

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ДОНЕЦКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ М. ГОРЬКОГО»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

ПЕРЕНЕСЕНКО АНАСТАСИЯ ОЛЕГОВНА

УДК 616.61-002.2-008.852/.853

**МЕХАНИЗМЫ ФОРМИРОВАНИЯ ТРОМБОЦИТАРНО-
ЛЕЙКОЦИТАРНЫХ АГРЕГАТОВ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ
ОБСТРУКТИВНОМ ПИЕЛОНЕФРИТЕ**

3.3.3. Патологическая физиология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук, профессор
Баринов Эдуард Федорович

*Экземпляр идентичный всем
существующим у Учёного
секретаря
Диссертационного совета
Д01.022.05*

Донецк – 2023

СОДЕРЖАНИЕ

	Стр.
ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	5
ВВЕДЕНИЕ.....	6
ГЛАВА 1. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ФОРМИРОВАНИЕ ТРОМБОЦИТАРНО-ЛЕЙКОЦИТАРНЫХ АГРЕГАТОВ В НОРМЕ И ПАТОЛОГИИ.....	15
1.1. Молекулярные особенности воспаления в почке.....	15
1.2. Роль тромбоцитов в формировании межклеточных коопераций.....	17
1.3. Индукционное влияние тромбоцитов на лейкоциты при межклеточных взаимодействиях.....	22
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	29
2.1. Характеристика пациентов с хроническим обструктивным пиелонефритом.....	29
2.2. Формирование дизайна исследования.....	31
2.3. Исследование показателей периферической крови у пациентов с хроническим обструктивным пиелонефритом.....	35
2.4. Анализ агрегационной способности тромбоцитов.....	36
2.5. Критерии анализа агрегатограмм у пациентов с хроническим обструктивным пиелонефритом.....	37
2.6. Исследование формирования тромбоцитарно-лейкоцитарных агрегатов.....	41
2.7. Статистическая обработка данных.....	42
ГЛАВА 3. ИНФОРМАТИВНОСТЬ И СПЕЦИФИЧНОСТЬ ЛАБОРАТОРНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ В ДИАГНОСТИКЕ ФАЗ ХРОНИЧЕСКОГО ОБСТРУКТИВНОГО ПИЕЛОНЕФРИТА.....	43
3.1. Клинико-лабораторная диагностика воспаления у пациентов с хроническим обструктивным пиелонефритом.....	43
3.2. Гендерные и возрастные особенности лейкопоза у пациентов с	49

хроническим обструктивным пиелонефритом.....	
3.3. Влияние оперативного вмешательства, как фактора, повышающего провоспалительную реактивность у пациентов с хроническим обструктивным пиелонефритом.....	56
3.4. Определение валидности маркеров воспаления в диагностике фаз ремиссии и рецидива у пациентов с хроническим обструктивным пиелонефритом.....	59
3.5. Тромбоцитарно-лейкоцитарные агрегаты как индикатор функциональной активности клеток, принимающих участие в воспалительной реакции.....	66
ГЛАВА 4. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ФОРМИРОВАНИЯ ТРОМБОЦИТАРНО-ЛЕЙКОЦИТАРНЫХ АГРЕГАТОВ ПРИ РЕАЛИЗАЦИИ ОСТРОГО И ХРОНИЧЕСКОГО ВОСПАЛЕНИЯ В МОЧЕВЫВОДЯЩИХ ПУТЯХ.....	74
4.1. Формирование ТЛА in vitro у здоровых лиц.....	75
4.2. Количество ТЛА в периферической крови у пациентов с ХОПН.....	78
4.3. Клеточный состав ТЛА крови у пациентов в фазе ремиссии ХОПН при индукции агонистами.....	82
4.4. Фенотипы клеток крови как проявления индивидуальной реактивности организма у пациентов с хроническим обструктивным пиелонефритом в фазе ремиссии.....	84
4.5. Реактивность лейкоцитов на системные и паракринные лиганды у пациентов с гиперadrenergическим фенотипом клеток крови в фазе ремиссии хронического обструктивного пиелонефрита.....	91
4.6. Формирование ТЛА при стимуляции тромбоцитов и лейкоцитов у пациентов в фазе рецидива хронического обструктивного пиелонефрита.....	95
4.8. Фенотипы клеток крови как проявление индивидуальной реактивности организма у пациентов в фазе рецидива хронического	98

обструктивного пиелонефрита.....	
4.9. Реактивность различных форм лейкоцитов у пациентов с нормопуринергическим и гиперпуринергическим фенотипом клеток крови.....	105
ГЛАВА 5. ХАРАКТЕРИСТИКИ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ТРОМБОЦИТОВ ПРИ ФОРМИРОВАНИИ ТРОМБОЦИТАРНО-ЛЕЙКОЦИТАРНЫХ АГРЕГАТОВ У ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМ ОБСТРУКТИВНЫМ ПИЕЛОНЕФРИТОМ.....	111
5.1. Референсные диапазоны индуцибельной агрегации тромбоцитов у здоровых волонтеров.....	112
5.2. Характеристики функциональной активности тромбоцитов у пациентов с гипoadренореактивным фенотипом клеток крови.....	121
5.3. Характеристики функциональной активности тромбоцитов у пациентов с нормoadренореактивным фенотипом клеток крови.....	125
5.4. Характеристики функциональной активности тромбоцитов у пациентов с гиперадренореактивным фенотипом клеток крови.....	129
5.5. Характеристики функциональной активности тромбоцитов у пациентов с гипопуринергическим фенотипом клеток крови.....	133
5.6. Характеристики функциональной активности тромбоцитов у пациентов с нормопуринергическим фенотипом клеток крови.....	137
5.7. Характеристики функциональной активности тромбоцитов у пациентов с гиперпуринергическим фенотипом клеток крови.....	140
АНАЛИЗ И ОБОБЩЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	145
ВЫВОДЫ.....	163
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	165
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	166

ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АДФ	– аденозинмонофосфат
Атц	– агрегация тромбоцитов
ДИ	– доверительный интервал
Лц	– лейкоцит
Лф	– лимфоцит
МВП	– мочевыводящие пути
МКБ	– мочекаменная болезнь
Мц	– моноцит
Нф	– нейтрофил
САС	– симпатoadреналовая система
СРБ	– С-реактивный белок
СОЭ	– скорость оседания эритроцитов
ТЛА	– тромбоцитарно-лейкоцитарные агрегаты
Тц	– тромбоцит
ФАТ	– фактор активации тромбоцитов
ХОПН	– хронический обструктивный пиелонефрит
Эо	– эозинофил
AUC	– площадь под кривой
P2Y	– пуриновые рецепторы

ВВЕДЕНИЕ.

Актуальность темы.

В настоящее время продолжают поиски критериев, позволяющих дифференцировать фазы рецидива и ремиссии хронического обструктивного пиелонефрита (ХОПН) [141, 148]. Причина заключается в субъективной оценке данных физикального осмотра пациента, «размытости» референтных диапазонов лабораторных критериев при остром и хроническом воспалении в мочевыводящих путях (МВП), отсутствием критериев перехода хронической воспалительной реакции в острую фазу [128]. В этом контексте перспективным представляется изучение индивидуальной реактивности организма при развитии воспалительной реакции. Критериями такой реактивности считаются лейкоцитоз, лейкоцитарная формула крови, скорость оседания эритроцитов (СОЭ), уровень С-реактивного белка (СРБ), интегральные лейкоцитарные индексы, лейкоцитурия [86, 92]. Характеристики тромбоцитарно-лейкоцитарных агрегатов (ТЛА) продолжают обсуждаться в контексте поиска ранних маркеров развития воспаления [132], поскольку открывается возможность управления воспалительной реакцией на самых ранних этапах. Известно, что системная регуляция гомеостаза сопровождается изменением активности клеток крови посредством стимуляции рецепторов, ассоциированных с различными внутриклеточными сигнальными путями [129], при этом в циркулирующей крови формируются ТЛА [13]. Такое взаимодействие обеспечивает рекрутирование лейкоцитов (Лц) в ткани органов; регулирует автономные функции Лц, включая образование и освобождение внеклеточных ловушек нейтрофилов (Нф); а также поддерживают обратную связь, позволяющую ограничить тяжесть воспаления и защитить орган от повреждения, вызванного чрезмерной активацией иммунной системы [88, 89]. Пусковым моментом в формировании ТЛА является активация тромбоцитов (Тц), однако механизмы регуляции адаптационной реакции клеток крови и пути внутриклеточной сигнализации при развитии воспаления остаются

малоизученными [110]. Провоспалительный потенциал при активации Тц подтверждается их взаимодействием с моноцитами (Мц), Нф, эозинофилами (Эо), базофилами и Т-клетками [130]. При дегрануляции Тц выделяют широкий спектр воспалительных и митогенных медиаторов. В α -гранулах Тц содержатся хемокины СХС и СС классов [116, 119]. Стимуляция Тц и последующее формирование ТЛА связано с формированием провоспалительного фенотипа Лц [96, 102]. Доказано, что адреналин и АДФ приводят к повышению образования ТЛА за счет усиления экспрессии CD11b, Р-селектина и гликопротеина Пв/Ша [146, 238, 239]. Участие симпатoadреналовой системы (САС) в рекрутировании Лц представляется логичным, поскольку экспрессия $\alpha 2$ -адренорецепторов на Тц, Лц и эндотелии создает оптимальные условия для формирования ТЛА при развитии пиелонефрита [19, 25, 64]. Пуриновые P2Y-рецепторов (P2Y1-рецептор, P2Y12-рецептор) связаны с Gi- и Gq-белком, сигнализация с которых обеспечивает повышение концентрации Ca²⁺ в клетках крови, следствием чего является индукция агрегации Тц и активация Лц [10, 11]. Доказана роль ФАТ в формировании ТЛА [12, 14]; фосфорилирование внеклеточной сигнально-регулируемой киназы (ERK), которое опосредовано фосфоинозитол-3-киназой, протеинкиназой С, фосфолипазой А2, фосфолипазой С и внеклеточным Ca²⁺, считается ответственным за регуляцию процесса воспаления [132, 138]. Очевидно, что отсутствие знаний, касающихся влияния системных и паракринных регуляторов на формирование и состав ТЛА при хронической и острой воспалительной реакции в МВП сдерживает совершенствование консервативной терапии у пациентов с нефролитиазом. Требуют исследования фенотипы клеток крови и механизмы формирования ТЛА в фазе ремиссии и рецидива ХОПН. Необходимо выяснить – как изменяется внутриклеточная сигнализация в Тц, при рекрутировании Лц из сосудистого русла; а также – в чем суть регуляции адаптационной реакции клеток крови в процессе формирования ТЛА при наличии острого и хронического воспалительного процесса в МВП. Верификация молекулярных механизмов инициации и ограничения воспаления в МВП при ХОПН позволит оптимизировать схему консервативной терапии за счет

модуляции внутриклеточной сигнализации, обеспечивающей реализацию функциональной активности клеток крови с учетом индивидуальной реактивности организма.

Степень разработанности темы исследования.

Сложность дифференцирования фаз ремиссии и рецидива заключается в несоответствии достоверности лабораторных критериев клинической картине. Систематизация критериев валидности лабораторных индикаторов позволяет ответить на вопрос об эффективности их использования у пациентов с ХОПН при условии острого и хронического воспаления. В этом контексте ТЛА является возможным индикатором провоспалительной активации у пациентов с ХОПН. При анализе патогенетических механизмов формирования ТЛА в цельной крови до и после индукции агонистами различного механизма действия возможно проанализировать активацию кластеров рецепторов Тц и выделение фенотипов клеток крови с различной степенью реактивности. Изучение амплитудных характеристик Тц, которые детализируют скорость включения рецепторов и внутриклеточных реакций представляется перспективным. В этой связи, степень активации Тц может рассматриваться как наиболее ранний индикатор рекрутирования Лц, а агонисты (патогенетические факторы, индуцирующие активацию Тц) – как факторы риска развития острого воспаления. Кроме того, характеристики агрегатограммы (Slope, AUC) при активации Тц, вероятно, связаны с количеством и составом Лц, принимающих участие в воспалительной реакции. Следовательно, изучение агрегатограмм позволит идентифицировать внутриклеточную сигнализацию в Тц при рекрутировании Лц, а также механизмы взаимосвязи между ними.

Связь с работы с научными программами, планами, темами.

Диссертационное исследование выполнено в рамках планируемой научно-исследовательской работы и является фрагментом научно-исследовательской работы «Изучить проявления индивидуальной реактивности организма и

предложить информативные показатели для совершенствования диагностики типовых патологических процессов» УН 16.01.28 и «Тромбоцитарные маркеры прогрессирования хронического нарушения органного кровообращения» УН 19.01.01 кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии. Диссертантка выполнила фрагмент научно-исследовательской работы, посвященной изучению патогенетическим механизмам формирования ТЛА у пациентов с ХОПН. При этом исследовались характеристики ТЛА периферической крови у здоровых лиц, а также у пациентов при остром и хроническом воспалении; был проведен статистический анализ и оценка информативности ТЛА как предиктора тяжести воспаления; изучены механизмы формирования ТЛА при проявлениях индивидуальной реактивности организма. Кроме того, диссертанткой изучены агрегатограммы контрольной группы с определением «стандарта» для сравнения, который включал в себя уровень амплитуды и подамплитудные характеристики Тц при индукции агонистами (адреналин, АДФ, ФАТ). Кроме того, были проанализированы амплитудные характеристики агрегатограмм пациентов с ХОПН в фазе ремиссии и рецидива. Тема диссертации и научный руководитель утверждены на заседании Ученого совета Донецкого национального медицинского университета имени М. Горького (протокол № 2 от 31.03.2016 г.).

Цель исследования – установить механизмы взаимодействия Тц и Лц при реализации воспалительной реакции у пациентов с ХОПН.

Задачи исследования

1. Сопоставить диагностическую информативность лабораторных показателей воспаления и характеристик ТЛА (механизмы регуляции, количество и состав агрегатов) для дифференциальной диагностики фаз рецидива и ремиссии ХОПН.

2. Изучить влияние системного гуморального фактора (адреналина) и паракринных регуляторов (АДФ и ФАТ) на формирование и состав ТЛА у здоровых лиц, при хронической и острой воспалительной реакции в МВП.

3. Установить фенотипы клеток крови и механизмы формирования ТЛА в фазе ремиссии и рецидива ХОПН.

4. Исследовать пути внутриклеточной сигнализации Тц в процессе рекрутирования Лц из сосудистого русла при ХОПН.
5. Определить механизмы регуляции адаптационных реакций Тц в процессе формирования ТЛА при наличии хронического воспалительного процесса в МВП.
6. Верифицировать механизмы регуляции адаптационных реакций Тц в процессе формирования ТЛА при наличии острого воспалительного процесса в МВП.

Объект исследования: хронический обструктивный пиелонефрит (МКБ – 10-N11.1).

Предмет исследования: лабораторные показатели (лейкоцитоз, общий анализ крови, СОЭ, уровень СРБ, лейкоцитурия, циркулирующие ТЛА); рецепторный аппарат клеток крови в базальных условиях и при связывании с агонистами в концентрации EC50 (функциональная активность α 2-адренорецептора, пуриновых P2Y-рецепторов, ФАТ-рецептора Тц); взаимодействие рецепторов при адаптационных реакциях клеток крови у пациентов с нефролитиазом; характеристики индуцированной агрегации Тц (амплитуда, Lag-time, Slope, AUC агрегатограмм).

Научная новизна полученных результатов.

Доказано, что исследование клеток крови *in vitro* являются репрезентативной моделью для оценки развития воспалительной реакции, а также исследования механизмов регуляции взаимодействия клеток крови при нефролитиазе. Впервые доказано, что в фазе ремиссии и рецидива ХОПН рекрутирование Лц из сосудистого русла достигается посредством стимуляции α 2-адренорецептора, пуриновых P2Y-рецепторов и ФАТ-рецептора. Впервые установлено, что индивидуальная реактивность организма при ХОПН проявляется наличием гипо-, нормо- и гиперреактивного фенотипов клеток крови, отличающихся реакцией на провоспалительные стимулы (адреналин, АДФ и ФАТ). Впервые идентифицированы пути внутриклеточной сигнализации, обеспечивающие модуляцию функциональной активности Тц на этапе формирования ТЛА, что предопределяет развитие воспалительной реакции в

МВП. Определена роль адренергической регуляции компенсаторной реакции Тц при наличии хронического воспалительного процесса в МВП. Впервые установлено участие пуринергической сигнализации в Тц в механизмах рекрутирования Лц при остром пиелонефрите.

Теоретическая и практическая значимость работы.

Проведенное исследование способствовало созданию концепции инициации и ограничения воспалительной реакции, обусловленной индивидуальной реактивностью организма у пациентов с ХОПН; позволило установить механизмы регуляции компенсаторных реакций клеток крови при развитии острого и хронического воспалительного процесса, а также обеспечило понимание роли внутриклеточной сигнализации Тц в механизмах формирования ТЛА и рекрутирования Лц. Разработанные методы исследования взаимодействия клеток крови при воспалении позволяют анализировать механизмы развития острой и хронической воспалительной реакции, состав агрегатов, контролировать и корректировать эффективность лечебных мероприятий у пациентов с ХОПН; прогнозировать риск развития острого пиелонефрита с учетом индивидуальной реактивности организма пациента. Полученные данные позволят улучшить уровень диагностических мероприятий и могут стать факторами прогнозирования риска инициации фаз ХОПН с учетом индивидуальной реактивности организма пациента. Результаты диссертационной работы, отражающие молекулярные механизмы формирования ТЛА и фенотипы клеток крови, участвующие в воспалительной реакции при различной реактивности организма, могут быть внедрены в учебный процесс кафедр медико-биологического профиля.

Методология и методы исследования.

Для решения сформулированных задач проведено открытое, наблюдательное, проспективное когортное исследование. Всем пациентам на этапе госпитализации проведено комплексное клиническое обследование по традиционной схеме, принятой для диагностики мочекаменной болезни (МКБ).

При анализе гемограммы определяли количество форменных элементов, лейкоцитарную формулу и абсолютное количество Лц, оценивали СОЭ, уровень СРБ. Для оценки процесса рекрутирования Лц из сосудистого русла в ткани проводили микроскопию мазков крови, окрашенных по методу Паппенгейма; рассчитывали количество циркулирующих в крови ТЛА. Тц больных использовали в качестве модели для оценки функциональной активности $\alpha 2$ -адренорецептора, пуриновых P2X1 и P2Y12 рецепторов, ФАТ-рецептора. Оценку агрегации Тц (АТц) проводили турбидиметрическим методом на анализаторе ChronoLog (США). Анализ агрегатограмм проводили по следующим параметрам: амплитуда агрегации Тц (%); максимальный наклон кривой (Slope, %/мин); площадь под кривой (AUC, U). Статистический анализ осуществлялся с использованием пакета MedCalc.

Положения, выносимые на защиту

1. Использование однофакторных моделей логистической регрессии позволяет повысить чувствительность и специфичность диагностических тестов оценки хронического и острого воспаления в МВП путем определения критических значений лейкоцитоза, СОЭ, СРБ.

2. На этапе госпитализации пациентов информативным индикатором дифференцировки фаз ХОПН является количество циркулирующих в крови ТЛА.

3. Развитие воспалительной реакции, связанное с формированием ТЛА, регулируется активностью $\alpha 2$ -адренорецептора, пуриновыми P2Y-рецепторами и ФАТ-рецептором.

4. Адренореактивные фенотипы клеток крови у пациентов в фазе ремиссии ХОПН и пуринергические фенотипы – в фазе рецидива ХОПН отражают индивидуальную реактивность организма, что позволяет персонализировать противовоспалительную терапию при нефролитолизе.

5. Активность рецепторов Тц может рассматриваться как ранний индикатор выраженности рекрутирования Лц из сосудистого русла для реализации воспалительной реакции.

6. Идентификация путей внутриклеточной сигнализации *in vitro* на изолированных Тц позволяет конкретизировать механизмы взаимодействия клеток крови при формировании ТЛА в фазе ремиссии и рецидива ХОПН.

Степень достоверности полученных данных.

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

Апробация результатов исследований.

Основные результаты диссертационной работы были доложены на научно-практических конференциях: «Международная медико-биологическая конференция молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина – человек и его здоровье»» (Санкт-Петербург 2015, 2016, 2017, 2018), «VII Национальный конгресс патофизиологов Украины с международным участием «Патофизиология и фармация: пути интеграции»» (Харьков, 2016), «Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Здоровье – основа человеческого потенциала: проблемы и пути их решения»» (Санкт-Петербург, 2016), «XV чтения им. В.В. Подвысоцкого» (Одесса, 2016), «Неделя науки 2018: Международный молодёжный форум, посвященный 80-летнему юбилею Ставропольского государственного медицинского университета» (Ставрополь, 2018, 2021), «Профилактическая медицина-2018: Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием» (Санкт-Петербург, 2018), «II Международная научно-практическая конференция» (Курск, 2021), «Донецкие чтения 2020: образование, наука, инновации, культура и вызовы современности» (Донецк, 2020-2022), «Международный медицинский форум Донбасса «Наука побеждать... болезнь» (Донецк, 2022).

Личный вклад соискателя.

Вклад соискателя в результаты диссертационной работы является основным и заключается в проведении лабораторных исследований, статистической обработке данных, написании всех разделов диссертации, формулировании выводов. Автором проведена статистическая обработка результатов исследования. Формулировка научной концепции исследования, определение цели и задач исследования, разработка методических подходов и выбор методов исследования, анализ и теоретическое обобщение результатов выполнены под руководством д.м.н., профессора Барина Э.Ф. Клиническое исследование проведено совместно с ассистентом кафедры урологии ФГБОУ ВО ДонГМУ Минздрава России, к.м.н. Григоряном Х.В. Диссертантом не были заимствованы результаты и идеи соавторов публикаций.

Публикации.

По материалам диссертации опубликовано 26 научных работ, в том числе: 11 статей – в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Донецкой Народной Республики и Российской Федерации для публикации основных результатов диссертаций на соискание ученых степеней кандидата медицинских наук и 15 тезисов и статей – в материалах конгрессов, форумов и конференций.

Структура и объем диссертации.

Диссертация изложена на 193 страницах печатного текста, состоит из «Введения», «Обзора литературы», «Материалов и методов исследования», трех глав собственных исследований, раздела «Анализ и обсуждение результатов исследования», «Выводов», «Практических рекомендаций», списка использованной литературы, насчитывающего 297 наименований (из них 80 отечественных и 217 – зарубежных источников). Диссертация содержит 33 таблицы и иллюстрирована 32 рисунками.

ГЛАВА 1**МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ФОРМИРОВАНИЕ
ТРОМБОЦИТАРНО-ЛЕЙКОЦИТАРНЫХ АГРЕГАТОВ В НОРМЕ И
ПАТОЛОГИИ****1.1. Молекулярные особенности активации воспаления в почке**

Клинические состояния при патологии мочевыделительных путей (МВП), такие как постишемические, острые токсические повреждения почек, а также диабетические нефропатии, индуцируемые гипертензией или конкрементами вовлекают процесс воспаления [35, 163]. Также, как и в других органах, в МВП воспаление индуцируется молекулярными паттернами, ассоциированными с повреждением (DAMP), которые выделяются поврежденными клетками или продуцируются при ремоделировании межклеточного вещества. Широкий спектр клеток почки и МВП (паренхиматозных, так и стромальных клеток) способны экспрессировать разновидности Toll-like рецепторов (TLRs; а именно TLR1 – TLR6) и компоненты инфламмасом, которые, как относятся к DAMP и могут индуцировать неспецифический иммунный ответ и последующую индукцию воспалительного процесса [138, 187, 237].

Эпителий канальцев и собирательных трубочек обладает высокой чувствительностью к оксидативному стрессу, по причине высокой реабсорбционной способности и секреторной активности. При сепсисе и реперфузионном повреждении, нейтрофилы (Нф) секретируют белок HMGB1, гистоны, белки теплового шока, компоненты межклеточного вещества и DAMP, которые активируют TLR2 и TLR4 на паренхиматозных клетках, а также дендритных клетках. Последние секретируют хемокины, которые обеспечивают острый Нф-зависимый воспалительный ответ, что приводит к повреждению почки [165, 258, 260]. Начальный воспалительный ответ усиливается путем инфильтрации Нф, с вовлечением других видов Лц. Повышение концентрации адгезивных молекул (sVCAM-1, sICAM-1, Р-селектин) или снижение (L-селектин) в группах исследования свидетельствует о реализации неспецифических

иммунных процессов и уже достоверно подтверждено при остром повреждении и на ранних стадиях хронических заболеваний почек [169].

Клетки паренхимы почки и МВП чувствительны к низкомолекулярным токсическим метаболитам. Последние могут накапливаться и инициировать некроз с последующим опосредованным TLR4–тубулоинтерстициальным воспалением [83, 269]. Высокая осмолярность и сдвиг pH мочи может обеспечивать кристаллизацию молекул (мочевая кислота, оксалаты, фосфаты кальция, миоглобин и свободные цепи иммуноглобулинов в канальцах). Кристаллы обтурируют канальцы и контактно повреждают эпителий, что косвенно приводит к воспалению (кристаллонефропатии, включая мочекаменную болезнь (МКБ), оксалатную нефропатию, острую уратовую нефропатию и др.). Последние исследования патологических механизмов воспаления почки сообщают о возможности достижения кристаллами тубулоинтерстициального компартмента и индукции воспаления путем активации инфламмасом в дендритных клетках [278]. Примечательно, что при ХОПН на фоне МКБ может происходить как инициация рецидива, за счет вышеуказанного механизма, так и присоединение инфекционного компонента. Последний факт может быть обусловлен индивидуальной иммунной реактивностью, анатомическими факторами и др. [85, 163].

Для ХОПН, помимо фактора активности Лц, актуальным становится риск развития кровотечения при нарушении целостности тканей (при травматизации конкрементам различного диаметра) [206, 253, 255]. Таким образом, можно прийти к заключению, что активация гемостаза, а именно Тц является важнейшим звеном в патогенезе ХОПН. В литературе было предложено развитие патофизиологических событий, опосредованных иммунными клетками в кооперации с системой гемостаза для усиления, распознавания и разрушения экзогенных патогенов при сосудистом воспалении под термином «иммуннотромбоз» [230, 283]. Значительно расширился перечень вопросов влияния Тц (как участников гемостаза) и Тц, как посредников лейкоцитарного рекрутирования и регуляции неспецифического иммунитета относительно

экзогенных патогенов и воспаления [36, 136, 167]. Экспериментальные модели демонстрируют, что явления тромбоза усиливают воспалительный ответ стенки сосуда, что вовлекает Нф, экспрессию адгезивных молекул (селектинов) и провоспалительных цитокинов [132]. Вопросам взаимосвязи между активацией гемостаза и некоторыми провоспалительными маркерами (IL-6, IL-8 MCP-1 и TNF- α) был посвящен ряд исследований [38, 44, 68]. Известно, что медиаторы тромбогенеза способны стимулировать множественные воспалительные пути, а с другой стороны такие как IL-6, IL-8 и моноцитарный хемотаксический белок (MCP-1) способны к активации системы свертывания [236]. Клинически было доказано, что пациенты с тромбозом глубоких вен демонстрировали главные признаки воспаления: отек, покраснение, боль и повышение температуры. Логичным представляется похожий тренд при компрометировании сосудов микроциркуляторного русла [144]. Также известно, что повышение MPV (средний объем Тц) свидетельствует о некоторых воспалительных процессах, например, неспецифический язвенный колит, ревматоидный артрит или анкилозирующий спондилит [137, 199]. Особое значение приобретает изучение провоспалительной активации Тц и участия в самом каскаде воспаления ввиду указанных фактов.

1.2. Роль тромбоцитов в формировании межклеточных коопераций

Циркулирующие тромбоцит-лейкоцитарные агрегаты (ТЛА) обнаружены у пациентов с патологическими процессами различной локализации и считаются чувствительным маркером активации Тц [36, 256, 263]. ТЛА могут играть важную роль в тромботических и воспалительных заболеваниях, но точная оценка механизмов их образования даже в физиологических условиях затруднена. Тем не менее, характеристики ТЛА в циркулирующей крови продолжают обсуждаться в контексте поиска ранних маркеров развития воспаления [265, 280], что позволило бы приблизиться к возможности ограничения развития воспалительной реакции на самых ранних этапах и пониманию механизмов инициации воспаления. Сообщается о взаимодействии популяций Лц с Тц у здоровых людей. Однако

дискуссионным остается вопрос метода анализа ТЛА и индивидуальной реактивности группы исследования [291].

Известно, что для формирования межклеточных коопераций требуется взаимодействие молекул адгезии на Тц (таких как Р-селектин, или GPIIb/IIIa) с соответствующими молекулами на Лц (PSGL-1) [131, 172, 192, 198]. В большинстве случаев в образование ТЛА вовлечены Мц и Нф, редко лимфоциты (Лфц) и эозинофилы (Эо). АДФ-зависимая активация Тц необходима для лейкоцитарного рекрутирования Тц в почке. При этом тромбоцитарная активация и дегрануляция вовлекает Лц через растворимые факторы и взаимодействие с широким спектром рецепторов. Наиболее главными рецепторами считаются: Р-селектин (CD62P) и CD40L (PSGL-1), CD40 и Mac-1 на Лц [78, 119]. После введения в суспензию клеток агонистов (АДФ, TRAP) адгезия Тц к Мц и гранулоцитам увеличилась в несколько раз. Микроскопическая проверка результатов проточной цитометрии показала, что Тц прикрепляются к Лц, Имобилизованные активированные Тц презентируют Р-селектин и эффективно захватываются движущимися Нф [88, 194]. Однако, блокада на Нф рецептора фактора, активирующего Тц (ФАТ), лейкотриена В4, или рецептора 1-типа СХС-хемокинов (CXCR1) не предотвращала переход от роллинга к стационарной адгезии. Таким образом, Тц, прикрепленные к поврежденным сосудам могут захватывать движущиеся мимо Нф, но стабильность нейтрофильных агрегатов будет зависеть от масштаба локальной секреции тромбоцитарных агонистов, таких как тромбин и АДФ [48, 133, 174].

Тц, прикрепленные к коллагену, секретировали значительное количество ФАТ, этим объясняется ингибирование адгезии Нф к Тц при использовании антагонистов ФАТ рецепторов [210]. Воздействие на Тц ацетилгидролазы, которая преобразует мембранно-связанный ФАТ в lyso-ФАТ, предотвращало адгезию на 60%. Добавление некоторых селектин-связывающих углеводов к Тц вызывало немедленное прикрепление подвижных Нф. Такое явление не наблюдалось при обработке эндотелия гистамином, тромбином или Р-селектином. Эти данные подтверждают мнение, что иммобилизованные Тц могут

обеспечивать паракринную активацию Нф и данный процесс вероятно запускается сигнальным механизмом с помощью Р-селектина [131, 172].

Ting и соавторы изучили, как условия гемодинамики (микроциркуляции) влияют на ТЛА [269]. Оказалось, что напряжение сдвига в ламинарном потоке клеток способно увеличить экспрессию Р-селектина на Тц, CD11b на Лц и образование ТЛА. Экспрессия Р-селектина позволяет циркулирующим Тц связываться и стимулировать Лц для фиксации к эндотелию. [225]. АДФ, который является классическим индуктором агрегации Тц, стимулировал образование ТЛА, однако напряжение сдвига уменьшало это явление. Стимуляция функциональной активности Лц посредством N-формил-метионил-лейцил-фенилаланин (FMLP) увеличивала формирование ТЛА и этот эффект усиливался напряжением сдвига ламинарного потока. Блокада Р-селектина отменяла, а блокада GPIIb/IIIa повышала эффект сдвига на образование ТЛА. При стимуляции клеток крови агонистом напряжение сдвига усиливает формирование ТЛА за счет интегринов (стабильная адгезия), но ослабляет формирование ТЛА, опосредованное Р-селектином (обратимая адгезия).

Активация Тц и формирование ТЛА в отсутствие воспалительного компонента в системе циркуляции гипотетически может свидетельствовать о получении информации посредством данных иммунных контактов или перепрограммировании форменных элементов. Сигналы, которые запускают процесс взаимодействия, индуцируются с помощью активации интегринов, что обеспечивает прайминг Лц к сосудам [98, 228, 213]. Межклеточные контакты между Тц и Лц могут осуществляться двумя механизмами: Лц адгезируются к активированным Тц, которые уже взаимодействуют с эндотелием или внеклеточным матриксом, а также путем внутрисосудистого формирования ТЛА.

ТЛА могут быть потенциальными биомаркерами для определения риска и диагностики заболеваний [47]. Однако, актуализируется необходимость стандартизации протоколов определения ТЛА (взятия образцов, дозировки реактивов и замеры) для определения референтных интервалов. Исследованиями были отмечены феномены образования ТЛА при мигрени [222], а также как

маркер активации Тц при ишемической болезни сердца (ИБС) [156]. В первом случае при фиксации Тц к Лц, последние адгезировались к эндотелию. Преобладающими оказались Нф, а количество агрегатов было статически значимо выше. При ИБС у пациентов количество ТЛА изменялось в динамике – с 1-го по 10-й день заболевания, нивелирование эффекта произошло на 90-й день после инсульта. Общая численность и процент Мц, формирующих с Тц агрегаты, значительно увеличивались на 2-й день, и не регистрировались в другие моменты времени после инсульта.

Раннее рекрутирование Лц-тов Тц, особенно Нф, эволюционно обеспеченный стойкий ответ неспецифического иммунитета для успешного контроля экзогенных инфекций [231, 256]. Было показано, что Тц физически взаимодействуют с различными видами Лц на протяжении всего воспалительного процесса. Это взаимодействие имеет далеко идущие последствия для лейкоцитарного рекрутирования в периферических тканях также, как и регуляция лейкоцитарных автономных функций, включая формирование и секрецию нейтрофильных внеклеточных ловушек. Эти функции критически зависят от взаимодействия Тц и Лц. Неспецифический иммунный ответ и лейкоцитарное рекрутирование может быть тесно взаимно регулировано для избежания чрезмерного тканевого или органного повреждения и избежания хронизации воспаления. Тц также являются важным ресурсом для хемокинов CXCL4 (platelet factor 4), CCL5 (RANTES) и CXCL7 (Нф-активирующий пептид- 2, NAP-2), которые секретируются активированными Тц и активно вовлекаются в рекрутирование и активацию Нф. CXCL7 и CXCL4 обладают уникальными структурными свойствами, которые модулируют Нф рекрутирование и процессы, включающие формирование хемокиновых гетеродимеров, гликозамингликановые (ГАГ) взаимодействия и формирование градиента. Примечательно, что свойства связывания этих гетеродимеров и ГАГ к эндотелию существенно различные по сравнению с мономерными CXCL7, который также моделирует рецепторное связывание с хемокинами [131,218].

Секреция CXCL7 при Тц дегрануляции, взаимодействие с ГАГ на эндотелиальной поверхности и влияние градиента формирует свободные ГАГ связи с комплексов CXCL7 и ГАГ, что играет роль в Нф рекрутировании в месте сосудистого воспаления. Исследования обеспечивают доказательства того, что Тц обеспечивают хемокины, которые могут вести к десенситизации хемокиновых рецепторов на Нф. Это может быть представлено, как главная обратная отрицательная регуляция активации Нф [228, 232].

Было определено, что паренхиматозные органы также являются место формирования ТЛА как явления неспецифического иммунного ответа. Объяснением может быть обильное кровоснабжение в стромальных элементах органов [83,205]. Кроме того, имеются специализированные иммунные клетки, определяющие местную воспалительную и защитную реакцию. Циркулирующие ТЛА могут контактировать с клетками системы фагоцитирующих мононуклеаров выполняя маневры по типу «touch-and-go». Сообщается, что Тц могут адгезироваться к макрофагам и привлекать Нф для выполнения иммунного ответа и клиренса патогенов [114, 134, 215].

Согласно исследованиям (в малых когортах) значительные эффекты анти-тромбоцитарной терапии на пациентов с гломерулонефритом снижали количество тромбоцитарных агрегатов, альбуминурию и/или скорость гломерулярной фильтрации [204]. Влияние Тц на индукцию почечного воспаления через прямые взаимодействия с Лц как сообщается требуют тромбоцитарный Р-селектин для рекрутирования Нф и/или Нф-опосредованного повреждения в экспериментальных острых постишемических недостаточностях и гломерулонефрите [253]. Нф-е истощение с одной стороны предотвращают накопление Тц внутри клубочковых капилляров в модели с индуцированными иммунными комплексами гломерулонефрите, усиливая важность взаимодействия между Тц и Нф в течение заболевания. Было отмечено, что различные виды Лц имели отношения почечному повреждению при остром воспалении клубочков в составе ТЛА [189, 271].

1.3. Индукционное влияние тромбоцитов на лейкоциты при межклеточных взаимодействиях

Первым и наиболее важным физическим взаимодействием между Тц и Лц и частично Нф является формирование связи между Р-селектином активированных Тц и PSGL-1, который экспрессируется на Нф. Это приводит к феномену вторичного захвата свободно плывущих Нф начальным связыванием PSGL-1 на этих клетках Р-селектином, который экспрессируется адгезивными и активированными Тц на сосудистой эндотелиальной поверхности. Однако связывание с лигандом на Нф опосредует не только межклеточные взаимодействия, но и индуцирует внутриклеточную сигнализацию. Вовлечение PSGL-1 в каскад сигнальных событий на Нф, включает ВТК (bruton's тирозин киназы), Src и MAP-киназы, что ведет к активации интегринов, экспрессированных на Нф, например, α Lb2 (LFA-1) и α Mb2 (Mac-1). LFA-1 является связывающим лигандом для ICAM-2 (внутриклеточной адгезивной молекулы-2) на Тц, хотя точное патофизиологическое значение данных взаимодействий при различных воспалительных состояниях требует дальнейшего рассмотрения. Активированные Mac-1 на Нф является особенно важным для взаимодействия Нф и Тц. Также, как и прямое связывание лиганда для Тц поверхностного GPIIb и также не прямое связывание через активированный GPIIbIIIa через «мостик» с фибриногеном [282].

Роль GPIIbIIIa связывания с Mac-1 в регуляции Нф рекрутирования и активации был показан при воспалении, например локализованном в легочной ткани, когда GPIIb связываясь с Mac-1 для регуляции адгезии Тц *in vitro* вовлечен с Лц рекрутирование, что ведет к повреждению артериального звена [283].

Комплексы формирования и взаимодействия Тц и Нф индуцируют последующие интегрин-опосредованную сигнализацию «outside-in» в Нф, которые в дополнение к хемокиновой стимуляции (реактивных форм кислорода) РФК, продукции и секреции их активированными Нф. Было показано, что связывание Тц с Нф повышает генерацию РФК в последних. Молекулярное

взаимодействие Р-селектина на Тц и PSGL-1 на Нф также значительно важно для этого процесса *in vivo* и *in vitro*. Также фармакологическая блокада связывания АДФ с P2Y₁₂-рецептором воздействует на РФК-продукцию Нф [131, 172]. Так как Тц активацию АДФ также индуцирует Р-селектиновую мобилизацию и сборку на мембране, усиление системы взаимодействия Р-селектин/PSGL-1 может быть вовлечена в подлежащий молекулярный механизм. Однако точное свидетельство этой гипотезы не хватает, так как АДФ-стимуляция тц также индуцирует активацию дополнительных Тц поверхностных адгезивных молекул. [131, 155] дополнили представление о формировании гетеротопических агрегатов фактом участия тромбоцитарного CD62P и лейкоцитарного β 2-интегрина. Эти взаимодействия были отмечены в крови, взятой у здоровых добровольцев и пациентов с тромбозом и воспалением. Стимуляция Тц посредством АДФ сопровождалась повышением в Нф, ассоциированных с Тц, фагоцитоза и продукции РФК. Когда эти опыты повторяли с антителами, блокирующими CD62P – эффект не воспроизводился. Эти результаты показывают, что растворимый и контакт-зависимый CD62P способствуют Тц-опосредованной активации Нф. Следовательно, в Тц-Нф агрегатах представлены субпопуляции Нф с более активированным профилем молекул адгезии, имеющими значительные возможности фагоцитоза и продукции РФК [101, 179].

