВП [287]. Одной из причин модуляции воспалительной реакции может быть длительная ЛКТ, включающая НПВП для анальгезии при почечной колике [43, 148]. Возникающее при этом ингибирование ЦОГ влияет на внутриклеточную сигнализацию в клетках крови [216], следствием чего могут быть изменения трансэндотелиальной миграции лейкоцитов и трафика клеток крови в рыхлой

волокнуистой соединительной ткани слизистой оболочки мочеточника при инфекции МВП [286].

Анализ динамики воспалительной реакции в МВП представляется достаточно субъективным, если необходимо установить переход от хронического к острому воспалению. Это связано с ограниченным набором информативных и специфичных индикаторов (лейкоцитоз, С-реактивный белок, СОЭ, спектр цитокинов). Очевидно, что констатация острого пиелонефрита это – и понимание упущенных возможностей для ранней профилактики и лечения. Известно, что реализация воспаления в организме осуществляется путем рекрутирования и миграции лейкоцитов из крови через эндотелий в рыхлую волокнуистую соединительную ткань. Однако, остаются не выясненными механизмы активации циркулирующих лейкоцитов, хотя факт взаимодействия лейкоцитов и Тц не вызывает сомнений [226]. В процессе развития воспалительной реакции активированные Тц могут индуцировать лейкоциты путем формирования ТЛА [169]. Условием взаимодействия клеток крови является активация Тц или лейкоцитов, проявляющаяся повышением экспрессии адгезивных молекул CD62P и CD40L [260]. Предлагается использовать тромбоцитарно-моноцитарные агрегаты (ТМА) как «золотой стандарт» активации тромбоцитов *in vivo* [64, 292]. Несмотря на проявляемый интерес к отдельным видам ТЛА, значение соотношения разных агрегатов при реализации воспаления остается не понятным. Отсутствуют знания, касающиеся роли различных агонистов, стимулирующих клетки при формировании ТЛА, а также – механизмов, обеспечивающих поддержание хронического воспаления и переход к острой воспалительной реакции [118]. При анализе механизмов ранней фазы воспаления, связанной с рекрутированием лейкоцитов из сосудистого русла необходимо учитывать наличие гематурии и включение механизмов поддержания гемостаза, связанных с функцией Тц. Одной из причин поддержания острого воспаления в МВП при нефролитиазе может быть длительное назначение

НПВП пациентам при неэффективной элиминации конкрементов из МВП, поскольку функциональная активность лейкоцитов настолько снижена, что не обеспечивается эффективный фагоцитоз [395]. Ситуация усугубляется после КЛТ поскольку разрушается уротелий и развивается инфекция в слизистой оболочке мочеточника. В этом случае сохранение введения НПВП должно сопровождаться усилением компенсаторной реакции лейкоцитов, призванных выполнять защитную функцию в организме [131]. Восстановление активности ЦОГ в клетках крови после отмены НПВП сопровождается переходом от компенсаторной к адаптационной реакции лейкоцитов. Регуляция компенсаторной и адаптационной реакции клеток крови при введении и отмене НПВП не изучена. Можно предположить, что анализ активности рецепторов на Тц и лейкоцитах, модулирующих миграцию клеток на разных этапах развития воспалительной реакции, позволит воссоздать картину патогенеза острого пиелонефрита на этапах консервативного и оперативного лечения пациентов с нефролитиазом.

Установлено, что через 48ч после КЛТ в верхней трети мочеточника при введении НПВП имеется положительная связь между количеством ТЛА и активностью α_2 -адренорецептора, ФАТ-рецептора и $P2X_1$ -рецептора. Выявленная положительная корреляционная связь между активностью α_2 -адренорецептора и ФАТ-рецептора, $P2X_1$ -рецептора позволяет рассматривать САС как фактор риска активации лейкоцитов в результате как прямой стимуляции адренорецепторов на лейкоцитах [109], так и посредством паракринной стимуляции (АТФ) активированными Тц [143]. Лейкоцитурия уменьшилась на 22,3% по сравнению с предыдущим сроком наблюдения и соответствовала легкой степени выраженности. Тяжесть лейкоцитоза в СО мочеточника снижалась параллельно с уменьшением количества рекрутируемых лейкоцитов; вероятно, ингибирование ЦОГ в Тц и лейкоцитах обеспечивалось поддержанием оптимального баланса количества клеток крови, участвующих в реализации воспаления [412]. Обнаружена положительная связь между выраженностью лейкоцитурии и активностью

α_2 -адренорецептора, ФАТ-рецептора и $P2X_1$ -рецептора. Имелась корреляция между активностью ФАТ-рецептора и $P2X_1$ -рецептора. Следовательно, на фоне длительного ингибирования ЦОГ в клетках крови, формирование ТЛА для рекрутирования лейкоцитов в ткани МВП и лейкоцитурия контролируются одними и тем же патогенетическим фактором – активацией САС и повышением уровня циркулирующих катехоламинов. Участие САС в рекрутировании лейкоцитов представляется логичным, поскольку экспрессия α_2 -адренорецепторов на Тц, лейкоцитах и эндотелии [332, 214] создает оптимальные условия для формирования ТЛА при развитии пиелонефрита [3, 376]. Сохранение нормореактивности ФАТ-рецептора и $P2X_1$ -рецептора, их связь с лейкоцитурией в этот срок наблюдения отражают «остаточную» реактивность ЦОГ лейкоцитов и Тц при длительном назначении НПВП, позволяющую клеткам крови взаимодействовать паракринными механизмами [29]. Участие ФАТ-рецептора в лейкоцитурии связано с повышением экспрессии Р-, L-селектинов, обеспечивающих взаимодействие клеток крови [142] и увеличением проницаемости эндотелия и адгези лейкоцитов [252, 277].

Через 48ч после КЛТ в средней трети мочеточника количество циркулирующих ТЛА снижалось, что может быть обусловлено изменением спектра компенсаторных механизмов, целью которых является модуляция взаимодействия Тц и лейкоцитов для обеспечения защитной реакции в стенке МВП. В последующем, после отмены НПВП, должны включаться адаптационные механизмы, призванные поддерживать воспалительную реакцию в МВП до момента устранения микробной инвазии; при этом трансформируются механизмы регулирующие активность лейкоцитов, при сохранении введения НПВП. Активность ЦОГ снизилась до порогового уровня, при котором чувствительность TxA_2 -рецептора находилась в диапазоне гипореактивности. Следствием ингибирования ЦОГ в клетках крови было снижение активности лейкоцитов, секретирующих провоспалительный медиатор – ФАТ. В этом контексте, восстановление гемостаза и развитие

воспаления обусловлены функционированием компенсаторных механизмов клеток крови [27]. Анализ множественной корреляции свидетельствует о сохранении положительной связи ТЛА с активностью ФАТ-рецептора, P2Y-рецепторов и АТ₁-рецептора, а также отрицательной связи между количеством ТЛА и активностью А2А-рецептора. Обнаружена связь между лейкоцитурией и активностью GPVI-рецептора; сохранялась связь трафика лейкоцитов с активностью α_2 -адренорецептора и А2А-рецептора. Следовательно, стереотипный механизм регуляции формирования ТЛА в течение 48ч после КЛТ представлен сигнализацией P2Y-рецептора и ФАТ-рецептора; вариативные механизмы регуляции обеспечивались активностью АТ₁-рецептора. Стереотипным механизмом регуляции лейкоцитурии при ингибировании ЦОГ являлась активация α_2 -адренорецептора; вариативные механизмы, модулирующие компенсаторные реакции лейкоцитов, связаны с активностью GPVI-рецептора и, вероятно, обусловлены уровнем цАМФ [331]. Обращает на себя внимание, что при сохранении введения НПВП через 48ч после КЛТ в разных отделах мочеточника общим механизмом формирования ТЛА являлась активация ФАТ-рецептора, который представлен на Тц и лейкоцитах [222]. В этом контексте можно заключить, что (а) несмотря на введение НПВП в клетках крови сохраняется достаточная остаточная активность ЦОГ, позволяющая поддерживать функциональную активность лейкоцитов; (б) ведущую роль в образовании ТЛА и поддержании воспаления в МВП играют лейкоциты (нейтрофилы), которые секретируют ФАТ и стимулируют Тц [126]. Что касается механизмов регуляции трафика лейкоцитов в стенке МВП (лейкоцитурия) через 48ч после КЛТ, то независимо от локализации конкрементов общим механизмом регуляции компенсаторных реакций лейкоцитов при ингибировании ЦОГ являлась активация α_2 -адренорецептора.

Через 72 ч после КЛТ в верхней трети мочеточника (24ч после отмены НПВП) количество циркулирующих ТЛА увеличилось в 2,2 раза и лейкоцитурия на 46,3% ($p < 0,001$), по сравнению с предшествующим сроком

наблюдения. Выявлена корреляционная связь между количеством ТЛА и активностью α_2 -адренорецептора, GPVI-рецептора, P2X₁-рецептора, активностью AT₁-рецептора и ФАТ-рецептора. Таким образом, триггерами формирования ТЛА, обеспечивающих поддержание воспалительной реакции после КЛТ, являются как системные регуляторы – адреналин и ангиотензин-2, так и локальные модуляторы функциональной активности клеток крови – ФАТ, АТФ и коллаген IV-типа БМ стенки сосудов. При наличии нормореактивности α_2 -адренорецептора, GPVI-рецептора, пуриновых P2-рецепторов, AT₁-рецептора и ФАТ-рецептора усиление формирования ТЛА может достигаться благодаря синергизму рецепторов [328]. В исследовании также выявлена связь между выраженностью лейкоцитурии и активностью GPVI-рецептора, ФАТ рецептора, P2X₁-рецептора, α_2 -адренорецептора. Полученные данные подтверждают общность механизмов, регулирующих разные стадии воспалительной реакции после КЛТ в верхней трети мочеточника при восстановлении активности ЦОГ в клетках крови [304, 303].

Через 72 ч после КЛТ в средней трети мочеточника количество ТЛА уменьшилось на 13,8% и лейкоцитурия – на 29,7% ($p < 0,001$) по сравнению со сроком наблюдения 48ч, что свидетельствуют о синхронизации и эффективности ранней стадии адаптационных процессов, призванной оптимизировать разные этапы воспалительной реакции в МВП. Активность ЦОГ возрастала до физиологического уровня, при котором активность TxA₂-рецептора находилась в диапазоне нормореактивности. Анализ множественной корреляции свидетельствует о наличии корреляционной связи между количеством ТЛА, активностью α_2 -адренорецептора, P2X₁-рецептора и TxA₂-рецептора; сохранялась положительная связь ТЛА с активностью ФАТ-рецептора. Обнаружена положительная связь между выраженностью лейкоцитурии и активностью ФАТ-рецептора, P2Y-рецепторов; сохранялась связь трафика лейкоцитов с активностью α_2 -адренорецептора и A₂A-рецептора. Следовательно, регуляция формирования

ТЛА связана со стимуляцией α_2 -адренорецептора, $P2X_1$ -рецептора, TxA_2 -рецептора и ФАТ-рецептора; тогда как лейкоцитурия контролировалась ФАТ-рецептором α_2 -адренорецептором, $P2Y$ -рецепторами и A_2A -рецептором. Следовательно, через 72ч после КЛТ в разных отделах мочеточника стереотипными механизмами регуляции адаптационных реакций клеток крови связанных с формированием ТЛА являлись стимуляция α_2 -адренорецептора, $P2X_1$ -рецептора и ФАТ-рецептора; лейкоцитурия регулировалась активностью α_2 -адренорецептора и ФАТ-рецептора. В литературе приведены доказательства участия указанных рецепторов в индукции функциональной активности клеток крови при развитии воспалительной реакции [318, 372, 34].

Через 7 суток после КУЛТ в верхней трети мочеточника (120ч после отмены НПВП отмечено снижение лейкоцитурии ($p < 0,05$), что проявлялось уменьшением силы корреляционной связи между выраженностью лейкоцитурии и гематурии. Сохранялись корреляционные связи между выраженностью лейкоцитурии и активностью $GPVI$ -рецептора, TxA_2 -рецептора, ФАТ-рецептора и $P2X_1$ -рецептора; отрицательная связь имела место между лейкоцитурией и активностью аденозинового A_2A -рецептора. Кластер данных рецепторов может повышать уровень внутриклеточного Ca^{2+} в результате сопряженности сигнальных путей, связанных с активацией ФИ-3К через Gi -, Gq -, G_{13} -белки [335] и открытия управляемого АТФ катионного канала. Вариативным механизмом увеличения количества ТЛА может быть активация ФАТ-рецептора (вследствие сопряженности путей сигнализации, связанных с Gq -белком), а усиления лейкоцитурии – стимуляция TxA_2 -рецептора (ко-активация сигнальных путей, связанных с Gq -белком и G_{13} -белком). Защитная реакция, направленная на ограничение количества циркулирующих ТЛА, обусловлена снижением активности α_2 -адренорецептора и нивелированием влияния $P2X_1$ -рецептора и AT_1 -рецептора на функцию клеток крови. В случае с α_2 -адренорецептором

причиной десенситизации рецептора может быть влияние A2A-рецептора [388].

Известно, что активированные тромбоциты секретируют растворимые медиаторы, такие как АДФ, АТФ, ТхА2, серотонин и др. [80]. Эти посредники, в свою очередь, стимулирует GPCRs (G-protein-coupled receptors), которые являются критическими для начала различных внутриклеточных сигнальных путей, связанных с активацией фосфолипазы С, протеинкиназы С и ФИ-3К [320]. Образовавшиеся мессенджеры способствуют активации интегрин $\alpha\text{IIb}\beta_3$, оказывающего существенное влияние на агрегацию тромбоцитов [97]. Два белка, талин и киндлин, которые связываются с различными регионами цитоплазматических доменов интегрин, играют важную роль в повышении аффинитета интегрин, необходимого для адгезивных взаимодействий тромбоцитов и лейкоцитов. ТхА2 синтезируется эндогенно из арахидоновой кислоты, которая выделяется из фосфолипидов мембран Тц с помощью цитозольной фосфолипазы А2 [329] Фосфорилирование серина ФЛА2 в положении Ser505 и ее перемещение в мембраны Са-зависимым путем является важным этапом активации цитоплазматической ФЛА2 [60]. В тромбоцитах фосфорилирование цФЛА2 происходит после стимуляции тромбином, ангиотензином II, адреналином или коллагеном. Синтез ТхА2 приводит к дальнейшей активации Тц, путем взаимодействия с ТР (Тромбоксан-Простагландинным) рецептором, связанным с Gq – и G_{12/13} белками [122]. Поскольку стимуляция Тц с высокой и низкой дозами агониста GPVI-рецептора в присутствии блокаторов интегрин характеризуется незначительным снижением продукции ТхА2 [69], то принято считать, что Тц могут генерировать тромбоксан интегрин-зависимым и интегрин-независимым образом. Имеются доказательства, что Р-селектин–опосредованные события имеют важное значение для начала формирования ТЛА, в то время как интегрин - способствует стабильности агрегатов при высоком напряжении сдвига [398]. Активированные лейкоциты

характеризуются повышенным синтезом ТхА2 [88], поэтому вполне логично индуцированное формирование ТЛА для поддержания воспалительной реакции. Почему через 7 суток после КЛТ в верхней трети мочеточника сохраняется активация лейкоцитов (поддерживается воспаление в стенке МВП)? Ответ на данный вопрос остается открытым, можно лишь предполагать, что это связано с медленным восстановлением барьерной функции уротелия [93].

Через 7 суток после КЛТ в средней трети мочеточника количество ТЛА снизилось на 17,7%, а лейкоцитурия – на 25,6% ($p < 0,001$) по сравнению с предыдущим сроком наблюдения. Анализ множественной корреляции позволил выявить положительную корреляционную связь между количеством ТЛА и активностью P2Y-рецепторов и GPVI-рецептора, а также – отрицательную связь с активностью A2A-рецептора. Сохранялась положительная связь количества ТЛА с активностью P2X₁-рецептора и ФАТ-рецептора. Обнаружена положительная связь между выраженностью лейкоцитурии и активностью P2X₁-рецептора; сохранялась связь трафика лейкоцитов с активностью ТхА2-рецептора. Таким образом, через 7 суток после КЛТ в средней трети мочеточника: (а) адаптационная реакция на этапе формирования ТЛА и рекрутирования лейкоцитов регулируется активностью P2Y-рецепторов, P2X₁-рецептора, ФАТ-рецептора и GPVI-рецептора; тогда как на этапе трафика лейкоцитов в стенке МВП – P2X₁-рецептором и ТхА2-рецептором; (б) ограничение воспалительной реакции модулируется аденозиновым A2A-рецептором и связано с уменьшением количества циркулирующих ТЛА. Стереотипными механизмами регуляции адаптационных реакций клеток крови, обеспечивающих гемостаз и защитную реакцию лейкоцитов в слизистой МВП после КЛТ, являются стимуляция P2Y-рецепторов, P2X₁-рецептора и GPVI-рецептора. Данный кластер рецепторов обеспечивает увеличение внутриклеточного Ca^{2+} посредством сопряженности сигнальных путей, связанных с активацией ФИ-3К посредством Gi-, Gq-, G₁₃-белков и открытием управляемого АТФ

катионного канала [361]. Вариативным механизмом, поддерживающим формирование ТЛА, может быть активация ФАТ-рецептора (вследствие сопряженности путей сигнализации, связанных с Gq-белком), а лейкоцитурии – стимуляция ТхА2-рецептора (ко-активация сигнальных путей, связанных с Gq-белком и G₁₃-белком) [191, 218]. Что касается участия P2X₁-рецептора в формировании ТЛА через 7 суток после КЛТ в средней трети мочеточника для поддержания воспаления, то этот процесс может быть обусловлен повышением экспрессии рецепторов для АТФ на поверхности лейкоцитов при их мобилизации [190, 68]. АТФ и хемокины и являются ключевыми медиаторами в зоне воспаления, высвобождение и рецепция внеклеточного АТФ лейкоцитами играет критическую роль в реакциях на травму и инфекцию [33]. Подтверждено, что макрофаги стимулируемые АТФ, активирует сигнальные пути, которые обеспечивают продукцию активных форм кислорода и способствуют выработке MIP-2, который регулирует миграцию нейтрофилов [184].

Проведенное исследование позволило впервые выявить как общие, так и специфические механизмы регуляции лейкоцитурии после КЛТ в разных отделах мочеточника. Участие P2X₁-рецептора и ТхА2-рецептора в регуляции трафика лейкоцитов в слизистой МВП проявлялось независимо от отдела мочеточника в котором проводилась КЛТ. Данный факт представляется понятным, учитывая возможность сохранения воспалительной реакции до восстановления барьерной функции уротелия [130, 392]. При этом синтез ТхА2 и повышение секреции АТФ являются звеньями одной цепи патологических процессов, сохраняющихся в тканях МВП через 7 суток после оперативного вмешательства: нарушение микроциркуляции – ишемия –воспаление – гематурия. В этом контексте стереотипные механизмы регуляции функциональной активности клеток крови и лейкоцитурия отражают наличие одних и тех факторов патогенеза пиелонефрита [283, 398]. Имеется ли объяснение специфической регуляции трафика лейкоцитов через 7 суток после КЛТ в верхней трети мочеточника,

которая связана с активацией GPVI-рецептора и ФАТ-рецептора? Сочетание данных рецепторов представляется объяснимым с точки зрения востребованной миграции лейкоцитов при которой усиливается функциональная деградация внеклеточного матрикса МВП [90, 136]. Иной вопрос- почему именно в верхней трети мочеточника воспалительная реакция связана с активацией GPVI-рецептора и ФАТ-рецептора? Тут может быть несколько объяснений – большая степень альтерации тканей мочеточника [342, 209], частота инфицирования МВП [377] и др.