Важная иммунная функция с помощью которой Нф ликвидируют патогены – фагоцитоз и этот процесс также находится под воздействием Тц-Нф взаимодействий. Здесь взаимодействие путей опосредовано путем растворимых воспалительных медиаторов, таких как простагландины и пуриновые нуклеотиды, играющие важную роль в прямом лиганд-рецепторном взаимодействии. Однако прямые клеточные взаимодействия кажется вовлечены в различные воспалительные процессы. Было показано, что утилизация периодонтита имела эффективный фагоцитоз при формировании Тц-Нф агрегатов, что отображает возможную тканевую и стимул-специфическую Тц зависимость [74, 92, 250].

Еще одна клеточно-автономная иммунологическая особенность с помощью которой Нф могут прямо вовлекаться или уничтожать бактерии при

формировании или секреции нейтрофильных внеклеточных ловушек (НФВЛ), которые являются деконденсированным ядерным хроматином, которые дополнены глыбчатыми белками Нф и выбрасывается во внеклеточное пространство. Хотя генерация НФВЛ приводит к безъядерному состоянию Нф, однако клетки могут продолжать существовать и выполнять свои функции (внутрисосудистое качение и миграция). Физически НФВЛ могут действовать как «рыболовные сети» для патогенов в различных моделях воспалительных процессов, которые вовлечены в гематогенный путь распространения патогенов в организме. Примечательно, что НФВЛ также причастны к патогенезу воспалительных расстройств, не вовлеченных в инфекционные стимулы и патогены. Здесь НФВЛ могут быть предпосылкой к достаточному рекрутированию Нф из сосудистого русла в очаг воспаления и формирования Тц-Нф комплексов критически вовлечено в данный процесс [185, 211].

Рецепторы распознавания паттерна TLR4 экспрессируются на Тц и могут быть активированы путем связывания бактериальных продуктов, таких как липополисахарид. TLR4 активация на Тц ведет к формированию НФВЛ и секреции, но данный механизм остается до конца не изученным. Далее прямое физическое воздействие Тц и Нф при связывании активируется с помощью GPIIb/IIIa к Mac-1 на Нф (через «мостик» фибриногена). Этот процесс также индуцирует формирование НФВЛ с схожей активацией GPCR (G-связываемых белковых рецепторов) на Нф через CXCL4/CCL5 гетеродимеры, которые выделяются активированными Тц и усиливают рекрутирование Нф при стерильному воспалению [238, 239].

Адгезивное взаимодействие Р-селектина и гликопротеинового лиганда-1 Р-селектина (PSGL-1) усиливает образование ТЛА, при этом активация Тц и связывание с Нф повышает секрецию Тц матриксных металлопротеиназ (ММП)-2 [276]. Секреция ММП-2 Тц человека увеличивалась в 3 раза после активации тромбином и более чем в 2 раза в присутствии Нф. Супернатант Нф не влиял на секрецию Тц ММП-2. В надосадочной жидкости Нф не была обнаружена ММП-2, однако Нф могли продуцировать большое количество ММП-9. Активация НФ

тромбином или добавление Тц не влияло на продукцию MMP-9. Экспрессия Р-селектина на Тц значительно увеличивалась после их связывания с нейтрофилами и полностью подавлялась антагонистами PSGL-1, или уменьшалась на 50% после введения антагониста GPIIb/IIIa. Активация Тц и связывание с нейтрофилами повышает секрецию Тц MMP-2 посредством адгезивного взаимодействия Р-селектина и PSGL-1, которые способствуют увеличению Тц- Нф агрегации [246].

Важно отметить, что блокирование CD62P, CD15, GPIIb/IIIa и CD11b/CD18 посредством моноклональных антител не влияет на не стимулированные ТЦ, но ингибирует агрегацию Тц, индуцированную АДФ [217, 286]. Это свидетельствует, что в физиологических условиях. ТЛА образуются при наличии функционально активных клеток крови. [236] утверждают, что активированные Тц имеют высокую степень адгезии к лейкоцитам.

В образовании ТЛА существенную роль играют молекулы CD40L, CD147 и JAM. Так, CD40 лиганд (CD40L), идентифицированный как костимуляторная молекула экспрессируемая на Т-клетках, представлен и функционирует на Тц [110]. Авторы исследовали роль тромбоцитарного CD40L в тромбогенезе и воспалении при атеросклерозе. Можно признать, что CD40L Тц усиливает тромбоцит - лейкоцитарное и лейкоцит - эндотелиальное взаимодействие. CD147 (EMMPRIN) считается индуктором матриксных металлопротеиназ, присутствующих в Лц и недавно идентифицированных на Тц. [192]. условиях и умеренно коррелирует с традиционными маркерами активации Тц и Лц. Молекула адгезии (JAM) является членом суперсемейства иммуноглобулинов (IgSF), экспрессированных в плотных соединениях эпителиальных и эндотелиальных клеток принимающих участие в трансэндотелиальной миграции Лц. JAM конститутивно экспрессируется на циркулирующих Тц, Мц, Нф и Лфц [183, 209]. Причем при активации Тц тромбином, коллагеном, но не АДФ, происходит фосфорилирование JAM посредством протеинкиназы С (PKC).

В Тц экспрессия Р-селектина ингибируется аденилатциклазой (АЦ) [107, 108, 174]. Известно, что Р-селектин быстро перемещается из альфа-гранул после активации Тц, а внутриклеточный цАМФ является мощным ингибитором этого

процесса. Предварительная обработка тромбин-стимулированных Тц форсколином приводила к дозо-зависимому ингибированию экспрессии Р-селектина, тогда как блокада протеинкиназы А (ПКА) воспроизводила противоположный эффект [84, 279]. Торможение цГМФ-зависимой протеинкиназы (ПКГ) значительно усиливало цАМФ-опосредованное ингибирование Р-селектина. Аналогичные результаты наблюдались также при связывании Тц и Нф. Следовательно, цАМФ-индуцированное ингибирование экспрессии Р-селектина, во многом, опосредовано через активацию ПКА, тогда как ПКГ способствует экспрессии Р-селектина.

В Тц активация интегрин (сигнализации inside-out) может быть инициирована такими агонистами как: фактор Виллебранда (ФВ) и тромбин, причем ключевую роль в этом процессе играет митоген-активированная протеинкиназа (p38 MAPK) [261]. p38AF (негативный мутант MAPK) –тормозит $\alpha\text{Ib}\beta\text{3}$ активацию при связывании ФВ с его рецептором, гликопротеином Ib-IX (GP1B-IX) Тц. Ингибиторы p38 MAPK уменьшают агрегацию Тц, вызванную ФВ или низкими дозами тромбина. Негативное действие ингибитора p38 вряд ли может быть вызвано влиянием циклооксигеназы (ЦОГ), так как процесс наблюдается в присутствии высоких концентраций ингибитора ЦОГ. Также установлено, что активацию p38 при действии ФВ или тромбина подавляется цГМФ-зависимой протеинкиназой (ПКГ). В свою очередь ингибиторы p38 уменьшают ПКГ-индуцированное фосфорилирование киназы отвечающей на внеклеточные стимулы (ERK), которая также играет важную роль в активации интегрин. Следовательно, p38MAPK играет важную роль посредника в ПКГ-зависимой активации ERK. Эти данные намечают новый сигнальный путь, в котором агонисты Тц последовательно активируют ПКГ, p38 и ERK пути, ведущие к активации интегрин [181].

Обнаружили, что Тц ингибируют генерацию РФК в Нф и Мц после установления межклеточных контактов. Тц могут также значительно снижать секрецию эластазы из Нф. Нф, которые не способны связывать тромбоциты имели

более низкую фагоцитарную активность по сравнению с Нф, связанными с Тц или Нф, которые инкубировали в отсутствие Тц [276].

АДФ, секретируемый активированными Тц, является не только основным фактором тромбообразования, но и мощным стимулятором продукции свободных радикалов кислорода (СРК) в Нф. Так использование фармакологической коррекции Тц-Нф каскадов, которые ингибировали Rho ГТФазы, необходимые для тромбоиновой сигнализации в Тц и Нф привело к подавлению выделения АДФ и АТФ Тц и, как следствие, ингибирование продукции СРК Нф [291].

Закономерным представляется вопрос воздействия Нф на функции Тц. Изучение влияния Нф человека на агонист-индуцированную агрегацию Тц, позволило обнаружить морфологические отличия в образовании ТЛА [147, 155]. Если добавить к агонист-стимулированной (коллаген, тромбин или АДФ) обогащенной Тц плазме нестимулированные Нф, то количество больших агрегатов Тц уменьшается, а малых увеличивается. Сканирующая электронная микроскопия выявила заметную адгезию Нф к агрегированным Тц. Супернатант Нф обладал таким же ингибирующим эффектом, тем самым подводя к мысли, что тормозящее действие Нф связано с выделением растворимых компонентов, возможно протеаз которые освобождаются из Нф прикрепленных к активированным Тц. Добавление ингибитора эластазы к интактным Нф или супернатанта Нф отменяло их антиагрегатное действие, что свидетельствует об участии протеаз в формировании ТЛА [291]. Тем самым подтверждается, что некоторые тирозинкиназы участвуют в переходе от малых к большим агрегатам Тц. Интересно, что фосфорилирование тирозина в Тц, индуцированное агонистами, ингибируется при инкубации с Нф. Совместная инкубация Тц с Нф сопровождалась снижением образования крупных агрегатов при стимуляции ТЦ (коллагеном и тромбином). Эти результаты показывают, что отщепление гликопротеинов от мембраны Тц в том числе эластазой, которая секретируется Нф, участвует в торможении перехода от малых к большим агрегатам Тц [186]. Кроме того, протеазы катепсин G и эластаза Нф человека могут непосредственно изменять функции Тц и / или участвовать в реакциях коагуляционного каскада на

поверхности Тц и Нф в процессе образования фибрина. Очищенный катепсин G является гораздо более мощным активатором Тц, чем эластаза [Goel MS, 2003]. Можно предположить, что катепсин G усиливает отложение фибрина, повышая активированное состояние фибриноген-прикрепленных Тц, а не путем расщепления факторов свертывания [148].

ГЛАВА 2

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Характеристика пациентов с хроническим обструктивным пиелонефритом

Обследовано 195 пациента на этапе госпитализации в урологического отделения ДОКТМО (г. Донецк) с верифицированным диагнозом ХОПН. Все пациенты были исследованы на динамических точках наблюдения: при поступлении в стационар, после проведения контактно ультразвуковой литотрипсии (КФУЛТ), на этапе выписки.

Исследованию подверглись 100 мужчин и 95 женщин. Средний возраст обратившихся в стационар составил $52,9 \pm 1,219$ лет (95% ДИ 50,5 – 55,3 лет). Диагноз ХОПН был установлен на основании анамнестических данных, данных объективного осмотра, лабораторных и инструментальных исследований. Из инструментальных исследований были использованы ультразвуковое исследование, компьютерная томография, с целью оценки анатомического статуса почки, локализации конкремента и наличия аномалий развития, патологических образований и осложнений. Для оценки функционального статуса проводилась экскреторная урография.

Согласно клиническим рекомендациям по диагностике и лечению хронического обструктивного пиелонефрита (согласно принятым на XIV конгрессе Российского общества урологов (Саратов, Россия, 10-12 сентября 2014 г.), клиническим рекомендациям, утвержденным Министерством здравоохранения РФ (2019г.), а также клиническим рекомендациям по мочекаменной болезни, утвержденным Министерством здравоохранения РФ (2020 г.)) были выделены критерии обострения процесса (Таблица 2.1.).

Критерии фаз ХОПН.

Фаза ремиссии	Фаза рецидива
Данные физикального осмотра	
<ul style="list-style-type: none"> - болезненность поражённой почки, - положительный симптом Пастернацкого (боль при поколачивании по пояснице). 	
<p>жалобы могут отсутствовать, диагноз подтверждают лабораторными исследованиями, основываются на анамнестических данных (в течение не менее 5 лет); жалоб и лабораторных изменений не выявляются.</p>	<p>больной жалуется на тупую боль в поясничной области. При детальном расспросе пациент может привести массу неспецифических жалоб:</p> <ul style="list-style-type: none"> - на эпизоды познабливания и субфебрилитета; - дискомфорт в поясничной области; - утомляемость; - общую слабость; - снижение работоспособности и т.д.
Лабораторные показатели	
<ul style="list-style-type: none"> - Нейтрофильный лейкоцитоз со сдвигом формулы влево; - Повышенные СОЭ. - Уровень С-реактивного белка. - Лабораторными критериями воспаления были лейкоцитоз и уровень С-реактивного белка (СРБ), а также лейкоцитурия или бактериурия, которые были вспомогательными критериями, подтверждающими наличие инфекции МВП. - Выраженность гематурии оценивали по общему анализу крови (более 3 эритроцитов в поле зрения) и анализу мочи по Нечипоренко. 	
Данные инструментального обследования	
<ul style="list-style-type: none"> - Обзорный снимок органов брюшной полости, также включающий область почек, мочеточников и мочевого пузыря, позволяет диагностировать рентгенопозитивные камни. - Ультразвуковое исследование почек. Прямое представление камня в почке и предпузырном отделе мочеточника. Косвенное представление: расширение чашечно-лоханочной системы, проксимального и дистального отделов мочеточника. УЗИ позволяет оценить отёк паренхимы, выявить очаги гнойной деструкции и индекс резистентности почечных артерий. - Экскреторная урография может быть выполнена после полного купирования почечной колики и способна дать полное представление об анатомо-функциональном состоянии почек, верхних и нижних мочевых путей. 	

2.2. Формирование дизайна исследования

Контрольной группой в данном исследовании стали 15 условно-здоровых волонтеров, не имеющих воспалительной патологии мочевыделительной системы и других систем, не принимающие нестероидные противовоспалительные препараты и препараты глюкокортикостероидного ряда.

Критерии соответствия. В качестве критериев включения рассматривались пациенты обоего пола, возраст пациентов не ограничивался. Общая схема дизайна исследования включала характеристики для исследуемой и контрольной группы (Таблица 2.2.).

Таблица 2.2.

Характеристика дизайна исследования.

Группы	Исследуемая	Контрольная
Кол-во случаев	195	15
Диагноз/состояние	Хронический обструктивный пиелонефрит	Здоровые
Характер воздействия	острое и хроническое воспаление	агрегация тромбоцитов, индуцированная адреналином, АДФ и ФАТ
Исход	Динамика агрегации тромбоцитов и формирования ТЛА у пациентов с различной индивидуальной реактивностью	Агрегация тромбоцитов и формирование ТЛА как референсный диапазон сравнения
Исследуемые явления: исходы (конечные точки) – первичные, вторичные	Изменение реактивности тромбоцитов при действии адреналин, АДФ и ФАТ; характеристики ТЛА.	Реактивность тромбоцитов и формирование ТЛА при действии агонистами в физиологических условиях

Пациенты основной группы были обследованы в урологическом отделении ДОКТМО (г. Донецк), при этом были выделены основные критерии формирования исследуемой группы (Таблица 2.3.). Пациенты контрольной

группы являлись волонтерами и были набраны в рамках проведения плановой диспансеризации. Все больные информированы о процедурах и плане лечения, получено письменное согласие на участие в исследовании.

Таблица 2.3.

Формирование групп исследования

Критерии включения	Критерии исключения
- наличие верифицированного хронического обструктивного пиелонефрита.	<ol style="list-style-type: none"> 1. наличие онкологической патологии; 2. наличие острых и хронических воспалительных заболевания другой локализации; 3. нарушения системы гемостаза; 4. беременность, коагулопатии, тромбоцитопатия, менструальные кровотечения; 5. пациенты, перенесшие острое нарушения мозгового кровообращения; 6. наличие в анамнезе язвенной болезни желудка или двенадцатиперстной кишки, печеночной и почечной недостаточности, также пациенты, госпитализированные в ургентном порядке; 7. Регулярный прием нестероидных противовоспалительных препаратов и антиагрегантов по показаниям.
Общая характеристика формирования групп исследования	
Условия набора (амбулаторное/госпитальное, первичное звено)	Стационарное лечение в урологическом отделении.
Способ формирования выборки («по удобству», случайный, стратифицированный, систематический, пр.)	Случайный.
Потенциальные вмешивающиеся факторы	Коморбидные состояния, назначение препаратов, ингибирующих циклооксигеназу-1 тромбоцитов
Условия прекращения исследования	Отсутствие согласия пациента, нарушение условий преаналитического этапа исследования.

Всем больным проводилось восстановление уродинамики согласно стандартным протоколам – с учетом локализации, размера и плотности конкрементов. Больным с ХОПН в фазе ремиссии при локализации конкремента в почке проводили контактную нефролитотрипсию (КНЛТ). В условиях эпидуральной анестезии и предварительного ретроградного введения катетера в верхнюю треть мочеточника проводили пункцию чашечно-лоханочной системы (ЧЛС) под ультразвуковым контролем. В дальнейшем выполняли антеградную пиелографию с проведением сквозь просвет пункционной иглы струны-проводника в ЧЛС под рентгеновским контролем. После фрагментации конкремента и эвакуации его фрагментов устанавливали нефростому. Удаление нефростомы выполняли на 2-3 сутки в условиях адекватной проходимости ЧЛС и мочеточников, полного удаления конкрементов и отсутствия признаков макрогематурии.

Пациентам с конкрементом в средней и нижней трети мочеточника выполняли контактную ретроградную уретеролитотрипсию (КУЛТ). Дробление конкремента проводили под эпидуральной анестезией. После введения уретероскопа через рабочий канал к нему подводили зонд литотриптера. После фрагментации и удаления остатков конкремента в условиях отека или повреждения стенки мочеточника устанавливали стент на 7-10 суток. В условиях фазы обострения ХОПН, блока почки (в течение 1 суток или больше), гидронефрозе (расширение ЧЛС, мочеточника над конкрементом) на первом этапе производили один из видов дренирования – стентирование мочеточника или ЧПНС. Стентирование с целью купирования острого обструктивного пиелонефрита не требует обезболивания и облегчает в дальнейшем процедуру проведения по мочеточнику уретероскопа и обеспечивает тотальную литоэкстракцию конкремента петлей или извлечение фрагментов камня. ЧПНС обеспечивает контроль выделенного объема мочи из заблокированной почки, оценку состава мочи и служит доступом для проведения нефроскопа. Кроме того, данный вид дренирования предоставляет возможность выполнения антеградной и ретроградной урографии для контроля расположения камня.

Кавитационную контактно-фрезную ультразвуковую литотрипсию (КФУЛТ) проводили при помощи аппарата KarlStorz – Calcuson 27610020. При дроблении конкрементов использовали визуальный контроль с использованием видеокамеры KarlStorz Telekam SL pal 202120 20 (Германия), рентген контроль (мобильный рентген С-Арка SiemensSiremobil 2002, Германия), УЗ-контроль (Mylabfive, Италия). Все пациенты до и после литотрипсии получали противовоспалительную терапию. Исследование проводилось в период 2020 – 2022 гг. Основным исходом являлось определение уровня гематологических показателей лабораторных исследований, определение агрегационных параметров тромбоцитов (при индукции агонистами адреналин 5 МкМ, аденозиндифосфат (АДФ) 5 МкМ, фактор активации тромбоцитов (ФАТ) 150 МкМ), определение формирования тромбоцитарно-лейкоцитарных агрегатов в крови пациентов с ХОПН и условно здоровых людей. *Дополнительным исходом исследования* являлось формирование различных уровней реактивности у пациентов с ХОПН.

Этическая экспертиза исследования. Все клинические исследования выполнены с согласования комиссии по биоэтике ГОО ВПО ДОННМУ ИМ. М. ГОРЬКОГО (протокол № 1 от 22.02.2023). Работы была выполнена с соблюдением норм медицинской этики и деонтологии, и отвечает этическим принципам проведения клинических исследований и положениям Хельсинской декларации, принятой генеральной ассамблеей Всемирной Медицинской Ассоциации (1997 – 2000 гг.), конвенцией Совета Европы о правах человека и биомедицине (1997 г.), соответственным положением ВОЗ, Международного совета медицинских научных обществ. Международного кодекса медицинской этики (1983 г.) и полностью исключает ограничение интересов больного и нанесение вреда его здоровью. Лабораторные исследования выполнены согласно принципам надлежащей лабораторной практики (ГОСТ Р 53434 — 2009).

2.3. Исследование показателей периферической крови у пациентов с хроническим обструктивным пиелонефритом.

Особенности *преаналитического этапа* включали в себя подготовку химически чистых пробирок для забора биоматериала, приготовления цитрата натрия для исследования тромбоцитарного звена гемостаза. Использование цитрата натрия (3,2% концентрация раствора, что соответствует 0,109 М (109 ммоль/л)) было обосновано отсутствием влияния на другие звенья гемостаза (согласно рекомендациям ВОЗ и Института Клинических Лабораторных Стандартов (CLSI)). Использовалось соотношение «кровь:антикоагулянт = 9:1». Забор биоматериала производился из локтевой вены по стандартной методике утром натощак, при этом забору крови не предшествовал другой забор или манипуляции для предотвращения активации звена гемостаза. Кровь выпускалась в пробирку постоянным током без вспенивания по внутренней стенке. Биоматериал подвергался исследованию в первые 2 часа после забора.

В исследовании использовали кровь пациентов с ХОПН, полученную на момент поступления в стационар, после проведения контактнофрезовой уретеролитотрипсии (КФУЛТ) (через 6 часа) и на этапе выписки из отделения. Были проанализированы результаты общего анализа крови, биохимического анализа крови. В качестве биохимического маркера воспаления использовали наличие или уровень выраженности лейкоцитоза, скорости оседания эритроцитов (СОЭ) и С-реактивного белка (СРБ).

При анализе гемограммы определяли количество форменных элементов и лейкоцитарную формулу. Наличие лейкоцитоза определяли при подсчете количества Лц в камере Горяева. Для этого образец исследуемой крови разводили в 20 раз 3% раствором уксусной кислоты с метиленовым синим (20 мкл крови и 380 мкл р-ра уксусной к-ты). Камеру и покровное стекло насухо протирали марлевой салфеткой и притирали покровное стекло к камере, слегка надавливая на него, до появления цветных колец Ньютона. Камера Горяева заполнялась кровью и при малом увеличении (окуляр $\times 10$) подсчитывались Лц в 100 больших

квадратах. Расчет числа Лц осуществляют, исходя из разведения крови (20) и числа больших квадратов (100), по формуле: $X = (a \times 250 \times 20) / 100$, где X – число Лц в 1 мкл крови; а – число лейкоцитов, посчитанных в 100 больших квадратах камеры Горяева. Практически, после сокращений в формуле, количество посчитанных Лц умножают на 50.

Далее исследовался качественный мазок крови, окрашенный по методу Паппенгейма. После высыхания мазки погружались в краску-фиксатор Май-Грюнвальда на 5 мин, после чего краску сливали и, не ополаскивая его, наливали профильтрованный рабочий раствор (разведение 1:4) готовой краски Романовского — Гимзы (при pH 6,8) на 5 мин. После окрашивания препараты промывали дистиллированной водой и высушивали на воздухе, устанавливая вертикально в специальной сушилке. Лейкоцитарная формула подсчитывалась на 100 клеток микроскопически при увеличении $\times 1000$.

2.4. Анализ агрегационной способности тромбоцитов.

Для проведения определения агрегации тромбоцитов (АТц), Тц выделяли путем центрифугирования и отделения 500 мкл богатой тромбоцитами плазмы (БТП) из периферической крови при 1000 об. 10 мин. Содержание Тц в 1 мкл составляло $200000 \pm 20000 \times 10^9/\text{л}$.

Для анализа реактивности Тц в 500 мкл суспензии Тц добавляли агонист по 10 мкл в концентрации, соответствующей 50% агрегации Тц (EC50%). В качестве агонистов использовали: АДФ (5 мкМ – 5 мкл, «Технология стандарт»), адреналин (epinephrine, 5 мкМ – 5 мкл, Sigma), ФАТ (PAF, 150 мкМ – 5 мкл, Sigma). Контрольным исследованием служила бедная тромбоцитами плазма, полученная путем центрифугирования при 2500 об. 30 минут (500 мкл). Инкубацию проводили в течение 6-8 минут при температуре 37 °С и при перемешивании мешалкой со скоростью 1000 об/мин до выхода кривой на плато.

В исследовании был проведен анализ влияния агонистов, подбор которых проводился на основании следующих заключений: (а) влияния АДФ –

аутокринного фактора, который обеспечивает активацию Тц по принципу inside-out. Активация происходит через P2Y₁₂- и P2Y₁-рецепторы через Gi- (активация аденилатциклазного пути с повышением циклического аденозинмонофосфата (цАМФ)) и Gq-субъединицы → активация фосфоинозитол3киназы (ФИЗК) → активация протеинкиназы G → MAPK → секреция гранул из Тц [202, 222]; (б) адреналина (Chrono-Log) – системного гуморального регулятора, уровень которого возрастает в условиях ХОПН и отражает реактивность организма вследствие активации САС. Активация Тц посредством адреналина происходит через Gi- сигнальный путь, посредством воздействия на аденилатциклазу и повышения цАМФ → активация Тц [245, 247]; (в) ФАТ (Sigma) – секретлируемым Тц и являющимся мощным проагрегантным фактором, который активируется посредством Gq-сигнального пути → активация фосфоинозитол-3-киназы (ФИЗК) → активация протеинкиназы G → MAPK → секреция эндогенных агонистов из гранул Тц, также Лц под влиянием фосфолипазы А₂ [244, 264].

2.5. Критерии анализа агрегатограмм у пациентов с хроническим обструктивным пиелонефритом.

Анализ агрегатограммы использовался для определения функциональной активности Тц и включал автоматическое определение показателей амплитуды агрегации (Amplitude, %); наклона кривой (Slope, % мин) – показатель волн агрегации, который отражает скорость агрегации; площадь под кривой (Area under curve, AUC), которая является производным двух переменных – амплитуды и времени агрегации, представляется в виде условных единиц (U); а также Lag-time (сек) – периода необходимого для активации рецептор опосредованного каскада активации Тц (Рисунок 2.1.).

Amplitude (%) - максимальное процентное приращение коэффициента пропускания света в ответ на добавление агониста. Оценивается агрегационная активность (максимальная сила агрегационного ответа при необратимом формировании тромбоцитарного агрегата) [224, 235].

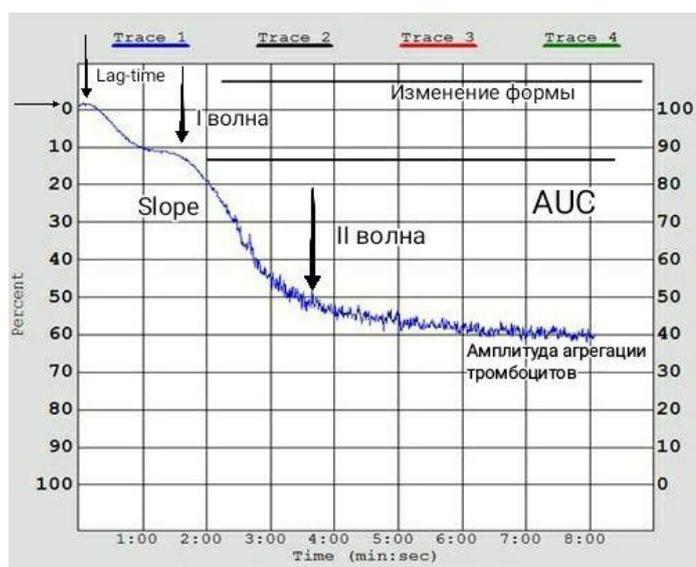


Рисунок 2.1. Показатели агрегации тромбоцитов в процессе формирования кривой на примере двухфазной агрегатограммы при индукции адреналином EC50%.

Примечание. По оси абсцисс – время агрегации (мин: сек); по оси ординат – амплитуда агрегации (%).

Lag-time (сек.) - период, необходимый для активации поверхностных рецепторов (α_2 -адренорецепторов, $P_2Y_{1,12}$, ФАТ-рецепторов) [235, 242, 295].

Slope (%/мин.) – максимальный наклон кривой светопропускания. Обобщенный показатель для двух волн агрегации, который отражает скорость агрегации (скорость течения внутриклеточных сигнальных каскадов). Для оценки скорости протекания каждого из процессов активации тромбоцитарного каскада нужно оценивать показатель для первой и второй волн агрегации [242, 285].

Area under curve (U) - является производным двух переменных (амплитуды и времени агрегации). Характеризует функциональный ответ Тц на воздействие агониста, включая все необходимые для осуществления агрегации процессы. Площадь агрегации тромбоцитов под кривой зависит от количества функционально активных тромбоцитов, задействованных в активном агрегационном ответе [285, 295].

В физиологических условиях при индукции слабым агонистом, образуется двухфазная кривая (I волна – мобилизация депо кальция, II волна – необратимый

агрегационный ответ с секрецией гранул) [126, 153, 164, 182]. При анализе амплитудных характеристик Тц, агрегатограммы подразделяются на разновидности:

1. Наличие однофазной кривой АТц без дезагрегации свидетельствует о слиянии волн, наложении второй волны на первую, в связи с: а) растяжение во времени процессов, происходящих при регистрации 1 волны, б) ускорение наступления протекания процессов 2 волны – мощный аутокринный ответ. При индукции АДФ (который считается сильным активирующим тромбоцитарным фактором) отмечается необратимая монофазная кривая (Рисунок 2.2.).

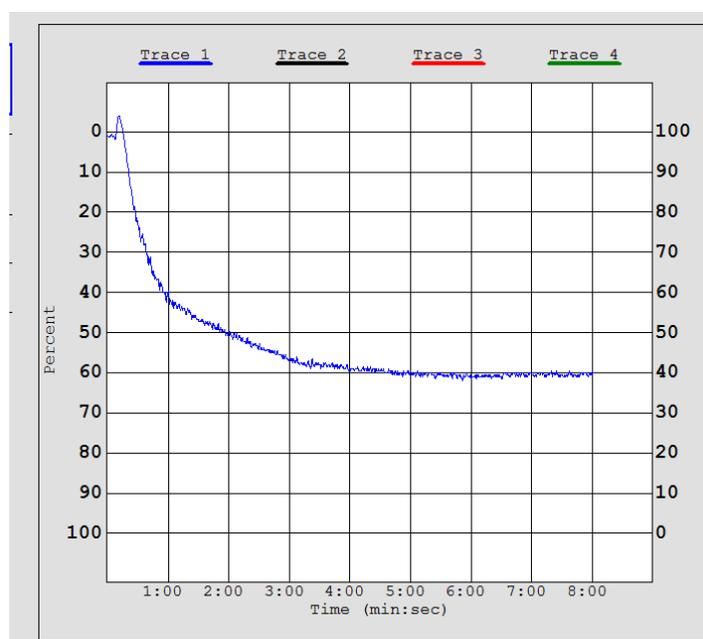


Рисунок 2.2. Пример агрегатограммы при индукции тромбоцитов

АДФ 5 мкМ ЕС 50% в контрольной группе (необратимая монофазная агрегация).

Примечание. По оси абсцисс – время агрегации (мин: сек); по оси ординат – амплитуда агрегации (%).

2. Наличие однофазной кривой АТц с дезагрегацией говорит об отсутствии механизмов аутокринной стимуляции, обеспечивающих возникновение второй волны.

3. Постоянное нарастание кривой АТц является свидетельством высокой аффинности рецепторного аппарата Тц.

Необратимость агрегационного ответа Тц представляется маркером присутствия аутокринной/ паракринной стимуляции. При этом обратимость агрегационного ответа является следствием отсутствия аутокринной/ паракринной стимуляции Тц (секреция эндогенного АДФ из плотных гранул или тромбоксана А₂ при активации арахидонового метаболизма). При наличии выхода на плато тромбоцитарной агрегации проявляется низкая или средняя аффинность рецепторного аппарата (в зависимости от амплитуды и Slope). БТП, индуцированная ФАТ, в условиях нормореактивности демонстрирует первичную обратимую агрегацию, которая может быть усилена при эффекте потенцирования смежными агонистами, давая начало вторичной необратимой агрегационной волне (Рисунок 2.3.).

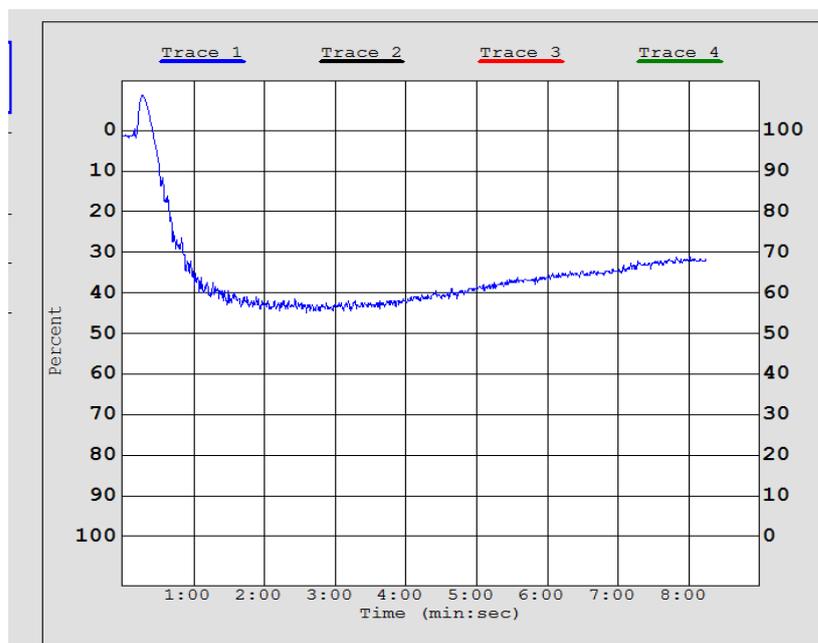


Рисунок 2.3. Пример монофазной агрегатограммы при индукции тромбоцитов ФАТ 150 мкМ EC₅₀% в контрольной группе здоровых лиц с частичной обратимостью.

Примечание. По оси абсцисс – время агрегации (мин: сек); по оси ординат – амплитуда агрегации (%).

2.6. Исследование формирования тромбоцитарно-лейкоцитарных агрегатов.

При анализе формирования ТЛА использовалась методика активации ТЛА в цельной крови, которая минимизировала преждевременную активацию Тц и Лц. 500 мкл цельной крови инкубировали на протяжении 10 минут при $t +38\text{ C}$ с предварительным добавлением агонистов для изучения межклеточного взаимодействия Тц и Лц при условии системного, аутокринного и паракринного фактора активации: проба 1 – адреналин (EC50% 5 мкМ – 1 мкл); проба 2 - АДФ (EC50% 5 мкМ – 1 мкл); проба 3 - ФАТ (EC50% 5мкМ – 1 мкл). Контрольным исследованием служил мазок без добавления агонистов (базальный уровень формирования ТЛА) – проба 0. Изготавливали мазки крови по стандартной методике: 1 мкл крови наносился на предметное стекло и распределялся на $\frac{3}{4}$. Окраска производилась по методу Паппенгейма. Микроскопия мазка проводилась при увеличении окуляров $\times 40$ и $\times 100$. При подсчете ТЛА оценивали наличие и морфологические характеристики агрегатов. Критерием подсчета в дизайне исследования стало формирование ТЛА, которые считали кооперацией клеток 1 и более Лц и нескольких Тц и рассчитывали в процентном отношении на 100 клеток (Лц). В составе клеточных агрегатов оценивалось соотношение различных видов Лц, что также выражалось в процентном соотношении на 100 клеток (Рисунок 2.4.).

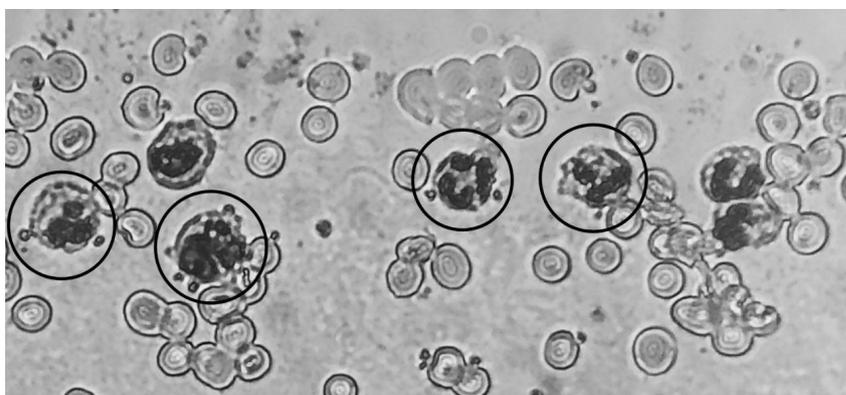


Рисунок 2.4. Формирование ТЛА при индукции агонистами в цельной крови. Выделены сформировавшиеся агрегаты с одиночными и множественными Тц.

2.7. Статистическая обработка данных.

Анализ полученных данных проведен с использованием статистического пакета MedCalc version 20.115 (MedCalcSoftware, 2022). *Количественная оценка* величин, которая подвергалась анализу, проводилась путем расчета среднего арифметического признака (M) (для данных с нормальным законом распределения) и медианы (Me) (для данных с законом распределения, отличающихся от нормального) и соответственной стандартной ошибки (m). Для качественных характеристик использовали показатель частоты признака (%) и его стандартную ошибку ($m \%$).

При анализе межгрупповых различий в случае *двух независимых групп* использовали критерий Стьюдента и Д'агостино-Пирсона (при нормальном законе распределения, и количественных характеристиках), критерий Вилкоксона и критерий Манна-Уитни (U) (в случае отличий закона распределения от нормального, и количественных характеристик), метод углового преобразования Фишера (в случае сравнения частоты качественных характеристик). Для сравнения межгрупповых различий в случае парных выборок использовались критерии Д'агостино-Пирсона (при нормальном законе распределения, и количественных характеристиках), критерий Вилкоксона и критерий Манна-Уитни (U) (в случае отличий закона распределения от нормального, и количественных характеристик)

Для расчета *зависимой изменчивости критериев*, связанных между собой использовался коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Для построения *анализа валидности диагностических критериев* производили расчет ROC-кривых с расчетом чувствительности и специфичности показателей. При этом учитывали точку отсечения показателя, 95% доверительный интервал. Во всех случаях отличия считались статистически значимыми при уровне значимости $p < 0,05$ (при условии равных дисперсий).

ИНФОРМАТИВНОСТЬ И СПЕЦИФИЧНОСТЬ ЛАБОРАТОРНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ В ДИАГНОСТИКЕ ФАЗ ХРОНИЧЕСКОГО ОБСТРУКТИВНОГО ПИЕЛОНЕФРИТА

3.1. Клинико-лабораторная диагностика воспаления у пациентов с хроническим обструктивным пиелонефритом.

В настоящее время продолжают поиски критериев, позволяющих дифференцировать фазы рецидива и ремиссии хронического обструктивного пиелонефрита (ХОПН) у пациентов с мочекаменной болезнью (МКБ) [93]. Это связано с субъективной оценкой данных физикального осмотра пациента, «размытостью» референтных диапазонов содержания лейкоцитов (Лц) при остром и хроническом воспалении, отсутствием критериев перехода хронической воспалительной реакции в острую фазу [163]. В этой связи необходимо ответить на исследовательский вопрос – позволяют ли лабораторные гематологические показатели констатировать наличие острого и хронического воспаления у пациентов с МКБ?

Проанализированы данные гемограмм 190 пациентов с МКБ и сопутствующим диагнозом ХОПН (в фазе ремиссии $n=85$, в фазе рецидива $n=105$). При анализе «классических» индикаторов воспаления у пациентов с ХОПН установлено, что абсолютное число Лц находилось на уровне $8,47 \pm 0,36 \times 10^9/\text{л}$ (95% ДИ $7,5 - 11,3 \times 10^9/\text{л}$), т. е. – в пределах референтного интервала ($4 - 9 \times 10^9/\text{л}$) установленного для здоровых индивидуумов; таким образом, можно констатировать отсутствие реакции клеток крови. Однако, значения уровня С-реактивного белка (СРБ), которые достигали $9,54 \pm 1,15 \text{ мг/л}$ (95% ДИ $6,0 - 12,0 \text{ мг/л}$) и скорости оседания эритроцитов (СОЭ) – $22,6 \pm 2,17 \text{ мм/ч}$ (95% ДИ $13,4 - 26,0 \text{ мм/ч}$) свидетельствуют о наличии воспалительной реакции у пациентов с МКБ. Таким образом, при МКБ более информативными показателями воспаления можно считать СРБ и СОЭ. Причины низкой информативности лейкоцитоза

можно связать с системной ошибкой – наличием в одной группе пациентов с острым и хроническим течением воспаления (гетерогенностью выборки пациентов). Дополнительно проведенный анализ показал, что абсолютное число Лц в фазу рецидива ХОПН действительно превышало референтный диапазон, установленный для здоровых лиц (Таблица 3.1).

Таблица 3.1.

Характеристика лабораторных показателей у пациентов с хроническим обструктивным пиелонефритом в фазу рецидива и ремиссии

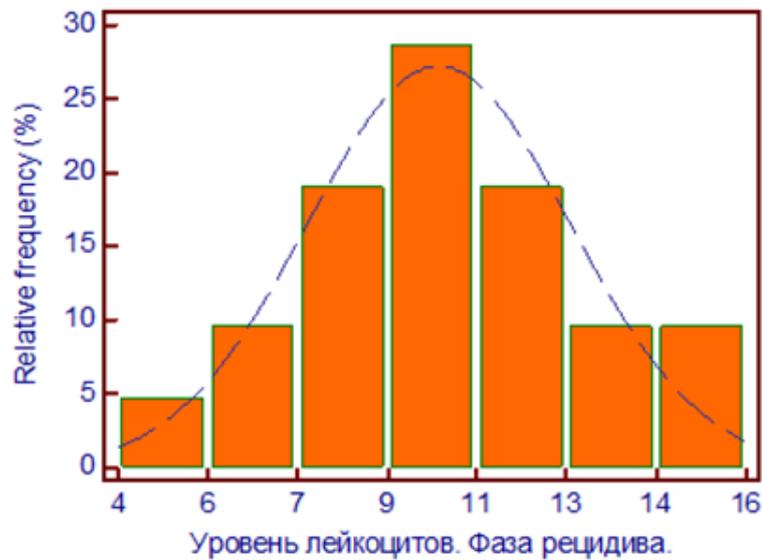
Показатель	Фаза рецидива	Фаза ремиссии
Лейкоцитоз ($\times 10^9/\text{л}$)	$10,10 \pm 0,54^{***}$ 95% ДИ 8,98 – 11,26	$7,10 \pm 0,38$ 95% ДИ 6,31 – 7,89
СОЭ (мм/час)	$29,50 \pm 3,6^{**}$ 95% ДИ 21,92 – 37,07	$17,10 \pm 2,10$ 95% ДИ 12,73 – 21,5
СРБ (мг/мл)	$12,00 \pm 1,71^{**}$ 95% ДИ 6,0 – 18,0	$7,68 \pm 2,26$ 95% ДИ 0,0 – 12,0

Примечание. ** – вероятность статистических различий относительно фазы ремиссии ХОПН на уровне $P < 0,01$; *** – $P < 0,001$.

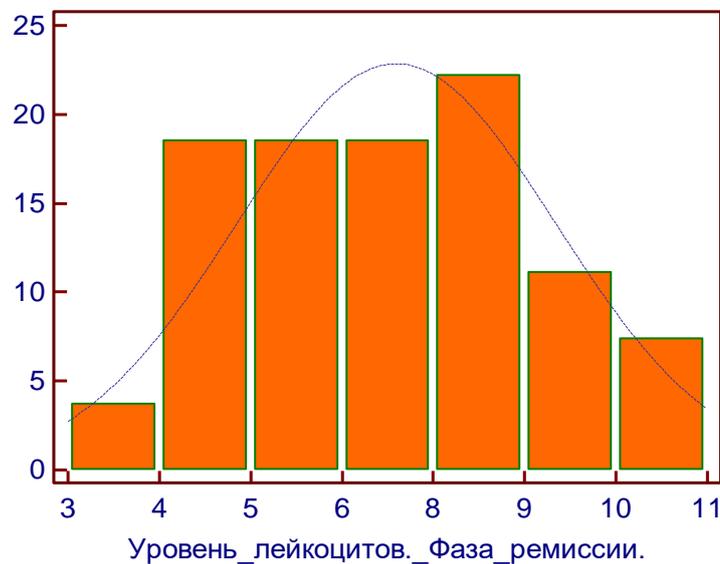
Примечательно, что у 35% ($n=37$) пациентов уровень Лц находился в диапазоне «нормы» – $4,0-9,0 \times 10^9/\text{л}$ (Рисунок 3.1.а). Следовательно, информативность лейкоцитоза при наличии острой фазы воспаления подтверждается у пациентов в фазе рецидива ХОПН.

В фазу ремиссии заболевания данный показатель не является информативным, поскольку у 85% ($n=72$) пациентов значение абсолютного числа Лц не превышало верхнюю границу референтного диапазона (Рисунок 3.1.б).

Анализ количества форменных элементов позволяет ответить на вопрос о состоянии компенсаторных реакций гемопоэза при развитии воспаления (Таблица 3.2.).



а.



б.

Рисунок 3.1. Распределение пациентов по абсолютному количеству лейкоцитов крови в фазу рецидива ХОПН (а) и в фазу ремиссии ХОПН (б).

Примечание. По оси абсцисс – количество лейкоцитов (x10⁹/л), по оси ординат – количество пациентов с соответствующим лейкоцитозом; по оси ординат (Relative frequency) – относительная частота (%).

При анализе гемограмм, представленных в фазе рецидива и ремиссии ХОПН не выявлено статистически значимых различий палочкоядерных Нф (P =0,752).

**Характеристика лейкоцитарной формулы у пациентов в фазу рецидива
и ремиссии ХОПН**

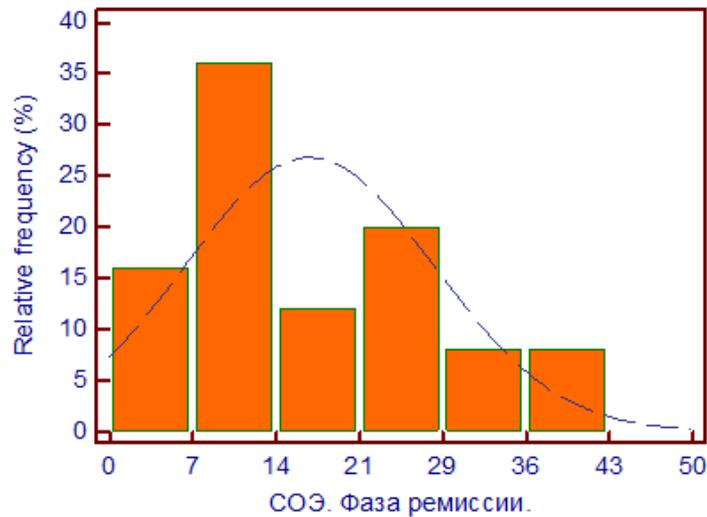
Показатель	Фаза рецидива	Фаза ремиссии	Общая группа пациентов с ХОПН
	X±m (%) 95% ДИ (лев. – прав.)	X±m (%) 95% ДИ (лев. – прав.)	X±m (%) 95% ДИ (лев. – прав.)
Палочкоядерные нейтрофилы	2,3 ±0,423 1,343 – 3,257	2,1 ±0,458 1,063 – 3,137	2,275±0,297 1,666 – 2,884
Сегментоядерные нейтрофилы	69,9 ±3,016* 63,0 – 76,7	60,9± 1,951 56,4 – 65,3	61,3±1,9 57,47 – 65,3
Моноциты	4,4 ±0,777 2,641 – 6,159	4,1 ± 0,752 2,399 - 5,801	4,714±0,445 3,801 – 5,627
Лимфоциты	21,8 ±2,628* 15,8 – 27,7	30,3 ±1,885 26,0 – 34,5	29,5±1,788 25,8 – 33,1
Эозинофилы	0,7 ±0,335* 0,057 – 1,458	1,8 ±0,727 0,155 – 3,445	1,601±0,466 0,649 – 2,564

Примечание. * – вероятность различий относительно фазы ремиссии ХОПН на уровне $P < 0,05$.

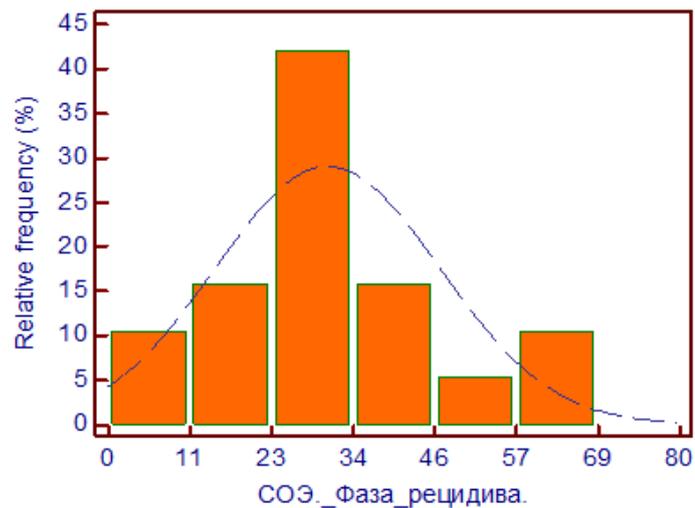
Количество сегментоядерных Нф в фазе рецидива было на 14,8% ($P=0,02$), чем в фазу ремиссии ХОПН; при этом в обеих фазах воспалительного процесса содержание Нф находилось в пределах референсного диапазона. Содержание Мц в периферической крови не отличалось ($P=0,784$), а Лф и Эо было, соответственно, на 39% ($P=0,017$) и в 2,6 раза больше в фазе ремиссии ХОПН ($P < 0,05$). Следовательно, информативными индикаторами острого воспаления является количество сегментоядерных НФ, а хронического – количество Лф и эозинофилов.

В фазе ремиссии ХОПН среднее значение СОЭ соответствовало референсным интервалам. Однако, у 50% ($n=42$) пациентов при анализе диапазона

частоты распределения значений СОЭ зафиксировано повышение данного показателя (Рисунок 3.2.а).



а



б

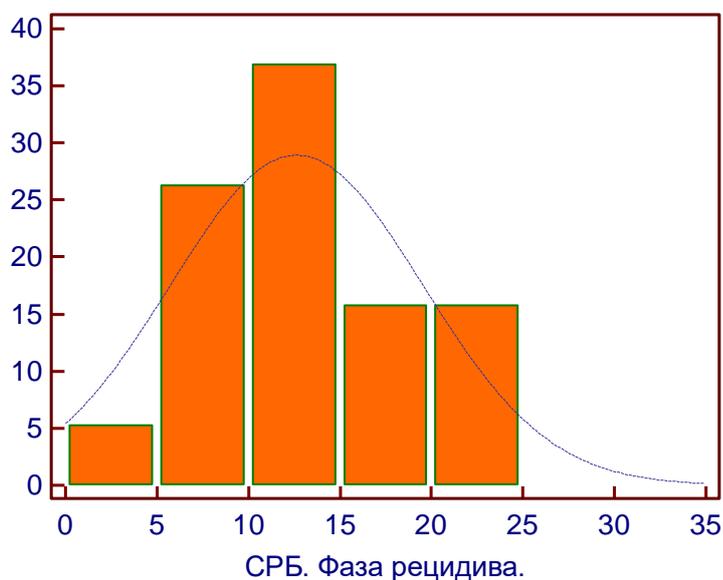
Рисунок 3.2. Распределение пациентов по СОЭ в фазу ремиссии ХОПН (а) и в фазу рецидива ХОПН (б).

Примечание. По оси абсцисс – СОЭ (мм/час), по оси ординат – количество пациентов с соответствующим СОЭ; по оси ординат (Relative frequency) – относительная частота (%).

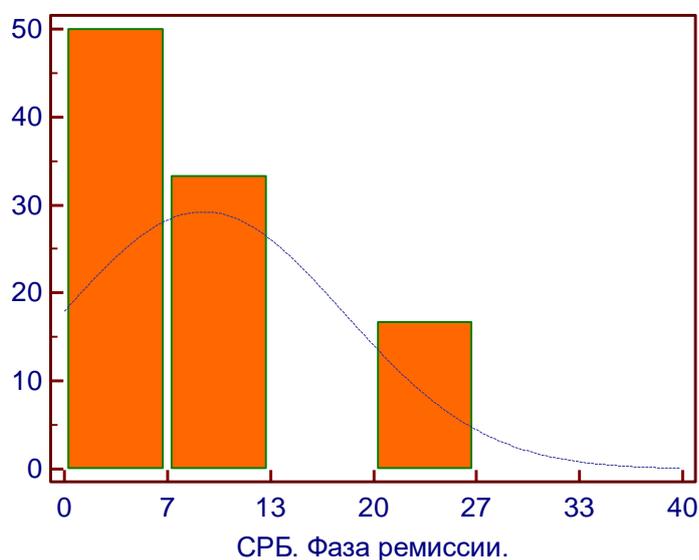
В фазу рецидива ХОПН величина СОЭ была больше, чем в фазе ремиссии на 74,3% ($P=0,003$), увеличение данного индикатора встречалось у 75% ($n=79$)

больных (Рисунок 3.2.б). У 25 % (n=26) пациентов значения СОЭ регистрировались в пределах референсных значений.

Показатель СРБ в фазе ремиссии ХОПН не подтверждал наличие хронического воспаления (Рисунок 3.3.а).



а



б

Рисунок 3.3. Распределение пациентов по абсолютному числу СРБ в крови в фазу рецидива (а) и ремиссии (б). Примечание. По оси абсцисс – уровень СРБ (мг/л), по оси ординат – количество пациентов с соответствующим уровнем С-реактивного белка; по оси ординат (Relative frequency) – относительная частота (%).

В фазу рецидива отмечается повышение уровня СРБ на 56,2% ($P=0,01$), значения которого выходили за верхнюю границу референтного диапазона. Значения данного показателя в референтном диапазоне встречались у 50% ($n=42$) пациентов в фазе ремиссии ХОПН и у 5% ($n=5$) пациентов в группе рецидива (Рисунок 3.3.б). Вопросом для дальнейшего обсуждения является какие причины лежат в основе гетерогенности значений лабораторных показателей, отражающих развитие воспаления у пациентов с МКБ?

3.2. Гендерные и возрастные особенности лейкопоза у пациентов с хроническим обструктивным пиелонефритом.

Установлено, что инфекция и воспаление МВП встречается чаще у женщин (78,5%) [163]. При этом частота патологии возрастает у пожилых пациентов. Сложность дифференцировки фаз ХОПН, в том числе, связана с отсутствием четких гематологических критериев рецидива в различных возрастных группах мужского и женского контингента больных. В этом контексте актуальным представляется детальный анализ изменчивости лейкопоза у пожилых пациентов с ХОПН в зависимости от индивидуальной реактивности организма.

Был поставлен исследовательский вопрос – влияет ли пол и возраст на значения индикаторов воспаления у пациентов в фазу рецидива и ремиссии ХОПН? В исследование включены 113 мужчин с ХОПН, среди которых было 44 (38,9%) пациента старше 65 лет (средний возраст $74,0 \pm 1,3$ года); 43 (38,05%) – в возрастном диапазоне 55 – 65 лет (средний возраст больных $61,0 \pm 0,8$ год) и 26 (23,0%) пациентов младше 55 лет (средний возраст которых составил $43 \pm 3,9$ лет). Из них в фазе рецидива ХОПН находилось 62 (54,9 %) пациента, в фазе ремиссии – 51 (45,1 %) пациент. Обследованные 77 женщин с ХОПН представлены тремя возрастными категориями: старше 65 лет – 28 (36,8%) пациенток 55 – 65 лет – 26 (34,2%) и моложе 55 лет – 23 (28,9%) пациентки. В фазе рецидива ХОПН находилось 43 (56,6%) пациентки, а в фазе ремиссии – 34 (43,4%).

В группе мужчин младше 55 лет, которые находились в фазе ремиссии ХОПН, показатели гемограммы находились в референтном диапазоне характерном для здорового человека (Таблица 3.3.).

Таблица 3.3.

Показатели периферической крови при ХОПН у мужчин в возрастной категории менее 55 лет.

Показатель	Фаза ремиссии		Фаза рецидива	
	X±m	95% ДИ (лев. – прав.)	X±m	95% ДИ (лев. – прав.)
Лейкоциты, $\times 10^9/\text{л}$	5,8±0,01	4,8 – 6,9	12,4±0,36***	9,8 – 14,6
Нейтрофилы сегментоядерные, %	63,8±0,02	58,0 – 65,0	77,5±0,98*	69,7 – 85,4
Нейтрофилы палочкоядерные, %	2,0±0,016	1,0 – 3,0	3,38±0,56	2,0 – 4,0
Эозинофилы, %	5,0±0,34	2,0 – 8,0	1,0±0,01	0,0 – 2,0
Моноциты, %	5,0±0,19	4,0 – 6,0	5±0,04	4,5 – 7,0
Лимфоциты, %	27,6±0,72	20,0 – 35,0	13,6±0,07**	6,0 – 19,0
СОЭ, мм/ч	5,5±0,15	4,0 – 7,0	10±0,1*	10,0 – 18,0

Примечание. * – вероятность статистических различий показателя относительно фазы ремиссии ХОПН на уровне $P < 0,05$; ** – $P < 0,01$, *** – $P < 0,001$.

При рецидиве ХОПН имел место лейкоцитоз, повышение количества сегментоядерных Нф, низкое содержание Лф и незначительный прирост СОЭ. Количество Лц, увеличилось в 2,2 раза ($P < 0,001$), а сегментоядерных Нф – на 31,3 % ($P < 0,05$), по сравнению с такими в фазе ремиссии. Содержание Лф было выше в

2 раза ($P \leq 0,001$) в фазе ремиссии ХОПН. У мужчин в возрастном диапазоне 55 – 65 лет рецидив ХОПН характеризовался лейкоцитозом, нейтрофилоцитозом, повышением СОЭ ($P < 0,001$) (Таблица 3.4.).

Таблица 3.4.

Показатели периферической крови при ХОПН у мужчин возрастной категории 55 – 65 лет.

Показатель	Фаза ремиссии		Фаза рецидива	
	X±m	95% ДИ (лев. – прав.)	X±m	95% ДИ (лев. – прав.)
Лейкоциты, $\times 10^9/\text{л}$	6,3±0,563	5,2 – 7,5	14,5±0,546***	4,5 – 17,2
Нейтрофилы сегментоядерные, %	58±0,66	56,0 – 60,0	72±0,4***	61,0 – 76,0
Нейтрофилы палочкоядерные, %	1,0±0,43	1,0-6,0	2,0±0,56	1,0 – 4,0
Эозинофилы, %	2,0±0,65	0,5 – 4,0	1,00±0,01	0,5 – 2,0
Моноциты, %	8±0,63	6,0 – 10,0	4±0,654**	2,0 – 6,0
Лимфоциты, %	24,0±0,44	14,2 – 28,5	24,0±0,65	15,75 – 30,0
СОЭ, мм/ч	14,5±0,64	7,0 – 24,0	37±0,64**	16,0 – 58,0

Примечание. * – вероятность статистических различий показателя относительно фазы ремиссии ХОПН на уровне $P < 0,05$; ** – $P < 0,01$, *** – $P < 0,001$.

В фазе рецидива ХОПН общее количество Лц повышалось в 2,3 раза ($P < 0,001$) и превышало референсный уровень данного показателя; содержание сегментоядерных Нф превышало на 24,1% ($P < 0,001$) таковое в фазе рецидива, а количество Мц уменьшалось в 2 раза ($P < 0,01$). СОЭ увеличивалась в 2 раза

($P < 0,01$), по сравнению с фазой ремиссии заболевания. У мужчин старше 65 лет при рецидиве ХОПН выявлен умеренный лейкоцитоз – на 47,4% ($P < 0,05$) больше, чем в фазе ремиссии, нейтрофилоцитоз, лимфоцитопения. У пациентов в фазе ремиссии количество Лф было на 21,4% больше, чем в фазе рецидива ХОПН ($P < 0,05$) (Таблица 3.5.).

Таблица 3.5.

Показатели периферической крови при ХОПН у мужчин возрастной категории старше 65 лет.

Показатель	Фаза ремиссии		Фаза рецидива	
	$X \pm m$	95% ДИ (лев. – прав.)	$X \pm m$	95% ДИ (лев. – прав.)
Лейкоциты, $\times 10^9/\text{л}$	$6,9 \pm 0,5$	5,8 – 6,5	$10,1 \pm 0,67^*$	6,1 – 23,2
Нейтрофилы сегментоядерные, %	$77,5 \pm 0,42$	77,0 – 78,0	$75,0 \pm 0,56^*$	64 – 77
Нейтрофилы палочкоядерные, %	$1 \pm 0,65$	1,0 – 1,0	$3,5 \pm 0,767$	2,0 – 5,0
Эозинофилы, %	$3,0 \pm 0,342$	1,0 – 5,0	$2,0 \pm 0,645$	0,75 – 2,0
Моноциты, %	$6,15 \pm 0,09$	3,9 – 7,5	$6,8 \pm 0,442$	4,0 – 8,0
Лимфоциты, %	$15,38 \pm 0,56$	12,0 – 18,0	$12,7 \pm 0,65^*$	8,3 – 27,0
СОЭ, мм/ч	$15,0 \pm 0,23$	9,75 – 27,75	$16,0 \pm 0,46$	7,72 – 23,25

Примечание. * – вероятность различий относительно фазы ремиссии ХОПН на уровне $P < 0,05$; ** – на уровне $P < 0,01$, *** – $P < 0,001$.

У женщин младше 55 лет в фазе ремиссии ХОПН гематологические показатели находились в пределах референтных интервалов (Таблица 3.6.). В фазу рецидива прирост общего числа Лц составил 87% ($p < 0,001$). При этом увеличивалось количество сегментоядерных Нф на 4,8% ($p < 0,05$), палочкоядерных Нф ($p < 0,001$) в 2,25 раза; моноцитов в 2,0 раза и СОЭ в 3,1 раза ($p < 0,001$) по сравнению с значениями показателей в фазе ремиссии ХОПН.

Таблица 3.6.

Показатели периферической крови при ХОПН у женщин младше 55 лет.

Показатель	Фаза ремиссии ХОПН		Фаза рецидива ХОПН	
	$X \pm m$	95% ДИ (лев. – прав.)	$X \pm m$	95% ДИ (лев. – прав.)
Лейкоциты, $\times 10^9/\text{л}$	$5,4 \pm 0,4$	5,05 – 7,35	$10,1 \pm 0,5^{***}$	9,9 – 10,9
Нейтрофилы сегментоядерные, %	$65,0 \pm 0,9$	48,0 – 71,0	$68,1 \pm 1,0^*$	59,5 – 73,0
Нейтрофилы палочкоядерные, %	$2,0 \pm 0,1$	1,0 – 4,0	$4,5 \pm 0,25^{***}$	2,0 – 6,0
Эозинофилы, %	$1,0 \pm 0,1$	1,0 – 4,0	$1,1 \pm 0,2$	1,0 – 2,0
Моноциты, %	$2,2 \pm 0,3$	2,0 – 4,0	$4,5 \pm 0,5^{***}$	3,0 – 7,0
Лимфоциты, %	$26,1 \pm 2,1$	23,0 – 44,0	$21,0 \pm 2,3$	18,0 – 23,0
СОЭ, мм/ч	$8,1 \pm 0,6$	4,0 – 15,0	$25,1 \pm 2,2^{***}$	16,04 – 7,0

Примечание. * - вероятность различий относительно фазы ремиссии ХОПН на уровне $p < 0,05$; ** – $P < 0,01$, *** – $P < 0,001$.

В возрастном диапазоне 55 – 65 лет статистически значимых различий показателей гематогаммы в обеих фазах ХОПН выявлено не было (Таблица 3.7.).

Таблица 3.7.

Показатели периферической крови при ХОПН у женщин возрастной категории 55 – 65 лет.

Показатель	Фаза ремиссии		Фаза рецидива	
	X±m	95% ДИ (лев.– прав.)	X±m	95% ДИ (лев. – прав.)
Лейкоциты, $\times 10^9/\text{л}$	7,8±0,1	6,1 – 12,35	8,1±0,5	6,2 – 10,5
Нейтрофилы сегментоядерные, %	59,5±0,16	48,0 – 76,0	66,0±0,343	50,7 – 72,7
Нейтрофилы палочкоядерные, %	1,5±0,43	1,0 – 4,0	2,0±0,44	1,0 – 4,0
Эозинофилы, %	1,0±0,03	0,75 – 3,5	1,0±0,32	0,0 – 1,0
Моноциты, %	3,5±0,56	3,0 – 5,0	4,0±0,76	3,0 – 6,0
Лимфоциты, %	25,0±0,43	16,0 – 36,0	27,0±0,32	18,7 – 33,7
СОЭ, мм/ч	22,0±0,22	7,0 – 30,0	15,0±0,32	8,5 – 29,0

Примечание. * – вероятность статистических различий показателя относительно фазы ремиссии ХОПН на уровне $P < 0,05$; ** – $P < 0,01$, *** – $P < 0,001$.

У женщин в возрасте старше 65 лет выявлен прирост лейкоцитов в фазу рецидива на 90% ($P<0,001$), Нф на 20,8% ($P<0,001$), Мц на 71,4 % ($P<0,01$), СОЭ на 31,6% ($P<0,05$), тогда как содержание Лф уменьшилось в 2,8 раза ($P<0,05$) по сравнению с фазой ремиссии (Таблица 3.8.).

Таблица 3.8.

Показатели периферической крови при ХОПН женщин старше 65 лет.

Показатель	Фаза ремиссии		Фаза рецидива	
	$X\pm m$	95% ДИ (лев. – прав.)	$X\pm m$	95% ДИ (лев. – прав.)
Лейкоциты, $\times 10^9/\text{л}$	$7,1\pm 0,5$	5,75 - 7,75	$13,5\pm 1,1^{***}$	10,1 - 20,9
Нейтрофилы сегментоядерные, %	$60,0\pm 1,4$	56,0 – 67,0	$72,5\pm 2,5^{***}$	66,0 – 77,0
Нейтрофилы палочкоядерные, %	$2\pm 0,13$	2,0 – 3,0	$4\pm 0,28^{***}$	1,0 – 10,0
Эозинофилы, %	$1,0\pm 0,2$	1,0 – 2,0	$0,5\pm 0,1^*$	0,0 – 1,0
Моноциты, %	$3,5\pm 0,3$	3,0 – 5,0	$6,0\pm 0,8$	3,5 – 8,0
Лимфоциты, %	$38,5\pm 3,0$	21,0 – 36,0	$13,5\pm 1,6^{***}$	9,5 – 20,5
СОЭ, мм/ч	$15,2\pm 1,3$	8,0 – 37,0	$20,0\pm 1,5^*$	16,0 – 35,0

Примечание. * – вероятность статистических различий показателя относительно фазы ремиссии ХОПН на уровне $P<0,05$; ** – $P<0,01$, *** – $P<0,001$.

Таким образом, причиной, выявленной гетерогенности значений индикаторов воспаления у пациентов с ХОПН может быть индивидуальная реактивность организма, связанная с полом и возрастом. К возрастным особенностям развития острой фазы воспаления у мужчин младше 55 лет можно отнести развитие лейкоцитоза и нейтрофилоцитоза на фоне низкого содержания лимфоцитов и незначительного прироста СОЭ. Возрастная группа 55 – 65 лет мужчин характеризовалась значительным приростом СОЭ в фазу рецидива. Аналогичная гематологическая картина характерна для возрастной группы старше 65 лет. В группе женщин к возрастным особенностям адаптационной реакции клеток крови при рецидиве ХОПН у женщин старше 65 лет можно отнести более выраженный нейтрофиллез и лимфоцитопению. Характерной особенностью является заметная мобилизация палочкоядерных нейтрофилов и моноцитов, более выраженной относительной лимфоцитопенией в группе женщин.

Как показали исследования, при использовании показателей гемограммы возможны ошибки в разграничении фаз ремиссии и рецидива ХОПН, что связано индивидуальной реактивностью организма, детерминирующей изменение значений показателей крови [193, 194]. Однако при разных фазах ХОПН значения показателей часто перекрывают друг друга в пределах референтного диапазона. В этой связи необходимо оценить существующие показатели воспаления на предмет их реактивности на различных сроках госпитализации в стационаре, в том числе и после оперативного вмешательства.

3.3. Влияние оперативного вмешательства, как фактора, повышающего провоспалительную реактивность у пациентов с хроническим обструктивным пиелонефритом.

При наличии нескольких гематологических показателей, характеризующих наличие воспаления в организме, возникает вопрос – какие из них являются информативным для оценки скорости развития воспалительной реакции, исходя

из индивидуальной реактивности организма. Разработка таких индикаторов позволила бы приблизиться к управлению воспалительной реакцией на раннем этапе – адгезии лейкоцитов к эндотелию с последующей их миграцией через стенку сосудов микроциркуляторного русла [130].

В исследование включили 85 пациентов в фазе ремиссии ХОПН и 105 пациентов в фазе рецидива ХОПН, которым была проведена контактно-фрезовая уретеролитотрипсия (КФУЛТ). Скорость адаптационной реакции системы гемопоза в ответ на механическую травму МВП оценивали по приросту показателей гемограммы через фиксированный промежуток времени, который составил 6 ч после КФУЛТ.

Был поставлен исследовательский вопрос – отличается ли скорость проявления реактивности организма (исходя из динамики стандартных показателей воспаления) у пациентов которым проводилась КФУЛТ в фазе рецидива и ремиссии ХОПН?

Установлено, что проведение КФУЛТ на фоне рецидива ХОПН не сопровождалось статистически значимым изменением лейкоцитоза (Таблица 3.9.) Таким образом, если судить по количеству Лц, то при наличии острого воспаления скорость развития реакции Лц не изменяется. Иная ситуация прослеживается у пациентов при наличии предсуществующего хронического воспаления в МВП. После КФУЛТ у данного контингента больных количество лейкоцитов увеличилось на 64,8% ($P < 0,01$).

Данная реакция организма на механическую травму МВП связана с повреждением гистогематического барьера в лоханке или мочеточнике, что влечет за собой инвазию микроорганизмов, на элиминацию которых необходимо значительно большее количество микро и макрофагов. На фоне рецидива ХОПН проведение КФУЛТ сопровождалось снижением СОЭ на 55,5% ($P = 0,034$), тогда как при наличии ремиссии заболевания данный показатель статистически значимо не изменялся после проведения оперативного вмешательства.

Таким образом, реакция организма, связанная с синтезом фракций белков крови в печени, отражает снижение антигенной нагрузки при повреждении

слизистой МВП, если таковая произошла на фоне предшествующего острого воспаления.

Таблица 3.9.

Изменение основных показателей гематограммы после проведения КФУЛТ на фоне острого (фаза рецидива) и хронического воспаления (фаза ремиссии) в МВП.

Исследуемые группы	До КФУЛТ (госпитализация)	После КФУЛТ в течение 6 часов
Уровень лейкоцитов $\times 10^9/\text{л}$		
Фаза рецидива	10,1 \pm 0,5 95% ДИ 8,98 – 11,3	8,9 \pm 0,6 95% ДИ 6,18 – 11,7
Фаза ремиссии	7,10 \pm 0,38 95% ДИ 6,31 – 7,89	11,7 \pm 2,3** 95% ДИ 5,300 – 18,1
СОЭ – мм/ч		
Фаза рецидива	29,5 \pm 3,6 95% ДИ 21,9 – 37,1	13,1 \pm 4,8* 95% ДИ 1,391 – 24,9
Фаза ремиссии	17,1 \pm 2,1 95% ДИ 12,7 – 21,5	14,0 \pm 5,3 95% ДИ 0,770- 28,8
СРБ – мг/мл		
Фаза рецидива	12,00 \pm 1,71** 95% ДИ 6,0 – 18,0	16,5 \pm 1,5** 95% ДИ 13,2 – 19,8
Фаза ремиссии	7,68 \pm 2,26 95% ДИ 0,0 – 12,0	14,3 \pm 1,5* 95% ДИ 11,2 – 17,3

Примечание: *** – вероятность различий после проведения КФУЛТ на уровне $P < 0,0001$; ** – $P < 0,01$; * – $P < 0,05$.

При наличии хронического воспаления логично было ожидать повышение этого показателя после КФУЛТ, поскольку регистрировалось увеличение количества лейкоцитов. Отсутствие значимой динамики СОЭ свидетельствует об инерционности данного показателя в течении 6 ч после травмы слизистой МВП.

Несколько неожиданным являются различия реактивности организма, связанной с продукцией печенью острофазного белка плазмы крови в зависимости от характера воспалительной реакции в МВП. Так, через 6 ч после проведения КФУЛТ в фазе рецидива ХОПН уровень СРБ увеличился на 37,5% ($P < 0,01$), тогда как в фазе ремиссии – на 86,2% ($P < 0,05$). Вероятно, большая реактивность гепатоцитов проявляется в случае инициации/развития острого воспаления (в т.ч. перехода от хронического воспаления к острому), чем при наличии предсуществующего воспаления в МВП.

Таким образом, лейкоцитоз, СОЭ и уровень СРБ не являются равноценными индикаторами оценки скорости развития воспаления в МВП. В этой связи необходимо оценить существующие показатели воспаления на предмет их чувствительности и специфичности, т.е. оценить эффективность диагностического теста применительно к фазе ремиссии и рецидива ХОПН.

3.4. Определение валидности маркеров воспаления в диагностике фаз ремиссии и рецидива у пациентов с хроническим обструктивным пиелонефритом

Для анализа информативности лабораторных индикаторов воспаления использовали показатели валидности, которые включали в себя чувствительность (количество истинно положительных результатов лабораторного теста или «заболевших») и специфичность (количество истинно отрицательных результатов лабораторного теста или «здоровых»).

Интегральным показателем индикаторов валидности является площадь под ROC-кривой (AUC), при построении которой определяется точка баланса чувствительности и специфичности, в которой эти показатели максимальны (точка отсечения или критическая точка (crit.)) (в диапазоне бинарной классификации значения 1 или 0). Точка отсечения является индикатором, превысив который, пациенты с ХОПН попадают в группу острого воспаления относительно данного лабораторного маркера. AUC является показателем

эффективности диагностического «предсказания». При этом диагностическая эффективность теста возрастает при приближении значений AUC к 1. Также использовался индекс Юдена, который оценивал корректность результатов классификации и являлся маркером диагностической ценности показателя (в диапазоне классификации значения от -1 до 1) [128].

При использовании лейкоцитоза, как лабораторного индикатора наличия острого воспаления, на этапе госпитализации значения AUC не превышали значения референтного интервала (Рисунок 3.4.). Относительно 1, значение AUC можно трактовать как имеющее среднюю степень предсказательной эффективности.

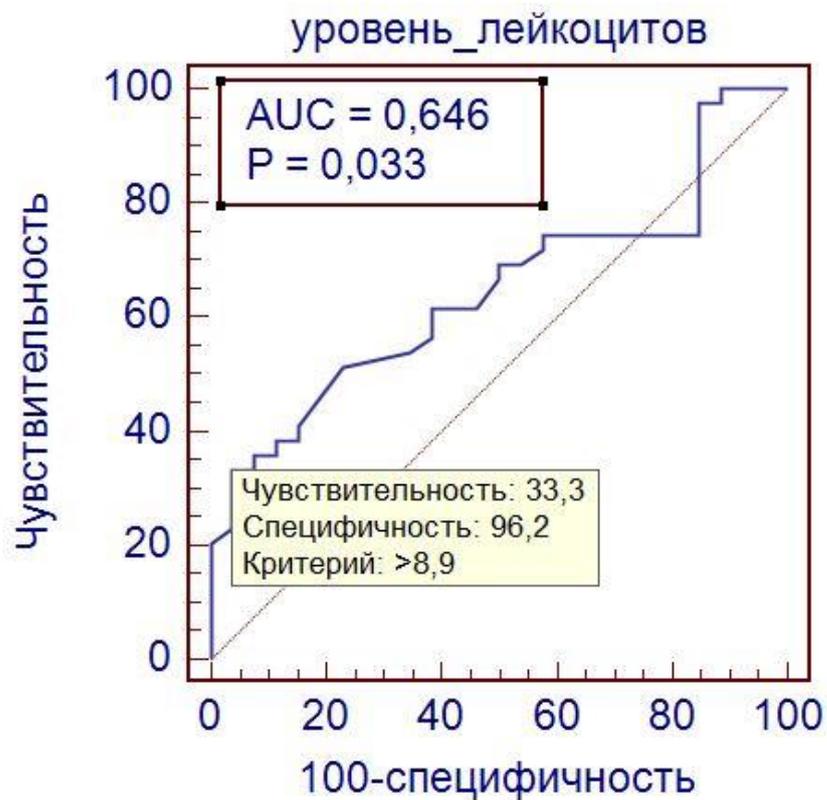


Рисунок 3.4. ROC-кривая диагностической эффективности уровня лейкоцитов на этапе госпитализации у пациентов с ХОПН.

Наиболее высокие значения AUC проявляются в первые 6 часов после оперативного вмешательства (Таблица 3.10.). Данный факт свидетельствует, что количество Лц является чувствительным и специфичным показателем наличия

хронического воспаления в МВП при ХОПН (судя из значений специфичности). Обращает на себя внимание снижение эффективности теста через 6 ч после КФУЛТ и на этапе выписки пациента из стационара, что, вероятно связано с влиянием на реактивность Лц противовоспалительной терапии. Примечательно, что уровень лейкоцитоза_{crit} был индифферентен на всех точках наблюдения за пациентами, что может трактоваться как особенность скорости реактивности данного показателя. На этапе выписки из стационара значения лейкоцитоза, превышающие величину $8,8 \times 10^9/\text{л}$ (точка отсечения) являются критическими и отражают переход от острой воспалительной реакции в МВП к хронической. Индекс Юдена, исходя из динамики уровня лейкоцитоза, достиг максимального значения в первые часы после КФУЛТ и оставался таковым на этапе выписки (Таблица 3.10.). При этом по степени диагностической эффективности его можно трактовать как средней степени.

Таблица 3.10.

Показатели ROC-кривой отражающие диагностическую эффективность лейкоцитоза ($\times 10^9/\text{л}$) у пациентов с ХОПН на различных этапах исследования.

Чувствительность (%)	Специфичность (%)	AUC 95% ДИ	Индекс Юдена	Точка отсечения $\times 10^9/\text{л}$
Этап госпитализации				
33,3	96,1	0,646* 0,517 – 0,761	0,294	>8,9
После КФУЛТ в течение 6 часов				
63,6	100,0	0,873** 0,473 – 0,996	0,636	>9
Выписки из стационара				
83,3	100,0	0,7*** 0,365 – 0,926	0,6	>8,8

Примечание: уровень статистической значимости * – $P < 0,0001$, ** – $P < 0,0001$.