Проблема прогнозирования рисков болезни или ее осложнений связана с информативностью клинико-лабораторных методов исследования [10,355]. Однако, даже при высокой информативности существующих современных методов диагностики математическое прогнозирование является скорее «красивой игрушкой» в руках научных работников, чем – рабочим инструментом в практической медицине. Подтверждением этого утверждения может быть факт низкой эффективности прогнозирования развития осложнений после КЛТ при экстраполяции полученных научных результатов в клиническую практику [140, 228]. Причина сложившейся ситуации видится в выхолащивании фундаментальных знаний цитологии и патофизиологии, желании заменить анализ кинетики механизмов патогенеза расчетом корреляционных связей между показателями на большом массиве данных. Ни в коем случае не умаляя значимость доказательной медицины, нельзя не видеть одну «ахиллесову пяту» такого методического подхода – между фактором риска и частотой возникновения осложнения, часто выпадает теоретическое доказательство того, что исследуемый фактор действительно воспроизводит определенный механизм развития конкретного осложнения. В этой связи, на одном из этапов исследования предшествующем биостатистике, целесообразно прибегать к моделированию *in vitro* общепатологических процессов, лежащих в основе прогнозируемого осложнения.

Одним из методических подходов к решению данной задачи может быть исследование внутриклеточной сигнализации на изолированных клетках крови, имеющих рецепторы-«сенсоры», воспринимающие разнообразные эндо- экзогенные воздействия «возмущающие» гомеостаз [40]. Логично предположить, что фактор риска болезни или возникновения осложнения вызывает появление в сосудистом русле или ЦНС каскада молекул, которые связываясь с соответствующими рецепторами вызывают защитную реакцию клеток и тканей в органах. В случае, если биохимический «мессенджер» фактора риска воспроизводит реакцию клетки, то он может быть признан значимым в анализе причинно-следственных связей, а выявленный конкретный патогенетический механизм может быть использован для таргетной оптимизации методов профилактики и лечения пациента.

Для проверки гипотезы необходимы инновационные биотехнологии, разработка которых ведется по нескольким направлениям. С нашей точки зрения, таковыми являются, во-первых, исследование *in vitro* функциональной активности рецепторов на клетках крови, обеспечивающих «ввод информации» в клетки о патогенетических факторах нарушающих гомеостаз [411]. Во-вторых, моделирование *in vitro* взаимодействия клеток крови, предопределяющего развитие воспалительной реакции. Известно, что на раннем этапе воспаления происходит активация клеток крови и формирование ТЛА [292]. Такое взаимодействие обеспечивает: (а) адгезию лейкоцитов к эндотелию и их рекрутирование из сосудистого русла в ткани органов; (б) регуляцию автономных функций лейкоцитов, включая образование и освобождение внеклеточных ловушек нейтрофилов [48]; (в) поддержание обратной связи, позволяющей ограничивать тяжесть воспаления и защищать орган от вторичной альтерации, вызванной чрезмерной активацией иммунной системы [302]. Доказательством участия конкретных рецепторов и их взаимодействия в регуляции компенсаторных и адаптационных реакций клеток крови могут быть результаты моделирования

in vitro механизмов агрегации Тц и формирования ТЛА. В этой связи были исследованы молекулярные механизмы регуляции и внутриклеточной сигнализации клеток крови после КЛТ при назначении НПВП. Как уже отмечалось, активация P2Y-рецепторов, α_2 -адренорецептора и ФАТ-рецептора может рассматриваться как стереотипный механизм, регулирующий компенсаторные реакции Тц и лейкоцитов при ингибировании активности ЦОГ. Моделирование *in vitro* механизмов регуляции компенсаторной реакции клеток крови через 24ч после КЛТ показало, что наиболее выраженный эффект агрегации Тц вызывал АДФ, тогда как максимальное количество ТЛА воспроизводили адреналин и АДФ. Амплитуда АТц при изолированной стимуляции P2Y-рецепторов, Slope и AUC была больше таковых при стимуляции ФАТ-рецептора. Максимальное количество ТЛА формировалось при стимуляции P2Y-рецепторов и α_2 -адренорецептора. Таким образом, P2Y-рецепторы, α_2 -адренорецептор и ФАТ-рецептор модулируют внутриклеточную сигнализацию, следствием чего являлось усиление АТц и формирования ТЛА [268].

Через 48ч после КУЛТ на фоне введения НПВП достигался остаточный уровень активности ЦОГ, что сопровождалось изменением компенсаторной реакции клеток крови, в регуляции которой предполагалась участие P2Y-рецепторов, ФАТ-рецептора и АТ₁-рецептора. Моделирование *in vitro* показало, что наиболее выраженный эффект агрегации Тц индуцировал АДФ, тогда как максимальное количество ТЛА воспроизводил ФАТ. При изолированной стимуляции P2Y-рецепторов значения Slope и AUC были больше таковых при стимуляции АТ₁-рецептора. Параметры агрегатометрии при изолированной стимуляции АТ₁-рецептора и ФАТ-рецептора были сопоставимыми. Установлено, что максимальный эффект агрегации Тц воспроизводился при взаимодействии P2Y-рецепторов и АТ₁-рецептора. В основе данного эффекта, лежит ко-активация внутриклеточных сигнальных систем, связанных с Gq-белком, что представляется логичным в условиях снижения активности α_2 -адренорецептора и уменьшения сигнализации,

связанной с Gi-белком [271]. Значения амплитуды Slope и AUC при одновременной стимуляции этих рецепторов превышали таковые при изолированной стимуляции P2Y-рецепторов. При взаимодействии P2Y-рецепторов и ФАТ-рецептора, а также ФАТ-рецептора и АТ₁-рецептора формировалось наибольшая численность ТЛА. Сопоставление эффективности механизмов, обеспечивающих максимальное формирование ТЛА через 24ч (взаимодействие P2Y-рецепторов и α_2 -адренорецептора) и 48ч (взаимодействие ФАТ-рецептора и АТ₁-рецептора) свидетельствует об ингибирующем влиянии ЦОГ на образование агрегатов. Так, через 48ч сформировалось ТЛА на 16,1% ($p < 0,05$) меньше, чем через 24ч. Таким образом, при ингибировании ЦОГ оптимальная регуляция компенсаторных реакций Тц и обеспечивается сопряженностью внутриклеточной сигнализации системы рецепторов связанных с G-белками (GPCR, G-protein [guanine nucleotide-binding protein]-coupled receptors).

Концепция регулирования адаптационных реакций клеток крови через 72ч после КУЛТ в средней трети мочеточника проверялась путем моделирования *in vitro* взаимосвязи P2X₁-рецепторов, ФАТ-рецептора и α_2 -адренорецептора. Наиболее выраженный эффект агрегации Тц индуцировал АТФ; при изолированной стимуляции P2X₁-рецептора значения AUC были больше таковых при стимуляции α_2 -адренорецептора и ФАТ-рецептора. При стимуляции P2X₁-рецептора и α_2 -адренорецептора формировалось сходное количество ТЛА, ФАТ-рецептор воспроизводил больше ТЛА, чем – α_2 -адренорецептор. Установлено, что максимальный эффект агрегации Тц воспроизводился при взаимодействии P2X₁-рецептора и α_2 -адренорецептора. В основе данного эффекта, вероятно, лежит повышение уровня внутриклеточного Ca²⁺, вследствие открытия, управляемого АТФ ионного канала и сигнализации, связанной с Gi- белком [26, 247]. Значения амплитуды, Slope и AUC при одновременной стимуляции этих рецепторов превышали таковые при изолированной стимуляции P2X-рецептора. Эффект синергизма воспроизводился при одновременной стимуляции α_2 -

адренорецептора и ФАТ-рецептора, а также P2X₁-рецептора и ФАТ-рецептора. Наиболее выраженный эффект формирования ТЛА *in vitro* обнаружен при взаимодействии ФАТ-рецептора и α_2 -адренорецептора, а также P2X₁-рецептора и ФАТ-рецептора. Количество ТЛА, образовавшихся при одновременной стимуляции P2X₁-рецептора и ФАТ-рецептора, превышало таковое при изолированной стимуляции P2X₁-рецептора и ФАТ-рецептора.

Через 7 суток после КЛТ адаптационная реакция Тц и лейкоцитов регулировалась активностью GPVI-рецептора, P2Y-рецепторов и P2X₁-рецептора. Моделирование *in vitro* показало, что АДФ и коллаген IV типа воспроизводили сходные параметры агрегации и формирования ТЛА. При анализе возможностей синергизма P2Y-рецепторов, P2X₁-рецептора и GPVI-рецептора установлено, что максимальный эффект агрегации Тц достигался при взаимодействии P2Y-рецептора и GPVI-рецептора. В основе данного эффекта, вероятно, лежит повышение уровня внутриклеточного Ca²⁺, вследствие сопряженности сигнализации, ассоциированной с участком Syk-ФИ-3К – ФИ-3К-фосфолипазаС (GPVI-рецептор) и сигнализации, связанной с Gi- и Gq-белками (P2Y-рецепторы) [44, 63]. При одновременной стимуляции P2Y-рецепторов и GPVI-рецептора значения амплитуды, Slope и AUC превышали таковые при изолированной стимуляции P2Y-рецепторов. Синергизм проявлялся при одновременной стимуляции α_2 -адренорецептора и P2X₁-рецептора, а также P2X₁-рецептора и GPVI-рецептора [194]. Наиболее выраженный эффект формирования ТЛА *in vitro* воспроизводился при взаимодействии P2X₁-рецептора и GPVI-рецептора. Так, количество ТЛА, образовавшихся при одновременной стимуляции этих рецепторов, превышало таковое при изолированной стимуляции GPVI-рецептора и P2X₁-рецептора. Таким образом, моделирование *in vitro* механизмов регуляции компенсаторных и адаптационных реакций клеток крови позволяет прогнозировать эффективность гемостаза и исхода пиелонефрита после КЛТ.

ВЫВОДЫ

В диссертации проведено теоретическое обобщение и достигнуто решение актуальной научной проблемы – установить механизмы развития геморрагии, гематурии, острого пиелонефрита после уретролитотрипсии, а также восстановления гемостаза и ограничения воспалительной реакции в мочевыводящих путях при длительном и кратковременном назначении НПВП; повысить эффективность диагностики и прогнозирования гематурии и лейкоцитурии после КЛТ в разных отделах мочеточника при неэффективной ЛКТ; обосновать подходы к совершенствованию методов профилактики и лечения послеоперационных осложнений при назначении и отмене НПВП у пациентов с нефролитиазом.

1. При неэффективной ЛКТ у пациентов с локализацией конкрементов размерами $11,2 \pm 0,9$ мм (min-max 6,0-27,0мм) в верхней трети мочеточника на этапе госпитализации наиболее информативным показателем прогнозирования выраженности гематурии является активность P2Y-рецепторов Тц, обеспечивающих амплификацию внутриклеточной сигнализации рецепторов, связанных с Gi- и Gq-белками. Критический порог активности P2Y-рецептора (P2Y-R crit) составляет 40 %; для выбранного порога чувствительность диагностического теста составляет 84,6 % (95 % ДИ 54,6 %-98,1 %), специфичность – 87,5 % (95 % ДИ 47,6 %-99,7 %) и AUC – 0,928 (95 % ДИ 0,727 – 0,995). Анализ кластера рецепторов позволяет верифицировать механизмы регуляции тромбоцитарного звена гемостаза после КЛТ.

2. При неэффективной ЛКТ через 24ч после КЛТ в верхней трети мочеточника и сохранении введения НПВП регуляция Тц обеспечивается гиперреактивностью AT₁-рецептора, ФАТ-рецептора, ТхA2-рецептора, P2X₁-рецептора и GP VI-рецептора, а также нормореактивностью P2Y-рецепторов, α_2 -адренорецептора и A2A-рецептора; через 48ч – проагрегантная функция Тц зависит от сопряженности сигнальных путей, вызванной повышением активности α_2 -адренорецептора и снижением активности P2X₁-рецептора,

P2Y-рецепторов, ФАТ-рецептора, A2A-рецептора, АТ₁-рецептора, GPVI-рецептора, ТхА2-рецептора. Через 72ч после КЛТ при отмене НПВП кластер рецепторов Тц характеризуется нормореактивностью α_2 -адренорецептора, GPVI-рецептора, АТ₁-рецептора, ТхА2-рецептора, ФАТ-рецептора и P2X₁-рецептора, а также гипореактивностью P2Y-рецепторов и A2A-рецептора. Через 7 суток устанавливается гиперреактивность GPVI-рецептора и ТхА2-рецептора; нормореактивность P2Y-рецепторов, АТ₁-рецептора, ФАТ-рецептора, P2X₁-рецептора, α_2 -адренорецептора и A2A-рецептора.

3. Через 24ч после КЛТ в верхней трети мочеточника и сохранении введения НПВП развивается тяжелая степень микрогематурии ($75,6 \pm 2,1$ э/пз; 95 % ДИ 71,1-81,1 э/пз), которая через 48ч уменьшается на 25,7 % ($p < 0,001$). Снижение микрогематурии после КЛТ связано с компенсаторными реакциями Тц, которые через 24ч регулируются P2X₁-рецептором, АТ₁-рецептором и α_2 -адренорецептором, через 48ч – α_2 -адренорецептором, ФАТ-рецептором и P2X₁-рецептором. Через 72ч после КЛТ и отмены введения НПВП микрогематурия соответствует средней степени тяжести – $25,6 \pm 1,2$ э/пз (95 % ДИ 23,1-28,1 э/пз), которая через 7 суток снижается на 31,2 % ($P < 0,001$). Гемостаз обеспечивается адаптационной реакцией Тц, которая через 72ч регулируется GP VI-рецептором, α_2 -адренорецептором и АТ₁-рецептором; через 7 суток – GP VI-рецептором, PY-рецепторами и АТ₁-рецептором. При одновременной стимуляции GPVI-рецептора и P2Y-рецепторов амплитуда, скорость агрегации (Slope) и AUC агрегатограмм увеличиваются, соответственно, на 79,1 %, 55,9 % и 52,3 % ($P < 0,001$) по сравнению с изолированной стимуляцией GPVI рецептора.

4. Динамика формирования тромбоцитарно-лейкоцитарных агрегатов (ТЛА) и лейкоцитурии после КЛТ зависит от активности ЦОГ в клетках крови. Через 24ч после КЛТ в верхней трети мочеточника и введении НПВП количество ТЛА достигает $11,2 \pm 0,6$ % (95 % ДИ 9,8-12,6 %), через 48ч содержание снижается на 25,0% ($p < 0,05$). Через 72 ч после КЛТ и отмены НПВП количество ТЛА увеличивается до $10,5 \pm 0,4$ % (95 % ДИ 9,8-11,3 %),

через 7 суток снижается на 15,2 % ($P < 0,001$). Через 24ч лейкоцитурия достигает $17,5 \pm 0,8$ п/з (95 %ДИ 15,8-19,3 п/з), через 48ч – уменьшается на 22,3 % ($p < 0,05$); через 72ч – повышается на 46,3 % ($p < 0,001$) и через 7 суток снижается на 21,5 % ($p < 0,05$), по сравнению с предыдущим сроком наблюдения.

5. Через 48ч после КЛТ в верхней трети мочеточника и сохранении введения НПВП выявляется корреляционная связь между количеством ТЛА и активностью α_2 -адренорецептора ($r_{\text{ТЛА-}\alpha_2\text{AP}} = 0,531$; $p < 0,05$), ФАТ-рецептора ($r_{\text{ТЛА-ФАТ}} = 0,400$; $p < 0,05$) и $P2X_1$ -рецептора ($r_{\text{ТЛА-P2X1}} = 0,480$; $p < 0,05$). Через 72ч после КЛТ и отмены НПВП имеется связь между количеством ТЛА и активностью α_2 -адренорецептора ($r_{\text{ТЛА-}\alpha_2\text{AP}} = 0,754$; $p < 0,05$), $GPVI$ -рецептора ($r_{\text{ТЛА-GPVI}} = 0,513$; $p < 0,05$), $P2X_1$ -рецептора ($r_{\text{ТЛА-P2X1}} = 0,404$; $p < 0,05$), AT_1 -рецептора ($r_{\text{ТЛА-AT1}} = 0,640$; $p < 0,05$) и ФАТ-рецептора ($r_{\text{ТЛА-ФАТ}} = 0,712$; $p < 0,05$). Через 7суток формирование ТЛА обусловлено активацией $GPVI$ -рецептора ($r_{\text{ТЛА-GPVI}} = 0,546$; $p < 0,05$), $P2Y$ -рецепторов ($r_{\text{ТЛА-P2Y}} = 0,624$; $p < 0,05$), TxA_2 -рецептора ($r_{\text{ТЛА-TxA2}} = 0,517$; $p < 0,05$) и ФАТ-рецептора ($r_{\text{ТЛА-ФАТ}} = 0,488$; $p < 0,05$). Ограничение формирования ТЛА регулируется аденозиновым A_2A -рецептором ($r_{\text{ТЛА-A2A}} = -0,539$; $p < 0,05$).

6. Через 48ч после КЛТ в верхней трети мочеточника и сохранении введения НПВП установлена корреляционная связь между выраженностью лейкоцитурии и активностью α_2 -адренорецептора ($r_{\text{ЛЛУ-}\alpha_2\text{AP}} = 0,383$; $p < 0,05$), ФАТ-рецептора ($r_{\text{ЛЛУ-ФАТ}} = 0,341$; $p < 0,05$) и $P2X_1$ -рецептора ($r_{\text{ЛЛУ-P2X1}} = 0,502$; $p < 0,05$). Через 72ч после КЛТ и отмены НПВП выявляется связь между выраженностью лейкоцитурии и активностью $GPVI$ -рецептора, ФАТ рецептора, $P2X_1$ -рецептора, α_2 -адренорецептора (соответственно, $r_{\text{ЛЛУ-GPVI}} = 0,455$; $r_{\text{ЛЛУ-ФАТ}} = 0,509$; $r_{\text{ЛЛУ-P2X1}} = 0,620$ и $r_{\text{ЛЛУ-}\alpha_2\text{AP}} = 0,461$; $p < 0,05$). Через 7суток сохраняются связи между выраженностью лейкоцитурии и активностью $GPVI$ -рецептора ($r_{\text{ЛЛУ-GPVI}} = 0,588$; $p < 0,05$), TxA_2 -рецептора ($r_{\text{ЛЛУ-TxA2}} = 0,640$; $p < 0,05$), ФАТ-рецептора ($r_{\text{ЛЛУ-ФАТ}} = 0,707$; $p < 0,05$), $P2X_1$ -рецептора

($r_{\text{ЛУ-P2X1}}=0,490$; $p<0,05$), обнаруживается отрицательная связь между лейкоцитурией и активностью аденозинового A2A-рецептора ($r_{\text{ГЛА-A2A}}=-0,654$; $p<0,05$). Наличие корреляционной связи между активностью α_2 -адренорецептора, GPVI-рецептора, пуриновых P2-рецепторов, AT₁-рецептора, ФАТ-рецептора, TxA2-рецептора и A2A-рецептора свидетельствует о сопряженности сигнальных путей в клетках крови, обеспечивающей исход воспалительной реакции в МВП.