Сопоставление рассчитанного «порога» лейкоцитоза с реальным лейкоцитозом крови у пациентов в фазе ремиссии и рецидива ХОПН (диагноз выставлен по данным клинико-лабораторного исследования, в т.ч. общего анализа крови) показало, что:

- на этапе госпитализации, при точке отсечения $>8,9 \times 10^9/\text{л}$, у 76 (40%) пациентов диагностировать острое воспаление в МВП (фаза ремиссии) было бы невозможно, поскольку значения лейкоцитоза были менее $8,9 \times 10^9/\text{л}$; применение рассчитанного лейкоцитоза позволило бы установить правильный диагноз лишь у 114 (60%) пациента;
- через 6 часов после проведения КФУЛТ (при точке лейкоцитоза_{crit} $>9 \times 10^9/\text{л}$) у 59 (31,25%) пациентов не могло быть острого воспаления в МВП, которое, тем не менее, проявлялось другими клинико-лабораторными показателями (повышением СОЭ, СРБ);
- на этапе выписки из стационара, только у 103 (54,55%) пациентов лейкоцитоз более $8,8 \times 10^9/\text{л}$ не позволял выявлять наличие острого воспаления в МВП.

Приведенные данные свидетельствуют, что при наличии фазы рецидива ХОПН рассчитанный «порог» лейкоцитоза позволял выявлять наличие острого воспаления в МВП: на этапе госпитализации (при точке отсечения $>8,9 \times 10^9/\text{л}$) у 60% пациентов; через 6 часов после проведения КФУЛТ (при точке отсечения $>9 \times 10^9/\text{л}$) у 68,7% пациентов и на этапе выписки из стационара (при точке отсечения $>8,8 \times 10^9/\text{л}$) у 45,45% пациентов позволял выявлять наличие острого воспаления в МВП.

Оценивая ROC-кривую диагностической эффективности СОЭ на разных этапах исследования пациентов, можно прийти к заключению, что определение фазы ремиссии на этапах госпитализации пациента с высокой точностью возможно, если $\text{СОЭ} > 16$ мм/ч. При этом необходимо отметить, исходя из данных АUC, что возможность «предсказания» превышения референтного значения в данном показателе на этапе госпитализации составила высокую степень (Рисунок 3.5.). Примечательно, что после проведения оперативного вмешательства АUC индикатора СОЭ было сопоставимо с первоначальным уровнем при поступлении.

На выписке из стационара, показатель снизился до средней степени. Индекс Юдена находился на уровне средней степени диагностической эффективности, а на этапе выписки значительно снизился (Таблица 3.11.).

Обращает на себя внимание вариабельности точки $СОЭ_{crit}$ – на этапе госпитализации данный показатель составил >16 мм/ч.

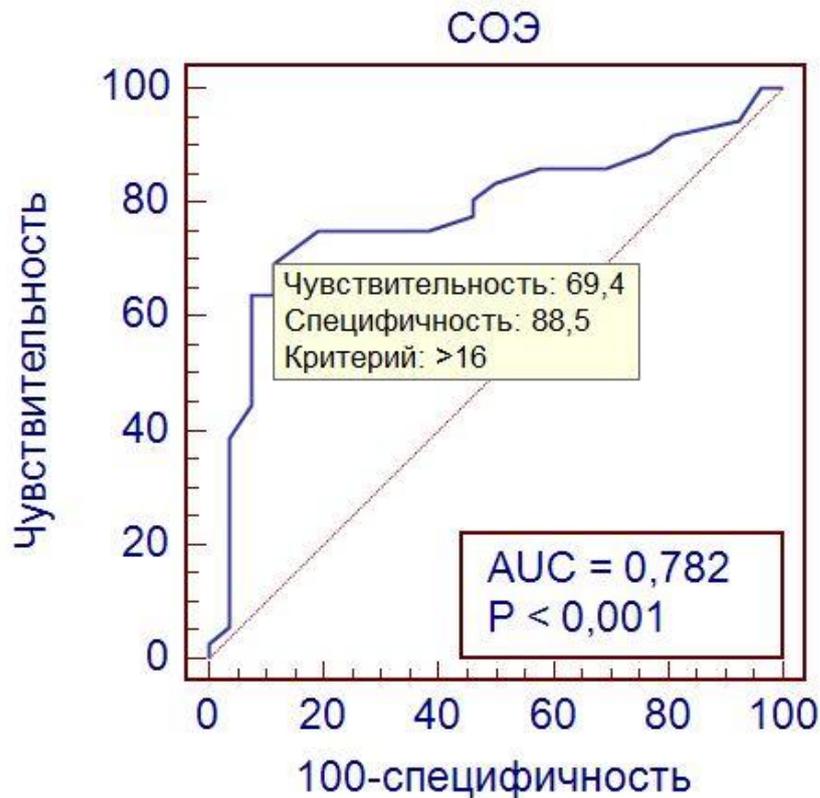


Рисунок 3.5. ROC-кривая диагностической эффективности СОЭ на этапе госпитализации у пациентов с ХОПН.

После проведения КФУЛТ $СОЭ_{crit}$ снизилось до 7 мм/ч и оставалась на сопоставимом уровне при выписке из стационара. Необходимо отметить, что референтные значения СОЭ достаточно вариабельны и необходимо анализировать в контексте групповой реактивности (по признаку возраста, пола, наличия сопутствующей патологии).

Рассчитанный «порог» СОЭ позволял выявлять хроническое воспаление (фазу ремиссии) в МВП: на этапе госпитализации (при точке $СОЭ_{crit} >16$ мм/ч) у 80

(42 %) пациентов; через 6 часов после проведения КФУЛТ (при точке $COЭ_{crit} >7$ мм/ч) у 57 (30%) пациентов; и на этапе выписки из стационара (при точке $COЭ_{crit} >5$ мм/ч) у 105 (55%) пациентов. При этом постановка острого воспаления в МВП по рассчитанным значениям $COЭ$ было возможно на этапе госпитализации (при точке $COЭ_{crit} >16$ мм/ч) у 110 (58%) пациентов; через 6 часов после проведения КФУЛТ (при точке $COЭ_{crit} >7$ мм/ч) у 133 (70%) пациентов; и на этапе выписки из стационара (при точке $COЭ_{crit} >5$ мм/ч) у 85 (55%) пациентов.

Таблица 3.11.

**Показатели ROC-кривой отражающие диагностическую
эффективность $COЭ$ (мм/ч) у пациентов с ХОПН на различных этапах
исследования.**

Чувствительность (%)	Специфичность (%)	AUC 95% ДИ	Индекс Юдена	Точка отсечения мм/ч
Этап госпитализации				
69,4	88,4	0,782* 0,659 – 0,877	0,579	>16
После КФУЛТ в течение 6 часов				
57,1	100,0	0,786 0,429 – 0,97	0,5714	>7
Выписка из стационара				
80,0	50,0	0,65 0,49 – 0,78	0,3	>5

Примечание: уровень статистической значимости * – $P < 0,0001$.

Оценивая ROC-кривую диагностической эффективности СРБ на разных этапах исследования пациентов с ХОПН, можно прийти к заключению, что определение фазы ремиссии на этапах госпитализации и выписки пациента с высокой точностью возможно, если $СРБ > 3$. При этом на этапе госпитализации показатель находился в средней степени способности диагностического предсказания (Рисунок 3.6.). На остальных точках наблюдения AUC показателя

слабо вариировалась (Таблица 3.12.). Примечательно, что индекс Юдена находился на достаточно низком уровне диагностической эффективности.

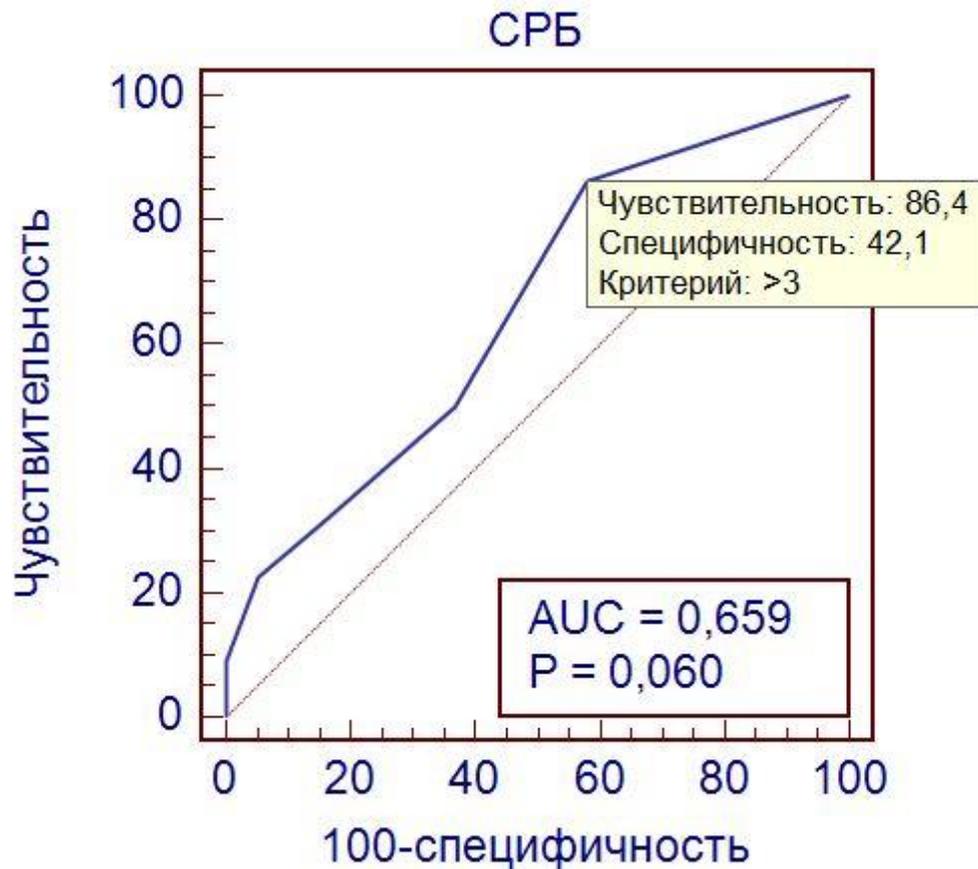


Рисунок 3.6. ROC-кривая диагностической эффективности СРБ на этапе госпитализации у пациентов с ХОПН.

Рассчитанный «порог» СРБ позволял выявлять хроническое воспаление (фазу ремиссии) в МВП: на этапе госпитализации (при точке $\text{СРБ}_{\text{crit}} > 3$ мг/мл) у 87 (46%) пациентов; через 6 часов после проведения КФУЛТ (при точке $\text{СРБ}_{\text{crit}} > 3$ мг/л) у 68 (36%) пациентов; и на этапе выписки из стационара (при то $\text{СРБ}_{\text{crit}} > 3$ мг/л) у 103 пациентов (54%). В фазе рецидива ХОПН рассчитанный референсный диапазон СРБ позволял выявить реакцию в МВП: на этапе госпитализации (при точке $\text{СРБ}_{\text{crit}} > 3$ мг/мл) у 103 (54%) пациентов; через 6 часов после проведения КФУЛТ (при точке $\text{СРБ}_{\text{crit}} > 3$ мг/л) у 122 (64%) пациентов, а на этапе выписки из стационара (при точке $\text{СРБ}_{\text{crit}} > 3$ мг/л) у 87 пациентов (45%).

Показатели ROC-кривой отражающие диагностическую эффективность С-реактивного белка (мг/л) у пациентов с ХОПН на различных этапах исследования.

Чувствительность (%)	Специфичность (%)	AUC 95% ДИ	Индекс Юдена	Точка отсечения мг/л
Этап госпитализации				
86,3	42,1	0,659* 0,495 – 0,8	0,284	>3
После КФУЛТ в течение 6 часов				
42,8	75,0	0,589 0,269 – 0,862	0,178	>3
Выписка из стационара				
80,0	57,1	0,686 0,366 – 0,912	0,371	>3

Примечание: уровень статистической значимости: * – P=0,05.

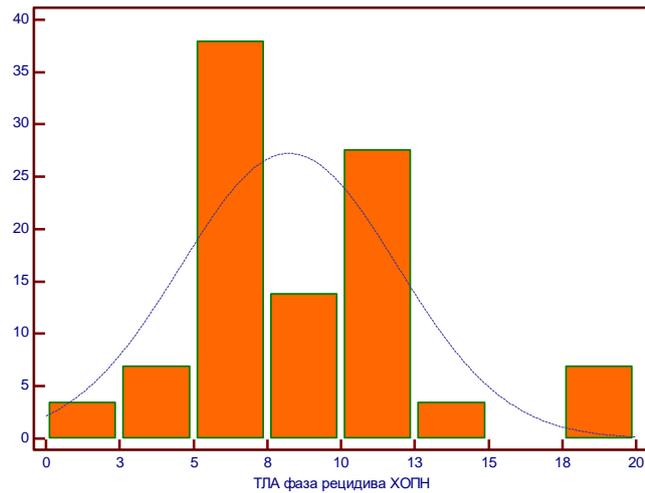
3.5. Тромбоцитарно-лейкоцитарные агрегаты как индикатор функциональной активности клеток, принимающих участие в воспалительной реакции

Гипотеза – если в физиологических условиях для поддержания тканевого гомеостаза происходит активация и миграция Лц, то в циркулирующей крови имеются агрегаты клеток крови, в частности тромбоцитарно-лейкоцитарные агрегаты (ТЛА) [162, 172]. Для обеспечения воспалительной реакции количество Лц и агрегатов в сосудистом русле должно увеличиться, в этом случае количество ТЛА может быть индикатором ранней стадии развития воспаления [172, 194].

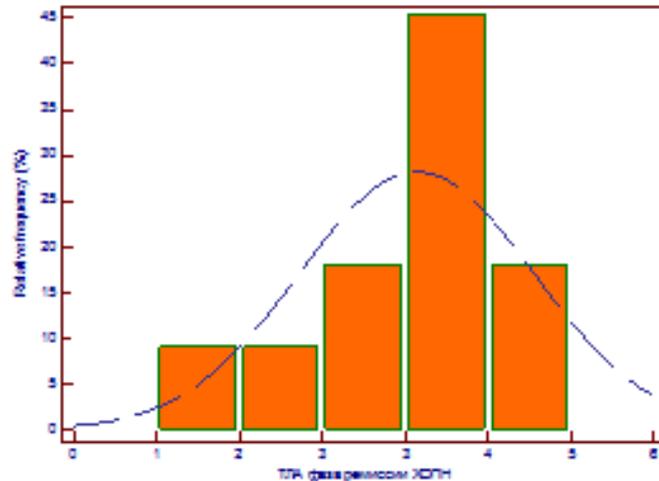
Вначале необходимо было ответить на вопрос – выявляются ли ТЛА в периферической венозной крови здоровых индивидов? Проведенные исследования на мазках крови, окрашенных по методу Паппенгейма, подтвердили

наличие ТЛА. Референсный интервал количества ТЛА у здоровых лиц составил $4,364 \pm 0,363$ агрегатов (95% ДИ 3,553 – 5,174 %).

В фазе рецидива ХОПН, количество ТЛА увеличилось в 2,64 раза ($P=0,001$), по сравнению с контрольной группой и составило $8,118 \pm 0,528$ агрегатов (95% ДИ 6,999 – 9,236 %) (Рисунок 3.7. а,б).



а.



б.

Рисунок 3.7. Частотная характеристика распределения количества ТЛА в крови у пациентов с фазой рецидива (а) и ремиссии (б) ХОПН.

Примечание. По оси абсцисс – уровень ТЛА (%), по оси ординат – количество пациентов с соответствующим уровнем ТЛА; Relative frequency – относительная частота (%).

В фазе ремиссии ХОПН количество ТЛА всего на 25,4 % ($P < 0,001$) превышало данный показатель в контрольной группе и достигало $3,909 \pm 0,315$ (95 % ДИ 3,207 – 4,611%). Тенденция к более высокому содержанию ТЛА в циркулирующей крови у пациентов с фазой рецидива ХОПН относительно данных в группе пациентов с фазой ремиссии (в 2,1 раза; $P < 0,001$), вероятно, кроется в усилении рекрутирования Лц в очаг воспаления. Скорость развития воспалительной реакции, индуцированной оперативным вмешательством, судя по количеству ТЛА (таблица 3.13), более высокая у пациентов с фазой ремиссии ХОПН (прирост показателя составил 37,7%; $P = 0,023$), по сравнению с таковой в фазе рецидива (18,8%; $P = 0,04$).

Таблица 3.13.

Реактивность тромбоцитов и лейкоцитов, участвующих в формировании ТЛА (агрегаты/100 клеток, %) после индукции воспаления связанного с проведением КФУЛТ у пациентов с ХОПН

Исследуемые группы	До КФУЛТ (госпитализация)	Через 6 ч после КФУЛТ
Фаза ремиссии ХОПН	$3,909 \pm 0,314$ 95 % ДИ 3,207 – 4,611	$5,385 \pm 0,615^*$ 95% ДИ 4,044 – 6,725
Фаза рецидива ХОПН	$8,222 \pm 1,722^{**}$ 95% ДИ 4,251 – 12,194	$9,765 \pm 1,378^*$ 95% ДИ 6,842 – 12,688

Примечание. * – вероятность различий относительно показателей на этапе госпитализации на уровне $P < 0,05$; ** – $P < 0,001$.

Данный факт, свидетельствует, что мобилизация Лц из сосудистого пула в ткани МВП при развитии острой воспалительной реакции происходит более интенсивно на фоне предсуществующего хронического воспаления. Полученный факт представляется важным, поскольку может подтверждать ограничение

потенциальных возможностей мобилизации Лц для дальнейшего развития острой воспалительной реакции. Подтверждением данной гипотезы может быть более высокое исходное (до КФУЛТ) содержание ТЛА (в 2,1 раза; $P < 0,0001$) в периферической крови у пациентов с фазой рецидива ХОПН.

Необходимо отметить, что диагностическая предсказательная способность ТЛА, которая выражалась в AUC, была на статистически значимом высоком уровне (Рисунок 3.8.).

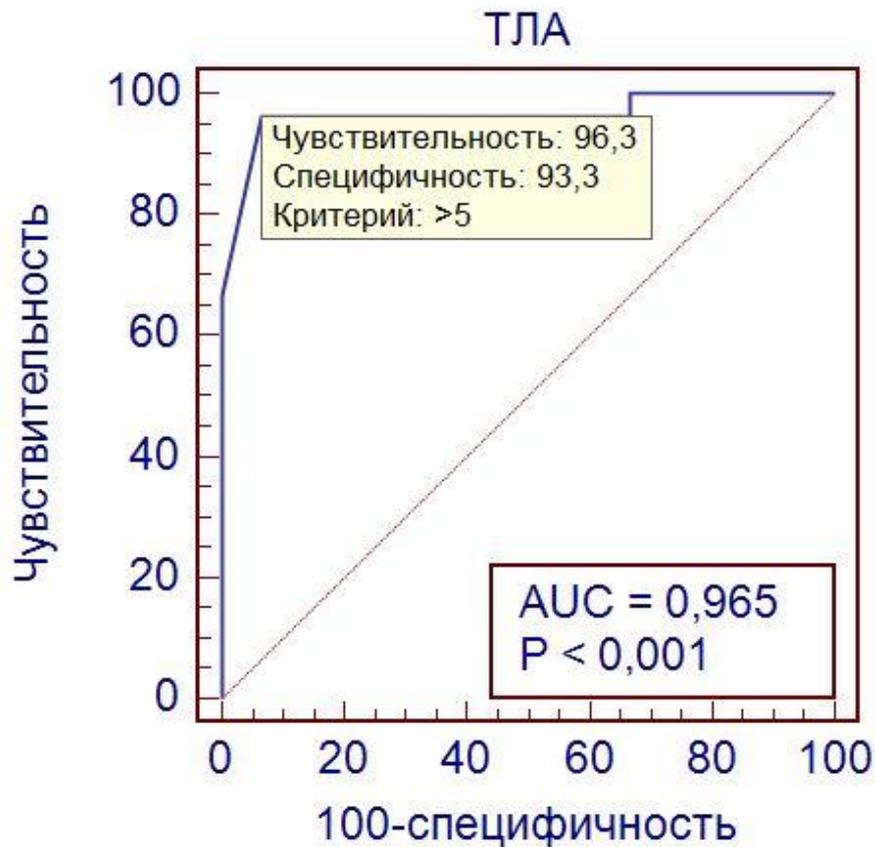


Рисунок 3.8. ROC-кривая диагностической эффективности ТЛА на этапе госпитализации у пациентов с ХОПН.

Кроме того, уровень AUC после КФУЛТ и на этапе выписки также соответствовал высокой степени диагностической способности (Таблица 3.14.). Индекс Юдена, который выражал диагностическую эффективность, снизился до средней степени после КФУЛТ. Однако на этапе выписки показатель незначительно увеличился. Данный факт может трактоваться перераспределением

ЛЦ в кровотоке, которые участвуют в формировании межклеточных коопераций, после оперативного вмешательства

На этапе госпитализации определение острого воспаления с помощью ТЛА (превышение точки отсечения $>5\%$) было возможным в 64% случаев (122 пациента) с верифицированным диагнозом фазы рецидива ХОПН; наличие хронического воспаления у пациентов с фазой ремиссии ХОПН оказалось возможным в 36% случаев (68 пациентов).

Таблица 3.14.

**Показатели ROC-кривой отражающие диагностическую
эффективность ТЛА у пациентов с ХОПН на различных этапах
исследования**

Чувствительность (%)	Специфичность (%)	AUC 95% ДИ	Индекс Юдена	Точка отсечения %
Этап госпитализации				
96,3	93,3	0,965* 0,858 – 0,998	0,896	>5
После КФУЛТ в течение 6 часов				
78,5	80,0	0,786** 0,540 – 0,937	0,585	>6
Выписка из стационара				
75,0	87,5	0,766*** 0,493 – 0,936	0,625	>6

Примечание: уровень статистической значимости * – $P < 0,0001$, ** – $P = 0,008$; *** $P = 0,049$.

Рассчитанный «порог» количества ТЛА позволял выявлять острую воспалительную реакцию в МВП через 6 часов после проведения КФУЛТ у 141 пациентов (74%) (при точке $TLA_{crit.} > 6\%$) с фазой рецидива ХОПН. При этом хроническое воспаление (фаза ремиссии) можно было констатировать (при точке $TLA_{crit.} > 6\%$) у 49 (26 %) пациентов с фазой ремиссии. На этапе выписки, судя по

количеству ТЛА (при точке $TLA_{crit.} > 6\%$), острое воспаление в МВП имело место у 95 (50%) пациентов и хроническое воспаление – у 95 (50%) пациентов.

При сопоставлении всех индикаторов (Рисунок 3.9.) статистически значимые различия были выявлены при сравнении разности AUC между ТЛА и остальными индикаторами (уровень Лц/ТЛА – $P=0,0001$, СОЭ/ТЛА – $P=0,0003$, СРБ/ТЛА – $P=0,0006$). При этом между собой AUC индикаторов были сопоставимы.

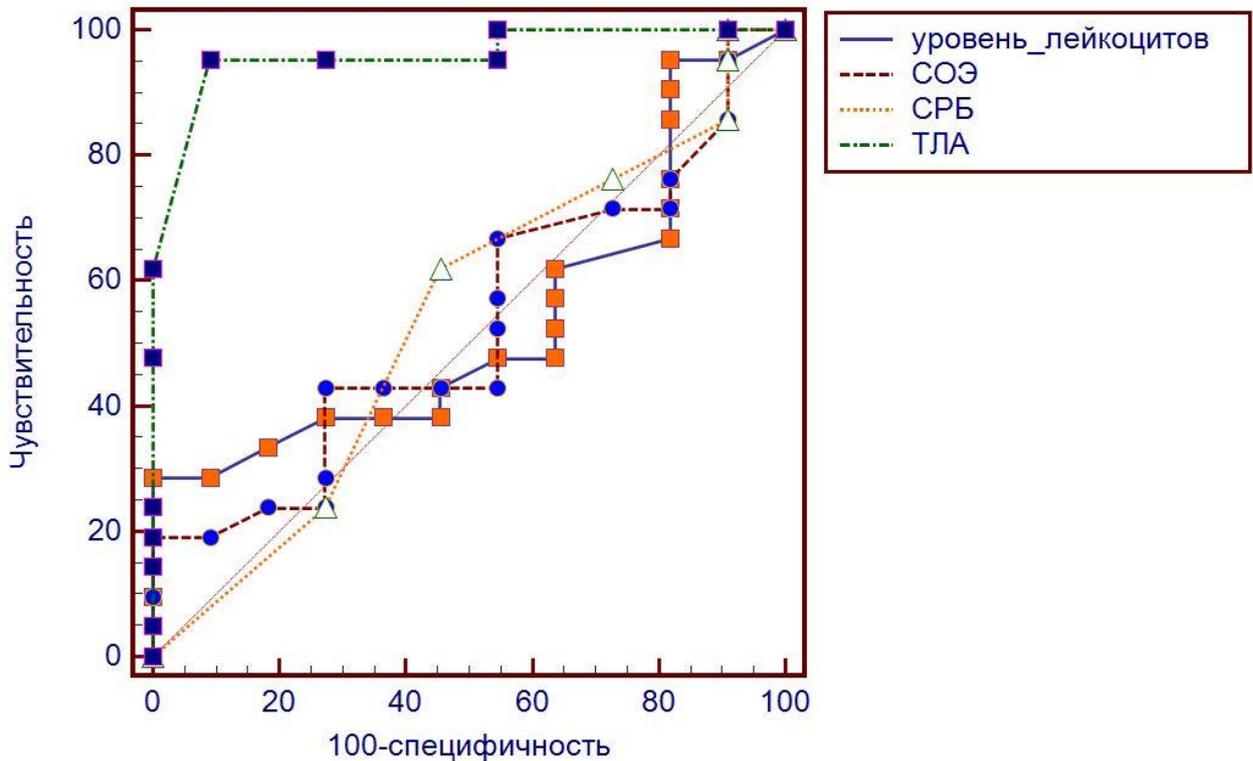


Рис. 3.9. Сравнительная характеристика ROC-кривых лабораторных индикаторов воспаления у пациентов с ХОПН на этапе госпитализации.

Если сопоставить количество выявления истинно положительных случаев среди лабораторных показателей, которые, по сути, отображают реальную картину пациентов с острым воспалением, на разных этапах наблюдения за пациентами, то рейтинг может быть представлен следующим образом (Рисунок 3.10.):

- (а) на этапе госпитализации количество ТЛА > лейкоцитоз > СОЭ > СРБ;
- (б) через 6 ч после КФУЛТ – количество ТЛА > СОЭ > лейкоцитоз > СРБ;
- (в) на этапе выписки – СОЭ > количество ТЛА > лейкоцитоз > СРБ.

Таким образом, показатель ТЛА сопоставим с другими лабораторными индикаторами воспаления по распознаванию истинно положительных случаев ХОПН.

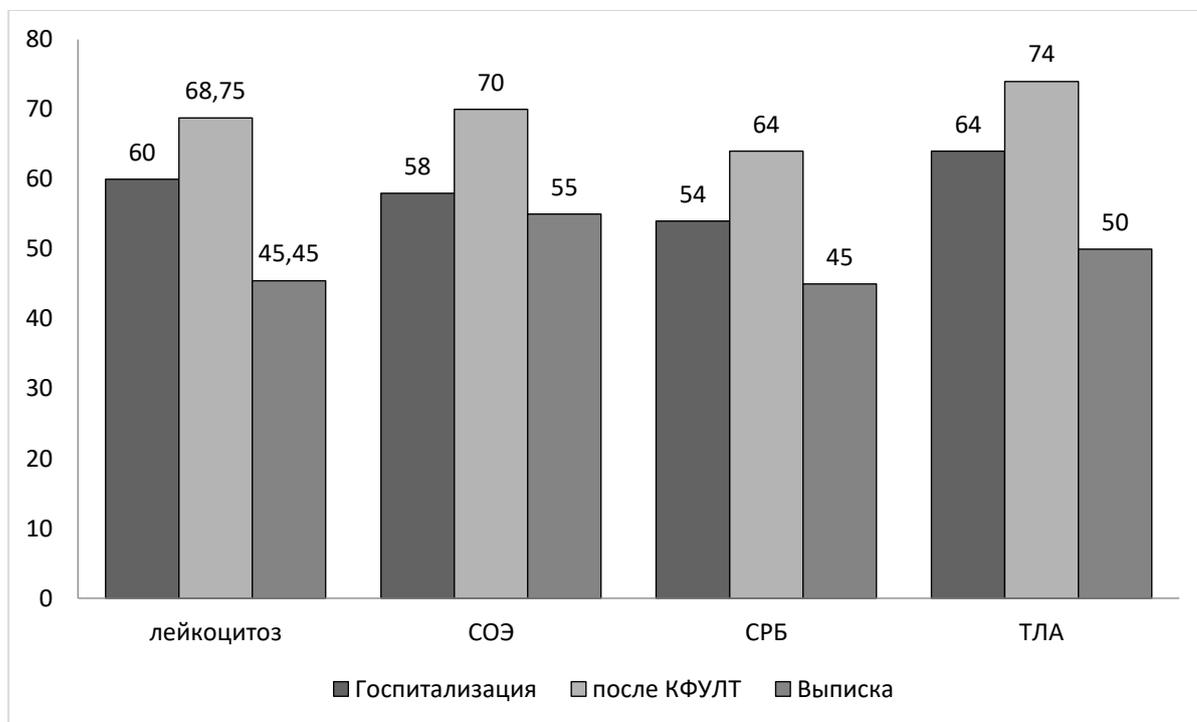


Рисунок 3.10. Количество истинно положительных случаев (%) при использовании биомаркеров воспаления у пациентов с ХОПН.

Примечание. По оси ординат представлена частота истинно положительных случаев.

Анализируя индекс Юдена, который является показателем диагностической ценности лабораторного индикатора, примечательно в сравнении с другими показателями, что формирование ТЛА характеризуется наибольшим индексом на этапе госпитализации (Рисунок 3.11.). В динамике наблюдения за пациентами индекс Юдена, ТЛА снижается до значений, сопоставимых с другими провоспалительными индикаторами. Это может свидетельствовать о хорошей прогностической ценности ТЛА на этапе госпитализации для установления факта воспаления у пациента, возможного перехода хронического воспаления в состояние рецидива, а также дифференциации острого и хронического

воспаления. Лейкоцитоз, СОЭ и СРБ хоть и являются достоверно используемыми показателями, однако они показывают статичный факт уже состоявшегося воспаления. ТЛА является кооперацией форменных элементов, которые, по сути, находятся в процессе преактивации [129] и необратимостью каскада молекулярных событий.

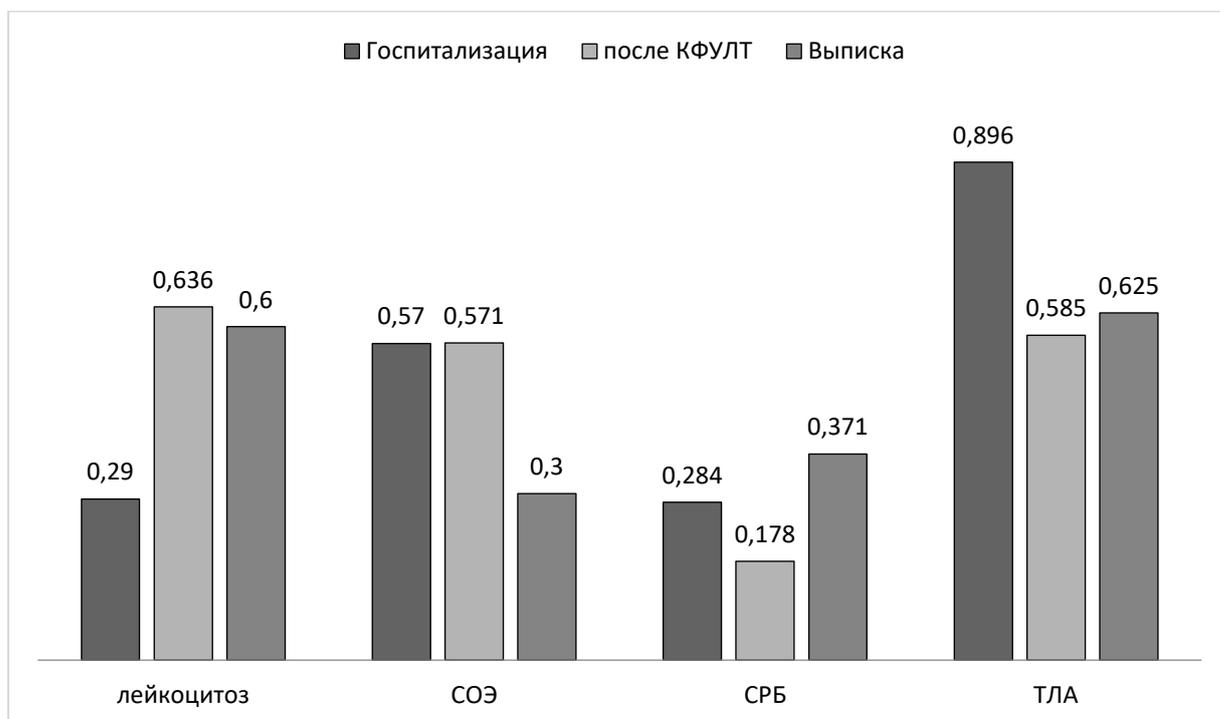


Рисунок 3.11. Сравнительная характеристика диагностической эффективности биомаркеров (индекс Юдена) воспаления у пациентов с ХОПН.

Причины разной информативности показателей воспаления требуют дальнейшего исследования и зачастую объясняются индивидуальной реактивностью организма. Можно предположить, что формирование ТЛА зависит от спектра системных и локальных регуляторов, вызывающих активацию и торможение клеток крови при реализации воспаления и участвующих в двухсторонней активации Тц и Лц.

**МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ФОРМИРОВАНИЯ
ТРОМБОЦИТАРНО-ЛЕЙКОЦИТАРНЫХ АГРЕГАТОВ ПРИ
РЕАЛИЗАЦИИ ОСТРОГО И ХРОНИЧЕСКОГО ВОСПАЛЕНИЯ
В МОЧЕВЫВОДЯЩИХ ПУТЯХ**

До настоящего времени продолжается уточнение механизмов рекрутирования лейкоцитов (Лц) из циркулирующей крови в очаг воспаления [160]. Считается, что миграции Лц предшествует формирование тромбоцитарно-лейкоцитарных агрегатов (ТЛА), обеспечивающих преколонизацию тромбоцитов (Тц) и/или Лц [130]. Если участие адгезивных молекул (Р-селектин и др.), секретируемых клетками крови, не вызывает сомнений при формировании циркулирующих агрегатов, то сами механизмы активации клеток – остаются малоизученными [283, 260]. Прежде всего, это касается особенностей влияния системных (повышение концентрации ангиотензина-II и адреналина при активации ренин-ангиотензиновой и симпатoadреналовой систем) и пара-/аутокринных (секреция клетками крови АТФ, АДФ, Ca²⁺, ФАТ и пр.) механизмов регуляции на функциональную активность Лц и Тц, а также роли гуморальных факторов в детерминации клеточного состава ТЛА [211, 223, 228].

В организме возможно одновременное воздействие нескольких гуморальных факторов (гормоны, цитокины, мРНК и др) на форменные элементы крови, тем не менее остается недостаточно изученным процесс формирования агрегатов [223, 243]. Сложность анализа кооперации Тц и Лц заключается во включении каскада паракринных медиаторов, которыми обмениваются клетки крови [258]. Необходимость изучения данной проблемы открывает возможность управления (амплификация или ингибирование) взаимодействием клеток крови на ранних этапах развития воспалительной реакции [282, 237]. Исследования *in vitro* на цельной крови позволяют моделировать условия взаимодействия системных и паракринных регуляторов Тц в формировании ТЛА и

рекрутировании Лц [201, 271]. Представляет интерес эффект одновременной стимуляции клеток крови на формирование ТЛА в цельной крови.

Цель исследования – изучить влияние системного гуморального фактора – адреналина, уровень которого повышается в циркулирующей крови при активации САС, а также паракринных регуляторов АДФ и ФАТ, обеспечивающих взаимодействие Тц и Лц.

4.1. Формирование ТЛА *in vitro* у здоровых лиц

Для получения «референсного диапазона» уровня формирования ТЛА исследовались показатели контрольной группы здоровых лиц до индукции (базальный уровень) и после стимуляции агонистами. Уровень ТЛА до инкубации с агонистами варьировал в диапазоне от 3,5 до 5,1% (согласно 95% доверительному интервалу (ДИ)) (Таблица 4.1.).

Таблица 4.1.

Базальный и индуцированный уровень ТЛА (%) в циркулирующей крови контрольной группы здоровых лиц.

Условия исследования	$\bar{x} \pm m$ (%)	Min. – Max.	95% ДИ (лев. – прав.)
До стимуляции клеток крови	4,364±0,363	2,0 – 6,0	3,553 – 5,174
Стимуляция клеток крови адреналином	5,4±0,541	3,0 – 8,0	4,175 – 6,625
Стимуляция клеток крови АДФ	8,0±1,92 P ₁ =0,001 P ₂ =0,021	2,0 – 12,0	2,659 – 13,3
Стимуляция клеток крови ФАТ	7,818±0,536 P ₁ =0,0001 P ₃ =0,005	5,0 – 11,0	6,623 – 9,013

Примечание: P₁ – сравнение вероятностей различий относительно показателя с уровнем до инкубации; P₂ – при индукции адреналином; P₃ – при индукции АДФ.

При стимуляции Тц адреналином количество ТЛА возросло – на 23,7% ($P=0,085$), по сравнению с количеством до стимуляции. Использование АДФ и ФАТ (в качестве индукторов активации клеток крови) связано с необходимостью анализа паракринных механизмов, участвующих в формировании ТЛА. При этом, Тц секретируют АТФ и АДФ, которые связываются с пуриновыми рецепторами Лц (P2X- и P2Y-рецепторы) [214], тогда как Лц секретируют ФАТ, который стимулирует ФАТ-рецепторы Тц [160].

АДФ воспроизводил увеличение количества ТЛА на 83,3%, по сравнению с их уровнем до инкубации ($P=0,001$); относительно эффекта адреналина – формирование агрегатов возросло на 48,1% ($P=0,021$). Воздействие ФАТ на клетки крови сопровождалось увеличением численности ТЛА по сравнению с базальным уровнем на 79,3% ($P<0,0001$) и на 44,8% ($P=0,005$), по сравнению с индуцирующим эффектом адреналина. Стимулирующее воздействие АДФ и ФАТ на клетки крови было сопоставимым ($P=0,09$).

Таким образом, у здоровых лиц: (а) стимулирующий эффект адреналина на клетки крови существенно не влиял на формирование ТЛА; (б) моделирование *in vitro* паракринных механизмов при взаимодействии Тц и Лц путем введения АДФ и ФАТ в цельную кровь свидетельствует о сопоставимости индуцирующего влияния Тц на Лц и Лц на Тц при формировании ТЛА; (в) поскольку индуцирующее влияние адреналина на формирование ТЛА в цельной крови – меньше, чем у АДФ и ФАТ, то можно заключить, что системный эффект адреналина не сопровождался амплификацией сигнала со стороны паракринных механизмов взаимодействующих клеток крови; (г) паракринный эффект взаимодействия Тц и Лц более эффективен при формировании ТЛА, чем системный механизм адреналина.

При исследовании клеточного состава ТЛА до инкубации с агонистами, выявлено преобладание тромбоцитарно-нейтрофильных агрегатов (Тц-НФа), количество которых составило – $3,091 \pm 0,31\%$ (95% ДИ 2,389 – 3,793%) (Рисунок 4.1.).