7. При неэффективной ЛКТ через 24ч после КЛТ в средней трети мочеточника и сохранении введения НПВП кластер рецепторов Тц характеризуется нормореактивностью пуриновых P2X₁-, P2Y-рецепторов и A2A-рецептора, α_2 -адренорецептора; гипореактивностью GPVI-рецептора, AT₁-рецептора, ФАТ-рецептора и TxA2-рецептора; через 48ч – сохраняется сенситивность P2Y-рецепторов, ФАТ-рецептора, TxA2-рецептора и GPVI-рецептора; повышается активность α_2 -адренорецептора на 16,1 %, AT₁-рецептора – на 41,3 %, P2X₁-рецептора – на 25,8 % и A2A-рецептора – 14,1 % ($p<0,05$), по сравнению со сроком наблюдения 24ч. При отмене НПВП регуляция тромбоцитарного звена гемостаза обеспечивается: через 72ч после КЛТ гиперреактивностью P2Y-рецепторов, TxA2-рецептора, α_2 -адренорецептора и нормореактивностью AT₁-рецептора, ФАТ-рецептора P2X₁-рецептора, GPVI-рецептора, A2A-рецептора; через 7 суток – гиперреактивностью ФАТ-рецептора, TxA2-рецептора, P2Y-рецепторов, GPVI-рецептора и нормореактивностью P2X₁-рецептора, AT₁-рецептора, α_2 -адренорецептора, A2A-рецептора.

8. Через 24ч после КЛТ в средней трети мочеточника при сохранении введения НПВП макрогематурия обнаружена у 10 (50 %) больных; выраженность микрогематурии достигает $81,9 \pm 1,7$ э/пз ($P<0,001$), которая через 48ч снижается на 36,1 % ($P<0,001$). Усиление компенсаторных механизмов гемостаза через 24ч после КЛТ обеспечивается взаимодействием пуриновых P2X₁-, P2Y-рецепторов и α_2 -адренорецептора; через 48ч – P2X₁-рецептора, AT₁-рецептора и α_2 -адренорецептора. Через 72ч после КЛТ и

отмены НПВП микрогематурия снижается на 32,7 % ($P < 0,001$), через 7 суток – в 6,9 раза ($P < 0,001$) до $5,1 \pm 0,4$ п/з (95 % ДИ 4,3-6,0 п/з). Регуляция адаптационных реакций Тц через 72ч осуществляется посредством P2Y-рецепторов, TxA2-рецептора и α_2 -адренорецептора; через 7 суток – стимуляцией P2Y-рецепторов, GPVI-рецептора, ФАТ-рецептора и TxA2-рецептора. Стереотипным механизмом реактивности Тц при восстановлении активности ЦОГ является сигнализация P2Y-рецепторов и TxA2-рецептора. Вариативными механизмами, повышающими проагрегантную активность Тц, через 24ч после отмены НПВП является сигнализация α_2 -адренорецептора, через 7 суток – сигнализация ФАТ-рецептора и GPVI-рецептора

9. КЛТ в средней трети мочеточника, сопровождается особенностями регуляции компенсаторных и адаптационных реакций клеток крови, участвующих в реализации воспаления. Ключевую роль в формировании ТЛА играют ФАТ-рецептор и P2Y-рецепторы, которые при необходимости усиления воспалительной реакции могут взаимодействовать с рецепторами, связанными с Gi-белком (α_2 -адренорецептором через 24ч) и Gq-белком (AT₁-рецептором через 48ч после КЛТ). Стимуляция α_2 -адренорецептора является стереотипным компенсаторным механизмом регуляции лейкоцитурии при ингибировании ЦОГ; модуляция реакций лейкоцитов связана с активностью ФАТ-рецептора через 1-3ч; ФАТ-рецептора и P2X₁-рецептора – через 24ч; GPVI-рецептора и A2A-рецептора – через 48ч после КЛТ. Через 72ч после КЛТ и отмены НПВП стереотипными механизмами регуляции адаптационных реакций клеток крови являются стимуляция α_2 -адренорецептора и ФАТ-рецептора, поскольку достигается оптимальная сопряженность путей сигнализации, связанных с P2X₁-рецептором, P2Y-рецепторами и TxA2-рецептором. Через 7 суток формирование ТЛА регулируется активностью P2Y-рецепторов, P2X₁-рецептора, ФАТ-рецептора и GPVI-рецептора; тогда как лейкоцитурия – P2X₁-рецептором и TxA2-рецептором.

10. Моделирование *in vitro* механизмов регуляции компенсаторных и адаптационных реакций клеток крови после КЛТ в средней трети мочеточника позволяет установить рецепторы, взаимодействие которых обеспечивает сопряженность путей внутриклеточной сигнализации, связанной с ограничением воспаления и гематурии. Усиление компенсаторной реакции Тц через 24ч после введения НПВП обеспечивается взаимодействием P2Y-рецепторов и α_2 -адренорецептора, а также P2Y-рецепторов и ФАТ-рецептора; через 48ч – 2Y-рецепторами и AT₁-рецептором. Синергизм P2Y-рецепторов и AT₁-рецептора сопровождается увеличением значений амплитуды, Slope и AUC агрегатограмм, соответственно, на 38,9 %, 17,9 % ($P<0,05$) и 55,9 % ($P<0,001$) по сравнению с изолированной стимуляцией P2Y-рецепторов. Усиление адаптационной реакции Тц через 72ч после отмены НПВП достигается при взаимодействии P2X₁-рецептора и α_2 -адренорецептора; через 7 суток агрегация усиливается благодаря синергизму P2Y-рецепторов и GPVI-рецептора, при этом значения амплитуды, Slope и AUC превышают таковые при изолированной стимуляции P2Y-рецепторов, соответственно, на 82,2 %, 66,3 % и 61,6 % ($P<0,001$).

11. Реализация воспалительной реакции в мочевыводящих путях при сохранении введения НПВП сопровождается компенсаторным повышением формирования ТЛА и рекрутирования лейкоцитов, которое через 24ч после КЛТ в средней трети мочеточника воспроизводится при синергизме α_2 -адренорецептора и ФАТ-рецептора; через 48ч – P2Y-рецепторов и ФАТ-рецептора, а также ФАТ-рецептора и AT₁-рецептора. При отмене НПВП через 72ч после КЛТ наиболее выраженный эффект образования ТЛА воспроизводится *in vitro* при взаимодействии P2X₁-рецептора и ФАТ-рецептора, а также ФАТ-рецептора и α_2 -адренорецептора. Через 7 суток количество ТЛА возрастает при взаимодействии P2X₁-рецептора и GPVI-рецептора на 23,4 % ($P<0,01$) и 51,9 % ($P<0,001$) по

сравнению с изолированной стимуляцией, соответственно, GPVI-рецептора и P2X₁-рецептора.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.

1. Анализ активности P2Y-рецепторов Тц на этапе госпитализации пациентов после неэффективной ЛКТ при локализации конкрементов размерами $11,2 \pm 0,9$ мм (min-max 6,0-27,0мм) в верхней трети мочеточника позволяет прогнозировать индивидуальную выраженность гематурии.

2. Определение активности ТхА2-рецептора обеспечивает возможность мониторинга ингибирования ЦОГ для оценки фармакодинамики НПВП, используемых у пациентов с нефролитиазом.

3. Исследование кластера рецепторов Тц при неэффективной ЛКТ через 1-3ч после КЛТ в верхней трети мочеточника позволит оценивать влияние хирургической «стресс-реакции» на компенсаторные механизмы гемостаза. При наличии гиперреактивности АТ₁-рецептора, P2X₁-рецептора, ФАТ-рецептора и нормореактивности α₂-адренорецептора можно прогнозировать снижение выраженности гематурии в течение первых суток после КЛТ.

4. Через 72ч после КЛТ в верхней трети мочеточника и отмены введения НПВП повышение активности GP VI-рецептора и АТ₁-рецептора, а через 7 суток – PY-рецепторов свидетельствует о восстановлении адаптационных механизмов гемостаза, ограничивающих выраженность геморрагии и гематурии.

5. После КЛТ в верхней трети мочеточника, выполненной при длительном введении пациентам НПВП, можно прогнозировать исход пиелонефрита путем сопоставления количества ТЛА в крови, лейкоцитов в моче и активности α₂-адренорецептора, ФАТ-рецептора и P2X₁-рецептора.

6. Через 72ч после КЛТ в верхней трети мочеточника и отмены НПВП факторами риска обострения пиелонефрита является сохранение

нормореактивности α_2 -адренорецептора, GPVI-рецептора, P2X₁-рецептора, АТ₁-рецептора, ТхА2-рецептора и ФАТ-рецептора; через 7 суток – активность аденозинового А2А-рецептора.

7. После КЛТ в средней трети мочеточника при сохранении введения НПВП ограничение гематурии через 24ч связано с взаимодействием пуриновых P2X₁-, P2Y-рецепторов и α_2 -адренорецептора, через 48ч – P2X₁-рецептора, АТ₁-рецептора и α_2 -адренорецептора. Экспресс-анализ активности рецепторов Тц позволяет контролировать эффективность гемостатической терапии и при необходимости корректировать схему лечения.

8. Через 72ч после КЛТ в средней трети мочеточника и отмены введения НПВП эффективность адаптационных реакций Тц *обеспечивается* P2Y-рецепторами, ТхА2-рецептором и α_2 -адренорецептором; через 7 суток – P2Y-рецепторами, GPVI-рецептором, ФАТ-рецептором и ТхА2-рецептором. Данный кластер рецепторов может использоваться как информативный прогностический показатель эффективности гемостаза у данного контингента больных.

9. Повышение количества ТЛА и выраженности лейкоцитурии через 24ч после КЛТ в *средней* трети мочеточника при сохранении введения НПВП связано с активацией ФАТ-рецептора, α_2 -адренорецептора и P2X₁-рецептора; через 48ч фактором, провоцирующим развитие пиелонефрита, является активность P2Y-рецепторов, ФАТ-рецептора и АТ₁-рецептора.

10. Прогностическими индикаторами динамики пиелонефрита через 72ч после КЛТ в средней трети мочеточника и отмены НПВП является активность α_2 -адренорецептора и ФАТ-рецептора, через 7 суток – активность аденозинового А2А-рецептора.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аббасов МГ, Прошин АВ, Максимюк НН, Салехов СА. Патогенетическое обоснование профилактики и коррекции функциональной илеоцекальной непроходимости после трансуретральной контактной литотрипсии Вестник Новгородского государственного университета. 2022;2 (127):10-16.
2. Аляев ЮГ, Глыбочко ПВ, Пушкаря ДЮ. Урология. Российские клинические рекомендации. М.: ГЭОТАР. Медиа; 2016. 496 с.
3. Баринов Э.Ф., Сулаева О.Н. Молекулярные механизмы тромбогенеза. Кардиология 2012;12:45-56.
4. Баринов ЭФ, Малинин ЮЮ, Григорян ХВ. Молекулярные механизмы элиминации конкрементов из верхней трети мочеочника Врач. 2022;6:58-64.
5. Бережной АГ, Дунаевская СС, Мамонтов АО, Бережная МА. Особенности изменений в системе гемостаза у пациентов с мочекаменной болезнью РМЖ. Мед. обозрение. 2020;4(2):101-104.
6. Бережной АГ, Дунаевская СС. Современные принципы хирургического лечения мочекаменной болезни РМЖ. Мед.обозрение. 2021;5(3):118-22.
7. Гудков АВ, Бощенко ВС, Лозовский МС, Тилашов ЭМ. Эффективность контактной антеградной электроимпульсной литотрипсии в лечении камней почек. Вестник урологии. 2020;8(4):16-22.
8. Демидко ЮЛ, Руденко ВИ, Алленов СН, Инояттов ЖШ, Ужегов ТА. Клиническая эффективность роватинекса в комплексном лечении калькулезного пиелонефрита в послеоперационном периоде. Фармакология & Фармакотерапия. 2022;1:38-40.
9. Еременко АН. Математическая модель дробления мочевых конкрементов в мочеочнике гольмиевым литотриптером. Таврический медико-биологический вестник. 2020;23(1):103-110.

10. Ершов АВ, Неймарк АИ, Капсаргин ФП, Бережной АГ, Винник ЮЮ. Использование нейронных алгоритмов при выборе метода оперативного лечения мочекаменной болезни Урология. 2021;4:47-52.
11. Зубков ИВ, Крупин ВН, Рогачиков ВВ, Кудряшов АВ, Игнатьев ДН, Малыхина АС. Факторы риска развития осложнения при хирургическом лечении мочекаменной болезни. Справочник врача общей практики. 2022;6:22-31.
12. Казмирчук АВ, Бычковских ВА, Телешева ЛФ, Наймушина ЮВ. Прогнозирование течения раннего послеоперационного периода у больных хроническим обструктивным пиелонефритом. Современные проблемы науки и образования. 2020;2:103.
13. Котов СВ, Беломытцев СВ, Мамаев ИЭ, Перов РА, Пульбере СА, Суренков ДН. Эволюция подходов в лечении мочекаменной болезни. мультицентровой анализ работы 5 урологических отделений многопрофильных стационаров г. Москвы. Экспериментальная и клиническая урология. 2020;13(5):51-59.
14. Крутецкая ЗИ, Лебедев ОЕ, Курилова ЛС. Механизмы внутриклеточной сигнализации. СПб. 2003. 208 с.
15. Попов СВ, Гусейнов РГ, Гаджиев НК, Давыдов АВ, Обидняк ВМ, Бархитдинов РС, и др. Опыт применения перкутанной антеградной литотрипсии при камнях проксимального отдела мочеточника. Вестник урологии. 2021;9(2):92-9.
16. Протощак ВВ, Паронников МВ, Киселев АО. Качество жизни больных с уретеролитиазом. Экспериментальная и клиническая урология. 2020;4:42-49.
17. Протощак ВВ., Тегза ВЮ, Паронников МВ, Орлов ДН, Алентьев СА, Лазуткин МВ. Клинико-экономическое обоснование выбора способа лечения больных с камнями почек размером 10-20 мм. Вестник Российской Военно-медицинской академии. 2020;1 (69):12-17.

18. Пушкарь ДЮ, Касян ГР. Функциональная урология и уродинамика. Москва.2014. 376с.
19. Рахимова КМ, Нурматов СЮ, Расулова ММ. Ультразвуковая диагностика мочекаменной болезни. Экономика и социум. 2020;11(78):1223-28.
20. Руденко ВИ, Демидко ЮЛ. Эффективность литокинетической терапии с применением растительных терпенов. Фармакология & Фармакотерапия. 2021;2:54-59.
21. Степанов НЮ, Дуваяров ЗА, Бояркин ЕВ, Куляпкин ВВ, Молодцова ЕС. Применение экстракорпоральной ударно-волновой литотрипсии и контактной уретеролитотрипсии при лечении конкрементов в дистальном отделе мочеточника Международный научно-исследовательский журнал. 2020;6-2 (96):116-118.
22. Стецишин РВ. Неудачи и осложнения при лечении уретеролитиаза с использованием интракорпоральной уретеролитотрипсии. Danish Scientific Journal. 2020;38(1):48-54.
23. Филимонов ВБ, Васин РВ, Собенников ИС, Широбакина ЕЮ. Сравнительный анализ различных хирургических методов лечения уrolитиаза Экспериментальная и клиническая урология. 2022;15(3):88-93.
24. Чернега ВС, Еременко АН, Еременко СН. Повышение точности прогнозирования длительности дробления мочевых конкрементов на основе многофакторных регрессионных моделей. Врач и информационные технологии. 2020;4:34-42.
25. Abdel-Khalek M, Sheir KZ, Mokhtar AA, Eraky I, Kenawy M, Bazeed M. Prediction of success rate after extracorporeal shock-wave lithotripsy of renal stones--a multivariate analysis model. Scand J Urol Nephrol. 2004;38(2):161-167.
26. Adam F, Kauskot A, Kurowska M, Goudin N, Munoz I, Bordet JC, Huang JD, Bryckaert M, Fischer A, Borgel D, de Saint Basile G, Christophe OD,

Ménasché G. Kinesin-1 Is a New Actor Involved in Platelet Secretion and Thrombus Stability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2018;38(5):1037-51.

27. Adib-Conquy M, Cavaillon JM. Compensatory anti-inflammatory response syndrome. *Thromb Haemost.* 2009;101(1):36-47.

28. Akter S, Sharma RK, Sharma S, Rastogi S, Fiebich BL, Akundi RS. Exogenous ATP modulates PGE2 release in macrophages through sustained phosphorylation of CDK9 and p38 MAPK. *J Leukoc Biol.* 2021;110(4):663-77.

29. Alberto AVP, Ferreira NCDS, Bonavita AGC, Nihei OK, Farias FP, Bisaggio RDC, Albuquerque C, Savino W, Coutinho-Silva R, Persechini PM, Alves LA. Physiologic roles of P2 receptors in leukocytes. *J Leukoc Biol.* 2022;112(5):983-1012

30. Alexander RT, McArthur E, Jandoc R, Welk B, Fuster DG, Garg AX, et al. Thiazide Diuretic Dose and Risk of Kidney Stones in Older Adults: A Retrospective Cohort Study. *Can J Kidney Health Dis.* 2018;5:2054358118787480.

31. Alexander RT, McArthur E, Jandoc R, Welk B, Hayward JS, Jain AK, et al. Antihypertensive medications and the risk of kidney stones in older adults: a retrospective cohort study. *Hypertens Res.* 2017;40(9):837-842.

32. Aliotta A, Bertaggia Calderara D, Zermatten MG, Marchetti M, Alberio L. Thrombocytopathies: Not Just Aggregation Defects-The Clinical Relevance of Procoagulant Platelets. *J Clin Med.* 2021;10(5):894.

33. Amati AL, Zakrzewicz A, Siebers R, Wilker S, Heldmann S, Zakrzewicz D, et al. Chemokines (CCL3, CCL4, and CCL5) Inhibit ATP-Induced Release of IL-1 β by Monocytic Cells. *Mediators Inflamm.* 2017;2017:1434872.

34. Amison RT, Arnold S, O'Shaughnessy BG, Cleary SJ, Ofoedu J. et al. Lipopolysaccharide (LPS) induced pulmonary neutrophil recruitment and platelet activation is mediated via the P2Y1 and P2Y14 receptors in mice. *Pulm Pharmacol Ther.* 2017;45:62-68.

35. Amison RT, Jamshidi S, Rahman KM, Page CP, Pitchford SC. Diverse signalling of the platelet P2Y₁ receptor leads to a dichotomy in platelet function. *Eur J Pharmacol*. 2018 15;827:58-70.
36. Amison RT, Momi S, Morris A, Manni G, Keir S, Gresele P. et al. RhoA signaling through platelet P2Y₁ receptor controls leukocyte recruitment in allergic mice. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;135(2):528-538.
37. Antoniadis C, Bakogiannis C, Tousoulis D, Antonopoulos AS, Stefanadis C. The CD40/CD40 ligand system: linking inflammation with atherothrombosis. *J Am Coll Cardiol*. 2009;54(8):669-677.
38. Aschrafi A, Berndt A, Kowalak JA, Gale JR, Gioio AE, Kaplan BB. Angiotensin II mediates the axonal trafficking of tyrosine hydroxylase and dopamine β -hydroxylase mRNAs and enhances norepinephrine synthesis in primary sympathetic neurons. *J Neurochem*. 2019 09;150(6):666-677.
39. Aslam M, Gündüz D, Troidl C, Heger J, Hamm CW, Schulz R. Purinergic Regulation of Endothelial Barrier Function. *Int J Mol Sci*. 2021;22(3):1207.
40. Aulak KS, Al Abdi S, Li L, Crabb JS, Ghosh A, Willard B, Stuehr DJ, Crabb JW, Dweik RA, Tonelli AR. Disease-specific platelet signaling defects in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2021;320(5):L739-749.
41. Ayada C, Toru Ü, Korkut Y. The relationship of stress and blood pressure effectors. *Hippokratia*. 2015;19(2):99-108.
42. Babur Ö, Melrose AR, Cunliffe JM, Klimek J, Pang J, Sepp AI, et al. Phosphoproteomic quantitation and causal analysis reveal pathways in GPVI/ITAM-mediated platelet activation programs. *Blood*. 2020;136(20):2346-58.
43. Bach C, Zaman F, Kachrilas S, Kumar P, Buchholz N, Masood J. Drugs for pain management in shock wave lithotripsy. *Pain Res Treat*. 2011;2011:259426.

44. Badorc A, Bordes MF, de Cointet P, Savi P, Bernat A, Lalé A, et al. New orally active non-peptide fibrinogen receptor (GpIIb-IIIa) antagonists. *J Med Chem.* 1997;40(21):3393-3401.
45. Baeza-Raja B, Goodyear A, Liu X, Lam K, Yamamoto L, Li Y, Dodson GS, Takeuchi T, Kisseleva T, Brenner DA, Dabbagh K. Pharmacological inhibition of P2RX7 ameliorates liver injury by reducing inflammation and fibrosis. *PLoS One.* 2020;15(6):e0234038.
46. Bai A, Lu N, Guo Y, Chen J, Liu Z. Modulation of inflammatory response via alpha2-adrenoceptor blockade in acute murine colitis. *Clin Exp Immunol.* 2009; 156(2):353-62.
47. Bamberger JN, Gallante B, Khusid JA, Yaghoubian A, Sadiq A, Shimonov R, et al. A prospective randomized study evaluating the necessity of narcotics following ureteroscopy for urinary stone disease. *World J Urol.* 2022;40(10):2567-2573.
48. Banerjee J, Hasan SN, Samanta S, Giri B, Bag BG, Dash SK. Self-Assembled Maslinic Acid Attenuates Doxorubicin Induced Cytotoxicity via Nrf2 Signaling Pathway: An In Vitro and In Silico Study in Human Healthy Cells. *Cell Biochem Biophys.* 2022;80(3):563-578.
49. Barallobre-Barreiro J, Radovits T, Fava M, Mayr U, Lin WY, Ermolaeva E, et al. Extracellular Matrix in Heart Failure: Role of ADAMTS5 in Proteoglycan Remodeling. *Circulation.* 2021;144(25):2021-2034.
50. Bayomy O, Zaheer S, Williams JS, Curhan G, Vaidya A. Disentangling the Relationships Between the Renin-Angiotensin-Aldosterone System, Calcium Physiology, and Risk for Kidney Stones. *J Clin Endocrinol Metab.* 2020; 105(6):dgaa123.
51. Bennetts FM, Mobbs JI, Ventura S, Thal DM. The P2X1 receptor as a therapeutic target. *Purinergic Signal.* 2022;11:1007/s11302-022-09880-4
52. Bhan C, Dash SP, Dipankar P, Kumar P, Chakraborty P, Sarangi PP. Investigation of Extracellular Matrix Protein Expression Dynamics Using Murine Models of Systemic Inflammation Inflammation. 2019;42(6):2020-2031.

53. Bhavé G, Colon S, Ferrell N. The sulfilimine cross-link of collagen IV contributes to kidney tubular basement membrane stiffness. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2017;313(3):F596-F602.
54. Birk AV, Leno E, Robertson HD, Bolotina VM, Szeto HH. Interaction between ATP and catecholamines in stimulation of platelet aggregation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003;284(2):H619-625.
55. Bishop K, Momah T, Ricks J. Nephrolithiasis. *Prim Care* . 2020;47(4):661-671.
56. Bleijerveld OB, van Holten TC, Preisinger C, van der Smagt JJ, Farndale RW, Kleefstra T, et al. Targeted phosphotyrosine profiling of glycoprotein VI signaling implicates oligophrenin-1 in platelet filopodia formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013;33(7):1538-1543.
57. Blockmans D, Deckmyn H, De Vos R, Vermeylen J. Epinephrine induces a late thromboxane-dependent platelet shape change and enhances synergistically the shape change induced by other platelet agonists. *Platelets*. 1996;7(1-2):35-42.
58. Bobalova J, Mutafova-Yambolieva VN. Presynaptic alpha2-adrenoceptor-mediated modulation of adenosine 5' triphosphate and noradrenaline corelease: differences in canine mesenteric artery and vein. *J Auton Pharmacol*. 2001;21(1):47-55.
59. Boehlen F, Clemetson KJ. Platelet chemokines and their receptors: what is their relevance to platelet storage and transfusion practice. *Transfus Med*. 2001; 11(6):403-17.
60. Börsch-Haubold AG, Bartoli F, Asselin J, Dudler T, Kramer RM, Apitz-Castro R, et al. Identification of the phosphorylation sites of cytosolic phospholipase A2 in agonist-stimulated human platelets and HeLa cells. *J Biol Chem*. 1998 20;273(8):4449-58.
61. Borst O, Gawaz M. Glycoprotein VI - novel target in antiplatelet medication. *Pharmacol Ther*. 2021 01;217:107630.

62. Brunskole Hummel I, Reinartz MT, Kälble S, Burhenne H, Schwede F, Buschauer A, et al. Dissociations in the effects of β 2-adrenergic receptor agonists on cAMP formation and superoxide production in human neutrophils: support for the concept of functional selectivity. *PLoS One*. 2013;8(5):e64556.
63. Buckles TC, Ziemba BP, Masson GR, Williams RL, Falke JJ. Single-Molecule Study Reveals How Receptor and Ras Synergistically Activate PI3K α and PIP3 Signaling. *Biophys J*. 2017;113(11):2396-405.
64. Burdess A, Michelsen AE, Brosstad F. et al. Platelet activation in patients with peripheral vascular disease: reproducibility and comparability of platelet markers. *Thromb Res*. 2012; 129 (1): 50-55.
65. Burnstock G. Introduction to Purinergic Signaling. *Methods Mol Biol*. 2020;2041:1-15.
66. Cai A, Chatziantoniou C, Calmont A. Vascular Permeability: Regulation Pathways and Role in Kidney Diseases. *Nephron*. 2021;145(3):297-310.
67. Campschroer T, Zhu X, Vernooij RW, Lock MT. Alpha-blockers as medical expulsive therapy for ureteral stones. *Cochrane Database Syst Rev*. 2018;4:CD008509.
68. Campwala H, Fountain SJ. Constitutive and agonist stimulated ATP secretion in leukocytes. *Commun Integr Biol*. 2013;6(3):e23631.
69. Canobbio I, Stefanini L, Cipolla L, Ciraolo E, Gruppi C, Balduini C, et al. Genetic evidence for a predominant role of PI3K β catalytic activity in ITAM- and integrin-mediated signaling in platelets. *Blood*. 2009;114(10):2193-2196.
70. Cao W, Wan H, Wu L, An X, Li Q, Dong J, et al. Adenosine kinase inhibition attenuates ischemia reperfusion-induced acute kidney injury. *Life Sci*. 2020;256:117972.
71. Cardoso AM, Silvério MNO, de Oliveira Maciel SFV. Purinergic signaling as a new mechanism underlying physical exercise benefits: a narrative review. *Purinergic Signal*. 2021;17(4):649-679.

72. Cardoso TC, Pompeu TE, Silva CLM. The P2Y1 receptor-mediated leukocyte adhesion to endothelial cells is inhibited by melatonin. *Purinergic Signal*. 2017;13(3):331-338.
73. Carlos EC, Youssef RF, Kaplan AG, Wollin DA, Winship BB, Eisner BH, et al. Antibiotic Utilization Before Endourological Surgery for Urolithiasis: Endourological Society Survey Results. *J Endourol*. 2018;32(10):978-985.
74. Castro-Faria-Neto HC, Bozza PT, Martins MA, Dias PM, Silva PM, Cordeiro RS. Platelet mobilization induced by PAF and its role in the thrombocytosis triggered by adrenaline in rats. *Thromb Haemost*. 1989;62(4):1107-111.
75. Chao Y, Zhu L, Qu X, Zhang J, Zhang J, Kong X, et al. Inhibition of angiotension II type 1 receptor reduced human endothelial inflammation induced by low shear stress. *Exp Cell Res*. 2017;360(2):94-104.
76. Chen H, Zhang S, Wang H, Bao L, Wu W, Qi R. Fruitflow inhibits platelet function by suppressing Akt/GSK3 β , Syk/PLC γ 2 and p38 MAPK phosphorylation in collagen-stimulated platelets. *BMC Complement Med Ther*. 2022;22(1):75.
77. Chen HQ, Chen ZY, Zeng F, Li Y, Yang ZQ, He C, et al. Comparative study of the treatment of 20-30 mm renal stones with miniaturized percutaneous nephrolithotomy and flexible ureterorenoscopy in obese patients. *World J Urol*. 2018;36(8):1309-1314.
78. Chen K, Xiao F, Hu D, Ge W, Tian M, Wang W. et al. SARS-CoV-2 Nucleocapsid Protein Interacts with RIG-I and Represses RIG-Mediated IFN- β Production. *Viruses*. 2020;13(1):E47.
79. Chen LW, Lin MW, Hsu CM. Different pathways leading to activation of extracellular signal-regulated kinase and p38 MAP kinase by formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine or platelet activating factor in human neutrophils. *J Biomed Sci*. 2005;12(2):31131-319.
80. Chen Y, Yuan Y, Li W. Sorting machineries: how platelet-dense granules differ from α -granules. *Biosci Rep*. 2018;38(5):BSR20180458.

81. Cheung HYF, Moran LA, Sickmann A, Heemskerk JWM, Garcia Á, Watson SP. Inhibition of Src but not Syk causes weak reversal of GPVI-mediated platelet aggregation measured by light transmission aggregometry. *Platelets*. 2022; 33(8):1293-1300.
82. Chigaev A, Waller A, Amit O, Sklar LA. Gα₁₂-coupled receptor signaling actively down-regulates α_{IIb}β₃-integrin affinity: a possible mechanism for cell de-adhesion. *BMC Immunol*. 2008;5:9-26.
83. Chung BI, Aron M, Hegarty NJ, Desai MM. Ureteroscopic versus percutaneous treatment for medium-size (1-2-cm) renal calculi. *J Endourol*. 2008;22(2):343-6.
84. Chung JM, Park BK, Kim JH, Lee HJ, Lee SD. Impact of repeated extracorporeal shock wave lithotripsy on prepubertal rat kidney. *Urolithiasis*. 2018;46(6):549-558.
85. Clark JC, Kavanagh DM, Watson S, Pike JA, Andrews RK, Gardiner EE, et al. Adenosine and Forskolin Inhibit Platelet Aggregation by Collagen but not the Proximal Signalling Events. *Thromb Haemost*. 2019;119(7):1124-1137.
86. Collado A, Marques P, Escudero P, Rius C, Domingo E, Martinez-Hervás S, et al. Functional role of endothelial CXCL16/CXCR6-platelet-leucocyte axis in angiotensin II-associated metabolic disorders. *Cardiovasc Res*. 2018;114(13):1764-1775.
87. Collado-Díaz V, Martínez-Cuesta MÁ, Blanch-Ruiz MA, Sánchez-López A, García-Martínez P, Peris JE, et al. Abacavir Increases Purinergic P2X₇ Receptor Activation by ATP: Does a Pro-inflammatory Synergism Underlie Its Cardiovascular Toxicity. *Front Pharmacol*. 2021;12:613449.
88. Conti P, Caraffa A, Gallenga CE, Ross R, Kritas SK, Frydas I, Younes A, Di Emidio P, Ronconi G, Toniato E. IL-1 induces thromboxane-A₂ (TxA₂) in COVID-19 causing inflammation and micro-thrombi: inhibitory effect of the IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra). *J Biol Regul Homeost Agents*. 2020;34(5):1623-1627.

89. Correa-Costa M, Andrade-Oliveira V, Braga TT, Castoldi A, Aguiar CF, Origassa CS, et al. Activation of platelet-activating factor receptor exacerbates renal inflammation and promotes fibrosis. *Lab Invest.* 2014;94(4):455-466.
90. Cui N, Hu M, Khalil RA. Biochemical and Biological Attributes of Matrix Metalloproteinases. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2017;147:1-73.
91. Curtis VF, Cartwright IM, Lee JS, Wang RX, Kao DJ, Lanis JM, et al. Neutrophils as sources of dinucleotide polyphosphates and metabolism by epithelial ENPP1 to influence barrier function via adenosine signaling. *Mol Biol Cell.* 2018;29(22):2687-2699.
92. da Silva Rossato J, Krause M, Fernandes AJ, Fernandes JR, Seibt IL, Rech A, et al. Role of alpha- and beta-adrenoreceptors in rat monocyte/macrophage function at rest and acute exercise. *J Physiol Biochem.* 2014;70(2):363-374.
93. Dalghi MG, Montalbetti N, Carattino MD, Apodaca G. The Urothelium: Life in a Liquid Environment. *Physiol Rev.* 2020;100(4):1621-1705.
94. De Ita M, Vargas MH, Carbajal V, Ortiz-Quintero B, López-López C, Miranda-Morales M, et al. ATP releases ATP or other nucleotides from human peripheral blood leukocytes through purinergic P2 receptors. *Life Sci.* 2016 15;145:85-92.
95. De La Cruz A, Hargrave A, Magadi S, Courson JA, Landry PT, Zhang W, et al. Platelet and Erythrocyte Extravasation across Inflamed Corneal Venules Depend on CD18, Neutrophils, and Mast Cell Degranulation. *Int J Mol Sci.* 2021; 22(14):7360.
96. de Menezes ST, Giatti L, Brant LCC, Griep RH, Schmidt MI, Duncan BB, et al. Hypertension, Prehypertension, and Hypertension Control: Association With Decline in Cognitive Performance in the ELSA-Brasil Cohort. *Hypertension.* 202; 77(2):672-681.
97. De Simone I, Baaten CCFMJ, Jandrot-Perrus M, Gibbins JM, Ten Cate H, Heemskerk JWM, Jones CI, van der Meijden PEJ. Coagulation Factor XIIIa and Activated Protein C Activate Platelets via GPVI and PAR1. *Int J Mol Sci.* 2022 Sep 6;23(18):10203.

98. Degirmenci T, Gunlusoy B, Kozacioglu Z, Arslan M, Koras O, Arslan B, et al. Comparison of Ho:YAG laser and pneumatic lithotripsy in the treatment of impacted ureteral stones: an analysis of risk factors. *Kaohsiung J Med Sci.* 2014;30(3):153-158.
99. Devi S, Alexandre YO, Loi JK, Gillis R, Ghazanfari N, Creed SJ, et al. Adrenergic regulation of the vasculature impairs leukocyte interstitial migration and suppresses immune responses. *Immunity.* 2021;54(6):1219-1230.
100. Dimitrov S, Lange T, Born J. Selective mobilization of cytotoxic leukocytes by epinephrine. *J Immunol.* 2010;184(1):503-511.
101. Ding YA, MacIntyre DE, Kenyon CJ, Semple PF. Potentiation of adrenaline-induced platelet aggregation by angiotensin II. *Thromb Haemost.* 1985;54(3):717-720.
102. DiNicolantonio JJ, Barroso-Aranda J. Harnessing adenosine A2A receptors as a strategy for suppressing the lung inflammation and thrombotic complications of COVID-19: Potential of pentoxifylline and dipyridamole. *Med Hypotheses.* 2020;143:110051.
103. Docherty JR. The pharmacology of α 1-adrenoceptor subtypes. *Eur J Pharmacol.* 2019;855:305-320.
104. Downey P, Tolley DA, Johnston SR, Young M. Ischemia-reperfusion injury after relief of ureteral obstruction: an animal study. *J Endour.* 2001;15(2):209-211.
105. Dwyer KM, Kishore BK, Robson SC. Conversion of extracellular ATP into adenosine: a master switch in renal health and disease. *Nat Rev Nephrol.* 2020;16(9):509-524.
106. Egan T.M., Khakh B.S. Contribution of calcium ions to P2X channel responses. *J Neurosci* 2004;24: 3413-3420.
107. Elzey BD, Tian J, Jensen RJ, Swanson AK, Lees JR, Lentz SR, et al. Platelet-mediated modulation of adaptive immunity. A communication link between innate and adaptive immune compartments. *Immunity.* 2003;19(1):9-19.