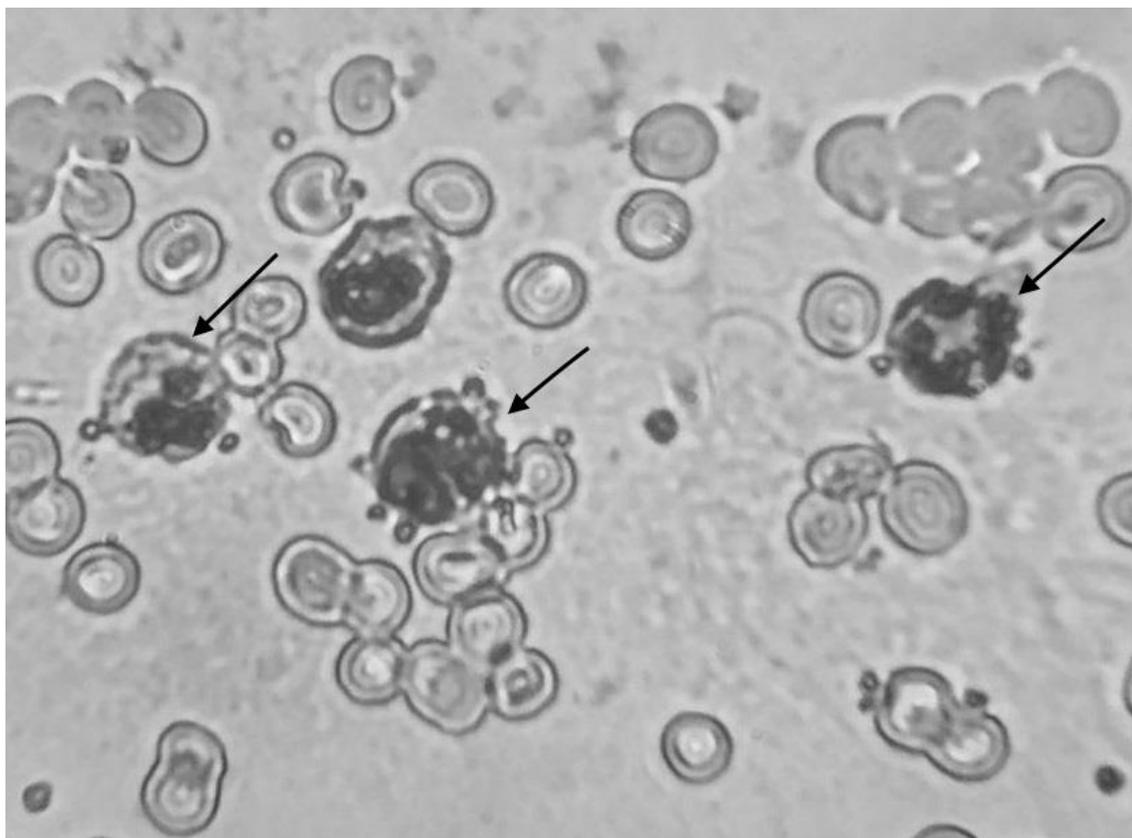


Рисунок 4.1. Формирование тромбоцитарно-нейтрофильных агрегатов в группе здоровых лиц (указаны стрелками). Окраска по методу Паппенгейма. Ув.×40.

Абсолютное количество тромбоцитарно-моноцитарных агрегатов (ТМА) составило $2,0 \pm 0,009$ % (95% ДИ 2,0 – 2,0 %), тромбоцитарно-лимфоцитарных агрегатов (Тц-ЛфА) $1,0 \pm 0,001$ %, тромбоцитарно-эозинофильных (Тц-ЭоА) – $2,0 \pm 0,675$ %.

После индукции клеток периферической крови с адреналином количество Тц-НФА повысились на 36,5% ($P = 0,026$) и достигло $4,222 \pm 0,862$ (95% ДИ 2,233 – 6,211%). Количество Мц, Лфц и Эо в составе агрегатов статистически значимо не изменялось и находилось в одном диапазоне значений.

Индукция клеток периферической крови с АДФ проявлялась увеличением количества Тц-НФА почти в 2 раза ($P < 0,0001$) до $6,18 \pm 0,59$ % (95% ДИ 4,701 – 9,299%); по сравнению с эффектом адреналина прирост составил 89% ($P = 0,001$).

При индукции ФАТ клеточный состав ТЛА также характеризовался гетерогенностью. Уровень Тц-НФА был выше, чем до индукции в 2 раза ($P <$

0,0001); при использовании ФАТ формировалось меньше агрегатов с наличием Тц и Нф – на 13,75% ($P = 0,019$), по сравнению с эффектом АДФ и на 63,5 % больше ($P=0,02$), чем при индукции адреналином. Было выявлено, что при индукции ФАТ формировалось наибольшее количество Тц-МцА – $3,0 \pm 1,0\%$ (95% ДИ 2,0 – 4,0%).

Важно подчеркнуть, что Нф присутствовали как инкубации агонистами и были преобладающим видом Лцв составе агрегатов у здоровых лиц, так и после индукции агонистами. При этом, Нф при инкубации АДФ были единственной популяцией Лц, которые взаимодействовали с Тц. Таким образом, в периферической крови здоровых лиц выявлены ТЛА, в формировании которых принимают участие как системный (адреналин), так и паракринные регуляторы (АДФ и ФАТ).

4.2. Количество ТЛА в периферической крови у пациентов с ХОПН

Результаты морфометрического исследования мазков крови до индукции агонистами (базальный уровень) свидетельствуют, что количество ТЛА до инкубации с агонистами в фазе ремиссии ХОПН соответствовало таковому в контрольной группе ($P=0,384$) (Таблица 4.2). В фазе рецидива ХОПН содержание ТЛА в крови превышало уровень агрегатов в контрольной группе ($P=0,002$) и в фазе ремиссии примерно в 2,2 раза ($P<0,001$) (Рисунок 4.2.).

Вероятно, в фазе рецидива ХОПН интенсивное рекрутирование Лц крови достигается посредством включения механизмов, которые не проявляются у здоровых лиц/волонтеров и пациентов с ремиссией заболевания. Выяснение данных механизмов активации клеток крови при формировании ТЛА в разных фазах ХОПН позволит приблизиться к пониманию причин рецидива острого воспаления в МВП.

Исследование взаимодействия Тц и Лц при стимуляции $\alpha 2$ -адренорецептора, ФАТ-рецептора и P2Y-рецепторов показало, что при введении адреналина в кровь количество ТЛА возросло относительно контрольной группы

на 29,6% ($P=0,049$) и на 79,1% ($P=0,003$) относительно уровня ТЛА до инкубации (Таблица 4.2.).

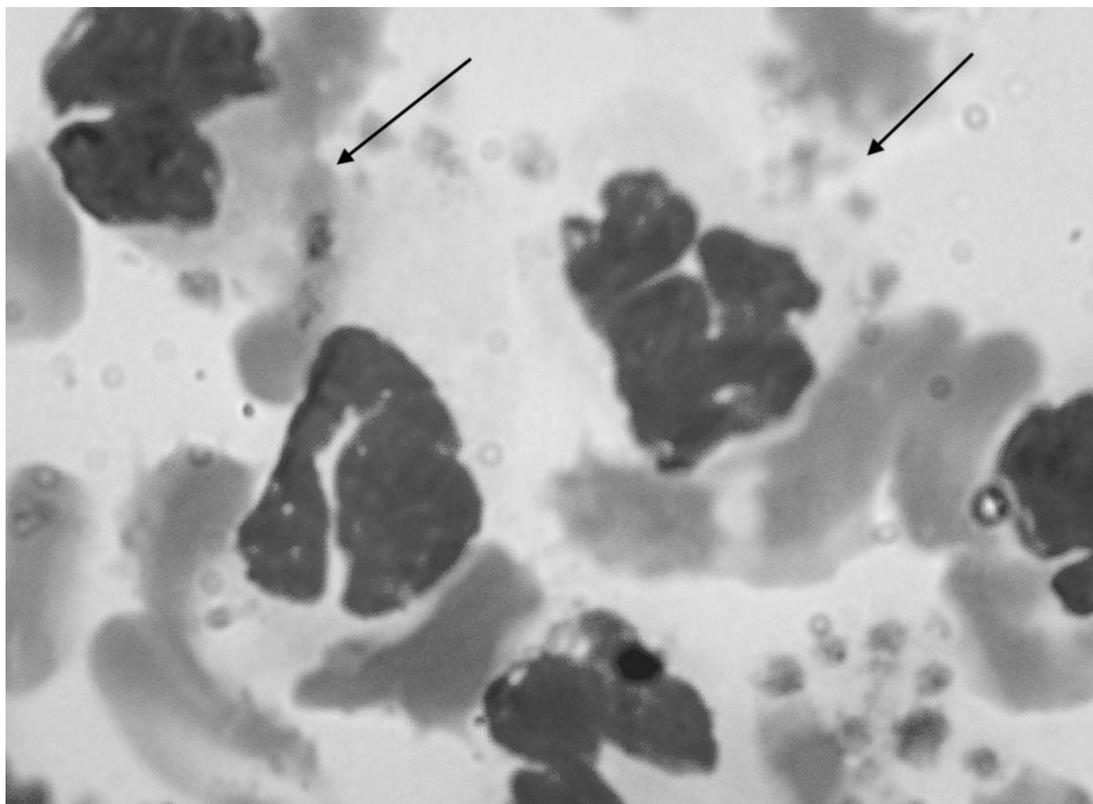


Рисунок 4.2. Наличие тромбоцитарно-нейтрофильных агрегатов в циркулирующей крови у пациентов в фазе ремиссии ХОПН (указаны стрелками).

Окраска по методу Паппенгейма Ув. $\times 100$.

Следовательно, при хроническом воспалении рекрутирование Лц в слизистую МВП может обеспечиваться системным механизмом активации САС.

При стимуляции форменных элементов крови с помощью АДФ количество ТЛА повысилось на 62% ($P=0,002$) относительно их численности до инкубации, что свидетельствует об участии пуриновых рецепторов во взаимодействии Лц и Тц. В тоже время, отсутствие значимой разницы ТЛА при воздействии АДФ на периферическую кровь у пациентов в фазе ремиссии ХОПН и у лиц контрольной группы, вероятно, свидетельствует о нормореактивности $P2Y$ -рецепторов клеток, участвующих в формировании ТЛА, а также сохранении адаптационных возможностей паракринной регуляции Тц.

Базальный и стимулированный агонистами уровень ТЛА (%) в циркулирующей крови у пациентов в фазе ремиссии ХОПН.

Условия исследования	$\bar{x} \pm m$ (%) Достоверность различий	Min.– Max.	95% ДИ (лев. – прав.)
До стимуляции клеток крови	3,909±0,31	1,0 – 5,0	3,207 – 4,611
Стимуляция клеток крови адреналином	7,0±0,94 $P_1 = 0,049$ $P_2 = 0,003$	3,0 – 12,0	4,867 – 9,133
Стимуляция клеток крови АДФ	6,333±2,33 $P_2 = 0,002$	2,0 – 10,0	3,25 – 9,25
Стимуляция клеток крови ФАТ	9,2±1,775 $P_1 = 0,01$ $P_2 = 0,001$ $P_3 = 0,008$ $P_4 = 0,035$	2,0 – 20,0	5,184 – 13,2

Примечание: P_1 – вероятность различий относительно показателя с уровнем до инкубации; P_2 – относительно показателя с контрольной группой здоровых лиц; P_3 – при индукции адреналином; P_4 – при индукции АДФ.

Поскольку не выявлена существенная разница между количеством ТЛА, сформировавшихся при воздействии АДФ и адреналина, то можно прийти к заключению, что эффект паракринной регуляции активированных Тц сопоставим с эффектом системной регуляции, обеспечивающей активацию Лц при

повышении концентрации адреналина в крови. При стимуляции клеток крови ФАТ количество ТЛА возросло в 2,35 раза ($P < 0,001$) относительно их численности до стимуляции, что свидетельствует об участии ФАТ-рецепторов в активации клеток крови при ремиссии ХОПН.

Количество ТЛА, сформировавшихся в фазу ремиссии ХОПН при инкубации крови с ФАТ, превышает на 17,9% ($P = 0,01$) таковое в контрольной группе. Таким образом, можно констатировать, что при наличии хронического воспаления в МВП имела место высокая реактивность ФАТ-рецепторов клеток крови и участие Лц, секретирующих ФАТ, в активации Тц при формировании ТЛА. Тем самым, подтверждается функционирование паракринного механизма, связанного с активацией Лц. Обращает на себя внимание, что количество ТЛА, сформировавшихся в фазу ремиссии ХОПН при инкубации крови с ФАТ, на 31,4% превышает содержание агрегатов, образовавшихся при воздействии адреналина ($P = 0,008$). Следовательно, паракринная стимуляция активированных Лц при формировании ТЛА воспроизводила эффект выше, чем системный механизм, обеспечивающий активацию клеток крови посредством адреналина. По сравнению с эффектом β_2 -рецепторов, стимуляция ФАТ-рецептора воспроизводила больше ТЛА (на 46,03%; $P = 0,035$), что отражает преобладание паракринного влияния Лц на Тц при формировании ТЛА (Рисунок 4.3.).

Таким образом, количественный показатель формирования ТЛА при индукции ФАТ является информативным индикатором активности воспалительного процесса в фазе ремиссии у пациентов с ХОПН. Суммарный кластер рецепторов у пациентов с ХОПН в фазе ремиссии можно представить следующим образом: активность ФАТ > активности адреналина = активности АДФ. Изучение клеточного состава ТЛА позволит ответить на вопрос – отличается ли реактивность разных видов Лц после индукции агонистами в фазе ремиссии ХОПН.

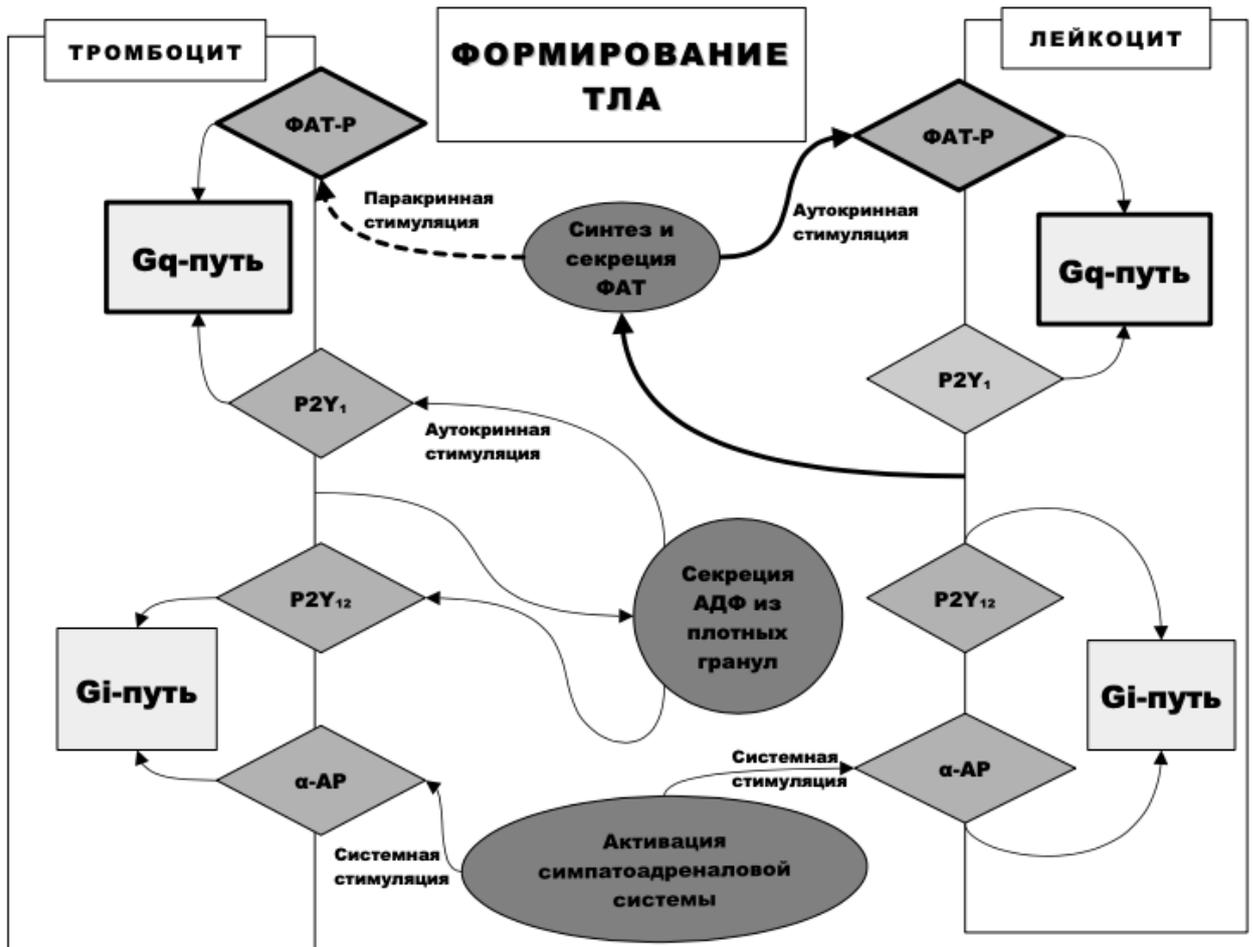


Рисунок 4.3. Схема механизмов регуляции формирования ТЛА у пациентов с ХОПН в фазе ремиссии.

Примечание. Ведущее звено механизма формирования ТЛА выделено черной и пунктирной стрелками.

4.3. Клеточный состав ТЛА крови у пациентов в фазе ремиссии ХОПН при индукции агонистами

Неизвестно существует ли гетерогенность клеточного состава ТЛА при ХОПН. В этой связи представляется целесообразным изучение состава ТЛА в фазу ремиссии и рецидива ХОПН. В фазе ремиссии до индукции агонистами выявили преобладание Нф и Эо в составе ТЛА, соответственно, $3,222 \pm 0,433\%$ (95% ДИ 2,222 – 4,223 %) и $3,0 \pm 1,0\%$ (95% ДИ 2,0 – 4,0%) (Рисунок 4.4.).

Количество ТМА находилось в диапазоне $1,0 \pm 0,0$ (95% ДИ 1,000 - 1,000%), а ТЛФА – $2,0 \pm 1,0$ (95% ДИ 1,0 – 4,0%). При индукции клеток крови с адреналином было выявлено, что количество ТНФА повышалось на 37,5% ($p = 0,087$), по сравнению с уровнем до инкубации. Количество моноцитов в составе агрегатов возросло в 3 раза ($p = 0,083$) до $4,0 \pm 2,0\%$ (95 % ДИ 2,0 – 6,5%), по сравнению с базальным уровнем. Лимфоциты и эозинофилы не продемонстрировали значимых изменений реактивности при стимуляции адреналином.

Инкубация клеток крови с АДФ сопровождалась увеличением количества нейтрофилов в составе ТЛА на 37,5% (до $4,4 \pm 0,61\%$; 95% ДИ 3,00 – 5,76%; $p = 0,048$) по сравнению с исходным уровнем. Однако, по сравнению с количеством ТЛА, возникающих при действии адреналина, достоверных различий выявлено не было ($p = 0,448$). Реактивность моноцитов возросла в 2 раза в ответ на АДФ, при этом количество ТМА составило $2,0 \pm 0,0$ (95% ДИ 2,0 – 2,0; $p = 0,049$). Статистически значимых различий с количеством сформированных ТМА при воздействии адреналина не выявлено ($p = 0,377$).

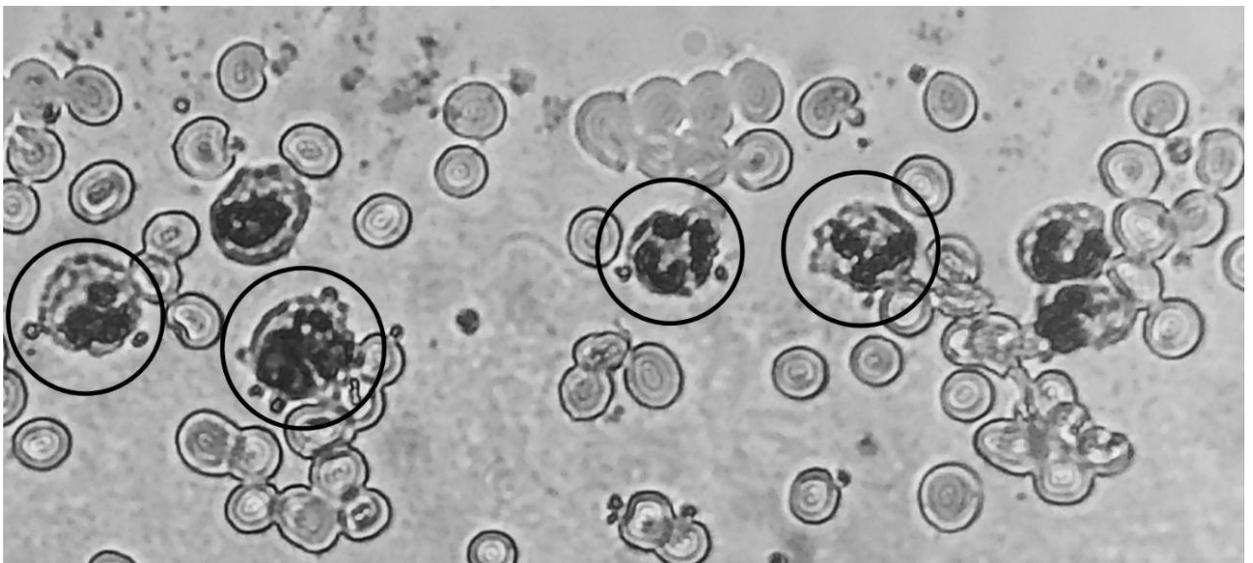


Рисунок 4.4. Морфология тромбоцитарно-нейтрофильных агрегатов у пациентов в фазе ремиссии ХОПН. Окраска по методу Паппенгейма Ув. $\times 100$.

Лимфоциты и эозинофилы не принимали участие в образовании ТЛА. Таким образом, паракринная стимуляция со стороны Тц секретирующих АДФ

проявлялась значимой мобилизацией из циркулирующей крови в агрегаты Нф и моноцитов.

При индукции клеток крови с ФАТ количество образовавшихся агрегатов было сопоставимо с таковым при действии АДФ. Обращает на себя внимание увеличение количества нейтрофилов включенных в состав агрегатов в 2 раза по сравнению с базальным уровнем – до $6,9 \pm 1,4$ % (95% ДИ 3,711 – 10,089%; $P=0,02$). Причем, реакция нейтрофилов на ФАТ превышала такую адреналина на 58,8% ($P=0,02$) и была сопоставимой с эффектом АДФ. Тенденция к увеличению количества агрегатов, включающих Эо, Лфц и Мц при действии ФАТ не носила статистически значимый характер ($P>0,05$) по сравнению с базальным уровнем. Таким образом, паракринная стимуляция Лц и Тц проявлялась лишь в отношении нейтрофилов. Что касается моноцитов и лимфоцитов, то различия реактивности ФАТ-рецепторов, $\alpha 2$ -адренорецепторов и P2Y-пуриновых рецепторов не наблюдались ($P>0,05$).

4.4. Фенотипы клеток крови как проявления индивидуальной реактивности организма у пациентов с ХОПН в фазе ремиссии

Можно предположить, что отсутствие статистически значимых различий реакции Тц и Лц на агонисты связано с существованием фенотипов клеток крови, обеспечивающих не только поддержание хронического воспаления, но и при необходимости реализацию острой воспалительной реакции, т.е. по сути мы сталкиваемся с гетерогенностью реактивности организма внутри исследуемой когорты больных. В этой связи, целесообразно проверить наличие гипореактивных (резистентных форм Лц не принимающих участие в формировании ТЛА), а также нормо- и гиперреактивных фенотипов клеток крови способных принимать участие в реализации воспаления, связанного с активацией САС и взаимной индукцией Тц и Лц.

Критерием предлагаемого распределения фенотипов клеток крови может быть левая и правая границы 95% доверительного интервала формирования ТЛА

(3,207 - 4,611 %), выявленное в процессе анализа мазков крови у пациентов с ХОПН в фазе ремиссии до инкубации с агонистами (базальный уровень стимуляции). На основании данного индикатора можно выделить, соответственно, гипореактивный фенотип, который характеризовался наличием 1 агрегата/поле зрения или отсутствием таковых; гиперреактивный – 5 агрегатов/поле зрения и более и нормореактивный фенотип – с наличием от 1 до 5 агрегатов п/з. (Таблица 4.3.).

При индукции агонистами клеток крови в трех выделенных фенотипах обнаружена следующая закономерность – только реактивность α 2-адренорецептора на Тц и Лц соответствовала своему фенотипу, тогда как реакция на ФАТ и/или АДФ не соответствовала таковому.

Данный феномен отражает одинаковую реактивность Тц и лейкоцитов на адреналин, и по сути отражает системную регуляцию функции клеток крови, тогда как реакция Тц и лейкоцитов (паракринная регуляция) отличается на ФАТ и АДФ. Таким образом, наиболее информативным показателем, отражающим реактивность клеток крови (фенотип) на агонисты является функциональная активность α 2-адренорецептора, что в литературе трактуется как адренореактивность организма [146].

В связи приведенными аргументами в дальнейшем когорту пациентов с фазой ремиссии распределили на три группы – с гипoadренореактивным, нормoadренореактивным и гиперадренореактивным фенотипом реактивности клеток крови.

При исследовании гипoadренореактивного фенотипа установлено, что реакция на адреналин была ниже на 27,1% ($P < 0,001$), АДФ на 12,5% ($P = 0,039$) и ФАТ на 48,4% ($P < 0,001$), по сравнению с контрольной группой. Таким образом, у пациентов в фазу ремиссии ХОПН имеет место гипoadренореактивный фенотип клеток крови, который характеризуется низкой реактивностью в отношении основных агонистов, принимающих участие в реализации воспалительной реакцию.

**Характеристика фенотипов клеток крови у пациентов в фазе ремиссии
ХОПН (исходя из уровня ТЛА, %).**

Условия индукции	Гипоадренореакт. фенотип (n=30) ср.зн.±ош.ср. 95%ДИ	Нормоадренореакт. фенотип (n=35) ср.зн.±ош.ср. 95%ДИ	Гиперадренореакт. фенотип (n=20) ср.зн.±ош.ср. 95%ДИ
До стимуляции	1,0 ± 0,129 0,668 – 1,332 P ₁ <0,0001	3,939 ±0,074 3,777 – 4,101	5,025 ±0,025 4,945 – 5,105 P ₁ < 0,0001
Индукция адреналином	3,183±0,132 2,842 – 3,524 P ₁ <0,001 P ₂ = 0,001	7,143±0,776 5,466 – 8,82	8,5±0,866 5,744 – 11,256 P ₁ =0,001 P ₂ = 0,0002
Индукция АДФ	7,0±0,055 6,823 – 7,11 P ₁ =0,039 P ₂ = 0,0012 P ₃ =0,001	6,429±0,3588 5,653 – 7,204 P ₁ =0,027	6,05 ±0,3891 5,130 – 6,970 P ₁ = 0,05 P ₂ = 0,0004 P ₃ = 0,007
Индукция ФАТ	4,033 ±0,055 3,89 – 4,177 P ₁ =0,001 P ₂ = 0,0002 P ₃ =0,001 P ₄ = 0,0004	11,286±1,3645 8,338 –14,234 P ₁ =0,043 P ₂ < 0,0001 P ₃ = 0,013 P ₄ = 0,002	6,012 ±0,3829 5,107 – 6,918 P ₁ =0,05 P ₂ < 0,0001 P ₃ < 0,0001
Кластер рецепторов	АДФ>адреналин> ФАТ	ФАТ>АДФ= адреналин	адреналин > АДФ= ФАТ

Примечание: P₁ – сравнение количества ТЛА с контрольной группой здоровых лиц; P₂ – с уровнем до стимуляции (базальный уровень ТЛА); P₃ – при стимуляции адреналином; P₄ – при инкубации АДФ.

Сопоставимость активности рецепторов гипoadренореактивного фенотипа клеток выявила следующую закономерность: пуриновые P2Y-рецепторы сохраняли более высокую активность, которая была на 120,0% ($P=0,001$) выше, чем таковая $\alpha 2$ -адренорецептора и на 73,7% ($P=0,001$) больше, чем активность ФАТ-рецепторов. В порядке снижения активности рецепторов искомый ряд можно представить следующим образом: активность P2Y-рецепторов > активности $\alpha 2$ -адренорецептора > активности ФАТ-рецептора.

Корреляционный анализ позволил установить высокую связь между количеством ТЛА, сформировавшихся при инкубации клеток крови с АДФ и двумя другими агонистами ($r_{\text{АДФ-Адрен}}=0,916$; $P=0,02$); $r_{\text{АДФ-ФАТ}}=0,893$; $P=0,003$); а также между количеством ТЛА, сформировавшихся при инкубации клеток крови с ФАТ и адреналином выявлена сильная позитивная связь ($r_{\text{ФАТ-Адрен}}=0,78$; $P=0,001$).

Представленные данные позволяют предположить, что: (а) системная активация САС обеспечивает стимуляцию Лц и Тц, следствием чего является секреция ими, соответственно, ФАТ и АДФ, которые участвуют в паракринной стимуляции клеток крови при формировании ТЛА; (б) снижение аутокринной стимуляции Тц, по сравнению с таковой в контрольной группе может быть основной причиной ограничения формирования ТЛА, поскольку индуцирующий эффект адреналина и ФАТ базируется на секреции АДФ из плотных гранул Тц (вторая волна агрегации) (Рисунок 4.5.).

Таким образом, наличие гипoadренореактивного фенотипа клеток крови в фазе ремиссии ХОПН, вероятно, связано с ограничением адаптационных механизмов, позволяющих усиливать функциональную активность Тц при их стимуляции, следствием чего является снижение формирования ТЛА и рекрутирования Лц из сосудистого русла.

При исследовании нормoadренореактивного фенотипа клеток крови у пациентов в фазе ремиссии обращало на себя внимание: повышение чувствительности ФАТ-рецепторов (на 44,4%; $P=0,043$) и снижение таковой

пуриновых P2Y-рецепторов (на 19,6%; $P=0,027$), по сравнению с таковой в контрольной группе; реакция Тц на адреналин, не отличаясь ($P>0,05$).

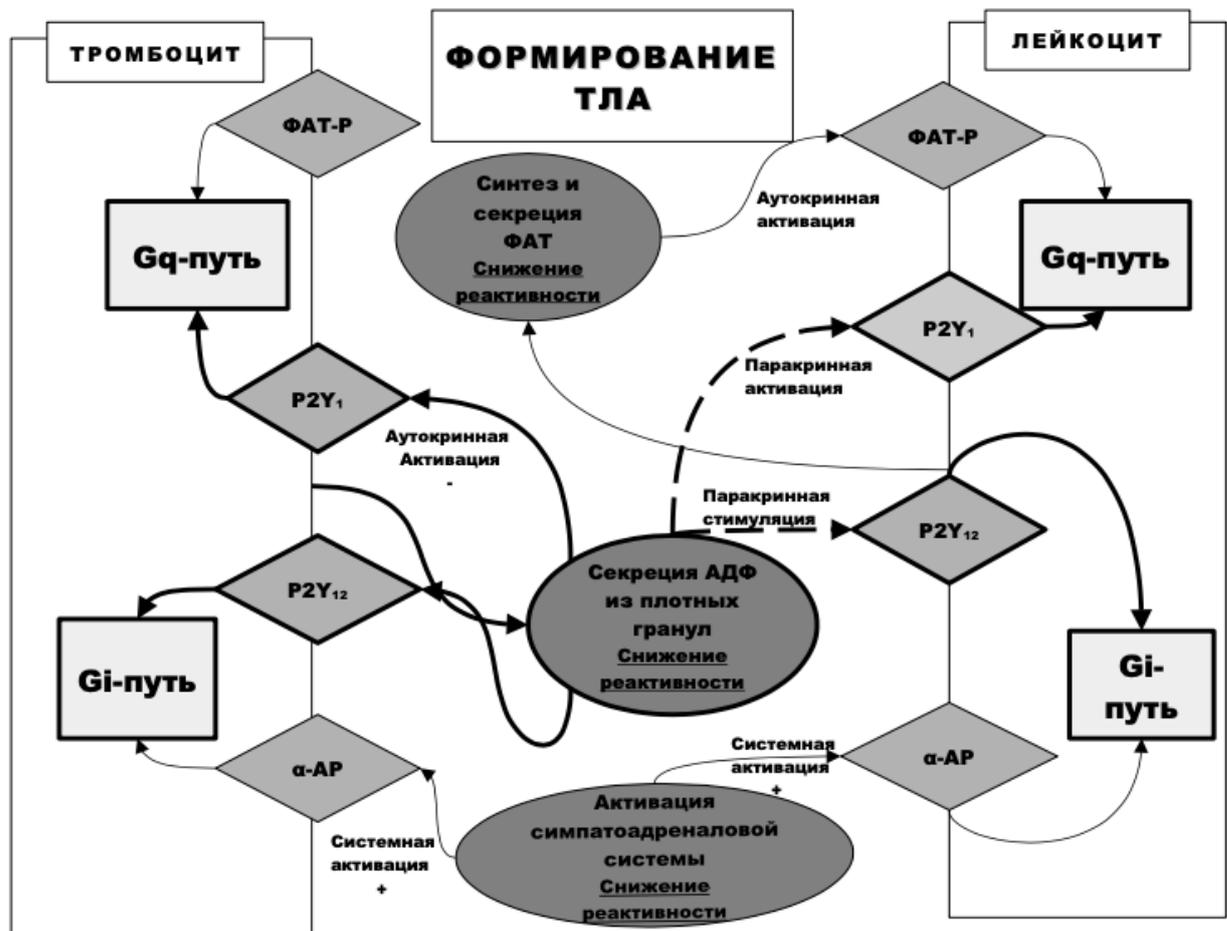


Рисунок 4.5. Схема механизмов регуляции формирования ТЛА у пациентов с гипoadренореактивным фенотипом клеток крови.

Примечание. Ведущее звено механизма формирования выделено пунктирной и черной стрелками. «+» – положительная связь, «-» – отрицательная связь

Таким образом, в сравнении с контрольной группой, при хроническом воспалении в МВП возрастала модулирующая роль Лц, секретирующих ФАТ; при этом снижение аутокринной стимуляции Тц не имело критического значения и не оказывало влияния на реактивность ФАТ-рецептора и α₂-адренорецептора. Анализ активности рецепторов клеток крови в нормoadренореактивном фенотипе выявили следующие особенности. Наиболее высокую реактивность проявлял ФАТ-рецептор, который воспроизводил формирование ТЛА –на 75,5% ($P=0,002$)

больше, чем пуриновые P2Y-рецепторы и на 58,0% (P=0,014) больше, чем $\alpha 2$ -адренорецептор. Таким образом, кластер рецепторов может быть представлен следующим образом: активность ФАТ-рецептора > активности P2Y-рецептора = активности $\alpha 2$ -адренорецептора. Корреляционный анализ не выявил взаимосвязи системного и паракринных механизмов, регулирующих воспалительную реакцию. Представленные данные позволяют прийти к заключению, что Лц играют ведущую роль в формировании ТЛА, причем их активация не связана с влиянием Тц, секретирующих АДФ, и состоянием САС. Мобилизация Лц может осуществляться как паракринным механизмом (секреция ФАТ), так и при действии других факторов, обеспечивающих рекрутирование резервного пула Лц (цитокины, лейкотриены, факторы хемотаксиса) (Рисунок 4.6.).

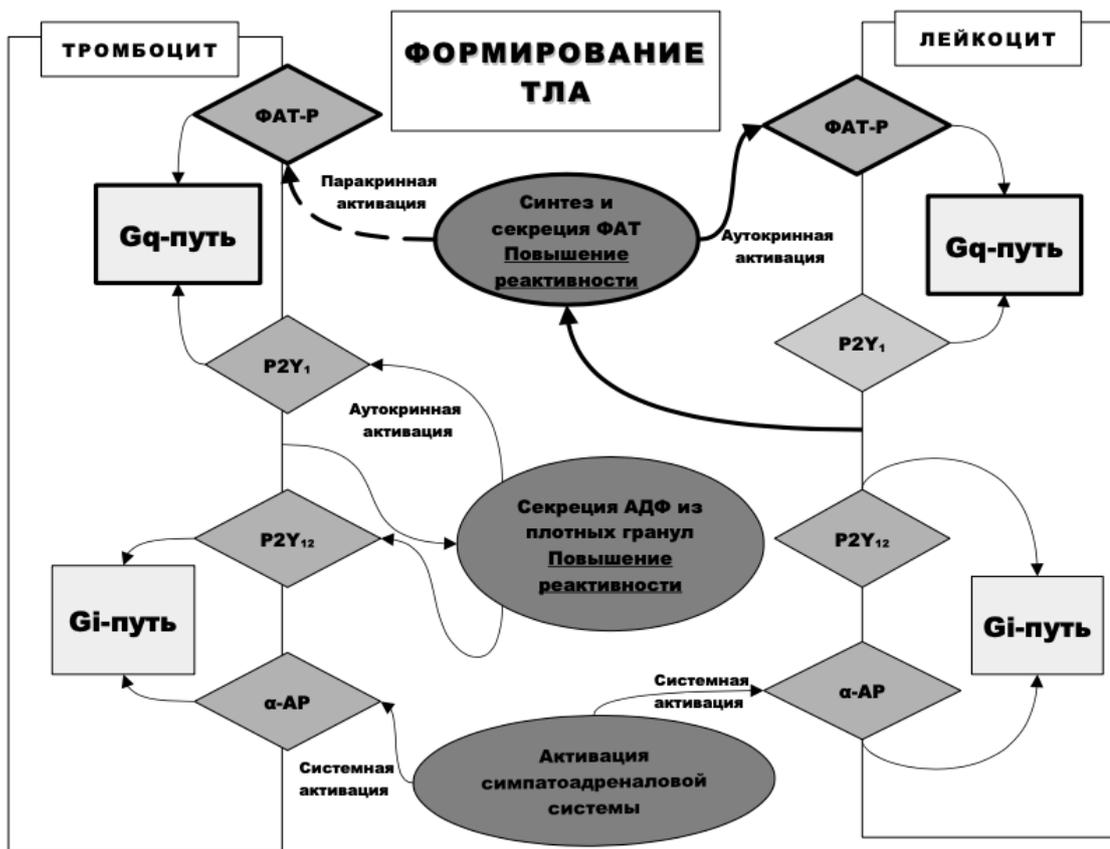


Рисунок 4.6. Схема механизмов регуляции формирования ТЛА у пациентов с нормоадренореактивным фенотипом клеток крови.

Примечание. Ведущее звено механизма формирования выделено пунктирной и черной стрелками.

При исследовании гипердренореактивного фенотипа клеток крови установлено, что реакция на адреналин была выше на 57,4% ($P=0,001$), тогда как АДФ и ФАТ ниже на 25% ($P=0,05$) по сравнению с таковой в контрольной группе. Таким образом, у пациентов в фазу ремиссии ХОПН гипердренореактивный фенотип клеток крови характеризуется высокой реактивностью в отношении адреналина, что отражает ведущую роль САС в активации Тц и Лц (Рисунок 4.7.).

При анализе кластера активности рецепторов установлено, что наиболее высокую реактивность проявлял $\alpha 2$ -адренорецептор, активность которого в отношении формирования ТЛА превышала таковую пуриновых P2Y-рецепторов и ФАТ-рецепторов примерно на 42% ($P = 0,007$ и $P < 0,0001$, соответственно).