108. Engelbrecht C, Sardinha LR, Rizzo LV. Cytokine and Chemokine Concentration in the Tear of Patients with Age-Related Cataract. *Curr Eye Res.* 2020; 45(9):1101-1106.
109. Enten GA, Gao X, Strzelinsk HR, Weche M, Liggett SB, Majetschak M. α 1B/D-adrenoceptors regulate chemokine receptor-mediated leukocyte migration via formation of heteromeric receptor complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2022;119(20):e2123511119.
110. Erb L, Weisman GA. Coupling of P2Y receptors to G proteins and other signaling pathways. *Wiley Interdiscip Rev Membr Transp Signal.* 2012;1(6):789-803.
111. Erratum to: 36th International Symposium on Intensive Care and Emergency Medicine: Brussels, Belgium. 15-18 March 2016. *Crit Care.* 2016;20:347.
112. Faas MM, Sáez T, de Vos P. Extracellular ATP and adenosine: The Yin and Yang in immune responses. *Mol Aspects Med.* 2017;55:9-19.
113. Falcinelli E, Iannone A, Mezzasoma AM, Amato L, Fierro T, Guglielmini G, et al. Inhibition of platelet function after ocular administration of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Thromb Res.* 2019;175:1-5.
114. Fang J, Ou Q, Wu B, Li S, Wu M, Qiu J, Cen N, Hu K, Che Y, Ma Y, Pan J Tcpc Inhibits M1 but Promotes M2 Macrophage Polarization via Regulation of the MAPK/NF- κ B and Akt/STAT6 Pathways in Urinary Tract Infection Cells 2022;11(17):2674.
115. Fawzi A, Robinet A, Monboisse JC, Ziaie Z, Kefalides NA, Bellon G. A peptide of the alpha 3(IV) chain of type IV collagen modulates stimulated neutrophil function via activation of cAMP-dependent protein kinase and Ser/Thr protein phosphatase. *Cell Signal.* 2000;12(5):327-335.
116. Feit L, John D, Torres ND, Sinert R. Flank pain and hematuria is not always a kidney stone. *Am J Emerg Med.* 2020;S0735-6757.
117. Finsterbusch M, Schrottmaier WC, Kral-Pointner JB, Salzmann M, Assinger A. Measuring and interpreting platelet-leukocyte aggregates. *Platelets.* 2018; 29(7):677-685.
118. Flamand N, Lefebvre J, Lapointe G, Picard S, Lemieux L, Bourgoin SG, et al. Inhibition of platelet-activating factor biosynthesis by adenosine and histamine

in human neutrophils: involvement of cPLA2 α and reversal by lyso-PAF. *J Leukoc Biol.* 2006;79(5):1043-1051.

119. Flamand N, Lefebvre J, Surette ME, Picard S, Borgeat P. Arachidonic acid regulates the translocation of 5-lipoxygenase to the nuclear membranes in human neutrophils. *J Biol Chem.* 2006;281(1):129-136.

120. Fonteh AN, Winkler JD, Torphy TJ, Heravi J, Undem BJ, Chilton FH. Influence of isoproterenol and phosphodiesterase inhibitors on platelet-activating factor biosynthesis in the human neutrophil. *J Immunol.* 1993;151(1):339-350.

121. Frenette PS, Denis CV, Weiss L, Jurk K, Subbarao S, Kehrel B, et al. P-Selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is expressed on platelets and can mediate platelet-endothelial interactions in vivo. *J Exp Med.* 2000;191(8):1413-1422.

122. Fu LW, Guo ZL, Longhurst JC. Undiscovered role of endogenous thromboxane A2 in activation of cardiac sympathetic afferents during ischaemia. *J Physiol.* 2008;586(13):3287-3300.

123. Fung CY, Jones S, Ntrakwah A, Naseem KM, Farndale RW, Mahaut-Smith MP. Platelet Ca(2+) responses coupled to glycoprotein VI and Toll-like receptors persist in the presence of endothelial-derived inhibitors: roles for secondary activation of P2X1 receptors and release from intracellular Ca(2+) stores. *Blood.* 2012;119(15):3613-3621.

124. Furman MI, Benoit SE, Barnard MR, Valeri CR, Borbone ML, Becker RC, et al. Increased platelet reactivity and circulating monocyte-platelet aggregates in patients with stable coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol.* 1998;31(2):352-358.

125. Gabl M, Holdfeldt A, Sundqvist M, Lomei J, Dahlgren C, Forsman H. FPR2 signaling without β -arrestin recruitment alters the functional repertoire of neutrophils. *Biochem Pharmacol.* 2017;145:114-22.

126. Gavriil L, Detopoulou M, Petsini F, Antonopoulou S, Fragopoulou E. Consumption of plant extract supplement reduces platelet activating factor-induced platelet aggregation and increases platelet activating factor catabolism: a randomised, double-blind and placebo-controlled trial. *Br J Nutr.* 2019;121(9):982-991.

127. Gdula AM, Swiatkowska M. A2A receptor agonists and P2Y12 receptor antagonists modulate expression of thrombospondin-1 (TSP-1) and its secretion from

Human Microvascular Endothelial Cells (HMEC-1). *Microvasc Res.* 2021;138:104218.

128. Gecit I, Kavak S, Oguz EK, Pirincci N, Günes M, Kara M, et al. Tissue damage in kidney, adrenal glands and diaphragm following extracorporeal shock wave lithotripsy. *Toxicol Ind Health.* 2014;30(9):845-850.

129. Genovese F, Boor P, Papasotiriou M, Leeming DJ, Karsdal MA, Floege J. Turnover of type III collagen reflects disease severity and is associated with progression and microinflammation in patients with IgA nephropathy. *Nephrol Dial Transplant.* 2016;31(3):472-479.

130. Gidday JM, Gasche YG, Copin JC, Shah AR, Perez RS, Shapiro SD, Chan PH, Park TS. Leukocyte-derived matrix metalloproteinase-9 mediates blood-brain barrier breakdown and is proinflammatory after transient focal cerebral ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005; 289(2):H558-568.

131. Giménez-Bastida JA, Boeglin WE, Boutaud O, Malkowski MG, Schneider C. Residual cyclooxygenase activity of aspirin-acetylated COX-2 forms 15 R-prostaglandins that inhibit platelet aggregation. *FASEB J.* 2019;33(1):1033-1041.

132. Giuliani AL, Sarti AC, Di Virgilio F. Ectonucleotidases in Acute and Chronic Inflammation. *Front Pharmacol.* 2020;11:619458.

133. Golaszewska A, Misztal T, Marcinczyk N, Chabielska E, Rusak T. Adrenaline May Contribute to Prothrombotic Condition via Augmentation of Platelet Procoagulant Response, Enhancement of Fibrin Formation, and Attenuation of Fibrinolysis. *Front Physiol.* 2021;12:657881.

134. Gottlieb M, Long B, Koyfman A. The evaluation and management of urolithiasis in the ED: A review of the literature. *Am J Emerg Med.* 2018;36(4):699-706.

135. Grabe M. Antibiotic prophylaxis in urological surgery, a European viewpoint. *Int J Antimicrob Agents.* 2011;38 Suppl:58-63.

136. Gray AL, Pun N, Ridley AJL, Dyer DP. Role of extracellular matrix proteoglycans in immune cell recruitment. *Int J Exp Pathol.* 2022;103(2):34-43.

137. Gremmel T, Xhelili E, Steiner S, Koppensteiner R, Kopp CW, Panzer S. Response to antiplatelet therapy and platelet reactivity to thrombin receptor activating

peptide-6 in cardiovascular interventions: Differences between peripheral and coronary angioplasty. *Atherosclerosis*. 2014;232(1):119-124.

138. Grenegård M, Vretenbrant-Oberg K, Nylander M, Désilets S, Lindström EG, Larsson A, et al. The ATP-gated P2X1 receptor plays a pivotal role in activation of aspirin-treated platelets by thrombin and epinephrine. *J Biol Chem*. 2008;283(27):18493-18504.

139. Grisanti LA, Gumpert AM, Traynham CJ, Gorsky JE, Repas AA, Gao E, et al. Leukocyte-Expressed β 2-Adrenergic Receptors Are Essential for Survival After Acute Myocardial Injury. *Circulation*. 2016;134(2):153-167.

140. Gu J, Liu J, Hong Y, Feng Y, Huang X. Nomogram for predicting risk factor of urosepsis in patients with diabetes after percutaneous nephrolithotomy. *BMC Anesthesiol*. 2022;22(1):87.

141. Guan NN, Gustafsson LE, Svennersten K. Inhibitory Effects of Urothelium-related Factors. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2017;121(4):220-224.

142. Guo NJ, Chang YL, Xiao DJ, Huang P. [Activation of platelet-neutrophil mediated by platelet-activating factor]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*. 2005;13(3):447-451.

143. Haas CB, Lovászi M, Pacher P, de Souza PO, Pelletier J, Leite RO, Sévigny J, Németh Z, Braganhol E, Haskó G. Extracellular ectonucleotidases are differentially regulated in murine tissues and human polymorphonuclear leukocytes during sepsis and inflammation. *Purinergic Signal*. 2021;17(4):713-724.

144. Hamburger SA, McEver RP. GMP-140 mediates adhesion of stimulated platelets to neutrophils. *Blood*. 1990;75(3):550-554.

145. Hammer A, Yang G, Friedrich J, Kovacs A, Lee DH, Grave K, et al. Role of the receptor Mas in macrophage-mediated inflammation in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(49):14109-14114.

146. Handtke S, Wesche J, Palankar R, Greinacher A, Thiele T. Function of Large and Small Platelets Differs, Depending on Extracellular Calcium Availability and Type of Inductor. *Thromb Haemost*. 2020;120(7):1075-1086.

147. Harden TK, Sesma JI, Fricks IP, Lazarowski ER. Signalling and pharmacological properties of the P2Y receptor. *Acta Physiol (Oxf)*. 2010;199(2):149-160.
148. Hashem A, Ghobrial FK, Elbaset MA, Atwa AM, Fadallah M, Laymon M, et al. Efficacy of pethidine, ketorolac, and lidocaine gel as analgesics for pain control in shockwave lithotripsy: A single-blinded randomized controlled trial. *Investig Clin Urol*. 2019;60(4):251-257.
149. He Z, Xu X, Chen C, Li H, Wang DW. Adenosine 2A Receptor Activation Contributes to Ang II-Induced Aortic Remodeling by Promoting Macrophage Retention. *Hypertension*. 2020;75(1):119-130.
150. Hellman KM, Yu PY, Oladosu FA, Segel C, Han A, Prasad PV, et al. The Effects of Platelet-Activating Factor on Uterine Contractility, Perfusion, Hypoxia, and Pain in Mice. *Reprod Sci*. 2018 03;25(3):384-394.
151. Helten C, Mourikis P, Dannenberg L, M'Pembale R, Trojovský K, Ayhan A, et al. A novel mechanism of ACE inhibition-associated enhanced platelet reactivity: disproof of the ARB-MI paradox. *Eur J Clin Pharmacol*. 2020;76(9):1245-251.
152. Herrera-García AM, Domínguez-Luis MJ, Arce-Franco M, Armas-González E, Álvarez de La Rosa D, Machado JD, et al. Prevention of neutrophil extravasation by α 2-adrenoceptor-mediated endothelial stabilization. *J Immunol*. 2014;193(6):3023-3035.
153. Hijmans RS, Rasmussen DGK, Yazdani S, Navis G, van Goor H, Karsdal MA, Genovese F, van den Born J. Urinary collagen degradation products as early markers of progressive renal fibrosis. *J Transl Med*. 2017;15(1):63.
154. Hiller SD, Heldmann S, Richter K, Jurastow I, Küllmar M, Hecker A, et al. β -Nicotinamide Adenine Dinucleotide (β -NAD) Inhibits ATP-Dependent IL-1 β Release from Human Monocytic Cells. *Int J Mol Sci*. 2018;19(4):E1126.
155. Hinchado MD, Giraldo E, Ortega E. Adrenoreceptors are involved in the stimulation of neutrophils by exercise-induced circulating concentrations of Hsp72: cAMP as a potential "intracellular danger signal". *J Cell Physiol*. 2012; 227(2):604-608.

156. Hoenderdos K, Lodge KM, Hirst RA, Chen C, Palazzo SG, Emerenciana A, et al. Hypoxia upregulates neutrophil degranulation and potential for tissue injury. *Thorax*. 2016;71(11):1030-1038.
157. Horn NA, Anastase DM, Hecker KE, Baumert JH, Robitzsch T, Rossaint R. Epinephrine enhances platelet-neutrophil adhesion in whole blood in vitro. *Anesth Analg*. 2005;100(2):520-526.
158. Hosseini S, Shahraki S, Bideska A E, Shafei MN, Sadeghnia HR, Soukhtanloo M, Rahmani F, Rad AK. Thymoquinone alleviates renal interstitial fibrosis and kidney dysfunction in rats with unilateral ureteral obstruction. *Phytother Res*. 2019;33(8):2023-2033.
159. Huang P, Zou Y, Zhong XZ, Cao Q, Zhao K, Zhu MX, et al. P2X4 forms functional ATP-activated cation channels on lysosomal membranes regulated by luminal pH. *J Biol Chem*. 2014;289(25):17658-7667.
160. Huang Z, Liu P, Zhu L, Li N, Hu H. P2X1-initiated p38 signalling enhances thromboxane A2-induced platelet secretion and aggregation. *Thromb Haemost*. 2014;112(1):142-150.
161. Hubert KC, Singh M, Zhou EH, Delos Santos G, Stovsky MD. Charlson comorbidity index and success of extracorporeal shock wave lithotripsy. *Can J Urol*. 2009;16(4):4733-735.
162. Huveneers S, Daemen MJ, Hordijk PL. Between Rho(k) and a hard place: the relation between vessel wall stiffness, endothelial contractility, and cardiovascular disease. *Circ Res*. 2015;116(5):895-908.
163. Ilkan Z, Watson S, Watson SP, Mahaut-Smith MP. P2X1 Receptors Amplify FcγRIIa-Induced Ca²⁺ Increases and Functional Responses in Human Platelets. *Thromb Haemost*. 2018;118(2):369-380.
164. Immler R, Simon SI, Sperandio M. Calcium signalling and related ion channels in neutrophil recruitment and function. *Eur J Clin Invest*. 2018;48 Suppl 2:e12964.
165. Inoue T, Okada S, Hamamoto S, Yoshida T, Murota T, Matsuda T. Impact of ureteric stent removal by string on patient's quality of life and on

complications at post-ureteroscopy for urolithiasis: a controlled trial. *BJU Int.* 2019;124(2):314-20.

166. Jackson EC, McNicol A. Cyclic nucleotides inhibit MAP kinase activity in low-dose collagen-stimulated platelets. *Thromb Res.* 2010;125(2):147-151.

167. Jackson SP. The growing complexity of platelet aggregation. *Blood.* 2007;109(12):5087-5095.

168. Jandl K, Marsh LM, Hoffmann J, Mutgan AC, Baum O, Bloch W, et al. Basement Membrane Remodeling Controls Endothelial Function in Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2020;63(1):104-117.

169. Japp AG, Chelliah R, Tattersall L. et al. Effect of PSI-697, a novel P-selectin inhibitor, on platelet-monocyte aggregate formation in humans. *J Am Heart Assoc.* 2013; 2(1): e006007.

170. Jesaitis AJ, Gripenrog J, Voyich JM. Formyl Met-Leu-Phe-Stimulated FPR1 Phosphorylation in Plate-Adherent Human Neutrophils: Enhanced Proteolysis but Lack of Inhibition by Platelet-Activating Factor. *J Immunol Res.* 2018;2018:3178970.

171. Jiang P, Loyau S, Tchitchinadze M, Ropers J, Jondeau G, Jandrot-Perrus M. Inhibition of Glycoprotein VI Clustering by Collagen as a Mechanism of Inhibiting Collagen-Induced Platelet Responses: The Example of Losartan *PLoS One* 2015;10(6):e0128744.

172. Jiménez-Orozco FA, Galicia-Zapatero S, López-López E, Medina-Franco JL, Cedeño FL, Flores-García M, Mejia-Domínguez AM, de la Peña-Díaz A. Monosubstituted Coumarins Inhibit Epinephrine-induced Platelet Aggregation. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem.* 2022;20(1):43-51.

173. Johansen TE, Botto H, Cek M, Grabe M, Tenke P, Wagenlehner FM, et al. Critical review of current definitions of urinary tract infections and proposal of an EAU/ESIU classification system. *Int J Antimicrob Agents.* 2011;38 Suppl:64-70.

174. Jones S, Evans RJ, Mahaut-Smith MP. Ca²⁺ influx through P2X1 receptors amplifies P2Y1 receptor-evoked Ca²⁺ signaling and ADP-evoked platelet aggregation. *Mol Pharmacol.* 2014;86(3):243-251.

175. Jones S, Evans RJ, Mahaut-Smith MP. Extracellular Ca(2+) modulates ADP-evoked aggregation through altered agonist degradation: implications for conditions used to study P2Y receptor activation. *Br J Haematol.* 2011;153(1):83-91.
176. Jung D, Alshaikh A, Ratakonda S, Bashir M, Amin R, Jeon S, et al. Adenosinergic signaling inhibits oxalate transport by human intestinal Caco2-BBE cells through the A2B adenosine receptor. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2018;315(5):C687-C698.
177. Jung SM, Takemura Y, Imamura Y, Hayashi T, Adachi E, Moroi M. Collagen-type specificity of glycoprotein VI as a determinant of platelet adhesion. *Platelets.* 2008;19(1):32-42.
178. Kalkoff M, Chan-Dominy A, Sleight JW, Jogia PM, Cursons RT, Towers R, et al. Alpha1-adrenergic receptor mRNA and inflammatory mediator expression in circulating leucocytes after cardiac surgery. *Anaesth Intensive Care.* 2008 ;36(4):535-543.
179. Kals M, Greve AS, Fagerberg SK, Johnsen N, Christensen MG, Praetorius HA. P2X1 receptor blockers reduce the number of circulating thrombocytes and the overall survival of urosepsis with haemolysin-producing *Escherichia coli*. *Purinergic Signal.* 2019;15(2):265-276.
180. Kameritsch P, Pogoda K. The Role of Connexin 43 and Pannexin 1 During Acute Inflammation. *Front Physiol.* 2020;11:594097.
181. Kardeby C, Paramel GV, Pournara D, Fotopoulou T, Sirsjö A, Koufaki M, et al. A novel purine analogue bearing nitrate ester prevents platelet activation by ROCK activity inhibition. *Eur J Pharmacol.* 2019;857:172428.
182. Karsdal MA, Genovese F, Madsen EA, Manon-Jensen T, Schuppan D. Collagen and tissue turnover as a function of age: Implications for fibrosis. *J Hepatol.* 2016;64(1):103-109.
183. Kawai T, Forrester SJ, O'Brien S, Baggett A, Rizzo V, Eguchi S. AT1 receptor signaling pathways in the cardiovascular system. *Pharmacol Res.* 2017;125(Pt A):4-13.
184. Kawamura H, Kawamura T, Kanda Y, Kobayashi T, Abo T. Extracellular ATP-stimulated macrophages produce macrophage inflammatory

protein-2 which is important for neutrophil migration. *Immunology*. 2012;136(4):448-458.

185. Kawano Y, Obana M, Nagata M, Mano Y, Katsuyama M, Yamamoto Y, et al. The antiplatelet effect of mirtazapine is mediated by co-blocking 5-HT_{2A} and α ₂-adrenergic receptors on platelets: An in vitro human plasma-based study. *Eur J Pharmacol*. 2022;917:174640.

186. Kingston P, Lascano D, Ourshalimian S, Russell CJ, Kim E, Kelley-Quon LI. Ketorolac use and risk of bleeding after appendectomy in children with perforated appendicitis. *J Pediatr Surg*. 2022;57(8):1487-1493.

187. Kishi F, Nagai K, Takamatsu N, Tominaga T, Tamaki M, Shibata E, Murakami T, Kishi S, Abe H, Koezuka Y, Minagawa N, Ichien G, Doi T. Urinary type IV collagen excretion is involved in the decline in estimated glomerular filtration rate in the Japanese general population without diabetes: A 5-year observational study. *PLoS One*. 2018;13(4):e0195523.

188. Kisling A., Lust RM, Katwa LC. What is the role of peptide fragments of collagen I and IV in health and disease? *Life Sci*. 2019;228:30-34.

189. Kispert S, Marentette J, McHowat J. Cigarette smoking promotes bladder cancer via increased platelet-activating factor. *Physiol Rep*. 2019;7(3):e13981.

190. Koo TY, Lee JG, Yan JJ, Jang JY, Ju KD, Han M, Oh KH, Ahn C, Yang J. The P2X₇ receptor antagonist, oxidized adenosine triphosphate, ameliorates renal ischemia-reperfusion injury by expansion of regulatory T cells. *Kidney Int*. 2017;92(2):415-431.

191. Kosuru R, Chrzanowska M. Integration of Rap1 and Calcium Signaling. *Int J Mol Sci*. 2020;21(5):1616.

192. Koudouovoh-Tripp P, Hübner K, Egeter J, Kandler C, Giesinger JM, Sopper S, et al. Stress Enhances Proinflammatory Platelet Activity: the Impact of Acute and Chronic Mental Stress. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2021;16(2):500-512.

193. Krebber MM, van Dijk CGM, Vernooij RWM, Brandt MM, Emter CA, Rau CD, Fledderus JO, Duncker DJ, Verhaar MC, Cheng C, Joles JA. Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases in Extracellular

Matrix Remodeling during Left Ventricular Diastolic Dysfunction and Heart Failure with Preserved Ejection Fraction: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Int J Mol Sci* . 2020;21(18):6742.

194. Krueger I, Gremer L, Mangels L, Klier M, Jurk K, Willbold D, Bock HH, Elvers M. Reelin Amplifies Glycoprotein VI Activation and α IIb β 3 Integrin Outside-In Signaling via PLC Gamma 2 and Rho GTPases. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2020;40(10):2391-403.

195. Kukreja R, Desai M, Patel S, Bapat S, Desai M. Factors affecting blood loss during percutaneous nephrolithotomy: prospective study. *J Endourol*. 2004;18(8):715-722.

196. Kulkarni S, Woollard KJ, Thomas S, Oxley D, Jackson SP. Conversion of platelets from a proaggregatory to a proinflammatory adhesive phenotype: role of PAF in spatially regulating neutrophil adhesion and spreading. *Blood*. 2007 Sep 15;110(6):1879-11886.

197. Kurts C, Ginhoux F, Panzer U. Kidney dendritic cells: fundamental biology and functional roles in health and disease. *Nat Rev Nephrol*. 2020;16(7):391-407.

198. Labus J, Wöltje K, Stolte KN, Häckel S, Kim KS, Hildmann A. IL-1 β promotes transendothelial migration of PBMCs by upregulation of the FN/ α 5 β 1 signalling pathway in immortalised human brain microvascular endothelial cells. *Exp Cell Res*. 2018; 373(1-2):99-111.

199. Lahti M, Heino J, K  pyl   J. Leukocyte integrins α L β 2, α M β 2 and α X β 2 as collagen receptors--receptor activation and recognition of GFOGER motif. *Int J Biochem Cell Biol*. 2013;45(7):1204-1211.

200. Lajdova I, Oksa A, Horvathova M, Spustova V. Expression of purinergic P2X7 receptors in subpopulations of peripheral blood mononuclear cells in early-stage of chronic kidney disease. *J Physiol Pharmacol*. 2017;68(5):779-785.

201. Lam FW, Burns AR, Smith CW, Rumbaut RE. Platelets enhance neutrophil transendothelial migration via P-selectin glycoprotein ligand-1. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011;300(2):H468-475.

202. Landmann R. Beta-adrenergic receptors in human leukocyte subpopulations. *Eur J Clin Invest.* 1992;22 Suppl 1:30-36.
203. Langer HF, Gawaz M. Platelet-vessel wall interactions in atherosclerotic disease. *Thromb Haemost.* 2008;99(3):480-486.
204. Laudanna C, Campbell JJ, Butcher EC. Elevation of intracellular cAMP inhibits RhoA activation and integrin-dependent leukocyte adhesion induced by chemoattractants. *J Biol Chem.* 1997;272(39):24141-24144.
205. Lawrie AS, Kobayashi K, Lane PJ, Mackie IJ, Machin SJ. The automation of routine light transmission platelet aggregation. *Int J Lab Hematol.* 2014;36(4):431-438.
206. Layhadi JA, Fountain SJ. P2X4 Receptor-Dependent Ca²⁺ Influx in Model Human Monocytes and Macrophages. *Int J Mol Sci.* 2017 27;18(11):E2261.
207. Le Duc D, Schulz A, Lede V, Schulz A, Thor D, Brüser A, et al. P2Y Receptors in Immune Response and Inflammation. *Adv Immunol.* 2017;136:85-121.
208. Lecut C, Schoolmeester A, Kuijpers MJ, Broers JL, van Zandvoort MA, Vanhoorelbeke K, et al. Principal role of glycoprotein VI in alpha2beta1 and alphaIIb beta3 activation during collagen-induced thrombus formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24(9):1727-1733.
209. Lee CC, Lin WR, Hsu JM, Chow YC, Tsai WK, Chiang PK, Chen M, Chiu AW. Comparison of electrohydraulic and electromagnetic extracorporeal shock wave lithotriptors for upper urinary tract stones in a single center. *World J Urol.* 2019;37(5):931-935.
210. Li L, Wang Cong, Gu Y. Collagen IV, a promising serum biomarker for evaluating the prognosis of revascularization in a 2-kidney, 1-clip hypertensive rat model. *Interact Cardiovasc Thorac Surg.* 2020;30(3):483-490.
211. Li W, Ma Y, Zhang C, Chen B, Zhang X, Yu X, et al. Tetrahydrocurcumin Downregulates MAPKs/cPLA2 Signaling and Attenuates Platelet Thromboxane A2 Generation, Granule Secretion, and Thrombus Growth. *Thromb Haemost.* 2022;122(5):739-754.

212. Li X, Long Q, Cheng X, He D. Shock wave induces biological renal damage by activating excessive inflammatory responses in rat model. *Inflammation*. 2014 Aug;37(4):1317-1325.

213. Lievens D, Zerneck A, Seijkens T, Soehnlein O, Beckers L, Munnix IC, et al. Platelet CD40L mediates thrombotic and inflammatory processes in atherosclerosis. *Blood*. 2010;116(20):4317-4327.

214. Lindkvist M, Fernberg U, Ljungberg LU, Fälker K, Fernström M, Hurtig-Wennlöf A, et al. Individual variations in platelet reactivity towards ADP, epinephrine, collagen and nitric oxide, and the association to arterial function in young, healthy adults. *Thromb Res*. 2019;174:5-12.

215. Liu G, Liu M, Xie G, Lei B. Characterization of streptococcal platelet-activating factor acetylhydrolase variants that are involved in innate immune evasion. *Infect Immun*. 2013;81(9):3128-3138.

216. Liu J, Pestina TI, Berndt MC, Jackson CW, Gartner TK. Botrocetin/VWF-induced signaling through GPIb-IX-V produces TxA₂ in an alphaIIb beta3- and aggregation-independent manner. *Blood*. 2005 Oct 15;106(8):2750-2756.

217. Liu J, Tang H, Xu C, Zhou S, Zhu X, Li Y, Prézeau L, Xu T, Pin JP, Rondard P, Ji W, Liu J. Biased signaling due to oligomerization of the G protein-coupled platelet-activating factor receptor. *Nat Commun*. 2022;13(1):6365.

218. Liu YW, Yang T, Zhao L, Ni Z, Yang N, He F, et al. Activation of Adenosine 2A receptor inhibits neutrophil apoptosis in an autophagy-dependent manner in mice with systemic inflammatory response syndrome. *Sci Rep*. 2016;6:33614.

219. Liverani E, Rico MC, Garcia AE, Kilpatrick LE, Kunapuli SP. Prasugrel metabolites inhibit neutrophil functions. *J Pharmacol Exp Ther*. 2013;344(1):231-243.

220. Liverani E, Rico MC, Tsygankov AY, Kilpatrick LE, Kunapuli SP. P2Y₁₂ Receptor Modulates Sepsis-Induced Inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2016;36(5):961-971.

221. Lohman AW, Leskov IL, Butcher JT, Johnstone SR, Stokes TA, Begandt D, et al. Pannexin 1 channels regulate leukocyte emigration through the venous endothelium during acute inflammation. *Nat Commun.* 2015;6:7965
222. Lordan R, Tsoupras A, Zabetakis I, Demopoulos CA. Forty Years Since the Structural Elucidation of Platelet-Activating Factor (PAF): Historical, Current, and Future Research Perspectives. *Molecules.* 2019;24(23):4414.
223. Lordan R, Tsoupras A, Zabetakis I. Platelet activation and prothrombotic mediators at the nexus of inflammation and atherosclerosis: Potential role of antiplatelet agents. *Blood Rev.* 2021;45:100694.
224. Lösche W, Dressel M, Krause S, Redlich H, Spangenberg P, Heptinstall S. Contact-induced modulation of neutrophil elastase secretion and phagocytic activity by platelets. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 1996 ;7(2):210-213.
225. Lova P, Guidetti GF, Canobbio I, Catricalà S, Balduini C, Torti M. Epinephrine-mediated protein kinase C and Rap1b activation requires the co-stimulation of Gz-, Gq-, and Gi-coupled receptors. *Thromb Haemost.* 2011;105(3):479-486.
226. Lukasik M, Dworacki G, Kufel-Grabowska J. et al. Upregulation of CD40 ligand and enhanced monocyte-platelet aggregate formation are associated with worse clinical outcome after ischaemic stroke. *Thromb Haemost.* 2012; 107(2):346-355.
227. Lumlertgul N, Siribamrungwong M, Jaber BL, Susantitaphong P. Secondary Oxalate Nephropathy: A Systematic Review *Kidney Int Rep.* 2018; 29;3(6):1363-1372.
228. Ma Y, Jian Z, Xiang L, Jin X. Higher genetically predicted low-density lipoprotein levels increase the renal cancer risk independent of triglycerides and high-density lipoprotein levels: A Mendelian randomization study. *Int J Cancer.* 2022;151(4):518-525.
229. Maczewski M, Borys M, Kacprzak P, Gdowski T, Wojciechowski D. Angiotensin II AT1 receptor density on blood platelets predicts early left ventricular remodelling in non-reperfused acute myocardial infarction in humans. *Eur J Heart Fail.* 2006;8(2):173-178.

230. Mankus C, Chi C, Rich C, Ren R, Trinkaus-Randall V. The P2X(7) receptor regulates proteoglycan expression in the corneal stroma. *Mol Vis*. 2012;18:128-138.

231. Marchand M, Monnot C, Muller L, Germain S. Extracellular matrix scaffolding in angiogenesis and capillary homeostasis. *Semin Cell Dev Biol*. 2019;89:147-156.

232. Margraf A, Herter JM, Kühne K, Stadtmann A, Ermert T, Wenk M, et al. 6% Hydroxyethyl starch (HES 130/0.4) diminishes glycocalyx degradation and decreases vascular permeability during systemic and pulmonary inflammation in mice. *Crit Care*. 2018;22(1):111.

233. Marin TA, Bertassoli BM, de Siqueira de Carvalho AA, Feder D. The use of aliskiren as an antifibrotic drug in experimental models: A systematic review. *Drug Dev Res*. 2020;81(1):114-126.

234. Marino F, Scanzano A, Pulze L, Pinoli M, Rasini E, Luini A, et al. β 2-Adrenoceptors inhibit neutrophil extracellular traps in human polymorphonuclear leukocytes. *J Leukoc Biol*. 2018;104(3):603-614.

235. Marjoram RJ, Voss B, Pan Y, Dickeson SK, Zutter MM, Hamm HE, Santoro SA. Suboptimal activation of protease-activated receptors enhances α 2 β 1 integrin-mediated platelet adhesion to collagen. *J Biol Chem*. 2009;284(50):34640-7.

236. Marketou ME, Kontaraki JE, Papadakis JA, Vrentzos GE, Patrianakos A, Fragkiadakis K, et al. Increased platelet α 2B-adrenergic receptor gene expression in well-controlled hypertensives: the effect of arterial stiffness. *J Am Soc Hypertens*. 2017;11(11):762-768.

237. Martin AC, Zlotnik D, Bonete GP, Baron E, Decouture B, Belleville-Rolland T, et al. Epinephrine restores platelet functions inhibited by ticagrelor: A mechanistic approach. *Eur J Pharmacol*. 2020;866:172798.

238. Martinod K, Deppermann C. Immunothrombosis and thromboinflammation in host defense and disease. *Platelets*. 2021;32(3):314-324.

239. Massberg S, Enders G, Matos FC, Tomic LI, Leiderer R, Eisenmenger S, et al. Fibrinogen deposition at the postischemic vessel wall promotes platelet adhesion during ischemia-reperfusion in vivo. *Blood*. 1999;94(11):3829-3838.

240. Mause SF, von Hundelshausen P, Zerneck A, Koenen RR, Weber C. Platelet microparticles: a transcellular delivery system for RANTES promoting monocyte recruitment on endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25(7):1512-518.

241. Mayans L. Nephrolithiasis. *Prim Care*. 2019;46(2):203-212.

242. Mayr M, Duerrschmid C, Medrano G, Taffet GE, Wang Y, Entman ML, Haudek SB. TNF/Ang-II synergy is obligate for fibroinflammatory pathology, but not for changes in cardiorenal function. *Physiol Rep*. 2016;4(8):e12765

243. McLean JE, Hill CJ, Riddick JB, Folsom CR. Investigation of Adult Post-Tonsillectomy Hemorrhage Rates and the Impact of NSAID Use. *Laryngoscope*. 2022;132(5):949-953.

244. Mefford JM. Tungate RM, Amini L, Suh D, Anderson CL, Rudkin SE, Boysen-Osborn M. Comparison of Urolithiasis in the Presence and Absence of Microscopic Hematuria in the Emergency Department. *West J Emerg Med*. 2017;18(4):775-779.

245. Menzies RI, Booth JWR, MullinsJJ, Bailey MA, Tam FWK, Norman JT, Robert Unwin J. Hyperglycemia-induced Renal P2X7 Receptor Activation Enhances Diabetes-related Injury. *EBioMedicine*. 2017;19:73-83.

246. Menzies RI, Tam FW, Unwin RJ, Bailey MA. Purinergic signaling in kidney disease. *Kidney Int*. 2017;91(2):315-23.

247. Metz LM, Elvers M. Pannexin-1 Activation by Phosphorylation Is Crucial for Platelet Aggregation and Thrombus Formation. *Int J Mol Sci*. 2022;23(9):5059.

248. Ming Y, Xin G, Ji B, Ji C, Wei Z, Zhang B, et al. Entecavir as a P2X7R antagonist ameliorates platelet activation and thrombus formation. *J Pharmacol Sci*. 2020;144(1):43-51.

249. Minhaj FS, Hoang-Nguyen M, Tenney A, Bragg A, Zhang W, Foster J, et al. Evaluation of opioid requirements in the management of renal colic after guideline implementation in the emergency department. *Am J Emerg Med*. 2020;38(12):2564-2569.

250. Minuz P, Fumagalli L, Gaino S, Tommasoli RM, Degan M, Cavallini C, et al. Rapid stimulation of tyrosine phosphorylation signals downstream of G-protein-coupled receptors for thromboxane A2 in human platelets. *Biochem J*. 2006;400(1):127-34.

251. Minuz P, Meneguzzi A, Fumagalli L, Degan M, Calabria S, Ferraro R, et al. Calcium-Dependent Src Phosphorylation and Reactive Oxygen Species Generation Are Implicated in the Activation of Human Platelet Induced by Thromboxane A2 Analogs. *Front Pharmacol*. 2018;9:1081.

252. Montezano AC, Neves KB, Lopes RA, Rios F. Isolation and Culture of Endothelial Cells from Large Vessels. *Methods Mol Biol*. 2017;1527:345-348.

253. Moor MB, Dhayat NA, Schietzel S, Grössl M, Vogt B, Fuster DG. Urinary tetrahydroaldosterone is associated with circulating FGF23 in kidney stone formers. *Urolithiasis*. 2022;50(3):333-340.

254. Morsing SKH, Rademakers T, Brouns SLN, Stalborch ADV, Donners MMPC, van Buul JD. ADAM10-Mediated Cleavage of ICAM-1 Is Involved in Neutrophil Transendothelial Migration. *Cells*. 2021;10(2):232.

255. Motegi SI, Sekiguchi A, Fujiwara C, Toki S, Ishikawa O. Possible association of elevated serum collagen type IV level with skin sclerosis in systemic sclerosis. *J Dermatol*. 2017;44(2):167-172.

256. Mueller H, Motulsky HJ, Sklar LA. The potency and kinetics of the beta-adrenergic receptors on human neutrophils. *Mol Pharmacol*. 1988;34(3):347-353.

257. Muralidharan J, Ramezani A, Hubal M, Knoblach S, Shrivastav S, Karandish S, Scott R, Maxwell N, Ozturk S, Beddhu S, Kopp JB, Raj DS. Extracellular microRNA signature in chronic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2017;312(6):F982-F991.

258. Naboka YL, Kogan MI, Gudima IA, Mitusova EV, Bedzhanyan SK, Chernitskaya ML. [Long-term monitoring of leukocyturia and bacteriuria after acute obstructive pyelonephritis]. *Urologiia*. 2018; (4):44-48.

259. Nagahama Y, Shimoda M, Mao G, Singh SK, Kozakai Y, Sun X, Motooka D, Nakamura S, Tanaka H, Satoh T, Maeda K, Akira S. Regnase-1 controls colon epithelial regeneration via regulation of mTOR and purine metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018;115(43):11036-11041.

260. Nagasawa A, Matsuno K, Tamura S. et al. The basis examination of leukocyte-platelet aggregates with CD45 gating as a novel platelet activation marker. *Int J Lab Hematol*. 2013; 35(5): 534-541.

261. Nagatsuka K, Miyata S, Kada A, Kawamura A, Nakagawara J, Furui E, et al. Cardiovascular events occur independently of high on-aspirin platelet reactivity and residual COX-1 activity in stable cardiovascular patients. *Thromb Haemost*. 2016;116(2):356-368.

262. Neagoe RAI, Gardiner EE, Stegner D, Nieswandt B, Watson SP, Poulter NS. Rac Inhibition Causes Impaired GPVI Signalling in Human Platelets through GPVI Shedding and Reduction in PLC γ 2 Phosphorylation. *Int J Mol Sci*. 2022;23(7):3746.

263. Nieswandt B, Pleines I, Bender M. Platelet adhesion and activation mechanisms in arterial thrombosis and ischaemic stroke *J Thromb Haemost*. 2011;9 Suppl 1:92-104.

264. Nieuwland R, Siffert W, Akkerman JW. Effect of epinephrine on the regulation of Na⁺/H⁺ exchange in human platelets. *Biochim Biophys Acta*. 1993;1148(2):185-90.