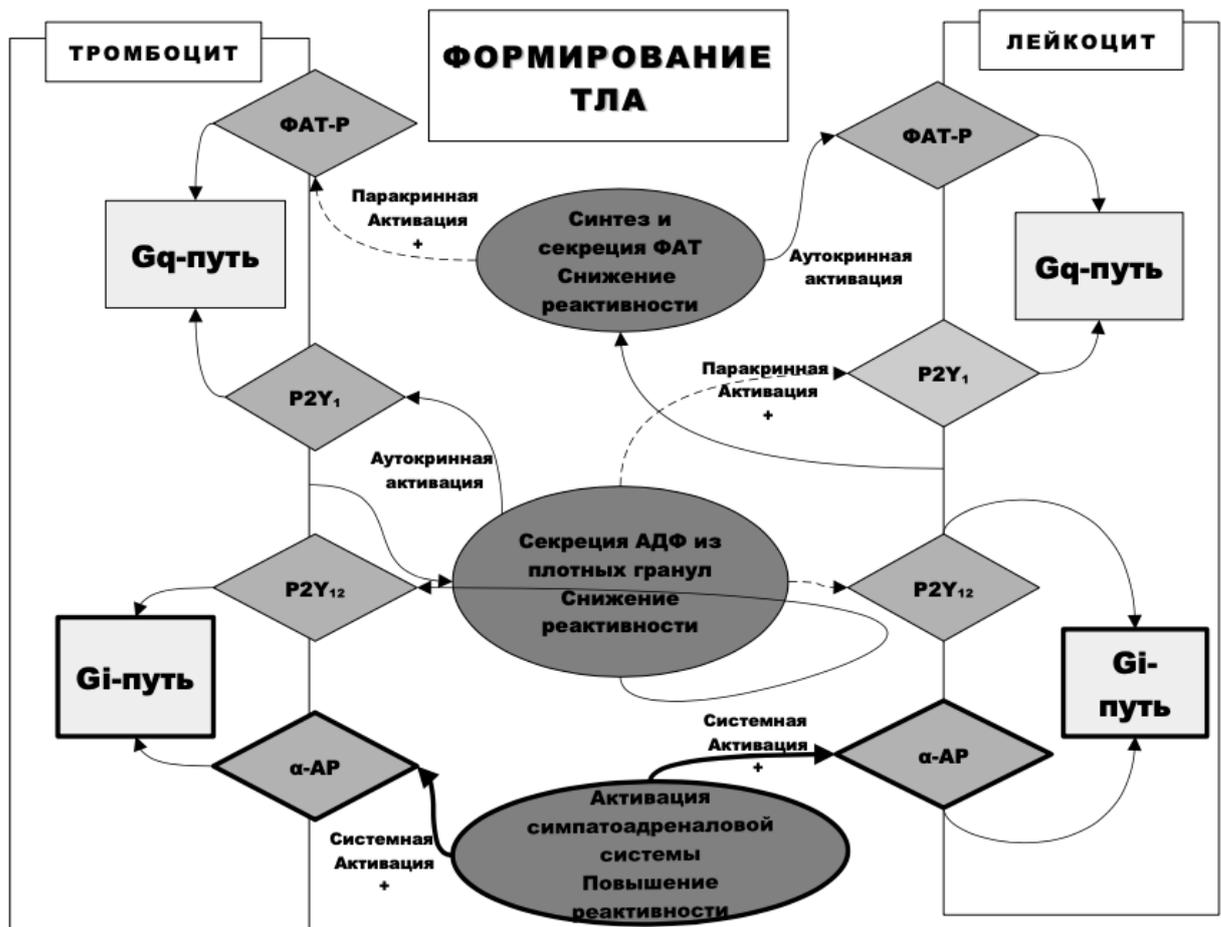


Рисунок 4.7. Схема механизмов регуляции формирования ТЛА у пациентов с гипердренореактивным фенотипом клеток крови.

Примечание. Ведущее звено механизма формирования выделено черными стрелками. «+» – положительная связь.

Таким образом, кластер рецепторов может быть представлен следующим образом: активность $\alpha 2$ -адренорецептора > активности P2Y-рецептора = активности ФАТ-рецептора. Корреляционный анализ выявил взаимосвязь системного и паракринных механизмов, регулирующих воспалительную реакцию. В частности, установлена высокая сила связи между количеством ТЛА, сформировавшихся при инкубации клеток крови с адреналином, АДФ и ФАТ ($r_{\text{Адрен-АДФ}}=0,97$, $P<0,001$; и $r_{\text{Адрен-ФАТ}}=0,96$; $P<0,001$). Между количеством ТЛА, сформировавшихся при действии АДФ и ФАТ также обнаружена сильная положительная корреляция ($r=0,98$; $P<0,001$). Представленные данные свидетельствуют, что при гипердренореактивном фенотипе клеток крови у пациентов с фазой ремиссии: (а) системная активация САС является доминирующей и обеспечивает стимуляцию Тц и Лц; (б) адаптационные механизмы Лц и Тц (аутокринная и паракринная стимуляция) обеспечивают взаимную индукцию клеток крови при формировании ТЛА, однако воспроизводимый эффект ниже, чем при системной активации САС.

4.5. Реактивность лейкоцитов на системные и паракринные лиганды у пациентов с гипердренергическим фенотипом клеток крови в фазе ремиссии ХОПН

До настоящего времени остается вопрос – какие могут активироваться при переходе от хронического к острому воспалению в МВП, какие факторы риска могут спровоцировать развитие рецидива и какие молекулярные механизмы принимают в этом участие? При этом также вопрос различий реактивности Лц в составе ТЛА при индукции агонистов различного механизма действия представляется особенно актуальным.

Можно попытаться ответить на данные вопросы посредством анализа клеточного состава ТЛА, сформировавшихся у пациентов с гипердренореактивным фенотипом клеток крови, т.е. когда Лц прекондиционированы для рекрутирования из крови в ткани (Таблица 4.4.).

Характеристика клеточного ТЛА у пациентов с гиперадренореактивным фенотипом клеток крови в фазе ремиссии ХОПН.

Показатель	Ср. значение ±ошибка ср.зн.	95% ДИ	Достоверность различий
Лц в составе ТЛА до инкубации			
Суммарное значение ТЛА	3,909±0,31	3,207 – 4,611	
Нейтрофилы	3,5±0,447	1,850– 4,15	P ₁ =0,044
Моноциты	1,3±0,244	0,919 – 2,18	P ₁ =0,012
Лимфоциты	1,0±0,0	1,0 – 1,0	P ₁ =0,011
Лц в составе ТЛА после инкубации адреналином			
Суммарное значение ТЛА	7,0±0,94	4,867 – 9,133	
Нейтрофилы	4,5±0,67	2,776 – 6,224	
Моноциты	2,0±0,0	2,000 – 2,000	
Лимфоциты	2,5±0,67	0,776 – 4,224	P ₁ – увеличение в 2,5 раза P ₂ = 0,009
Эозинофилы	1,0±0,0	1,0 – 1,0	
Лц в составе ТЛА после инкубации АДФ			
Суммарное значение ТЛА	6,333±2,33	3,25 – 9,25	
Нейтрофилы	3,9±0,223	2,925 – 4,075	
Моноциты	2,0±0,0	2,0 – 2,0	P ₂ =0,004
Эозинофилы	3,0±0,0	3,0 – 3,0	
Лц в составе ТЛА после инкубации ФАТ			
Суммарное значение ТЛА	9,2±1,775	5,184 – 13,2	
Нейтрофилы	4,333±0,954	1,879 – 6,787	P ₁ =0,041
Моноциты	2,2±0,489	0,839 – 3,56	
Лимфоциты	3,0±0,365	2,061 – 3,938	P ₂ < 0,0001
Эозинофилы	1,333±0,21	0,791 – 1,875	

Примечание: P₁ – сравнение показателя с контрольной группой; P₂ – с уровнем до инкубации. В таблице представлены данные, которые статистически значимо отличались на уровне P<0,05.

Как уже отмечалось, одним из факторов риска рецидива ХОПН является активация САС. Оказалось, что адреналин индуцировал все основные формы Лц, при этом наиболее выраженную реактивность демонстрировали Лфц (количество ТЛА с их участием возросло в 2,5 раза; $P=0,011$), далее следовали Мц (на 53,84%; $P=0,012$) и нейтрофилы (на 28,57%; $P=0,044$).

Обращает на себя внимание появление в составе агрегатов Эо при стимуляции адреналином. Корреляционный анализ выявил наличие положительной значимой связи между представленными в агрегатах Нф и Мц ($r=0,9$; $P<0,001$), а также негативной связи между Нф и Лф ($r=-0,896$; $P=0,003$), Нф и Эо ($r=-0,923$; $P<0,001$).

Таким образом, (а) активация $\alpha 2$ -адренорецепторов имела место на всех Лц; (б) при возможной реализации острого воспаления может происходить потенцирование эффектов Нф и Мц; (в) взаимодействие Нф с Лфц и Эо, отражает включение компенсаторных реакций, направленных, соответственно, на ингибирование функции Лфц, тем самым обеспечивается супрессия иммунных реакций и ограничивается активация Нф; (г) появление в составе ТЛА Эо представляет собой компенсаторную реакцию, направленную на ограничение активации Нф.

Активация пуриновых рецепторов на клетках крови при воспалении рассматривается как результат повышения уровня АТФ и АДФ в циркулирующей крови при гипоксии/ишемии тканей и/или воздействия стимулированных Тц на Лц. У здоровых лиц АДФ вызывал выраженную стимуляцию Нф (отмечено повышение уровня ТЛА, включающих эти Лц, более чем в 2 раза; $P < 0,05$). В фазу ремиссии эффект АДФ распространялся на Мц (повышение ТМА на 53,84%; $P=0,004$) и Эо (появление ТЭоА, отсутствовавших до стимуляции агонистом). Возрастала сила негативной корреляции между количеством ТНфА и ТМА ($r=-0,98$; $P=0,02$) и появлялась таковая между количеством ТНфА и ТЭоА ($r=-0,9$; $P<0,001$).

Можно констатировать, что (а) пуриновые P2Y-рецепторов принимают участие в активации Мц и Эо, причем эти Лц могут стимулироваться как

системным регулятором (катехоламины), так паракринными регуляторами АТФ и АДФ, которые секретируются Тц; (б) снижение влияния пуринергической сигнализации в Нф связано с функциональной активностью Мц и Эо.

Процесс аутокринной стимуляции Лц посредством ФАТ-рецепторов рассматривается как фактор риска самоподдержания высокой функциональной активности Нф. Активация ФАТ-рецепторов на Тц отражает влияние Нф в процессе межклеточной кооперации клеток крови. У здоровых лиц ФАТ вызывал селективную стимуляцию Нф (отмечено повышение уровня ТНфА, включающих эти Лц в 2,3 раза ($P=0,016$)). При этом не выявлено значимой корреляции между количеством ТЛА различного состава. В фазу ремиссии стимулирующий эффект ФАТ на Нф сохранялся, хотя и был значительно меньше, чем в контрольной группе. Прирост ТНфА у пациентов с ХОПН составил 21,4% ($P=0,041$), по сравнению с базальным уровнем. Уровень Т-Лфц-А вырос при аутокринной стимуляции ФАТ, по сравнению с базального уровня в 3 раза ($P<0,0001$). Однако, была выявлена негативная корреляция между количеством ТНфА и ТЛфА ($r= -0,871$; $P= 0,024$), что отражает наличие функциональной отрицательной связи при взаимодействии Тц, Нф и Лф.

Таким образом, можно констатировать, что: (а) активация ФАТ-рецепторов имеет место на Нф и Лфц, причем эти Лц могут стимулироваться САС, а значит, возможно потенцирование эффектов ФАТ-рецептора и $\alpha 2$ -адренорецептора; (б) имеет место резистентность ФАТ-рецепторов Мц; (в) усиление стимуляции Нф посредством ФАТ-рецептора может ограничивать активность Лф, тем самым, ингибируется поддержание хронического воспаления в МВП.

Полученные результаты позволяют сформулировать концепцию механизмов контроля активности Лц при выборе направления и скорости развития воспалительной реакции в МВП.

При этом исходили из понимания, что:(а) клетки крови у пациентов в фазу ремиссии ХОПН представляет собой динамическую систему, состояние которой поддерживается балансом стимуляторов и ингибиторов; (б) Нф играют ключевую роль в развитии острой воспалительной реакции. Анализ клеточного состава ТЛА

показал, что усиление функциональной активности Нф в фазу ремиссии ХОПН может быть связано с их аутокринной стимуляцией посредством ФАТ-рецепторов и/или системной стимуляцией клеток крови при активации САС. В последнем случае возможна как прямая стимуляция $\alpha 2$ -адренорецепторов на поверхности Нф, так и – опосредованная Мц, которые при стимуляции $\alpha 2$ -адренорецепторов секретируют цитокины, регулирующие функцию Нф [146]. Выбор пути развития/поддержания хронического воспаления может быть связан с ингибированием активности Нф, и сопутствующей активацией Лф и М. При этом М (в случае активации P2Y-рецепторов) и Эо (при совместной активации $\alpha 2$ -адренорецепторов и пуриновых P2Y-рецепторов) могут снижать функциональную активность Нф. Что касается активации Лф – данный эффект может быть связан со стимуляцией $\alpha 2$ -адренорецепторов и ФАТ-рецепторов? для поддержания хронического воспаления [109, 121, 166], однако может лимитироваться активными Нф, секретирующими ФАТ.

4.6. Формирование ТЛА при стимуляции тромбоцитов и лейкоцитов у пациентов в фазе рецидива ХОПН

Установлено, что количество ТЛА, образовавшихся при инкубации клеток крови с адреналином, возросло по сравнению с контрольной группой на 73,5% ($P=0,002$) и на 15,5% относительно их числа до стимуляции ($P=0,049$) (Таблица 4.5.). Примечательно, что относительно пациентов в фазе ремиссии наблюдался прирост на 33,85% ($P=0,022$) до инкубации агонистами. Следовательно, рекрутирование Лц при остром воспалении в МВП может воспроизводиться адреналином, путем активации $\alpha 2$ -адренорецепторов на клетках крови. Стимуляция клеток крови посредством АДФ также сопровождалась повышением количества ТЛА на 22,9% ($P=0,022$), по сравнению с контрольной группой и на 21,2%, по сравнению с их базальным содержанием в мазках крови до стимуляции данным агонистом ($P=0,028$).

Уровень индукции адреналина и АДФ на формирование ТЛА был сходен ($p = 0,471$). Относительно фазы ремиссии ХОПН количество ТЛА при влиянии

индукционного действия АДФ возросло на 56,03% ($P=0,019$). Таким образом, формирование ТЛА в фазу рецидива ХОПН: (а) происходит с участием активированных Тц, секретирующих АДФ; (б) сопровождается гиперреактивностью пуриновых рецепторов $P2Y_1$ и $P2Y_{12}$ на Лц; (г) эффект паракринной регуляции посредством Тц сопоставим с эффектом системной регуляции катехоламинов, обеспечивающей активацию Лц посредством $\alpha 2$ -адренорецептора.

Таблица 4.5.

Количество ТЛА (%) при стимуляции Тц и Лц *in vitro* у пациентов с рецидивом ХОПН.

Условия исследования	$\bar{x} \pm m$ (%)	Min. – Max.	95% ДИ (лев.–прав.)
До стимуляции клеток крови	8,118 \pm 0,528 $P_1 < 0,0001$ $P_p = 0,023$	6,0 – 13,0	6,999 – 9,236
Стимуляция клеток крови адреналином	9,375 \pm 0,746 $P_1 = 0,002$ $P_2 = 0,049$ $P_p = 0,022$	4,0 – 14,0	7,784 – 10,9
Стимуляция клеток крови АДФ	9,833 \pm 0,767 $P_1 = 0,022$ $P_2 = 0,028$ $P_p = 0,019$	6,0 – 13,0	8,145 – 11,5
Стимуляция клеток крови ФАТ	12,1 \pm 1,162 $P_1 = 0,008$ $P_2 = 0,011$ $P_3 = 0,008$ $P_4 = 0,025$ $P_p = 0,046$	8,0 – 22,0	9,633 – 14,6

Примечание: P_1 – сравнение показателя с уровнем до инкубации; P_2 – с контрольной группой здоровых лиц; P_3 – с уровнем индукции адреналином; P_4 – с уровнем индукции АДФ; P_p – сравнение с показателем пациентов с ХОПН в фазе ремиссии.

При использовании ФАТ количество ТЛА возросло на 49,4% ($P=0,011$), по сравнению с количеством до стимуляции, что подтверждает участие ФАТ-

рецепторов в активации клеток крови. Количество ТЛА, сформировавшихся в фазу рецидива ХОПН при инкубации крови с ФАТ, превышает на 55,12% ($P=0,008$) число ТЛА в контрольной группе, которые сформировались в аналогичных условиях инкубации.

Можно констатировать, что повышение реактивности ФАТ-рецепторов клеток крови имеет место при наличии острого воспаления в МВП и функционировании паракринного механизма стимуляции Лц при формировании ТЛА (Рисунок 4.8.).



Рисунок 4.8. Схема механизмов регуляции формирования ТЛА у пациентов в фазе ремиссии и рецидива ХОПН.

Примечание. Ведущее звено механизма формирования выделено пунктирной и черной стрелками.

В этой связи, можно полагать, что паракринная стимуляция активированных Лц воспроизводила эффект образования ТЛА, который

сопоставим с системным механизмом, возникающим при повышении уровня катехоламинов в циркулирующей крови. Также отсутствует разница в количестве ТЛА при воздействии ФАТ и АДФ, что, означает совпадение агрегатформирующего потенциала паракринных механизмов Тц и Лц. При воздействии на клетки крови ФАТ в фазу рецидива ХОПН выявлено выраженное формирование ТЛА по сравнению с фазой ремиссии заболевания (на 32%; $P=0,046$), что отражает усиление влияния активированных Лц на Тц. Таким образом, установлено, что в фазе ремиссии и рецидива ХОПН формирование ТЛА и рекрутирование Лц крови из циркулирующей крови в очаг воспаления достигается посредством включения системного (влияние адреналина) и паракринных механизмов (секреция АДФ и ФАТ), зависит от активности $\alpha 2$ -адренорецепторов, пуриновых P2X-, P2Y-рецепторов и ФАТ-рецептора клеток крови. Причем аутокринная стимуляция Лц посредством ФАТ воспроизводила большее количество агрегатов, по сравнению с системным механизмом адреналина и паракринным механизмом Тц. Таким образом, анализируя показатели формирования ТЛА при индукции ФАТ, можно заключить, что паракринная стимуляция Тц и аутокринная активация Лц являются стереотипным регулятором клеток крови в фазе ремиссии и рецидива ХОПН.

4.8. Фенотипы клеток крови как проявление индивидуальной реактивности организма у пациентов в фазе рецидива ХОПН

Гипотеза, у пациентов в фазе рецидива также (как и у пациентов в фазе ремиссии) присутствуют специализированные фенотипы клеток крови, следствием чего является различная реактивность Тц и Лц, участвующих в формировании ТЛА. Такие фенотипы клеток крови могут быть индикаторами перехода воспаления из фазы рецидива ХОПН в фазу ремиссии (гипореактивный фенотип); ранней фазы (инициации) острой воспалительной реакции, проявляющийся усилением рекрутирования Нф путем формирования ТЛА

(нормопуринергический фенотип), или усиления тяжести воспалительной реакции (гиперреактивный фенотип).

Для проверки данной гипотезы когорту пациентов с фазой рецидива ХОПН распределили на три группы в зависимости от количества циркулирующих ТЛА (базальный уровень формирования ТЛА). Критерием распределения являлись: среднее значение количества ТЛА, а также значения левой и правой границ 95% ДИ (Таблица 4.6.). Соответственно гипореактивный фенотип клеток характеризовался наличием до 6 агрегатов/поле зрения или таковые отсутствовали, а гиперреактивный – 9 и более агрегатов/ поле зрения.

При индукции агонистами клеток крови в трех выделенных фенотипах обнаружена следующая закономерность – реактивность $\alpha 2$ -адренорецептора, пуриновых рецепторов и ФАТ-рецепторов на Тц и Лц соответствовала искомому фенотипу. Данный феномен отражает наличие гипо-, нормо- или гиперреактивности $\alpha 2$ -адренорецептора, P2Y-рецепторов и ФАТ-рецептора в соответствующем фенотипе клеток крови. При выборе информативного индикатора, который позволяет объективно разграничивать реактивность клеток можно воспользоваться реактивностью как P2Y-рецепторов, так и ФАТ-рецептора. В данном исследовании использована реактивностью как P2Y-рецепторов, поскольку внутриклеточная сигнализация сопряжена как с Gi-, так и Gq-белками. В этой связи, реактивность ФАТ-рецептора представляется как производное активности P2Y-рецепторов.

При исследовании гипопуринергического фенотипа клеток установлено, что реакция на адреналин была сопоставимой с таковой в контрольной группе ($P = 0,784$). В то время как индукция АДФ и ФАТ были снижены на 21,95% ($P = 0,05$) и на 21,17% ($P = 0,019$) соответственно.

Формирование ТЛА при индукции агонистами у пациентов в фазе рецидива ХОПН.

Условия индукции	Гипопурин. фенотип (n=34) ср.зн.±ош.ср. 95%ДИ	Нормопурин. фенотип (n=34) ср.зн.±ош.ср. 95%ДИ	Гиперпурин. фенотип (n=37) ср.зн.±ош.ср. 95%ДИ
До стимуляции	3,5±0,422 2,501 – 4,499 P ₁ = 0,0001	6,579±0,192 6,175 – 6,983 P ₁ = 0,0001	10,1±0,112 9,919 – 10,4 P ₁ = 0,0001
Индукция адреналином	5,25±0,295 4,62 – 5,88 P ₂ < 0,0001	9,647±0,647 8,275 – 11,01 P ₁ = 0,0001 P ₂ = 0,0001	10,6±0,266 9,997 – 11,2 P ₁ < 0,0001
Индукция АДФ	6,562±0,273 5,98 – 7,145 P ₁ = 0,05 P ₂ < 0,0001 P ₃ = 0,002	8,625±0,546 7,459 – 9,79 P ₂ = 0,0006	12,3±0,421 11,2 – 13,4 P ₁ = 0,005 P ₂ = 0,002 P ₃ = 0,007
Индукция ФАТ	6,437±0,273 5,855 – 7,02 P ₁ = 0,0192 P ₂ < 0,0001 P ₃ = 0,006	11,3±0,825 9,553 – 13,07 P ₁ = 0,005 P ₂ = 0,0004	12,0±0,755 10,2 – 13,7 P ₁ = 0,0002 P ₂ = 0,05 P ₃ = 0,05
Кластер	АДФ=ФАТ >адреналин	ФАТ=АДФ =адреналин	АДФ=ФАТ >адреналин

Примечание: P₁ – сравнение с контрольной группой здоровых лиц; P₂ – до стимуляции (базальный уровень ТЛА); P₃ – при стимуляции адреналином; P₄ – при инкубации АДФ.

Таким образом, у пациентов в фазе рецидива можно констатировать сниженный ответ формирования ТЛА на АДФ и ФАТ при острой воспалительной реакции, вследствие снижения сигнализации P2Y-рецепторов и ФАТ-рецептора. Представляет интерес кластер рецепторов активности гипопуринергичного фенотипа.

Проведенный анализ показал, что активность P2Y-рецепторов была на 24,9% ($P=0,003$) выше, чем таковая $\alpha 2$ -адренорецептора и совпадала с активностью ФАТ-рецептора ($P=0,749$). По степени влияния на формирование ТЛА активность рецепторов может быть представлена следующим образом: активность P2Y-рецепторов = активности ФАТ-рецептора > активности $\alpha 2$ -адренорецептора (Рисунок 4.9.).



Рисунок 4.9. Схема механизмов регуляции формирования ТЛА у пациентов с гипопуринергическим фенотипом клеток крови.

Примечание. Ведущее звено механизма формирования выделено пунктирной и черной стрелками. «+» - положительная связь.

При формировании ТЛА выявлена корреляционная связь между активностью P2Y-рецепторов и $\alpha 2$ -адренорецептора ($r_{\text{АДФ-Адр}}=0,9$, $P<0,0001$); между активностью P2Y-рецептора и ФАТ-рецептора ($r_{\text{ФАТ-АДФ}}=0,89$, $P<0,0001$), а также между активностью ФАТ-рецептора и $\alpha 2$ -адренорецептора ($r_{\text{ФАТ-Адр}}=0,98$; $P<0,001$).

Следовательно, в фазе рецидива ХОПН имеются пациенты с гипопуринергическим фенотипом клеток крови, у которых снижено индуцированное агонистами формирование ТЛА. Десенситизация P2Y-рецепторов и ФАТ-рецептора на клетках крови может быть следствием ограничения компенсаторных реакций Тц или включения «ингибирующего» влияния Нф посредством функциональной обратной связи. Взаимодействие P2Y-рецепторов, ФАТ-рецептора и $\alpha 2$ -адренорецептора может при необходимости усиливать рекрутирование Лц.

При наличии нормопуринергического фенотипа (Рисунок 4.10.) клеток крови количество ТЛА увеличивалось при индукции адреналином на 78,6% ($P=0,0001$), при индукции АДФ – на 25% ($P=0,048$), при индукции ФАТ – на 45,02% ($P = 0,005$), по сравнению с контрольной группой.

Статистически значимых различий между показателями формирования ТЛА при стимуляции P2Y-рецепторов, ФАТ-рецептора и $\alpha 2$ -адренорецептора выявлено не было. Выявлены корреляционные связи между активностью ФАТ-рецепторов и $\alpha 2$ -адренорецептора ($r_{\text{ФАТ-адреналин}} 0,863$; $P<0,001$), а также активностью P2Y-рецепторов и $\alpha 2$ -адренорецептора ($r_{\text{АДФ-адреналин}} 0,542$; $P=0,03$). Представленные факты позволяют заключить, что системная регуляция клеток крови при активации САС может усиливать эффект паракринной стимуляции Лц (синергия с ФАТ-рецептором) и Тц (синергия с P2Y-рецепторы) при формировании ТЛА (Рисунок 4.10.).

При наличии гиперпуринергического фенотипа клеток крови количество ТЛА увеличивалось при индукции адреналином на 98,0% ($P<0,0001$), АДФ – на 54,1% ($P = 0,005$), и ФАТ – на 53,8% ($P = 0,0002$), по сравнению с контрольной

группой здоровых лиц. Формирование ТЛА при стимуляции P2Y-рецепторов и ФАТ-рецептора было сопоставимым ($P=0,732$).

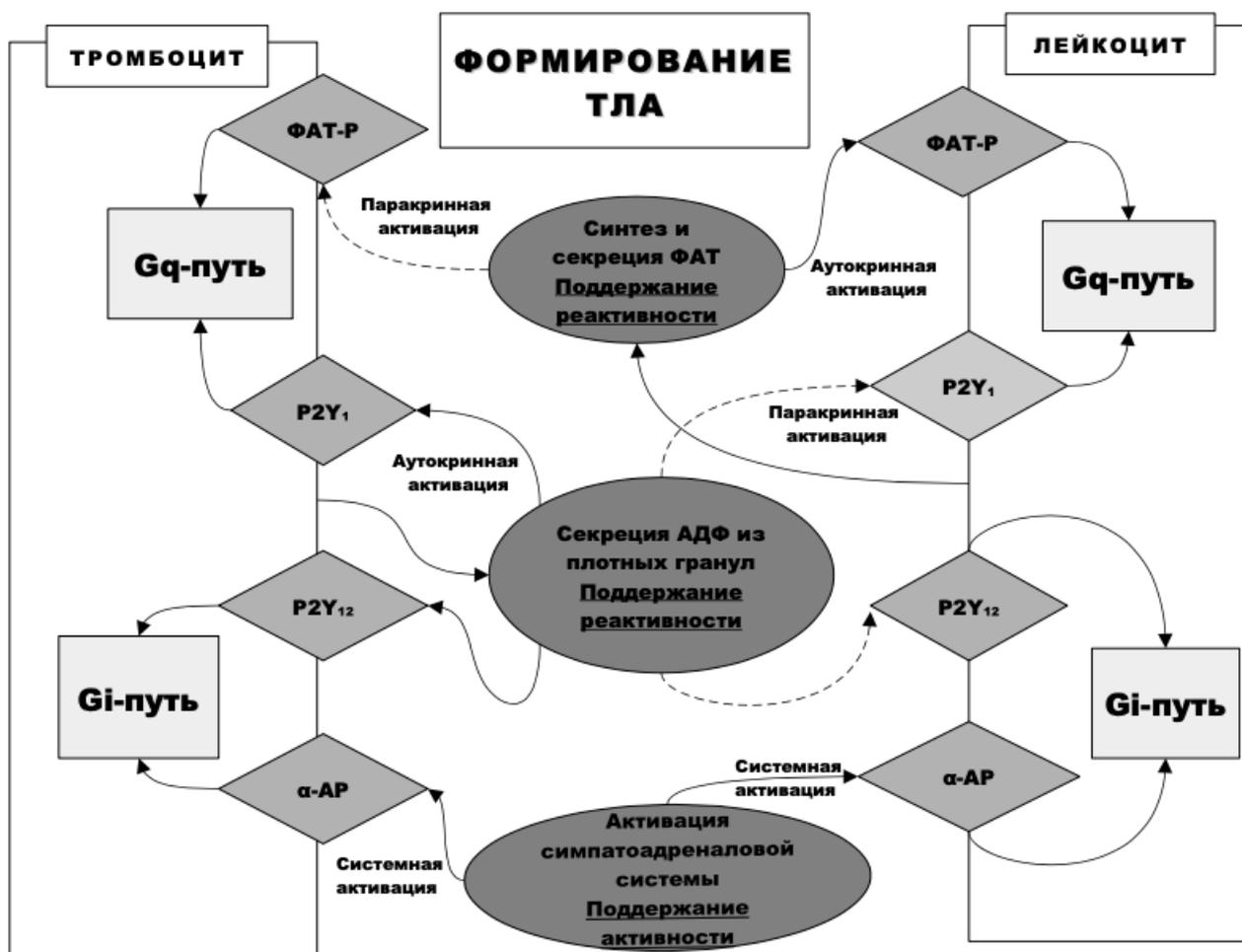


Рисунок 4.10. Схема механизмов регуляции формирования ТЛА у пациентов с нормопуринергическим фенотипом клеток крови.

Примечание. Ведущее звено механизма формирования выделено пунктирной и черной стрелками.

Эффект стимуляции α_2 -адренорецептора при образовании ТЛА был на 23,3% ($P = 0,007$) меньше, чем при стимуляции P2Y-рецепторов и на 20,0% ($P=0,05$), чем при стимуляции ФАТ-рецептора. Кластер активности рецепторов можно представить в виде: активность P2Y-рецепторов=активности ФАТ-рецептора >активности α_2 -адренорецептора. Выявлена корреляционная связь между активностью P2Y-рецепторов и α_2 -адренорецептора ($r_{\text{адф-адреналин}} = 0,899$; $P=0,001$); Также сильная положительная связь была определена между α_2 -

адренорецептора и ФАТ-рецептора ($r_{\alpha\text{AP-ФАТ}}=0,847$; $P=0,001$) и между P2Y-рецепторов и ФАТ-рецептора ($r_{\text{P2Y-ФАТ}}=0,732$; $P=0,025$). Полученные данные свидетельствуют, что у пациентов с гиперпуринергическим фенотипом клеток крови поддержание острой воспалительной реакции может быть связано с: (а) эффективной межклеточной кооперацией Тц и Лц при формировании ТЛА; (б) синергией $\alpha 2$ -адренорецептора с P2Y-рецепторами и ФАТ-рецептором клеток крови, обеспечивающей увеличение количества ТЛА (Рисунок 4.11.).

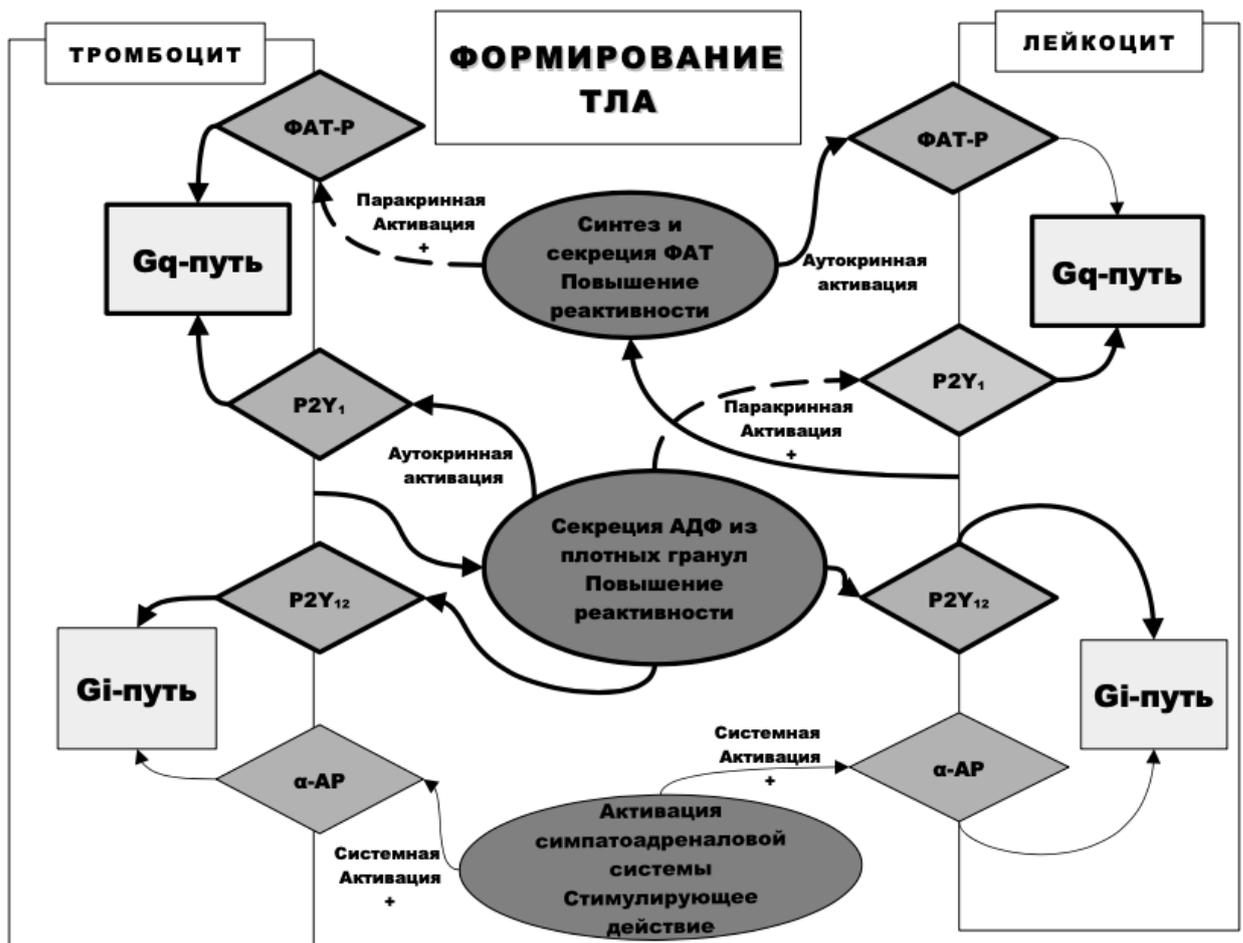


Рисунок 4.11. Схема механизмов регуляции формирования ТЛА у пациентов с гиперпуринергическим фенотипом клеток крови.

Примечание. Ведущее звено механизма формирования выделено пунктирной и черной стрелками. «+» - положительная связь.

Гипер- и нормопуринергические фенотипы клеток крови характеризовались сходной активностью ФАТ-рецептора и $\alpha 2$ -адренорецептора, что подтверждает гипотезу об отличиях реактивности Тц и Лц, принимающих участие в воспалительной реакции. Логично предположить, что клетки крови, участвующие в острой воспалительной реакции, обладают сходной реактивностью в отношении адреналина и ФАТ, позволяющей поддерживающих воспаление в МВП. При этом фактором ограничивающим формирование ТЛА и рекрутирование клеток крови может являться различная реактивность P2Y-рецепторов Тц.

В сущности, повышение аутокринной стимуляции активности P2Y-рецепторов может быть механизмом усиления острой воспалительной реакции, отражением чего является гиперпуринергический фенотип клеток крови. Нормореактивность P2Y-рецепторов на Тц при наличии гиперреактивности ФАТ-рецептора и $\alpha 2$ -адренорецептора, вероятно, отражает синергизм рецепторов, позволяющий «запускать» формирование ТЛА для поддержания острой воспалительной реакции. В этом случае аутокринная стимуляция Тц является триггером развития воспаления в фазе рецидива.

4.9. Реактивность различных форм лейкоцитов у пациентов с нормопуринергическим и гиперпуринергическим фенотипом клеток крови.

Наличие фенотипов клеток крови у пациентов в фазе рецидива ХОПН отражает разные процессы развития острой воспалительной реакции. Так, гипопуринергический фенотип представлен клетками с низкой функциональной активностью, которые не могут участвовать в воспалительной реакции. Гиперпуринергический фенотип клеток участвует в острой воспалительной реакции. Остается спорной роль нормопуринергического фенотипа в патогенезе острого пиелонефрита.

Гипотеза. Можно предположить, что нормопуринергический фенотип является резервным и не принимает участие в воспалительной реакции, но тогда клеточный состав ТЛА должен соответствовать таковому у здоровых лиц. Либо,

мы сталкиваемся с прекондиционированием Тц и Лц, когда имеет место ранняя фаза острой воспалительной реакции. В этом случае количество Нф в составе ТЛА будет выше, чем у здоровых лиц, но меньше, чем в фазу рецидива при наличии гиперпуринергического фенотипа.

Исследовательский вопрос – отличается ли количество Нф в составе циркулирующих ТЛА (базальный уровень ТЛА) у здоровых лиц и пациентов в фазе рецидива с различными фенотипами клеток крови? Оценивая взаимодействие клеточных элементов у пациентов с нормопуринергическим фенотипом клеток крови при формировании ТЛА, было выявлено увеличение Нф в составе ТЛА (по сравнению с контрольной группой здоровых лиц) на 71% ($P = 0,001$) (Таблица 4.7.).

Следовательно, при наличии нормореактивности P2Y-рецепторов на клетках крови у данного контингента больных имеются условия для усиления рекрутирования Нф с целью поддержания острой воспалительной реакции в МВП. При стимуляции $\alpha 2$ -адренорецептора количество Нф в составе ТЛА возросло на 42,9% ($P = 0,013$), P2Y-рецептора – 41,9% ($P = 0,025$) и ФАТ-рецептора – на 57,9% ($P < 0,001$), по сравнению с их количеством до стимуляции рецепторов.

Таким образом, при наличии нормопуринергического фенотипа клеток крови стимуляция рецепторов, связанных с индукцией воспалительной реакции, сопровождается повышением рекрутирования Нф, тем самым подтверждается возможность развития ранней фазы острой воспалительной реакции. При этом ведущую роль в активации Тц и Нф играет активность ФАТ-рецептора. Вероятно, сигнальный путь, связанный с ФАТ-рецептором является ведущим рекрутирования неактивных «интактных» Нф и Тц. Следовательно, у пациентов с нормопуринергическим фенотипом клеток крови активация ФАТ-рецептора является триггером вовлечения в воспалительный процесс интактных Нф.

Также установлено, что при стимуляции $\alpha 2$ -адренорецептора количество Нф в составе ТЛА возросло на 73,7% ($P = 0,011$), P2Y-рецептора – на 17,8% ($P = 0,012$) и ФАТ-рецептора – на 17,4% ($P = 0,019$).

Характеристика нейтрофилов в составе ТЛА у пациентов с различными фенотипами клеток крови в фазе рецидива ХОПН

Показатель	Ср. значение ±ошибка ср.зн.	95% ДИ	Достоверность различий
Количество НФ в составе ТЛА у пациентов с гипопуринергическим фенотипом			
До инкубации с агонистами	3,0±0,288	2,334 – 3,666	
После инкубации с адреналином	3,667±0,441	2,650 – 4,684	
После инкубации с АДФ	4,333±0,726	2,658 – 6,009	P ₂ = 0,006
После инкубации с ФАТ	5,888±0,512	4,707 – 7,07	P ₁ = 0,005
Количество НФ в составе ТЛА у пациентов с нормопуринергическим фенотипом			
До инкубации с агонистами	5,136±0,356	4,396 – 5,877	P ₂ = 0,001
После инкубации с адреналином	7,333 ±0,648	5,98 – 8,686	P ₁ = 0,01 P ₂ = 0,01
После инкубации с АДФ	7,289±0,742	5,729 – 8,85	P ₁ = 0,025 P ₂ = 0,012
После инкубации с ФАТ	8,1±0,66	6,717 – 9,483	P ₁ = 0,0002 P ₂ = 0,019
Количество НФ в составе ТЛА у пациентов с гиперпуринергическим фенотипом			
До инкубации с агонистами	6,364±0,876	5,41 – 8,317	P ₂ < 0,0001
После инкубации с адреналином	8,6± 0,9	6,543 – 10,6	P ₁ = 0,018 P ₂ = 0,002
После инкубации с АДФ	8,571±1,6014	7,653 – 12,4	P ₁ = 0,051 P ₂ = 0,018
После инкубации с ФАТ	10,6±1,627	6,918 – 14,2	P ₁ = 0,05 P ₂ = 0,042

Примечание: P₁ – сравнение показателя относительно базального уровня ТЛА до инкубации с агонистами; P₂ – относительно значений контрольной группы здоровых лиц.

В этой связи можно констатировать, что, по сравнению с их количеством в контрольной группе пациентов с нормопуринергическим фенотипом клеток, стимуляция $\alpha 2$ -адренорецептора является ведущим механизмом взаимодействия активированных Тц и Нф.

Содержание разных видов Лц в составе ТЛА при анализе мазков крови без добавления агонистов не отличалось от такового, по сравнению с контрольной группой, у пациентов с нормопуринергическим фенотипом клеток крови (Таблица 4.8.). Выявлена отрицательная корреляционная связь между количеством Нф и Эо в составе ТЛА ($r_{\text{нф-эо}} = -0,829$; $P=0,021$) и положительная связь между количеством Мц и Лфц в составе агрегатов ($r_{\text{мц-лфц}} = 0,809$ $p= 0,002$). В этом контексте, можно констатировать, что Нф и Эо конкурируют за кооперацию с Тц, тогда как М и Лф поддерживают формирование ТЛА с их участием.

При инкубации клеток крови с адреналином количество Лфц в составе ТЛА увеличилось на 13,9 % ($P= 0,003$), а содержание Эо снижалось 2 раза ($P = 0,044$), по сравнению с их содержанием в ТЛА в контрольной группе.

Корреляционный анализ выявил отрицательную связь между количеством Нф и Мц в составе ТЛА ($r_{\text{нф-мц}} = -0,782$; $P=0,0009$), а также между Нф и Лфц в составе ТЛА ($r_{\text{нф-лфц}} = -0,411$; $P=0,09$). При этом между количеством Мц и Лфц отмечалась положительная корреляционная связь ($r_{\text{мц-лфц}} = 0,562$; $P= 0,05$).

Таким образом: стимуляция $\alpha 2$ -адренорецептора на клетках крови проявлялась (а) преимущественной активацией Нф; (б) взаимодействием Мц и Лфц, направленным на ограничение формирования агрегатов Нф и Тц.

В группе пациентов с гиперпуринергическим фенотипом клеток при формировании ТЛА было выявлено увеличение Нф в составе ТЛА в 2,1 ($P<0,001$), относительно контрольной группы и на 23,9% ($P=0,0001$), по сравнению с нормопуринергическим фенотипом. Следовательно, у данного контингента больных значительно увеличено количество интактных Нф в составе ТЛА, по сути создается пул Нф, необходимый для реализации острой воспалительной реакции.

**Характеристика клеточного ТЛА у пациентов с
нормопуринергическим фенотипом клеток крови в фазе рецидива ХОПН.**

Показатель	Ср. значение \pm ошибка ср.зн.	95% ДИ	Достоверность различий
Лц в составе ТЛА до инкубации			
Нф	5,136 \pm 0,356	4,396 – 5,877	$P_2 = 0,001$
Мц	1,469 \pm 0,14	1,169 – 1,768	
Лфц	1,765 \pm 0,182	1,378 – 2,152	
Эо	1,1875 \pm 0,131	0,876 – 1,498	
Лц в составе ТЛА после инкубации адреналином			
Нф	7,333 \pm 0,648	5,980 – 8,686	$P_1 = 0,013$ $P_2 = 0,011$
Мц	1,571 \pm 0,221	1,093 – 2,05	
Лфц	1,139 \pm 0,078	0,973 – 1,305	$P_2 = 0,003$
Эо	0,900 \pm 0,1	0,622 – 1,178	$P_2 = 0,044$
Лц в составе ТЛА после инкубации АДФ			
Нф	7,289 \pm 0,742	5,729 – 8,850	$P_1 = 0,025$ $P_2 = 0,012$
Мц	1,969 \pm 0,393	1,129 – 2,808	
Лфц	1,364 \pm 0,302	0,690 – 2,037	
Эо	1,200 \pm 0,2	0,645 – 1,755	
Лц в составе ТЛА после инкубации ФАТ			
Нф	8,100 \pm 0,66	6,717 – 9,483	$P_1 = 0,0002$ $P_2 = 0,019$
Мц	2,026 \pm 0,255	1,491 – 2,562	
Лфц	1,722 \pm 0,207	1,286 – 2,159	
Эо	1,682 \pm 0,37	0,855 – 2,508	$P_1 = 0,004$

Примечание: P_1 – сравнение показателя относительно базального уровня ТЛА до инкубации с агонистами; P_2 – относительно контрольной группы здоровых лиц.

При стимуляции $\alpha 2$ -адренорецептора на клетках крови количество Нф в составе ТЛА возросло на 35,1% ($P=0,018$), P2Y-рецепторов – 34,7% ($P=0,05$) и ФАТ-рецептора – на 66,6% ($P=0,05$), по сравнению с их количеством выявленном до стимуляции рецепторов

Таким образом, наличие гиперпуринергического фенотипа клеток крови отражает возможность участия всех исследованных рецепторов в мобилизации интактных Нф, причем доминирующую роль в этом процессе играет ФАТ-рецептор. Обращает на себя внимание, что при нормопуринергическом фенотипе клеток крови ведущую роль в трафике Нф играл $\alpha 2$ -адренорецептор. Если руководствоваться предназначением этих двух фенотипов клеток, то можно прийти к заключению, что на ранней стадии развития воспалительной реакции (нормопуринергический фенотип) инициация рекрутирования Нф обеспечивается посредством адренорецепторов, тогда как на поздней стадии – поддержание стабильного пула Нф мигрирующих в ткани МВП регулируется ФАТ-рецепторами, т.е. механизмом аутокринной стимуляции Лц. В процессе исследования оказалось, что при стимуляции $\alpha 2$ -адренорецептора количество Нф в составе ТЛА возросло в 2,0 раза ($P=0,002$), P2Y-рецептора – на 38,7% ($P = 0,018$) и ФАТ-рецептора – на 53,3% ($P=0,042$), по сравнению с их количеством в контрольной группе. Следовательно, у пациентов с гиперпуринергическим фенотипом клеток возрастает роль сигнализации, связанной с $\alpha 2$ -адренорецептором на Нф и/или Тц. В этой связи отмеченный эффект стимуляции ФАТ-рецептора при мобилизации Нф может быть следствием синергизма ФАТ-рецептора с и $\alpha 2$ -адренорецептора.

Таким образом, различная реактивность клеток крови в фазе ремиссии и рецидива ХОПН позволяет мониторить развитие и моделировать регуляцию воспалительной реакции в МВП. Остается открытым вопрос о селективной роли Тц в рекрутировании Лц из сосудистого русла при реализации хронической и острой воспалительной реакции в слизистой оболочке МВП.

ХАРАКТЕРИСТИКИ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ТРОМБОЦИТОВ ПРИ ФОРМИРОВАНИИ ТРОМБОЦИТАРНО-ЛЕЙКОЦИТАРНЫХ АГРЕГАТОВ У ПАЦИЕНТОВ С ХОПН

Гипотеза. Если ТЛА являются индикатором развития воспалительной реакции при обструкции мочеточника, то можно предположить участие в формировании циркулирующих агрегатов, как Лц, так и Тц. Полученные нами данные подтверждают, что процесс активации Лц может обеспечиваться посредством стимуляции пуриновых P₂-рецепторов при секреции Тц АТФ и АДФ (паракринная регуляция функциональной активности Лц) [80-82, 97]. Можно предположить, что в зависимости от спектра агонистов, вызывающих активацию Тц, и степени самой активации Тц, изменяется количество и состав активированных Лц, подлежащих рекрутированию из сосудистого русла в слизистую оболочку мочевыводящих путей (МВП). В этой связи:

(а) степень активации Тц может рассматриваться как наиболее ранний индикатор рекрутирования Лц, а агонисты (патогенетические факторы, индуцирующие активацию Тц) – как факторы риска развития острого воспаления;

(б) характеристики агрегатограммы (Slope, AUC) при активации Тц, вероятно, связаны с количеством и составом Лц, принимающих участие в воспалительной реакции. Следовательно, изучение агрегатограмм позволит идентифицировать внутриклеточную сигнализацию в Тц при рекрутировании Лц.

В литературе обсуждается участие Тц в воспалении, но отсутствует информация, конкретизирующая характеристики функциональной активности Тц при развитии воспаления [128, 129].

Цель исследования – изучить функциональную активность α 2-адренорецептора, P₂Y-рецепторов и ФАТ-рецептора и установить соответствующие параметры активации Тц (пути внутриклеточной сигнализации и количество Тц, вовлеченных в реакцию) при формировании ТЛА в фазе

ремиссии и рецидива ХОПН.

5.1. Референсные диапазоны индуцибельной агрегации тромбоцитов у здоровых волонтеров

Цель исследования – установить диапазон функциональной активности Тц у здоровых волонтеров при стимуляции $\alpha 2$ -адренорецептора, P2Y-рецепторов и ФАТ-рецептора. Выяснение данного вопроса позволит стандартизировать степень изменения активности Тц при ремиссии и рецидиве ХОПН относительно здоровых лиц.

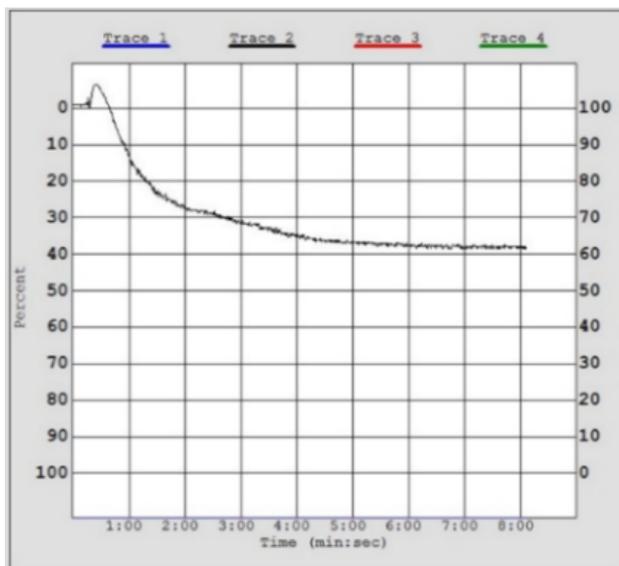
Амплитуда АТц для трех указанных рецепторов находится в диапазоне нормореактивности, т.е. при использовании $EC_{50\%}$ агониста воспроизводится агрегация в диапазоне $50,0 \pm 5,0\%$ (Таблица 5.1.). Обращает на себя внимание левая и правая граница референсного диапазона, отражающая индивидуальную реактивность пациентов. Так, в I квартиле активность $\alpha 2$ -адренорецептора соответствовала гипореактивности (95% левый ДИ – 41,2%), тогда как для P2Y-рецепторов и ФАТ-рецептора – нормореактивности (95% левый ДИ соответственно, 47,1% и 45,1%). В III квартиле активность всех рецепторов находилась на уровне нормореактивности и гиперреактивности.

Следовательно, индивидуальная реактивность организма проявляется в когорте здоровых волонтеров и отражает эпигеномное влияние на экспрессию рецепторов клетки (Рисунок 5.1 а, б, в) [85]. Судя по обследованному контингенту здоровых волонтеров, аутокринная стимуляция Тц (секреция АДФ из плотных гранул) сопоставима с паракринной стимуляцией Тц активированными Лц (секреция ФАТ) и системной стимуляцией катехоламинами при активации САС.

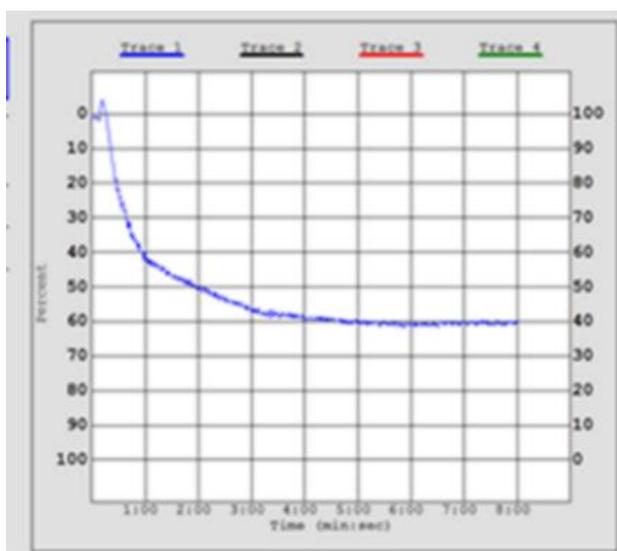
Сопоставимость агрегационной активности Тц и формирования ТЛА в контрольной группе условно здоровых волонтеров

Вид реактивности	ТЛА (%)			АТц		
	Адреналин	АДФ	ФАТ	Адреналин	АДФ	ФАТ
Амплитуда (%)	5,4±0,5 95%ДИ 4,175 – 6,625	8,0±1,923 95%ДИ 2,659 – 13,3	7,818±0,536 95%ДИ 6,623 – 9,013	48,8±3,226 41,2 – 56,5	51,8±1,907 47,1 – 56,5	49,1±1,624 45,1 – 53,1
Lag time (сек.)				0,0853±0,01287 0,057 – 0,113	0,048±0,012 0,021 – 0,07 P ₁ = 0,05	0,064±0,008 0,045 – 0,08
Slope (%/сек.)				30,8±6,872 14,6 – 47,1 r =0,8417 (P ₃ =0,008)	63,2± 2,757 56,5 – 70,03 P ₁ = 0,001 r =0,9359 (P ₃ =0,001)	57,1± 3,621 48,2 – 66,004 P ₁ = 0,01 r =0,9503 (P ₃ =0,001)
AUC (U)				160,1±21,6 108,8 – 211,4 r =0,7933 (P ₃ =0,018)	238,4±12,9 206,6 – 270,1 P ₁ = 0,01 r=0,8919 (P ₃ =0,007)	178,4±15,9 139,3 – 217,4 P ₂ = 0,013 r=0,9355 (P ₃ =0,002)
Кластер рецепторов Тц	АТц _{адреналин} = АТц _{ФАТ} = АТц _{АДФ} .					

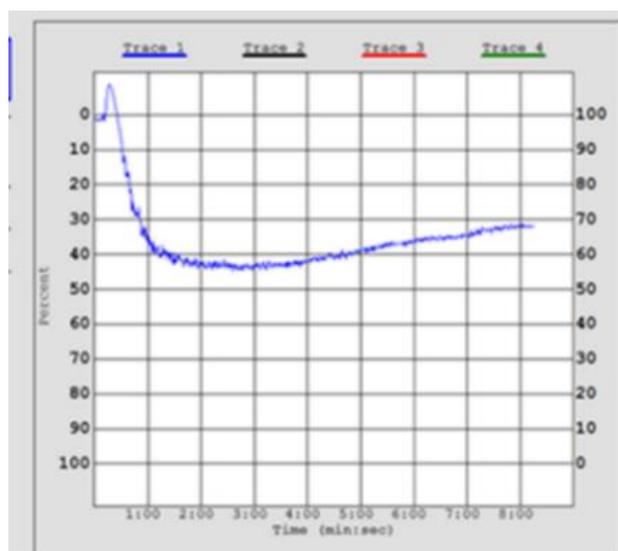
Примечание. P₁ – сравнение показателя контрольной группы условно здоровых лиц относительно индукции адреналином; P₂ – сравнение показателя контрольной группы условно здоровых лиц относительно индукции АДФ; P₃ – сравнение показателя с ТЛА соответствующего агониста.



а



б



в

Рисунок 5.1. Вариабельность агрегационного ответа условно здорового волонтера контрольного группы при индукции (а) адреналином (5мкм – 5 мкл, ЕС 50%), (б) АДФ (5мкм – 5 мкл, ЕС 50%), (в) ФАТ (150мкм – 5 мкл, ЕС 50%).

При анализе показателя Lag-time, который отображает время активации поверхностного рецепторного аппарата плазмолеммы Тц при воздействии агонистом, выявлено, что активация α_2 -адренорецептора было статистически

значимо сопоставимо с таковым при стимуляции P2Y-рецепторов и ФАТ-рецептора.

Оценивая значения Slope, можно констатировать, что аутокринная стимуляция Тц посредством АДФ проявлялась более высокой скоростью сигнализации через P2Y₁ и P2Y₁₂, чем системная индукция Тц адреналином посредством α2-адренорецептора (в 2,0 раза; P = 0,001) и была сопоставимой со скоростью паракринной стимуляции ФАТ-рецептора. Интересным представляется наличие корреляционной связи между показателем Slope и количеством сформированных ТЛА при действии адреналина, АДФ и ФАТ, соответственно, $r_{\text{Адреналин}} = 0,841$, $r_{\text{АДФ}} = 0,935$, $r_{\text{ФАТ}} = 0,95$ (P<0,05) (Таблица 5.1.), что свидетельствует о наличии причинно-следственной связи между скоростью сигнализации в Тц и количеством активированных Тц, принимающих участие в формировании ТЛА.

Закономерным является вопрос взаимосвязи характеристик агрегатограммы между собой при различных механизмах стимуляции Тц. Установлено, что при индукции адреналином показатель Lag-time был обратно пропорционален Slope и AUC, в то время как сами показатели Slope и AUC положительно коррелировали между собой (Таблица 5.2.). При стимуляции Тц АДФ скорость связывания рецепторов с агонистом имела отрицательную корреляционную связь со скоростью внутриклеточной сигнализации (P=0,018), однако не коррелировала с количеством активированных Тц. Показатель Slope положительно коррелировал с AUC (P=0,001). При индукции ФАТ-рецептора установлено, что скорость связывания рецепторов с агонистом также имела отрицательную корреляционную связь с показателем Slope (P=0,0331), при этом между показателями Slope и AUC имелся высокий уровень положительной корреляции (P<0,001). Следовательно, при использовании у здоровых лиц трех агонистов – адреналина, АДФ и ФАТ процесс агрегации является сопоставимым.

При наличии зависимости между характеристиками АТц, выявленные для каждого агониста, остается вопрос – отличается ли сила связи между показателями агрегатограммы при использовании адреналина, АДФ, ФАТ? С

практической точки зрения представляют интерес референсные диапазоны показателей агрегатограмм, учитывая наличие индивидуальной реактивности организма.

Таблица 5.2.

Наличие зависимости между амплитудными характеристиками при индукции адреналином, АДФ и ФАТ (EC50%) в контрольной группе условно здоровых лиц.

Показатель при индукции адреналином	Lag-time	Slope	AUC
Lag-time		r= -0,735 P=0,001	r= -0,778 P=0,0006
Slope	r= -0,735 P=0,001		r=0,827 P=0,0001
AUC	r= -0,778 P=0,0006	r=0,827 P=0,0001	
Показатель при индукции АДФ	Lag-time	Slope	AUC
Lag-time		r= -0,616 P=0,018	
Slope	r= -0,616 P=0,018		r=0,762 P=0,001
AUC		r=0,762 P=0,001	
Показатель при индукции ФАТ	Lag-time	Slope	AUC
Lag-time		r= -0,571 P=0,033	
Slope	r= -0,571 P=0,033		r=0,895 P<0,0001
AUC		r=0,895 P<0,0001	

Примечание: корреляционные связи считаются статистически значимыми при $P < 0,05$.

Установлено, что большая вариабельность амплитуды агрегации проявляется при использовании в качестве индуктора – адреналина, что может быть связано со значительным количеством Тц, принимающих участие в агрегации. Наиболее короткое время для связывания критического количества Тц проявляется при использовании АДФ, что может быть связано со стабильным количеством на плазмалемме P2Y-рецепторов участвующих в агрегации Тц. Для АДФ является характерным меньший «разброс» значений скорости сигнализации в Тц, по сравнению с таковыми для адреналина и ФАТ процессов. Данное явление отражает присутствие аутокринной сигнализации при использовании указанных агонистов. Стабильностью квантов АДФ, секретируемых из плотных гранул, можно объяснить и количеством Тц, участвующих в агрегации, отражением чего является «разброс» значений AUC.

Прикладное значение также имеет связь между функциональной активностью Тц, количеством и составом формирующихся ТЛА. Известно [110, 111, 206], что молекулярные механизмы, которые ответственны за межклеточное взаимодействие Тц и Лц, включают участие Р-селектина на поверхности Тц и PSGL-1 (корцептор Лц для сигнального каскада), а также β -2-интегрин Мас-1, который опосредует фиксацию этих молекул форменных элементов между собой. Количество адгезивных молекул зависит от количества функционально вовлеченных Тц в процесс адгезии и агрегации. При участии паракринной стимуляции между Тц и Лц, секретируемые кванты пуриновых нуклеотидов АДФ и АТФ вовлекают в процессе активации Лц посредством P2Y-рецепторов [130, 238, 239].

Возникает вопрос – отличается ли количество Тц, взаимодействующих с Лц при нормореактивности α 2-адренорецептора, P2Y-рецепторов и ФАТ-рецептора, т.е. по сути, при прочих равных условиях адреналин, АДФ и ФАТ в равной ли степени воспроизводят массу активированных Тц для взаимодействия с Лц?

При стимуляции Тц адреналином в контрольной группе условно здоровых

лиц выявлена тенденция к повышению количества ТЛА – на 23,7% ($P>0,05$) при формировании ТЛА, по сравнению с количеством до стимуляции (что являлось базальным уровнем формирования ТЛА). АДФ воспроизводил увеличение количества ТЛА на 83,3%, по сравнению с их уровнем до инкубации ($P=0,001$). Воздействие ФАТ сопровождалось увеличением численности ТЛА, по сравнению с базальным уровнем на 79,3% ($P=0,0001$).

Судя по значениям показателя AUC, у здоровых волонтеров количество Тц, взаимодействующих в процессе агрегации, было сопоставимым при нормореактивности $\alpha 2$ -адренорецептора, P2Y-рецепторов и ФАТ-рецептора. При активации $\alpha 2$ -адренорецептора, в группе условно здоровых лиц (Рисунок 5.2.) увеличение количества ТЛА находилось в зависимости не только от количества функционально активных Тц ($r_{AUC}=0,793$; $P=0,018$), но и скорости внутриклеточных сигнальных реакций ($r_{slope}=0,841$; $P=0,008$).

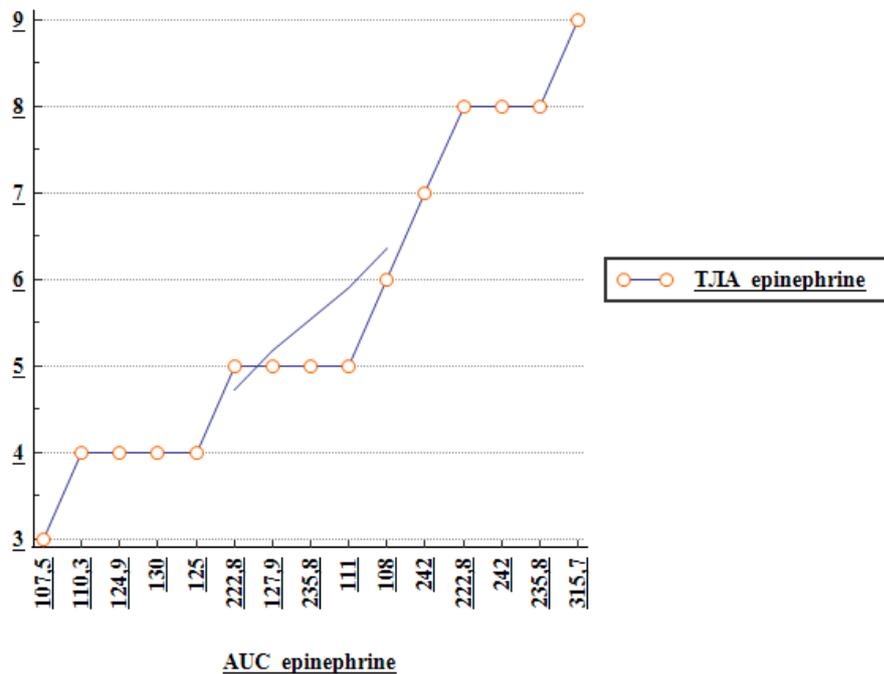


Рисунок 5.2. Линейный график зависимости количества ТЛА от амплитудных характеристик АТц при индукции адреналином (epinephrine) ЕС 50%.

При стимуляции P2Y-рецепторов коэффициент корреляции составил $r_{AUC}=0,891$ ($P=0,007$). Данный показатель может быть продемонстрирован

нарастанием тренда количества ТЛА при увеличении AUC (Рисунок 5.3.) и Slope ($r_{\text{Slope}}=0,935$, $P=0,001$).

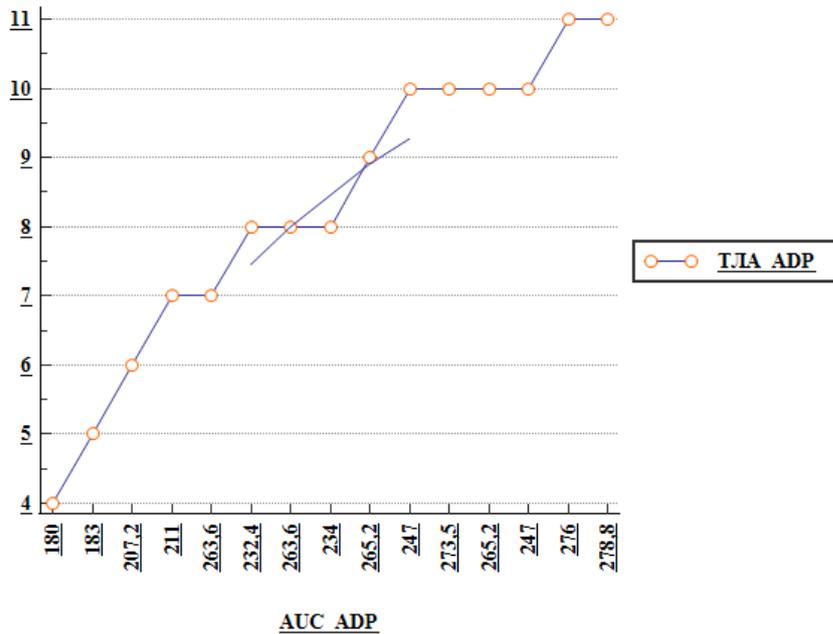


Рисунок 5.3. Линейный график зависимости количества ТЛА от амплитудных характеристик АТц при индукции АДФ (ADP) ЕС 50%.

Так при индукции ФАТ, количество активированных Тц коррелировало на уровне $r_{\text{AUC}}=0,935$ ($P=0,002$) с формированием ТЛА. При этом уровень показателя Slope при расчете взаимосвязей с формированием межклеточных коопераций составила $r_{\text{Slope}}=0,95$ ($P=0,001$) (Рисунок 5.4.).

Логично предположить, что чем больше сила корреляции между показателями, тем выше роль активированных Тц в формировании ТЛА при активации рецептора. Проведенный анализ свидетельствует, что в физиологических условиях внутриклеточная сигнализация, связанная с $\alpha 2$ -адренорецептором, воспроизводит меньше ТЛА, чем P2Y-рецепторы и ФАТ-рецептор. Вероятно, данный путь внутриклеточной сигнализации является менее эффективным в плане вовлечения в агрегацию резервных (не активированных) Тц. Как следствие при адреналин-индуцированной АТц регистрируется менее значимая AUC.

Феномен сходства значений показателей агрегатограммы при АТц,

индуцированный P2Y-рецепторов и ФАТ, вероятно, связан с сигнализацией, повышающей содержание ионов Ca^{2+} . В частности, это может быть сигнальный путь связанный с активацией Gq-белка, следствием чего является; активация фосфолипазы C β , при этом образуется инозитол-3-фосфат и диацилглицерол (ДАГ). В случае с $\alpha 2$ -адренорецептором, сопряженным с Gi-белком, активируется система SFK–фосфоинозитол-3-киназа (МАРК), регулирующая секрецию БАВ из гранул [129, 132].

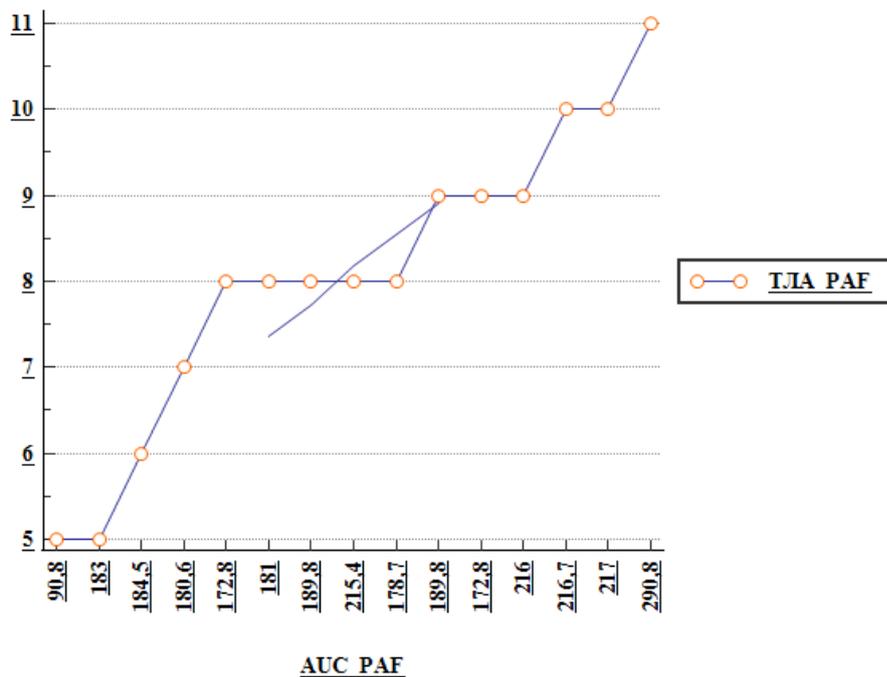


Рис. 5.4. Линейный график зависимости количества ТЛА от амплитудных характеристик АТц при индукции ФАТ(PAF) ЕС 50%.

Таким образом:

- референсные диапазоны агрегатограмм отражают индивидуальную реактивность организма;
- установленные референсные диапазоны агрегатограмм у здоровых волонтеров при стимуляции $\alpha 2$ -адренорецептора, P2Y-рецепторов и ФАТ-рецептора позволяют верифицировать нарушения функциональной активности Тц;

– количество сформированных ТЛА зависит от функциональной активности Тц и определяется не только количеством адгезивных молекул, но и паракринной стимуляцией Лц, посредством пуриновых P2Y₁-рецепторов (Gq-путь).

5.2. Характеристики функциональной активности тромбоцитов у пациентов с гипoadренореактивным фенотипом клеток крови

Ранее нами была высказана гипотеза, что у ряда пациентов снижение функциональной активности клеток крови в фазе ремиссии отражает защитную реакцию организма, направленную на ингибирование воспалительной реакции [99]. Установлено, что стимуляция α 2-адренорецепторов, P2Y-рецепторов и ФАТ-рецептора на Тц и Лц вызывает увеличение количества ТЛА, однако этот результат был значительно ниже, чем у здоровых лиц. Было высказано предположение, что низкая аутокринная стимуляция Тц посредством АДФ является одной из причин ограничения количества формирующихся ТЛА. Исследования *in vitro* на суспензии Тц позволяют проверить данную гипотезу.

При анализе агрегатограмм амплитуда агрегации, индуцированная адреналином, оказалась на 43,7 % ($P=0,0004$), АДФ – на 21,6% ($P<0,0001$) и ФАТ на 53,1% меньше, чем аналогичные показатели, зарегистрированные в контрольной группе ($P=0,0001$) (Таблица 5.3.). При этом стимуляция P2Y-рецепторов воспроизводила амплитуду агрегации на 44,1% больше ($P= 0,029$), чем α 2-адренорецептор и на 67,5% больше чем ФАТ-рецептор ($P<0,001$). Таким образом, по результатам анализа амплитуды агрегации можно прийти к заключению, что ведущим агонистом регуляции функции Тц у пациентов с гипoadренореактивным фенотипом является АДФ. Наличие второй волны на кривой агрегации при индукции адреналином, свидетельствует об участии аутокринной стимуляции P2Y-рецепторов. В сущности, адаптационные механизмы Тц, связанные с секрецией АДФ из плотных гранул могут предопределять реактивность других рецепторов, связанных с Gi- и Gq-белками.

Несмотря на то, что средние значения амплитуды при индукции Тц адреналином и ФАТ были сопоставимыми, имелась значительная вариабельность значений адреналин-индуцированной амплитуды (Рисунок 5.5.).

Данный факт подтверждает различия индивидуальной реактивности $\alpha 2$ -адренорецептора Тц при активации САС. Наиболее приближенным к значениям ЕС 50% у здоровых лиц была верхняя граница амплитуды при индукции АДФ, что может свидетельствовать о наличии в этой когорте пациентов с максимально сохраненным механизмом стимуляции Тц при стресс-реакции.

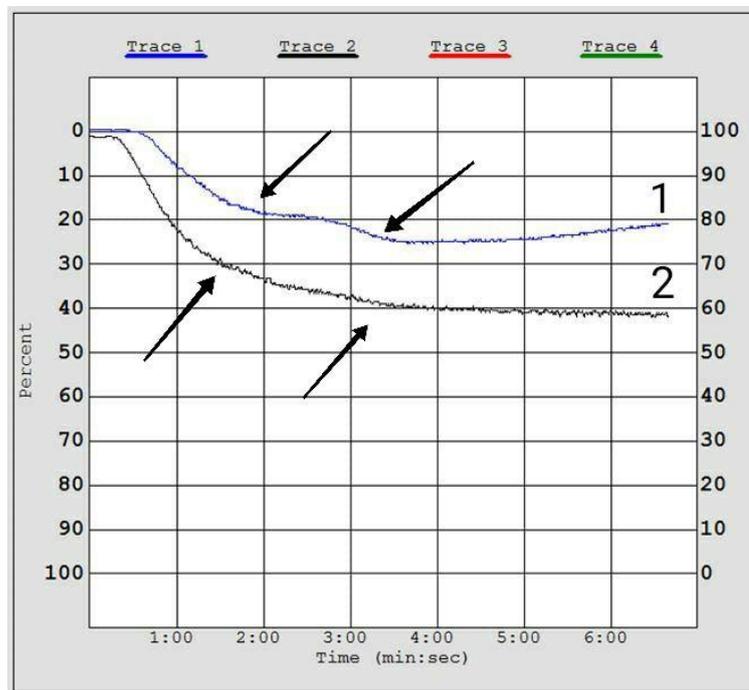


Рис. 5.5. Наличие двух волн агрегации (указаны стрелками) на агрегатограммах у пациентов с гипoadренореактивным фенотипом при ремиссии ХОПН в случае индукции тромбоцитов адреналином (1) и ФАТ (2).

Анализ показателя Lag-time позволил сопоставить время необходимое для связывания агониста с рецептором, по сути является косвенным отражением плотности и сенситивности рецепторов. Оказалось, что максимальные значения lag-time имели место при стимуляции ФАТ-рецептора – в 7,8 раза больше ($P=0,016$), чем у здоровых лиц. Минимальные значения показателя отмечены при стимуляции P2Y-рецепторов. В порядке снижения плотности и сенситивности

рецепторов, исследованный ряд агонистов можно представить следующим образом АДФ> адреналин>ФАТ. Таким образом, можно констатировать, что у данного контингента больных одной из причин снижения реактивности клеток крови было нарушение сигнализации на уровне связывания рецептора с G-белком.

Сопоставимость агрегационной активности Тц и формирования ТЛА в гипoadренореактивном фенотипе ремиссии ХОПН

Вид реактивности	ТЛА (%)			АТц		
	Адреналин	АДФ	ФАТ	Адреналин	АДФ	ФАТ
Амплитуда (%)	3,183±0,132 95%ДИ 2,842 – 3,524	7,0±0,055 95%ДИ 6,823 – 7,11	4,033 ±0,055 95%ДИ 3,89 – 4,177	27,7±5,205 15,4 – 40,05 P ₁ = 0,0004	40,0±1,943 35,6 – 44,3 P ₁ < 0,0001 P ₂ = 0,029	23,8±2,018 19,7 – 28,04 P ₁ < 0,0001 P ₃ < 0,0001
Lag time (сек.)				0,295±0,029 0,225 – 0,365 P ₁ < 0,0001	0,095±0,018 0,053 – 0,136 P ₁ = 0,04 P ₂ < 0,0001	0,47±0,119 0,224 – 0,716 P ₁ = 0,015 P ₂ < 0,001 P ₃ < 0,001
Slope(%/сек.)				12,8±2,363 7,286 – 18,4 P ₁ = 0,008	44,9±4,455 34,8 – 54,9 P ₁ = 0,0003 P ₂ < 0,0001	29,6±2,519 24,4 – 34,8 P ₁ < 0,0001 P ₂ = 0,0011 P ₃ = 0,0037
AUC (U)				96,0±17,3 54,9 – 137,02 P ₁ = 0,013 r=0,987, P ₄ <0,0001	127,7±13,07 98,1 – 157,3 P ₁ < 0,0001 P ₂ = 0,1551 r=0,68, P ₄ =0,008	81,5±10,3 60,1 – 103,02 P ₁ < 0,0001 P ₃ = 0,0173 r=0,7, P ₄ =0,04
Кластер рецепторов				АДФ↓> Адреналин↓=ФАТ↓		

Примечание: P₁ – сравнение показателя с контрольной группой; P₂ – сравнение показателя с индукцией адреналином у пациентов в фазе ремиссии ХОПН; P₃ – сравнение показателя с индукцией АДФ у пациентов в фазе ремиссии ХОПН; P₄ – сравнение показателя с результатами ТЛА.

Достаточно широкий разброс значений Lag-time, судя по 95% ДИ, был характерным для ФАТ-рецептора, что отражает вариабельность реакции клеток крови на провоспалительный липидный медиатор. Можно констатировать, что в фазе ремиссии ХОПН встречаются пациенты с выраженной десенситизацией ФАТ-рецептора, т.е. не отвечающие на «запрос» при индукции воспаления.

Скорость внутриклеточной сигнализации (Slope) в данной группе пациентов при индукции адреналином была снижена на 58,3% ($P=0,008$), АДФ – на 29,0% ($P=0,003$), а ФАТ 48,3% ($P<0,0001$), по сравнению со здоровыми лицами. При связывании P2Y-рецепторов с АДФ скорость сигнализации была в 3,48 раза больше, чем при стимуляции $\alpha 2$ -адренорецептора ($P<0,0001$) и на 51,3% больше, чем таковая при стимуляции ФАТ-рецептора ($P=0,004$). Максимальная вариабельность значений показателя Slope имела место при АДФ-индуцированной агрегации Тц, что необходимо учитывать при трактовке результатов у данного контингента больных.