265. Nishimura A, Sunggip C, Oda S, Numaga-Tomita T, Tsuda M, Nishida M. Purinergic P2Y receptors: Molecular diversity and implications for treatment of cardiovascular diseases. *Pharmacol Ther*. 2017;180:113-28.

266. Nomikos T, Fragopoulou E, Antonopoulou S, Panagiotakos DB. Mediterranean diet and platelet-activating factor; a systematic review. *Clin Biochem*. 2018;60:1-10.

267. Nuti E, Rossello A, Cuffaro D, Camodeca C, Bael JV, van der Maat D, Martens E, Fiten P, Pereira RVS, Ugarte-Berzal E, Gouwy M, Opdenakker G, Vandooren J. Bivalent Inhibitor with Selectivity for Trimeric MMP-9 Amplifies Neutrophil Chemotaxis and Enables Functional Studies on MMP-9 Proteoforms. *Cells*. 2020;9(7):1634.
268. Okabayashi K, Kanai S, Katakura F, Takeuchi R, Yamauchi T, Nakayama S, Kinoshita R, Koie H, Narita T. Activation of canine neutrophils by platelet-activating factor. *Vet Immunol Immunopathol*. 2021;241:110336.
269. Oliveira SD, Oliveira NF, Meyer-Fernandes JR, Savio LE, Ornelas FG, Ferreira ZS, et al. Increased expression of NTPDases 2 and 3 in mesenteric endothelial cells during schistosomiasis favors leukocyte adhesion through P2Y1 receptors. *Vascul Pharmacol*. 2016;82:66-72.
270. Onselaer MB, Nagy M, Pallini C, Pike JA, Perrella G, Quintanilla LG, et al. Comparison of the GPVI inhibitors losartan and honokiol. *Platelets*. 2020;31(2):187-97.
271. O'Reilly PJ, Ding Q, Akthar S, Cai G, Genschmer KR, Patel DF, Jackson PL, Viera L, Roda M, Locy ML, Bernstein EA, Lloyd CM, Bernstein KE, Snelgrove RJ, Blalock JE. Angiotensin-converting enzyme defines matrikine-regulated inflammation and fibrosis. *JCI Insight*. 2017; 2(22): pii: 91923.
272. Ortiz-Capisano MC, Atchison DK, Harding P, Lasley RD, Beierwaltes WH. Adenosine inhibits renin release from juxtaglomerular cells via an A1 receptor-TRPC-mediated pathway. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2013;305(8):F1209-1219.
273. Oskolkov SA, Zhmurov VA, Tverdoĭ VE, Arshakian GG, Zhmurov DV, Siniaev EA. [Characteristics of lipid peroxidation and activity of sympathetic nervous system in patients with chronic calculous pyelonephritis]. *Urologiia*. 2014;(3):8-12.
274. Ou Z, Dolmatova E, Lassègue B, Griendling KK. β 1- and β 2-integrins: central players in regulating vascular permeability and leukocyte

recruitment during acute inflammation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2021;320(2):H734-H739.

275. Oury C, Wéra O. P2X1: a unique platelet receptor with a key role in thromboinflammation. *Platelets*. 2021;32(7):902-908.

276. Padilla A, Moake JL, Bernardo A, Ball C, Wang Y, Arya M, et al. P-selectin anchors newly released ultralarge von Willebrand factor multimers to the endothelial cell surface. *Blood*. 2004;103(6):2150-2156.

277. Palur Ramakrishnan AV, Varghese TP, Vanapalli S, Nair NK, Mingate MD. Platelet activating factor: A potential biomarker in acute coronary syndrome. *Cardiovasc Ther*. 2017;35(1):64-70.

278. Pani A, Pastori D, Senatore M, Romandini A, Colombo G, Agnelli F, et al. Clinical and pharmacological characteristics of elderly patients admitted for bleeding: impact on in-hospital mortality. *Ann Med*. 2020;52(7):413-422.

279. Passacuale G, Vamadevan P, Pereira L, Hamid C, Corrigall V, Ferro A. Monocyte-platelet interaction induces a pro-inflammatory phenotype in circulating monocytes. *PLoS One*. 2011;6(10):e25595.

280. Paternoster M, Steichen O, Lapeyre-Mestre M, Blanchon T, Rossignol L, Vilcu AM, et al. Risk of Bleeding Associated With Nonsteroidal Anti-inflammatory Drug Use in Patients Exposed to Antithrombotic Therapy: A Case-Crossover Study. *J Clin Pharmacol*. 2022;62(5):636-645.

281. Perrella G, Huang J, Provenzale I, Swieringa F, Heubel-Moenen FCJI, Farndale RW, et al. Nonredundant Roles of Platelet Glycoprotein VI and Integrin $\alpha\text{IIb}\beta 3$ in Fibrin-Mediated Microthrombus Formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2021 02;41(2):e97-e111.

282. Petsepe DC, Kourkoulis SK, Papadodima SA, Sokolis DP. Regional and age-dependent residual strains, curvature, and dimensions of the human ureter. *Proc Inst Mech Eng H*. 2018;232(2):149-162.

283. Pevzner IB, Zorova LD, Galkin FA, Plotnikov EY, Zorov DB. Mitochondria-Associated Matrix Metalloproteinases 2 and 9 in Acute Renal Pathologies. *Bull Exp Biol Med*. 2019;166(3):334-338.

284. Piollet M, Sturza A, Chadet S, Gabillard-Lefort C, Benoist L, Muntean DM, et al. P2Y₁₁ Agonism Prevents Hypoxia/Reoxygenation- and Angiotensin II-Induced Vascular Dysfunction and Intimal Hyperplasia Development. *Int J Mol Sci.* 2021;22(2):E855.

285. Pluta K, Porębska K, Urbanowicz T, Gąsecka A, Olasińska-Wisniewska A, Targoński R, Krasińska A, Filipiak KJ, Jemielity M, Krasiński Z. Platelet-Leucocyte Aggregates as Novel Biomarkers in Cardiovascular Diseases. *Biology (Basel).* 2022;11(2):224.

286. Potenza M, Sciarretta M, Chini MG, Saviano A, Maione F, D'Auria MV, De Marino S, Giordano A, Hofstetter RK, Festa C, Werz O, Bifulco G. Structure-based screening for the discovery of 1,2,4-oxadiazoles as promising hits for the development of new anti-inflammatory agents interfering with eicosanoid biosynthesis pathways. *Eur J Med Chem.* 2021;224:113693.

287. Prosyannikov MY, Zolotuhin OV, Madykin YY, Konstantinova OV, Voytko DA, Anokhin NV, et al. [An influence of herbal plant based on the combination of natural terpenes, vitamin and essential oil on the spontaneous stone passage after extracorporeal shock-wave lithotripsy]. *Urologiia.* 2020; (4):45-49.

288. Pugh N, Maddox BD, Bihan D, Taylor KA, Mahaut-Smith MP, Farndale RW. Differential integrin activity mediated by platelet collagen receptor engagement under flow conditions. *Thromb Haemost.* 2017;117(8):1588-600.

289. Quiroga J, Alarcón P, Manosalva C, Taubert A, Hermosilla C, Hidalgo MA, et al. Mitochondria-derived ATP participates in the formation of neutrophil extracellular traps induced by platelet-activating factor through purinergic signaling in cows. *Dev Comp Immunol.* 2020;113:103768.

290. Quiroga J, Alarcón P, Manosalva C, Teuber S, Carretta MD, Burgos RA. d-lactate-triggered extracellular trap formation in cattle polymorphonuclear leucocytes is glucose metabolism dependent. *Dev Comp Immunol.* 2022;135:104492.

291. Ralevic V, Dunn WR. Purinergic transmission in blood vessels. *Auton Neurosci.* 2015;191:48-66.

292. Ramirez GA, Manfredi AA, Maugeri N. Misunderstandings Between Platelets and Neutrophils Build in Chronic Inflammation. *Front Immunol.* 2019;10:2491.

293. Rasmussen DGK, Boesby L, Nielsen SH, Tepel M, Birot S, Karsdal MA, Kamper AL, Genovese F. Collagen turnover profiles in chronic kidney disease. *Sci Rep.* 2019;9(1):16062.

294. Ratelade J, Mezouar N, Domenga-Denier, Rochey A, Plaisier E, Joutel A. Severity of arterial defects in the retina correlates with the burden of intracerebral haemorrhage in COL4A1-related stroke *J Pathol* . 2018;244(4):408-420.

295. Rawish E, Langer HF. Platelets and the Role of P2X Receptors in Nociception, Pain, Neuronal Toxicity and Thromboinflammation. *Int J Mol Sci.* 2022;23(12):6585.

296. Rendu F, Brohard-Bohn B. The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions. *Platelets.* 2001 Aug;12(5):261-73.

297. Rezakahn Khajeh N, Majdalany SE, Ghani KR. Moses 2.0 for High-Power Ureteroscopic Stone Dusting: Clinical Principles for Step-by-Step Video Technique. *J Endourol.* 2021 12;35(S3):S22-S28.

298. Richter LA, Lippmann QK, Jallad K, Lucas J, Yeung J, Dune T, Mellano E, Weissbart S, Mete M, Kim Ja-H, Gutman R. Risk Factors for Microscopic Hematuria in Women. *Female Pelvic Med Reconstr Surg.* 2016;22(6):486-490.

299. Riegel AK, Faigle M, Zug S, Rosenberger P, Robaye B, Boeynaems JM, et al. Selective induction of endothelial P2Y6 nucleotide receptor promotes vascular inflammation. *Blood.* 2011;117(8):2548-2555.

300. Ripa F, Pietropaolo A, Montanari E, Hameed BMZ, Gauhar V, Somani BK. Association of Kidney Stones and Recurrent UTIs: the Chicken and Egg Situation. A Systematic Review of Literature. *Curr Urol Rep.* 2022;23(9):165-74.

301. Roca R, Esteban P, Zapater P, Inda MD, Conte AL, Gómez-Escolar L, et al. β 2-adrenergic receptor functionality and genotype in two different models of chronic inflammatory disease: Liver cirrhosis and osteoarthritis. *Mol Med Rep*. 2018;17(6):7987-7995.
302. Rossaint J, Margraf A, Zarbock A. Role of Platelets in Leukocyte Recruitment and Resolution of Inflammation. *Front Immunol*. 2018;9:2712.
303. Rubenich DS, de Souza PO, Omizzollo N, Lenz GS, Seigny J, Braganhol E. Neutrophils: fast and furious-the nucleotide pathway. *Purinergic Signal*. 2021;17(3):371-383.
304. Rudziak P, Ellis CG, Kowalewska PM. Role and Molecular Mechanisms of Pericytes in Regulation of Leukocyte Diapedesis in Inflamed Tissues. *Mediators Inflamm*. 2019; 2019:4123605.
305. Saeed SA, Rasheed H, Gilani AU. Synergism interaction between arachidonic acid by 5-hydroxytryptamine in human platelet aggregation is mediated through multiple signalling pathways. *Acta Pharmacol Sin*. 2003;24(10):958-964.
306. Saeed SA, Rasheed H. Calcium-dependent synergistic interaction of platelet activating factor and epinephrine in human platelet aggregation. *Acta Pharmacol Sin*. 2003;24(1):31-36.
307. Sahin C, Can U, Eryildirim B, Sarica K. Transient cessation of antiplatelet medication before percutaneous stone surgery: does it have any safety concern on bleeding related problems? *Urolithiasis*. 2017;45(4):371-378.
308. Sakariassen KS, Alberts P, Fontana P, Mann J, Bounameaux H, Sorensen AS. Effect of pharmaceutical interventions targeting thromboxane receptors and thromboxane synthase in cardiovascular and renal diseases. *Future Cardiol*. 2009;5(5):479-93.
309. Salvadó JA, Mandujano R, Saez I, Saavedra A, Dell'oro A, Dominguez J, et al. Ureteroscopic lithotripsy for distal ureteral calculi: comparative evaluation of three different lithotriptors. *J Endourol*. 2012;26(4):343-346.

310. Sangaralingham SJ, Wang BH, Huang L, Kumfu S, Ichiki T, Krum H, Burnett JJC. Cardioresenal fibrosis and dysfunction in aging: Imbalance in mediators and regulators of collagen. *Peptides*. 2016;76:108-114.
311. Santisteban MM, Ahn SJ, Lane D, Faraco G, Garcia-Bonilla L, Racchumi G, et al. Endothelium-Macrophage Crosstalk Mediates Blood-Brain Barrier Dysfunction in Hypertension. *Hypertension*. 2020;76(3):795-807.
312. Santos-Otte P, Leysen H, van Gastel J, Hendrickx JO, Martin B, Maudsley S. G Protein-Coupled Receptor Systems and Their Role in Cellular Senescence. *Comput Struct Biotechnol J*. 2019;17:1265-1277.
313. Sasmaz Mİ, Kirpat V. The relationship between the severity of pain and stone size, hydronephrosis and laboratory parameters in renal colic attack *Am J Emerg Med*. 2019;37(11):2107-2110.
314. Sato A, Yokoyama I, Ebina K. Angiotensin peptides attenuate platelet-activating factor-induced inflammatory activity in rats. *Peptides*. 2015;73:60-66.
315. Satoh K. [Plasma platelet-activating factor acetylhydrolase (PAF-AH) deficiency as a risk factor for stroke]. *Brain Nerve*. 2008;60(11):1319-1324.
316. Satonaka H, Nagata D, Takahashi M, Kiyosue A, Myojo M, Fujita D, et al. Involvement of P2Y₁₂ receptor in vascular smooth muscle inflammatory changes via MCP-1 upregulation and monocyte adhesion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2015;308(8):H853-861.
317. Saygin D, Wanner N, Rose JA, Naga Prasad SV, Tang WHW, Erzurum S, et al. Relative quantification of beta-adrenergic receptor in peripheral blood cells using flow cytometry. *Cytometry A*. 2018;93(5):563-570.
318. Scanzano A, Cosentino M. Adrenergic regulation of innate immunity: a review. *Front Pharmacol*. 2015;6:171.
319. Schaefer MB, Schaefer CA, Hecker M, Morty RE, Witzenrath M, Seeger W, et al. Co-incubation of PMN and CaCo-2 cells modulates inflammatory potential. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2017;63(5):119-126

320. Schlagenhauf A, Bohler S, Kunze M, Strini T, Haidl H, Erlacher M, Zieger B. Neonatal Platelets: Lower G12/13 Expression Contributes to Reduced Secretion of Dense Granules. *Cells*. 2022;11(16):2563.

321. Schnabel MJ, Gierth M, Chaussy CG, Dötzer K, Burger M, Fritsche HM. Incidence and risk factors of renal hematoma: a prospective study of 1,300 SWL treatments. *Urolithiasis*. 2014;42(3):247-253.

322. Schregel C, John H, Randazzo M, Keller I. Influence of acetylsalicylic acid and low-molecular weight heparins on the formation of renal hematoma after shock wave lithotripsy. *World J Urol*. 2017;35(12):1939-1946.

323. Scrivens M, Dickenson JM. Functional expression of the P2Y₁₄ receptor in human neutrophils. *Eur J Pharmacol*. 2006;543(1-3):166-73.

324. Seizer P, Gawaz M, May AE. Platelet-monocyte interactions--a dangerous liaison linking thrombosis, inflammation and atherosclerosis. *Curr Med Chem*. 2008;15(20):1976-1980.

325. Semen KO, van der Doelen RHA, van der Lugt M, van Dam DGHA, Reimer J, Stassen FRM, et al. Non-steroidal anti-inflammatory drugs increase urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin in recreational runners. *Scand J Med Sci Sports*. 2020;30(10):1888-1895.

326. Shafi H, Ilkhani M, Darabi Ahangar Z, Bayani M. Antibiotic prophylaxis in the prevention of urinary tract infection in patients with sterile urine before extracorporeal shock wave lithotripsy. *CaspJ Intern Med*. 2018;9(3):296-298.

327. Sheppe AEF, Santelices J, Czyz DM, Edelmann MJ. *Yersinia pseudotuberculosis* YopJ Limits Macrophage Response by Downregulating COX-2-Mediated Biosynthesis of PGE₂ in a MAPK/ERK-Dependent Manner. *Microbiol Spectr*. 2021;9(1):e0049621.

328. Shih CC, Chan MV, Kirkby NS, Vojnovic I, Mitchell JA, Armstrong PC, Warner TD. Platelet inhibition by P2Y₁₂ antagonists is potentiated by adenosine signalling activators. *Br J Pharmacol*. 2021;178(23):4758-4771.

329. Signorello MG, Giacobbe E, Leoncini G. Activation by 2-arachidonoylglycerol of platelet p38MAPK/cPLA2 pathway. *J Cell Biochem.* 2011;112(10):2794-2802.

330. Sikora J, Karczmarzka-Wódzka A, Bugieda J, Sobczak P. The Importance of Platelets Response during Antiplatelet Treatment after Ischemic Stroke-Between Benefit and Risk: A Systematic Review. *Res Commun.* 2022;586:20-26.

331. Silvestri M, Oddera S, Lantero S, Rossi GA. beta 2-agonist-induced inhibition of neutrophil chemotaxis is not associated with modification of LFA-1 and Mac-1 expression or with impairment of polymorphonuclear leukocyte antibacterial activity. *Respir Med.* 1999;93(6):416-423.

332. Singh S, Malm CJ, Ramström S, Hesse C, Jeppsson A. Adrenaline enhances in vitro platelet activation and aggregation in blood samples from ticagrelor-treated patients. *Res Pract Thromb Haemost.* 2018;2(4):718-725.

333. Sivaramakrishnan V, Bidula S, Campwala H, Katikaneni D, Fountain SJ. Constitutive lysosome exocytosis releases ATP and engages P2Y receptors in human monocytes. *J Cell Sci.* 2012;125(Pt 19):4567-4575.

334. Skolarikos A, Grivas N, Kallidonis P, Mourmouris P, Rountos T, Fiamegos A, et al. The Efficacy of Medical Expulsive Therapy (MET) in Improving Stone-free Rate and Stone Expulsion Time, After Extracorporeal Shock Wave Lithotripsy (SWL) for Upper Urinary Stones: A Systematic Review and Meta-analysis. *Urology.* 2015;86(6):1057-1064.

335. Smyth SS, Woulfe DS, Weitz JI, Gachet C, Conley PB, Goodman SG, Roe MT, Kuliopulos A, Moliterno DJ, French PA, Steinhubl SR, Becker RC G-protein-coupled receptors as signaling targets for antiplatelet therapy. Platelet Colloquium Participants. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009;29(4):449-457.

336. Sokolis DP, Petsepe DC, Papadodima SA, Kourkoulis SK. Age- and region-related changes in the biomechanical properties and composition of the human ureter. *J Biomech.* 2017;51:57-64.

337. Song T, Liao B, Zheng S, Wei Q. Meta-analysis of postoperatively stenting or not in patients underwent ureteroscopic lithotripsy. *Urol Res*. 2012;40(1):67-77.

338. Soriano Jerez EM, Gibbins JM, Hughes CE. Targeting platelet inhibition receptors for novel therapies: PECAM-1 and G6b-B. *Platelets*. 2021;32(6):761-769.

339. Souza PR, Walker ME, Goulding NJ, Dalli J, Perretti M, Norling LV. The GPR40 Agonist GW9508 Enhances Neutrophil Function to Aid Bacterial Clearance During *E. coli* Infections. *Front Immunol*. 2020;11:573019.

340. Stafforini DM. Biology of platelet-activating factor acetylhydrolase (PAF-AH, lipoprotein associated phospholipase A2). *Cardiovasc Drugs Ther*. 2009;23(1):73-83.

341. Steen VM, Holmsen H, Aarbakke G. The platelet-stimulating effect of adrenaline through alpha 2-adrenergic receptors requires simultaneous activation by a true stimulatory platelet agonist. Evidence that adrenaline per se does not induce human platelet activation in vitro. *Thromb Haemost*. 1993;70(3):506-513.

342. Stetsyshyn R, Schukin D, Tsyganenko O, Danylchenko S. Contact ultrasound lithotripsy during ureterolithiasis therapy. an analysis of late postoperative complication. *Georgian Med News*. 2018;(282):25-29.

343. Stritt K, Bosshard P, Bonny, Roth B. Prevention of nephrolithiasis - Preliminary results of the Swiss Kidney Stone Cohort (SKSC) and the NOSTONE trial. *Rev Med Suisse* . 2020;16(717):2317-2320.

344. Stromberga Z, Chess-Williams R, Moro C. The five primary prostaglandins stimulate contractions and phasic activity of the urinary bladder urothelium, lamina propria and detrusor. *BMC Urol*. 2020;20(1):48.

345. Sud R, Spengler RN, Nader ND, Ignatowski TA. Antinociception occurs with a reversal in alpha 2-adrenoceptor regulation of TNF production by peripheral monocytes/macrophages from pro- to anti-inflammatory. *Eur J Pharmacol*. 2008;588(2-3):217-231.

346. Suenaga A, Ueki H. Effect of orthovanadate on platelet aggregation induced by platelet-activating factor. *Biol Pharm Bull.* 2004;27(11):1859-1863.

347. Sugihara T, Yasunaga H, Horiguchi H, Nishimatsu H, Hirano Y, Matsuda S, et al. Renal haemorrhage risk after extracorporeal shockwave lithotripsy: results from the Japanese Diagnosis Procedure Combination Database. *BJU Int.* 2012;110(8 Pt B):E332-338.

348. Sumanth MS, Jacob SP, Abhilasha KV, Manne BK, Basrur V, Lehoux S, et al. Different glycoforms of alpha-1-acid glycoprotein contribute to its functional alterations in platelets and neutrophils. *J Leukoc Biol.* 2021;109(5):915-930.

349. Summers L, Kangwantas K, Rodriguez-Grande B, Denes A, Penny J, Kielty C, Pinteaux E. Activation of brain endothelial cells by interleukin-1 is regulated by the extracellular matrix after acute brain injury. *Mol Cell Neurosci.* 2013;57:93-103.

350. Sunggip C, Nishimura A, Shimoda K, Numaga-Tomita T, Tsuda M, Nishida M. Purinergic P2Y6 receptors: A new therapeutic target of age-dependent hypertension. *Pharmacol Res.* 2017;120:51-59.

351. Suresh A, Sanji N, Kamath PM, Devendrappa SL, Hanumanthareddy SG, Maniyar I, et al. A Pilot Study on the Effect of Angiotensin Receptor Blockers on Platelet Aggregation in Hypertensive Patients- A Prospective Observational Study. *J Clin Diagn Res.* 2016;10(11):FC14-FC16.

352. Suurväli J, Boudinot P, Kanellopoulos J, Rüütel Boudinot S. P2X4: A fast and sensitive purinergic receptor. *Biomed J.* 2017;40(5):245-256.

353. Suzuki-Inoue K, Inoue O, Frampton J, Watson SP. Murine GPVI stimulates weak integrin activation in PLCgamma2-/- platelets: involvement of PLCgamma1 and PI3-kinase. *Blood.* 2003;102(4):1367-1373.

354. Taie K, Jasemi M, Khazaeli D, Fatholahi A. Prevalence and management of complications of ureteroscopy: a seven-year experience with introduction of a new maneuver to prevent ureteral avulsion. *Urol J.* 2012;9(1):356-360.

355. Takahashi T, Somiya S, Ito K, Haitani T, Higashi Y, Yamada H, Kanno T. Risk Factors for Febrile Urinary Tract Infection after Transurethral Ureterolithotripsy : ANALYSIS of Treatment Outcomes of 1,235 Patients at a Single Center. *Hinyokika Kiyo*. 2022;68(6):171-178.

356. Tanaka K, Choi J, Cao Y, Stacey G. Extracellular ATP acts as a damage-associated molecular pattern (DAMP) signal in plants. *Front Plant Sci*. 2014;5:446.

357. Tanriverdi O, Silay MS, Kadihasanoglu M, Aydin M, Kendirci M, Miroglu C. Revisiting the predictive factors for intra-operative complications of rigid ureteroscopy: a 15-year experience. *Urol J*. 2012;9(2):457-464.

358. Tapbergenov SO, Sovetov BS, Smailova ZK. Adrenergic Receptors in the Mechanism of Regulation of Mitochondrial and Cytoplasmic Enzymes of Cardiomyocytes by Catecholamines. *Bull Exp Biol Med*. 2022;173(3):330-334.

359. Tawfeek AM, Abdelwahab MS, Higazy A, Radwan A, Swar SA, Shaker H, et al. Effect of perioperative selective alpha-1 blockers in non-stented ureteroscopic laser lithotripsy for ureteric stones: a randomized controlled trial. *Cent European J Urol*. 2020;73(4):520-525.

360. Tawinwung S, Petpiroon N, Chanvorachote P. Blocking of Type 1 Angiotensin II Receptor Inhibits T-lymphocyte Activation and IL-2 Production. *In Vivo*. 2018;32(6):1353-1359.

361. Thibeault PE, Ramachandran R. Biased signaling in platelet G-protein coupled receptors. *Can J Physiol Pharmacol*. 2021;99(3):255-69.

362. Timaru CM, Stefan C, Iliescu DA, De Simone A, Batras M. Matrix regenerative therapy. *Rom J Ophthalmol*. 2017;61(1):2-10.

363. Trojanek JB, Michałkiewicz J, Grzywa-Czuba R, Jańczyk W, Gackowska L, Kubiszewska I, Helmin-Basa A, Wierzbička-Rucińska A, Szalecki M, Socha P. Expression of Matrix Metalloproteinases and Their Tissue Inhibitors in Peripheral Blood Leukocytes and Plasma of Children with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Mediators Inflamm*. 2020;2020:8327945.

364. Tsuda K. Angiotensin 1-7 and the Sympathetic Nervous System in Hypertensive Kidney Disease. *Am J Hypertens*. 2019;32(10):e3.

365. Turnbull RE, Sander KN, Turnbull J, Barrett DA, Goodall AH. Profiling oxylipins released from human platelets activated through the GPVI collagen receptor. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2022;158:106607.

366. Ulker P, Ozkan O, Amoroso M, Aslan M, Bassorgun I, Ubur MC, et al. Does ischemic preconditioning increase flap survival by ADORA2B receptor activation. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2020;75(2):151-162.

367. Valgimigli M, Cao D, Angiolillo DJ, Bangalore S, Bhatt DL, Ge J, et al. Duration of Dual Antiplatelet Therapy for Patients at High Bleeding Risk Undergoing PCI. *J Am Coll Cardiol*. 2021;78(21):2060-2072.

368. Vargaftig BB, Fouque F, Benveniste J, Odier J. Adrenaline and PAF-acether synergize to trigger cyclooxygenase-independent activation of plasma-free human platelets. *Thromb Res*. 1982;28(4):557-573.

369. Vargas-Martínez EM, Gómez-Coronado KS, Espinosa-Luna R, Valdez-Morales EE, Barrios-García T, Barajas-Espinosa A, et al. Functional expression of P2X1, P2X4 and P2X7 purinergic receptors in human monocyte-derived macrophages. *Eur J Pharmacol*. 2020;888:173460.

370. Vasamsetti SB, Florentin J, Coppin E, Stiekema LCA, Zheng KH, Nisar MU, et al. Sympathetic Neuronal Activation Triggers Myeloid Progenitor Proliferation and Differentiation. *Immunity*. 2018;49(1):93-106.e7.

371. Vecchio EA, White PJ, May LT. The adenosine A2B G protein-coupled receptor: Recent advances and therapeutic implications. *Pharmacol Ther*. 2019;198:20-33.

372. Vilela MC, Lima GK, Rodrigues DH, Lacerda-Queiroz N, Pedrosa VS, de Miranda AS, et al. Platelet Activating Factor (PAF) Receptor Deletion or Antagonism Attenuates Severe HSV-1 Meningoencephalitis. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2016;11(4):613-621.

373. von Kügelgen I, Hoffmann K. Pharmacology and structure of P2Y receptors. *Neuropharmacology*. 2016;104:50-61.

374. von Kügelgen I. Molecular pharmacology of P2Y receptor subtypes. *Biochem Pharmacol.* 2021;187:114361.
375. Wagenius M, Jakobsson J, Stranne J, Linder A. Complications in extracorporeal shockwave lithotripsy: a cohort study. *Scand J Urol.* 2017;51(5):407-413.
376. Wahle M, Greulich T, Baerwald CG, Häntzschel H, Kaufmann A. Influence of catecholamines on cytokine production and expression of adhesion molecules of human neutrophils in vitro. *Immunobiology.* 2005;210(1):43-52.
377. Wang B, Ye JF, Zhao L, Bi H, Lu J, Ma LL. Multiple endoscopy for the treatment of upper urinary tract calculi following ileal conduit: a case report and literature review. *Beijing Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* 2017;49(4):733-735.
378. Wang C, Xu R, Zhang Y, Wu Y, Zhang T, Dong X, et al. Nomograms for Predicting the Risk of SIRS and Urosepsis after Uroscopic Minimally Invasive Lithotripsy. *Biomed Res Int.* 2022;2022:6808239.
379. Wang H, Man L, Li G, Huang G, Liu N, Wang J. Meta-Analysis of Stenting versus Non-Stenting for the Treatment of Ureteral Stones. *PLoS One.* 2017;12(1):e0167670.
380. Wang P, Jia J, Zhang D. Purinergic signalling in liver diseases: Pathological functions and therapeutic opportunities. *JHEP Rep.* 2020;2(6):100165.
381. Wang S, Cao C, Chen Z, Bankaitis V, Tzima E, Sheibani N, et al. Pericytes regulate vascular basement membrane remodeling and govern neutrophil extravasation during inflammation. *PLoS One.* 2012;7(9):e45499.
382. Wang W, Hu D, Feng Y, Wu C, Song Y, Liu W, et al. Paxillin mediates ATP-induced activation of P2X7 receptor and NLRP3 inflammasome. *BMC Biol.* 2020;18(1):182.
383. Wang X, Chen D. Purinergic Regulation of Neutrophil Function. *Front Immunol.* 2018;9:399.
384. Watala C, Wzorek J, Palma A, Boncler M A comparison of different regression models for the quantitative analysis of the combined effect of P2Y₁₂

and P2Y1 receptor antagonists on ADP-induced platelet activation. *Thromb Res.* 2022;211:88-97.

385. Watanabe R, Maeda T, Zhang H, Berry GJ, Zeisbrich M, Brockett R, Greenstein AE, Tian L, Goronzy JJ, Weyand CM. MMP (Matrix Metalloprotease)-9-Producing Monocytes Enable T Cells to Invade the Vessel Wall and Cause Vasculitis. *Circ Res.* 2018;123(6):700-715.

386. Watts IS, Keery RJ, Lumley P. Differential ability of agonists to express distinct pools of fibrinogen (GpIIb/IIIa) receptors which can mediate the aggregation of human platelets. *Thromb Haemost.* 1989;62(3):955-961.

387. Werner I, Guo F, Bogert NV, Stock UA, Meybohm P, Moritz A, et al. Methylene blue modulates transendothelial migration of peripheral blood cells. *PLoS One.* 2013;8(12):e82214.

388. Wolska N, Kassassir H, Luzak B, Watala C, Rozalski M. Adenosine Receptor Agonists Increase the Inhibition of Platelet Function by P2Y12 Antagonists in a cAMP- and Calcium-Dependent Manner. *Pharmaceuticals (Basel).* 2020;13(8):177.

389. Wolska N, Rozalski M. Blood Platelet Adenosine Receptors as Potential Targets for Anti-Platelet Therapy. *Int J Mol Sci.* 2019;20(21):E5475.

390. Wong J, Gu BJ, Teoh H, Krupa M, Monif M, Slee M, et al. Flow cytometry identifies an early stage of platelet apoptosis produced by agonists of the P2X1 and P2X7 receptors. *Platelets.* 2022;33(4):621-631.

391. Woźniak P, Kontek B, Róžański W, Olas B. Evaluation of hemostasis parameters and the role of the oxidative damage to plasma proteins in the modulation of hemostasis in patients with nephrolithiasis before and after extracorporeal shock wave lithotripsy. *PLoS One.* 2017;12(10):e0185157.

392. Wu SY, Jiang YH, Jhang JF, Hsu YH, Ho HC, Kuo HC. Inflammation and Barrier Function Deficits in the Bladder Urothelium of Patients with Chronic Spinal Cord Injury and Recurrent Urinary Tract Infections. *Biomedicines.* 2022;10(2):220.

393. Wu XM, Zhang N, Li JS, Yang ZH, Huang XL, Yang XF. Purinergic receptors mediate endothelial dysfunction and participate in atherosclerosis. *Purinergic Signal*. 2022; Jan 3;10.1007/s11302-021-09839-x

394. Xiao YH, He XY, Han Q, Yang F, Zhou SX. Atorvastatin prevents glomerular extracellular matrix formation by interfering with the PKC signaling pathway. *Mol Med Rep*. 2018;17(5):6441-6448.

395. Yamashita M, Shinohara T, Tsuji S, Myrvik QN, Nishiyama A, Henriksen RA, Shibata Y. Catalytically inactive cyclooxygenase 2 and absence of prostaglandin E2 biosynthesis in murine peritoneal macrophages following in vivo phagocytosis of heat-killed *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin. *J Immunol*. 2007;179(10):7072-7078.

396. Yan Y, Bai J, Zhou X, Tang J, Jiang C, Tolbert E, Bayliss G, Gong R, Zhao TC, Zhuang S. P2X7 receptor inhibition protects against ischemic acute kidney injury in mice. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2015;308(6):C463-472.

397. Yang F, Zhao K, Zhang X, Zhang J, Xu B. ATP Induces Disruption of Tight Junction Proteins via IL-1 Beta-Dependent MMP-9 Activation of Human Blood-Brain Barrier In Vitro. *Neural Plast*. 2016;2016:8928530.

398. Yang QQ, Fang MS, Tu J, Ma QX, Shen LY, Xu YY, Chen J, Chen ML. Guanxinning tablet inhibits the interaction between leukocyte integrin Mac-1 and platelet GPIIb α for antithrombosis without increased bleeding risk. *Chin J Nat Med*. 2022;20(8):589-600.

399. Yang S, Huang X, Liao J, Li Q, Chen S, Liu C, et al. Platelet-leukocyte aggregates - a predictor for acute kidney injury after cardiac surgery. *Ren Fail*. 2021;43(1):1155-1162.

400. Yang SX, Zhang ZC, Bai HL. ClC-5 alleviates renal fibrosis in unilateral ureteral obstruction mice. *Hum Cell*. 2019;32(3):297-305.

401. Yang X, Leng M, Yang L, Peng Y, Wang J, Wang Q, et al. Effect of Evodiamine on Collagen-Induced Platelet Activation and Thrombosis. *Biomed Res Int*. 2022;2022:4893859.

402. Yang Y, Zhang H, Lu Q, Liu X, Fan Y, Zhu J, et al. Suppression of adenosine A2a receptors alleviates bladder overactivity and hyperalgesia in cyclophosphamide-induced cystitis by inhibiting TRPV1. *Biochem Pharmacol.* 2021;183:114340.

403. Yaw HP, Van Den Helm S, Linden M, Monagle P, Ignjatovic V. Whole blood flow cytometry protocol for the assessment of platelet phenotype, function, and cellular interactions. *Platelets.* 2021;32(6):786-793.

404. Yazici CM, Akgul M, Ozcaglayan O, Dogru M, Dogan C, Altın E. Prospective Evaluation of Ipsilateral and Contralateral Renal Blood Flow During Retrograde Intrarenal Surgery. *Urology.* 2021;154:77-82.

405. Yazici O, Tuncer M, Sahin C, Demirkol MK, Kafkasli A, Sarica K. Shock Wave Lithotripsy in Ureteral Stones: Evaluation of Patient and Stone Related Predictive Factors. *Int Braz J Urol.* 2015;41(4):676-682.

406. Yildirim A, Russell J, Yan LS, Senchenkova EY, Granger DN. Leukocyte-dependent responses of the microvasculature to chronic angiotensin II exposure. *Hypertension.* 2012;60(6):1503-1509.

407. Yoon SS, Kwon HW, Shin JH, Rhee MH, Park CE, Lee DH. Anti-Thrombotic Effects of Artesunate through Regulation of cAMP and PI3K/MAPK Pathway on Human Platelets. *Int J Mol Sci.* 2022;23(3):1586.

408. Yuan D, He P. Vascular remodeling alters adhesion protein and cytoskeleton reactions to inflammatory stimuli resulting in enhanced permeability increases in rat venules. *J Appl Physiol (1985).* 2012;113(7):1110-120.

409. Zeng G, Zhong W, Mazzon G, Choong S, Pearle M, Agrawal M, et al. International Alliance of Urolithiasis (IAU) guideline on percutaneous nephrolithotomy. *Minerva Urol Nephrol.* 2022; Jan 31:10.23736/S2724-6051.22.04752-8

410. Zhao H, Zhang X, Dai Z, Feng Y, Li Q, Zhang JH, et al. P2X7 Receptor Suppression Preserves Blood-Brain Barrier through Inhibiting RhoA Activation after Experimental Intracerebral Hemorrhage in Rats. *Sci Rep.* 2016;6:23286.

411. Zheng TJ, Parra-Izquierdo I, Reitsma SE, Heinrich MC, Larson MK, Shatzel JJ, Aslan JE, McCarty OJT. Platelets and tyrosine kinase inhibitors: clinical features, mechanisms of action, and effects on physiology. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2022;323(4):C1231-C50.

412. Zhu L, Xu C, Huo X, Hao H, Wan Q, Chen H, Zhang X, Breyer RM, Huang Y, Cao X, Liu DP, FitzGerald GA, Wang M. The cyclooxygenase-1/mPGES-1/endothelial prostaglandin EP4 receptor pathway constrains myocardial ischemia-reperfusion injury. *Nat Commun.* 2019;10(1):1888.