Таким образом, (а) стимуляция P2Y-рецепторов, связанных с Gi- и Gq-белками проявляется наиболее высокой скоростью сигнализации; (б) стимуляция ФАТ-рецептора, связанного с Gq-белком, сопровождается более высокой скоростью сигнализации, чем при стимуляции $\alpha 2$ -адренорецептора, связанного с Gi-белком.

Следовательно, гипoadренореактивный фенотип клеток крови в фазе ремиссии ХОПН характеризуется снижением скорости внутриклеточной сигнализации в Тц, в меньшей степени этот феномен воспроизводится при стимуляции P2Y-рецепторов.

Количество тромбоцитов, участвующих в агрегации (AUC), у пациентов с гипoadренореактивным фенотипом клеток крови при индукции адреналином, на 66,0% ($P=0,013$), меньше чем в контрольной группе условно здоровых лиц. При стимуляции P2Y-рецепторов и ФАТ-рецептора значения показателя AUC были, соответственно, на 86,6% и в 2,2 раза меньше, чем в контрольной группе ($P<0,0001$). Количество Тц[^] участвующих в реакции было сопоставимо с при стимуляции $\alpha 2$ -адренорецептора, P2Y-рецепторов и ФАТ-рецептора.

Наличие сильной корреляционной связи между значениями AUC агрегатограмм при индукции Тц адреналином ($r=0,987$), АДФ ($r=0,68$) и ФАТ ($r=0,7$) и количеством ТЛА, сформировавшихся при стимуляции $\alpha 2$ -адренорецептора, P2Y-рецепторов и ФАТ-рецептора, одновременно на Тц и Лц, позволяет заключить, что Тц участвуют в формировании ТЛА, а адреналин, АДФ и ФАТ могут быть факторами риска восстановления воспалительной реакции в почке. Максимальная вариабельность значений показателя AUC имела место при адреналин-индуцированной агрегации Тц.

Остается вопрос за счет каких механизмов осуществляется взаимодействие Тц и Лц у пациентов с гипoadренореактивным фенотипом клеток крови? Установлено, что в крови пациентов с фазой ремиссии ХОПН уровень ТЛА ниже, чем у здоровых лиц. При изучении функциональной активности Тц в процессе агрегации было выявлена гипореактивность $\alpha 2$ -адренорецептора, P2Y-рецепторов и ФАТ-рецептора, что свидетельствует о снижении влияния системной активации (САС), аутокринной (АДФ) и паракринной стимуляции (ФАТ) на Тц. В сущности,

Таким образом, наличие гипoadренореактивного фенотипа клеток крови в фазе ремиссии ХОПН связано с функционированием защитных механизмов ограничивающих функциональную активность Тц, следствием чего является снижение количества циркулирующих ТЛА и рекрутирования Лц из сосудистого русла в ткани почки и МВП.

5.3. Характеристики функциональной активности тромбоцитов у пациентов с нормoadренореактивным фенотипом клеток крови.

Ранее нами было установлено, что у части пациентов, находящихся в фазе ремиссии ХОПН реактивность клеток крови на адреналин, соответствует таковой в контрольной группе, поскольку количество формирующихся ТЛА статистически значимо не различалось. При инкубации клеток крови с АДФ воспроизводилось сопоставимое количество агрегатов с контрольной группой, тогда как ФАТ индуцировал образование большего числа агрегатов, чем в контрольной группе.

Было высказано предположение, что в фазе ремиссии ХОПН имеется когорта пациентов с физиологической реактивностью α 2-адренорецептора, у которых возможен переход к острой воспалительной реакции. Оставалось неизвестным какой патогенетический механизм провоцирует развитие фазы рецидива ХОПН при нормореактивности α 2-адренорецептора? Какую роль играют Тц в формировании ТЛА и рекрутировании Лц из сосудистого русла у данного контингента пациентов?

При исследовании агрегатограмм амплитуда АТц находилась на уровне значений здоровых лиц при индукции адреналином ($P=0,662$) и АДФ ($P=0,241$) (Таблица 5.4.). Показатели были в одном диапазоне 95% ДИ и были сопоставимы. Примечательно, что ФАТ-индуцированная амплитуда находилась на незначительном уровне гиперреактивности ($P=0,0007$), по сравнению с контрольной группой условно здоровых лиц и превышала амплитуду, индуцированную адреналином на 12,99% ($P=0,0007$) и индуцированную АДФ на 14,89% ($P=0,003$). Таким образом, по результатам анализа амплитуды агрегации можно заключить, что ведущим агонистом регуляции функции Тц у пациентов с нормоадренореактивным фенотипом является ФАТ.

Скорость включения рецепторов (Lag-time) при индукции адреналином (в 3,2 раза; $P<0,0001$), АДФ (в 3,91 раза; $P=0,04$) и ФАТ (в 1,81 раза, $P=0,007$) была замедлена, по сравнению с показателями здоровых лиц. Данный факт свидетельствует о наличии снижения чувствительности и уровня плотности рецепторов ко всем агонистам в исследовании у пациентов с ХОПН в фазе ремиссии, несмотря на нормореактивные показатели уровня амплитуды.

Длительная активация происходила при индукции адренорецепторов, хотя показатель Lag-time был равен скорости активации пуриновых рецепторов ($P=0,41$) и превышал включение ФАТ-рецепторов в 2,49 раза ($P<0,0001$). Наибольшую вариабельность значений в пределах доверительного интервала продемонстрировал показатель включения пуриновых рецепторов Тц.

Таким образом, плотность и чувствительность рецепторов в данной группе пациентов с ХОПН можно представить как $\text{адреналин} \geq \text{АДФ} \geq \text{ФАТ}$. То есть ФАТ-рецепторы сохранили способность максимальной реактивности и адаптации.

Оценивая при определении уровня скорости внутриклеточной сигнализации (Slope) установлено, что индукция адреналином ($P = 0,798$), АДФ ($P = 0,172$), ФАТ ($P = 0,489$) не приводили к изменениям данного показателя относительно значений контрольной группы условно здоровых лиц. Таким образом, можно заключить, что у пациентов с нормоадренореактивным фенотипом ХОПН скорость внутриклеточных сигнальных механизмов функционировала на адекватном уровне. Доверительные интервалы Slope в данной группе исследования, относительно контрольной группы условно здоровых лиц, имели незначительное расширение верхних и нижних границ. Так максимальную вариабельность значений определили при аутокринной индукции АДФ.

Уровень количества Тц, участвующих в агрегации (AUC) при системном воздействии адреналином, находились на уровне значений здоровых лиц ($P = 0,361$) у пациентов с нормоадренореактивным фенотипом клеток крови в фазе ремиссии ХОПН. Примечательно, что АДФ-индуцированный показатель AUC снизился у пациентов с нормореактивным фенотипом на 34,11%, по сравнению с контрольной группой условно здоровых лиц ($P = 0,003$), хотя вариабельность значений при этом была достаточно широкой. ФАТ-стимулированный ответ Тц активности у пациентов с ХОПН был выше на 38,31% ($P = 0,001$), по сравнению со здоровыми лицами. Можно заключить, что ФАТ активировал наиболее высокое количество Тц, по сравнению с действием адреналина ($P = 0,0007$) и АДФ ($P = 0,01$) у пациентов с нормоадренореактивным фенотипом в фазе ремиссии ХОПН, что может быть подтверждением влияния паракринного влияния Лц на Тц, в том числе при формировании ТЛА.

Таблица 5.4

Сопоставимость агрегационной активности Тц и формирования ТЛА в нормоадренореактивном фенотипе ремиссии ХОПН

Вид реактивности	ТЛА (%)			АТЦ		
	Адреналин	АДФ	ФАТ	Адреналин	АДФ	ФАТ
Амплитуда (%)	7,143±0,776 95%ДИ 5,466 - 8,820	6,429±0,358 95%ДИ 5,653 - 7,204	11,286±1,364 95%ДИ 8,338 - 14,234	50,3±1,763 45,7 – 54,8	49,5±1,21 46,6 – 52,3	56,8±1,705 52,8 – 60,9 P ₁ = 0,0007 P ₂ = 0,0007 P ₃ = 0,0034
Lag time (сек.)				0,272±0,012 0,240 – 0,303 P ₁ < 0,0001	0,188±0,084 0,011 – 0,386 P ₁ = 0,043	0,109±0,012 0,08 – 0,138 P ₁ = 0,007 P ₂ < 0,0001
Slope(%/сек.)				30,5±2,789 23,3 – 37,6	56,2±5,79 42,5 – 69,9 P ₂ = 0,0037	54,1±3,705 45,3 – 62,8 P ₂ = 0,0004
AUC (U)				137,4±18,9 88,7 – 186,1	177,7±18,8 133,1 – 222,3 P ₁ = 0,0035	246,8±15,2 210,7 – 282,8 P ₁ = 0,001 P ₂ = 0,0007 P ₃ = 0,012
Кластер рецепторов	Адреналин= АДФ↓<ФАТ поддержание хронического воспаления из обобщения			Адреналин= АДФ↓<ФАТ поддержание хронического воспаления		

Примечание: P₁ – сравнение показателя с контрольной группой; P₂ – сравнение показателя с индукцией адреналином у пациентов в фазе ремиссии ХОПН; P₃ – сравнение показателя с индукцией АДФ у пациентов в фазе ремиссии ХОПН; P₄ – сравнение показателя с результатами ТЛА.

При сравнении корреляционных связей, которые демонстрируют согласованность работы сигнальных путей Тц, у пациентов с нормоадренореактивным фенотипом ремиссии ХОПН при анализе аутокринной индукции АДФ на Тц была определена отрицательная связь сильной степени ($r = -0,813$; $P = 0,01$) между Lag-time и AUC. Несмотря на факт наличия десенситизации пуриновых рецепторов и снижение функционально активированных Тц, возможность частичного сохранения паттерна взаимодействия амплитудных характеристик остался. Объяснением этому может быть потенцирующий эффект Gq- и Gi-сигнальных путей, которые реализуются при индукции пуриновых рецепторов Тц. Паракринная стимуляция Тц ФАТ, при исследовании корреляционных связей амплитудных характеристик продемонстрировала тесное взаимодействие скорости внутриклеточных реакций (Slope) с количеством функционально активированных Тц (AUC) ($r = 0,756$; $P = 0,03$).

У пациентов находящихся в фазе ремиссии ХОПН с физиологической адренореактивностью клеток крови переход к острой воспалительной реакции (рецидив ХОПН) обеспечивается активными Лц, которые секретируют ФАТ и индуцируют Тц, что способствует формированию ТЛА. Функциональная активность Тц характеризуется снижением аутокринной стимуляции посредством АДФ, что обуславливает ограничение количества Тц способных участвовать во взаимодействии с Лц. В этом контексте Тц являются «слабым» звеном воспалительной реакции, лимитирующим возникновение рецидива ХОПН.

5.4. Характеристики функциональной активности тромбоцитов у пациентов с гиперадренореактивным фенотипом клеток крови

Установлено, что у пациентов в фазу ремиссии ХОПН гиперадренореактивный фенотип клеток крови характеризуется высокой чувствительностью в отношении адреналина, что могло отражать доминирующую роль САС в активации Тц и Лц. А взаимодействие Тц и Лц обеспечивали взаимную индукцию друг друга при образовании ТЛА. Для подтверждения

данного заключения исследовались характеристики функциональной агрегационной активности Тц.

Адреналин-индуцированная амплитуда АТц была на 37,9% выше уровня контрольной группы здоровых лиц ($P < 0,0001$) (Таблица 5.5.). Показатель пуринергической и ФАТ-ергической активации при стимуляции Тц были выше на 20,3% ($P = 0,0006$) и 19,5% ($P < 0,0001$) соответственно. Показатели находились в одном диапазоне 95% ДИ. Необходимо отметить, что активация САС при агрегации Тц превышала амплитуду, индуцированную АДФ ($P = 0,05$) и ФАТ ($P = 0,002$). Таким образом, в порядке убывания уровень амплитуды можно представить, как адреналин > АДФ > ФАТ. Для адреналин-индуцированной амплитуды оставалось характерна двухфазность (Рисунок 5.6).

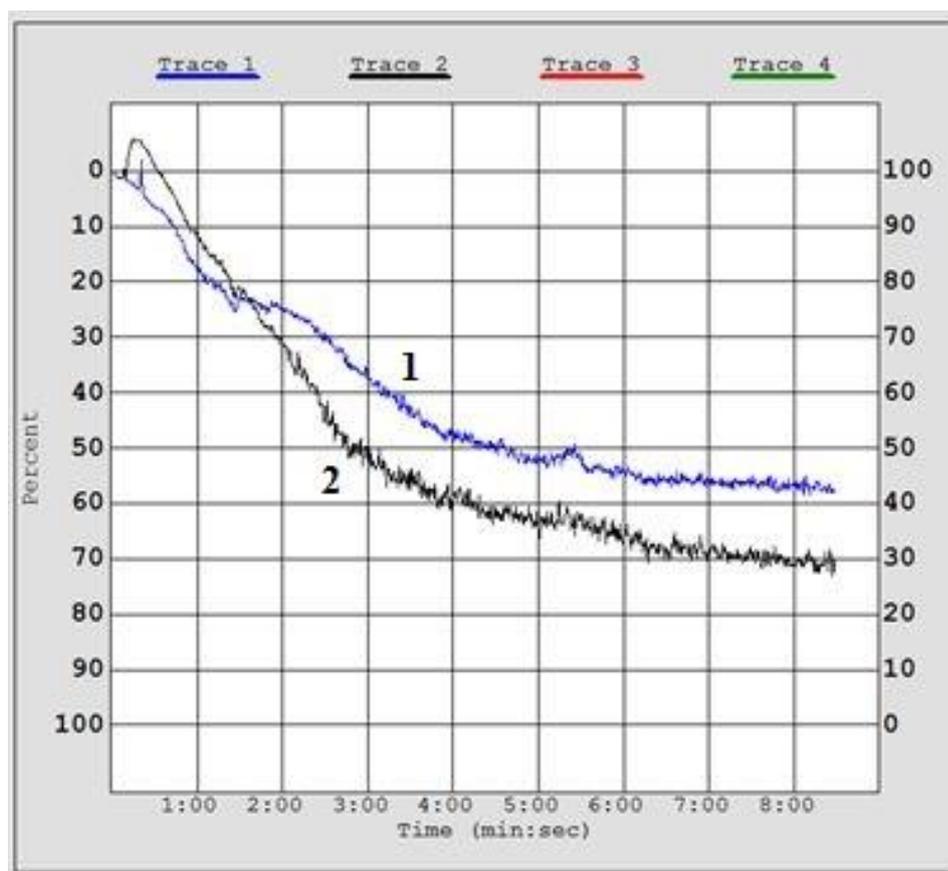


Рисунок 5.6. Наличие двухфазной кривой АТц при индукции адреналином (1) и монофазной кривой при индукции АДФ (2) ЕС 50% у пациентов с гиперадренореактивным фенотипом ремиссии ХОПН.

Показатель скорости включения рецепторов (Lag-time) при стимуляции Тц адреналином не изменилась относительно здоровых лиц ($P = 0,232$). Однако, при индукции АДФ и ФАТ десенситизация рецепторов у пациентов в данной группе сохранялась. Так скорость активации пуриновых рецепторов замедлилась в 2,65 раза ($P=0,001$), а ФАТ-рецепторов в 2,61 раза ($P=0,035$). Таким образом, плотность рецепторов можно представить в виде: адреналин=АДФ=ФАТ.

При расчете Slope (скорости внутриклеточных реакций), у пациентов с гипердренореактивным фенотипом отмечалось увеличение значений при индукции адреналином на 63,58% ($P=0,02$). При этом аутокринный и паракринный тип скорости внутриклеточных реакций Тц продемонстрировали остались на уровне значений контрольной группы здоровых лиц ($P=0,193$ и $P=0,307$ соответственно). При анализе доверительных интервалов значительный разброс демонстрировал показатель Slope при индукции адреналином.

Примечательно, что инкубация БТП Тц с АДФ была выше адренергического воздействия на Тц на 15,39% ($P= 0,017$) и ФАТ-воздействия на ТЦ на 9,38% ($P= 0,003$). Таким образом, стимуляция P2Y-рецепторов (сопряженность Gi- и Gq-белков) и α -адренорецепторов (сопряженность Gi-белком) обуславливала высокую скорость сигнализации, чем стимуляция ФАТ-рецепторов.

Показатель AUC у пациентов с гипердренореактивным фенотипом клеток при индукции тремя агонистами статистически значимо не различался. По сравнению с контрольной группой, выявлено увеличение AUC при индукции адреналином на 46,7% ($P = 0,009$) и – ФАТ на 42,2% ($P = 0,003$). Обнаружена корреляционная связь между AUC и Slope – при индукции адреналином таковая составила $r=0,882$ ($P=0,0007$), АДФ – $r=0,671$ ($P=0,023$) и ФАТ – $r=0,631$ ($P=0,037$), что свидетельствует о большем влиянии внутриклеточной сигнализации, связанной с Gi-белком, по сравнению с сигнализацией, связанной с Gq-белком на вовлечение в процесс агрегации новых Тц. Наибольшая вариабельность значений AUC имела место при стимуляции $\alpha 2$ -адренорецептора, что подтверждает высокую индивидуальную адренореактивность у данного контингента больных.

Сопоставимость агрегационной активности Тц и формирования ТЛА в гипердренореактивном фенотипе ремиссии ХОПН

Вид реактивности	ТЛА (%)			АТЦ		
	Адреналин	АДФ	ФАТ	Адреналин	АДФ	ФАТ
Амплитуда (%)	8,5±0,866 95%ДИ 5,744 – 11,2	6,05±0,389 95%ДИ 5,13 – 6,97	6,012±0,382 95%ДИ 5,107 – 6,918	67,4±2,737 61,2 – 73,5 P ₁ < 0,0001	62,4±2,527 56,8 – 68,08 P ₁ = 0,0006 P ₂ = 0,05	58,7±1,152 56,1 – 61,2 P ₁ < 0,0001 P ₂ = 0,0023 P ₃ = 0,05
Lag time (сек.)				0,11±0,015 0,075 – 0,145	0,106±0,008 0,086 – 0,126 P ₁ = 0,001	0,157±0,03 0,085 – 0,229 P ₁ = 0,03
Slope(%/сек.)				50,5±5,127 38,9 – 62,1 P ₁ = 0,02	58,2±3,5 50,472 – 66,073 P ₂ = 0,017	53,2±2,78 47,078 – 59,4 P ₃ = 0,003
AUC (U)				234,9±20,3 188,8 – 281,09 P ₁ = 0,0091	249,8±14,02 218,6 – 281,1	253,7±14,7 220,9 – 286,5 P ₁ = 0,0003
Кластер рецепторов	ТЛА адреналин= > АДФ=ФАТ			Адреналин>АДФ>ФАТ		

Примечание: P₁ – сравнение с контрольной группой, P₂ – сравнение с индукцией адреналином у пациентов в фазе ремиссии ХОПН, P₃ – сравнение с индукцией АДФ у пациентов в фазе ремиссии ХОПН.

Таким образом, можно констатировать, что у пациентов в фазе ремиссии: (а) САС участвует как в индукции тромбоцитарного звена гемостаза, так и развитии воспаления (рекрутирование Лц из сосудистого русла); (б) выявлены гипoadренореактивный (защитные механизмы ограничения воспаления), нормoadренореактивный (поддержание хронического воспаления) и гиперадренореактивный (провокация перехода хронического воспаления к острому) фенотипы клеток крови, отличающиеся реактивностью $\alpha 2$ -адренорецептора; (в) адаптационные механизмы аутокринной и паракринной стимуляции клеток крови, связанные со стимуляцией P2Y-рецепторов и ФАТ-рецептора, обеспечивают взаимную индукцию Тц и Лц, однако локальная регуляция при формировании ТЛА менее эффективна, чем системная адренергическая стимуляция.

5.5. Характеристики функциональной активности тромбоцитов у пациентов с гипопуринергическим фенотипом клеток крови в фазе рецидива ХОПН

Ранее было установлено, что у пациентов с ХОПН в фазе рецидива присутствуют специализированные фенотипы Тц и Лц, которые отражают реактивность клеток при формировании ТЛА. Была выдвинута гипотеза, что данные фенотипы клеток крови могут являться индикаторами перехода воспаления из фазы рецидива ХОПН в фазу ремиссии (гипореактивный фенотип), «выздоровления» пациента (нормореактивный фенотип) или усиления тяжести воспалительной реакции (гиперреактивный фенотип) [288]. Для проверки данной гипотезы когорту пациентов с фазой рецидива ХОПН распределили на три группы в зависимости от количества циркулирующих ТЛА (базальный уровень формирования ТЛА). Критерием распределения являлись: среднее значение количества ТЛА (%), а также значения левой и правой границ 95% доверительного интервала. Однако были получены результаты (доминирующая роль пуринергических рецепторов), на основании которых были выделены

гипопуринергический, нормопуринергический и гиперпуринергический фенотипы клеток крови у пациентов в фазе ремиссии ХОПН. Это дает основания предположить, что в фазе рецидива действует иной патогенетический механизм, нежели у пациентов в фазе ремиссии ХОПН. При определении формирования ТЛА гипопуринергического фенотипа клеток крови, у пациентов в фазе рецидива ХОПН установили, что пуринергическая активация является ведущей. При этом она стимулировала участие Лц в формировании ТЛА их рекрутирование. Кроме того, пуринергическая активация воздействовала на системное влияние САС путем мобилизации иммунных клеток. При определении показателя амплитуды АТц у пациентов с гипопуринергическим фенотипом было выявлено, что адреналин- и ФАТ-индуцированная стимуляция Тц находились на одном уровне значений ($P=0,513$) (Таблица 5.6.).

При этом стимуляция АДФ превышала данные показатели на 11,61% ($P=0,09$) и на 18,35% ($P=0,04$) соответственно. Относительно сравнения с контрольной группой здоровых лиц отмечалось снижение уровня амплитуды АТц на 34,69% ($P=0,003$) при стимуляции адреналином, на 28,04% ($P<0,0001$) при стимуляции АДФ и на 43,6% ($P<0,0001$) при индукции ФАТ. Таким образом, показатели на трех агонистах находились в значениях гипореактивности.

Показатель скорости включения рецепторов (Lag-time) при активации адренорецепторов Тц демонтировал признаки десенситизации – произошло удлинение активации в 3,37 раза, по сравнению с контрольной группой здоровых лиц ($P<0,0001$). При активации ФАТ-рецепторов также выявили удлинение скорости включения данных рецепторов – в 2,65 раза ($P=0,0002$) дольше, относительно контрольной группы здоровых лиц. Пуриновые рецепторы Тц активировались в пределах установленного «референсного значения» здоровых лиц ($P=0,664$). Среди агонистов наибольшей длительностью активации был отмечен показатель адренорецепторов, который превышал ФАТ-индуцибельный на 69,8% ($P=0,002$), а АДФ-индуцибельный Lag-time в 5,4 раза ($P<0,0001$). Таким образом, плотность рецепторов у пациентов с гипопуринергическим фенотипом можно представить в виде: адреналин>ФАТ>АДФ.

Скорость протекания внутриклеточных реакций (Slope) при воздействии адреналином находилась в пределах значений контрольной группы ($P=0,515$). Примечательно, что показатели Slope были снижены на 85,43% ($P<0,0001$) при воздействии АДФ, а при стимуляции ФАТ – снижение скорости внутриклеточных реакций произошло в 2 раза ($P<0,0001$). Сравнивая показатели между собой, можно отметить, что они находились на одном уровне значений. Таким образом, можно констатировать, что сохранение внутриклеточной сигнализации имело место в G_i -системе.

При анализе количества активированных Тц (AUC) определили, что индукция адреналином не вызывала изменений данного показателя относительно количества контрольной группы условно здоровых лиц ($P = 0,438$). При этом АДФ-стимулированный показатель снизился на 36,61% ($P=0,0001$). А индуктор паракринной активации ФАТ – на 32,49% ($P=0,021$). Уровень системной (адреналин) и паракринной (ФАТ) регуляции был равнозначен ($P= 0,206$). Уровень AUC при стимуляции АДФ превышал адренергическую активацию на 16,19% ($P= 0,001$), а ФАТ – на 29,57% ($P=0,026$).

Таким образом можно представить степень значимости показателя в следующем виде: АДФ>адреналин=ФАТ. Учитывая полученные данные значений гипопуринергического фенотипа клеток крови при формировании ТЛА и при АТц можно сделать следующие выводы:

1. при формировании ТЛА аутокринная активация Тц АДФ поддерживала на уровне гипореактивности количество агрегатов. При этом оказывалось влияние на активацию Лц, что также проявлялось сниженным количеством ТЛА относительно контрольной группы. Системное влияние адреналина было достаточным для поддержания уровня межклеточных коопераций на уровне здоровых лиц;
2. амплитуда АТц при стимуляции всеми агонистами находилась на уровне гипореактивности;

**Сопоставимость агрегационной активности Тц и формирования ТЛА
в гипопуринергическом фенотипе рецидива ХОПН**

Вид реактивности	ТЛА (%)			АТЦ		
	Адреналин	АДФ	ФАТ	Адреналин	АДФ	ФАТ
Амплитуда (%)	5,25±0,295 95% ДИ 4,62 – 5,88	6,562±0,273 95% ДИ 5,98 – 7,145	6,437±0,273 95% ДИ 5,855 – 0,273	36,2±1,873 31,7 — 40,8 P ₁ = 0,0032	40,5±1,5 36,9 — 44,04 P ₁ < 0,0001	34,2±2,277 28,9 — 39,4 P ₁ < 0,0001 P ₃ = 0,04
Lag time (сек.)				0,27±0,015 0,231 — 0,309 P ₁ < 0,0001	0,056±0,006 0,04 — 0,072 P ₂ < 0,0001	0,159±0,023 0,106 — 0,212 P ₁ = 0,0002 P ₂ = 0,002 P ₃ = 0,001
Slope(%/сек.)				27,5±3,657 18,6 — 36,5	34,1±1,757 29,9 — 38,2 P ₁ < 0,0001	28,4±3,567 20,2 — 36,6 P ₁ < 0,0001
AUC (U)				150,1±5,06 137,8 — 162,5	174,5±6,745 158,5 — 190,4 P ₁ = 0,0001 P ₂ = 0,001	134,6±14,003 102,3 — 166,9 P ₁ = 0,021 P ₃ = 0,02
Кластер рецепторов				АДФ↓=ФАТ↓>Адреналин		

Примечание: P₁ – сравнение с контрольной группой, P₂ – сравнение с индукцией адреналином у пациентов в фазе рецидива ХОПН, P₃ – сравнение с индукцией АДФ у пациентов в фазе рецидива ХОПН.

4. десенситизация рецепторов наблюдалась у адренорецепторов, ФАТ-рецепторов, но не пуриновых рецепторов (что подтверждает доминирующее влияние АДФ);
5. несмотря на это, скорость включения рецепторов сохранилась на уровне контрольной группы только при стимуляции адреналином, похожая тенденция отмечалась и при измерении количества активированных Тц. Создается впечатление, что был установлен потенцирующий эффект АДФ, но за счет Gi-системы активации (адреналин), а не Gq-эффекта.

5.6. Характеристики функциональной активности тромбоцитов у пациентов с нормопуринергическим фенотипом клеток крови

Ранее у пациентов с нормопуринергическим фенотипом клеток крови в фазе рецидива ХОПН было установлено, что пуринергическая сигнализация посредством P2Y-рецепторов ограничивала формирование ТЛА при стимуляции ФАТ-рецептора. В то время как адренергическая активация $\alpha 2$ -адренорецептора сопровождалась коактивацией сигнальных путей, ассоциированных с P2Y-рецепторами и ФАТ-рецептором. Для подтверждения результатов исследовались амплитудные характеристики АТц пациентов данной исследуемой группы.

При исследовании агрегатограмм у пациентов с нормопуринергическим фенотипом клеток крови амплитуда АТц, индуцированная АДФ, адреналином и ФАТ, статистически значимо не различалась и была сопоставима со значениями контрольной группы здоровых лиц, т.е. находилась на уровне нормореактивности (Таблица 5.7.). Индивидуальная вариабельность значений амплитуды АТц-индуцированной АДФ была выше, чем при использовании адреналина и ФАТ, что необходимо учитывать в лабораторной практике при оценке пуринергической сигнализации у пациентов с фазой рецидива ХОПН.

Показатель Lag-time отражал задержку рецепторного ответа $\alpha 2$ -адренорецептора примерно в 3,05 раза ($P < 0,0001$) и ФАТ-рецептор в 6,6 раз ($P = 0,016$). Активация пуриновых рецепторов соответствовала таковой в контрольной группе ($P = 0,186$). В порядке длительности активацию рецепторов у данного контингента больных можно представить следующим образом: ФАТ-рецептор >

$\alpha 2$ -адренорецептор>P2Y-рецепторы. Индивидуальная вариабельность значений показателя для P2Y-рецепторов была сопоставимой с таковой у лиц контрольной группы. Следовательно, только пуринергическая сигнализация соответствовала критерию нормореактивности.

Значения Slope при индукции агрегации адреналином в данной группе пациентов не отличалась от таковых в контрольной группе ($P=0,451$), что отражает сохранение физиологической скорости внутриклеточной сигнализации, связанной с Gi-белком. Скорость протекания внутриклеточных реакций при индукции ФАТ у пациентов с нормопуринергическим фенотипом клеток крови была на 48,8% ниже, чем показатель контрольной группы здоровых лиц ($P<0,0001$). Обращает на себя внимание снижение показателя Slope на 7,86% ($P=0,01$), по сравнению с таковым в контрольной группе, что, вероятно, свидетельствует о снижении скорости секреции АДФ из плотных гранул.

Тем не менее скорость сигнализации, сопряженной с пуриновыми P2Y₁₂- и P2Y₁-рецепторами превосходит таковую при активации $\alpha 2$ -адренорецептора на 52,77% ($P=0,01$) и ФАТ-рецептора в 2,22 раза ($P<0,0001$), что отражает значимость рецепторов в воспроизведении адаптационной реакции Тц. Вариабельность скорости пуринергической сигнализации была сопоставимой с таковой в контрольной группе и отражает стабильность реактивности P2Y-рецепторов в фазе рецидива у пациентов с нормореактивным фенотипом клеток крови.

Количество Тц, участвующих в агрегации (AUC) у пациентов с нормопуринергическим фенотипом клеток при стимуляции АДФ, адреналином и ФАТ статистически значимо не отличалось от таковых в контрольной группе. При этом необходимо подчеркнуть, что значения AUC при индукции Тц адреналином и ФАТ находились в одном диапазоне значений ($P=0,426$). Однако, значения AUC при стимуляции P2Y-рецепторов были на 25,5% ($P=0,014$) выше, чем таковые при стимуляции $\alpha 2$ -адренорецептора и на 36,5% ($P=0,01$) больше, чем при стимуляции ФАТ-рецептора. Максимальная вариабельность значений AUC у данного контингента больных, вероятно, отражает индивидуальные особенности аутокринной стимуляции Тц.

Сопоставимость агрегационной активности Тц и формирования ТЛА в нормопуринергическом фенотипе рецидива ХОПН

Вид реактивности и	ТЛА (%)			АТЦ		
	Адреналин	АДФ	ФАТ	Адреналин	АДФ	ФАТ
Амплитуда (%)	9,647±0,647 95% ДИ 8,275 – 11,01	8,625±0,546 95% ДИ 7,45 – 9,79	11,3± 0,825 95% ДИ 9,55 – 13,07	48,6±0,557 47,2 – 50,1	50,3±1,054 47,6 – 53,04	49,0±0,816 47,1 – 50,8
Lag time (сек.)				0,26±0,014 0,222 – 0,298 P ₁ <0,0001	0,08±0,0193 0,03 – 0,13 P ₂ <0,0001	0,396±0,1522 0,051 – 0,74 P ₁ = 0,016 P ₃ = 0,013
Slope (%/сек.)				26,3±4,07 15,8 – 36,8	58,6±2,01 от 53,4 – 63,8 P ₁ = 0,01 P ₂ < 0,0001	38,4±2,028 33,8 – 42,9 P ₁ < 0,0001 P ₂ = 0,01 P ₃ < 0,0001
AUC (U)				175,2±5,294 161,6 – 188,8	219,8±14,1 183,5 — 256,2 P ₂ = 0,0144	161,06±12,8 131,9 – 190,2 P ₃ = 0,01
Кластер рецепторов				ФАТ↑= АДФ=адреналин↑		

Примечание: P₁ – сравнение с контрольной группой, P₂ – сравнение с индукцией адреналином у пациентов в фазе рецидива ХОПН, P₃ – сравнение с индукцией АДФ у пациентов в фазе рецидива ХОПН.

На основании полученных данных можно сделать ряд выводов:

1. уровень амплитуды агрегации Тц (что по сути является интегральным показателем амплитудных характеристик Тц) был нормореактивен и сопоставим с ЕС50%;
2. при детальном исследовании скорости включения рецепторов только пуриновые рецепторы сохранили адаптационные свойства у пациентов данной группы исследования, в то время как адренорецепторы и ФАТ-рецепторы были подвержены десенситизации;
3. при индукции тремя агонистами Slope был снижен, по сравнению со здоровыми лицами, а количество активированных Тц сопоставимо с контрольной группой;
4. таким образом, можно подвести итог, сопоставляя данные формирования ТЛА и АТц – аутокринная регуляция Тц в достаточной мере стимулировала активность Лц (судя по уровню формирования ТЛА при индукции ФАТ и восприимчивости ФАТ-рецепторов на Тц) и также оказывала компенсирующее влияние на Тц. Системная активация САС стимулировала и Тц (судя по уровню АUC) и Лц (уровень формирования ТЛА).

5.7. Характеристики функциональной активности тромбоцитов у пациентов с гиперпуринергическим фенотипом клеток крови

Данные реактивности клеток крови, которые были получены при анализе гиперпуринергического фенотипа у пациентов в фазе рецидива ХОПН свидетельствовали, что активирующим влиянием на формирование ТЛА обладает симпатoadреналовая стимуляция (адреналин), она же параллельно стимулировала паракринное звено Тц (АДФ) и обладала провоспалительной активацией (ФАТ); также было отмечено, что адаптационная регуляция Тц (АДФ) и провоспалительная индукция Лц (ФАТ) взаимно активировали друг друга, исходя из корреляционной зависимости. Актуальным представляется изучение

амплитудных характеристик данной группы исследования в контексте полученных сведений.

При исследовании показателей агрегации у пациентов с гиперпуринергическим фенотипом клеток установлено, что амплитуда адреналин-индуцированной АТц была на 26,4% выше, чем таковая в контрольной группе ($P=0,0004$) (Таблица 5.8.). При использовании АДФ, адреналин и ФАТ – выявлены сопоставимые результаты. Следовательно, гиперпуринергический фенотип клеток характеризуется также гиперреактивностью $\alpha 2$ -адренорецептора и ФАТ-рецептора. Данный феномен представляется логичным, учитывая, что сигнализация $\alpha 2$ -адренорецептора и ФАТ-рецептора связана, соответственно, с Gi- и Gq-белком, а следовательно, модулируется активностью P2Y-рецепторов. Вариабельность значений агрегации Тц при использовании АДФ, адреналина и ФАТ у данного контингента больных была сопоставимой, что отражает сходную индивидуальную реактивность P2Y-рецепторов, $\alpha 2$ -адренорецептора и ФАТ-рецептора. Анализ показателя Lag-time свидетельствует о равнозначности продолжительности времени необходимого для связывания агониста с рецептором с данными контрольной группой здоровых лиц. Данные статистически значимо не отличались (Таблица 5.8.), что говорило об адекватности рецепторной реактивности при влиянии трех агонистов. Вариабельность значений Lag-time при использовании АДФ, адреналина и ФАТ у данного контингента больных была сопоставимой, при этом значительный разброс индивидуальной реактивности показателя отмечался при индукции адреналином.

Скорость внутриклеточной сигнализации (Slope) у пациентов с данным фенотипом клеток крови при стимуляции P2Y-рецепторов была на 35,0% ($P = 0,001$), выше таковой в контрольной группе. При этом, значения Slope в случае связывания агониста с $\alpha 2$ -адренорецептором и ФАТ-рецептором находилась на уровне значений контрольной группы. В этой связи, можно констатировать усиление скорости компенсаторной реакции Тц, в основе которой лежит аутокринная стимуляция P2Y-рецепторов, поскольку скорость сигнализации $\alpha 2$ -адренорецептора и ФАТ-рецептора посредством Gi- и Gq-белков соответствовала

физиологическим значениям. Вариабельность значений скорости внутриклеточной сигнализации (Slope) была выше при использовании АДФ и адреналина.

Количество Тц, участвующих в агрегации (AUC), у пациентов с гиперпуринергическим фенотипом в фазе рецидива ХОПН, при стимуляции АДФ повысилось на 22,42% ($P=0,002$) относительно контрольной группы. AUC при действии адреналина и ФАТ статистически значимо не отличался от данных здоровых лиц, кроме того показатели были сопоставимы между собой. Показатель стимулирующего влияния адреналином имел наиболее широкий диапазон вариабельности. Уровень АДФ-активированных Тц был на 67,46% больше количества Тц ($P=0,0001$), стимулированных адреналином и на 56,45% – стимулированных ФАТ ($P<0,0001$). Таким образом, степень значимости показателя можно представить, как адреналин=ФАТ=АДФ.

На основании результатов формирования межклеточных коопераций ТЛА и данных амплитудных характеристик у пациентов с гиперпуринергическим фенотипом рецидива ХОПН, можно сделать ряд заключений:

1. согласно уровню формирования ТЛА, все значения превышали показатели контрольной группы здоровых лиц, что было проявлением гиперреактивности;
2. по показателю амплитуды можно также сделать заключение о превышении реактивности Тц при воздействии тремя агонистами;
3. десенсетизация рецепторов в данной группе пациентов отсутствовала;
4. характерно, что скорость протекания внутриклеточных реакций повышалась при индукции АДФ, в то время как адреналин (Gi) и ФАТ (Gq) поддерживали данный показатель на уровне контрольной группы. Это может свидетельствовать о потенцирующем эффекте внутриклеточной сигнальной кооперации Gi- и Gq-путей;
5. количество активированных Тц было сопоставимо со здоровыми лицами при активации адреналином и ФАТ. АДФ стимулировал активацию повышенного числа Тц относительно контрольной группы здоровых лиц;

Сопоставимость агрегационной активности Тц и формирования ТЛА в гиперпуринергическом фенотипе рецидива ХОПН

Вид реактивности	ТЛА (%)			АТЦ		
	Адреналин	АДФ	ФАТ	Адреналин	АДФ	ФАТ
Агонист						
Амплитуда (%)				61,7±0,894 59,7 — 63,8 P ₁ = №3 0,0004	65,4±1,659 61,6 — 69,2 P ₁ < 0,0001	60,6±1,22 57,9 — 63,3 P ₁ < 0,0001
Lag time (сек.)				0,082± 0,025 0,023 — 0,141	0,058± 0,006 0,042 — 0,074	0,075± 0,01 0,037 — 0,113
Slope (%/сек.)	10,1±0,112 95% ДИ 9,997 – 10,4	12,3±0,421 95% ДИ 11,2 – 13,4	12,0±0,755 95% ДИ 10,2 – 13,7	41,1±6,594 25,9 – 56,3	85,4±7,012 69,27 – 101,6 P ₁ = 0,001 P ₂ = 0,0003	66,6±6,05 53,3 – 79,9 P ₂ = 0,01 P ₃ = 0,05
AUC (U)				174,2±19,13 130,1 — 218,4	291,8± 14,0 259,5 — 324,1 P ₁ = 0,0026 P ₂ = 0,0001	186,5±10,3 163,6–209,4 P ₃ < 0,0001
Кластер рецепторов	АДФ↑=ФАТ↑>адреналин↑			Адреналин↑ =ФАТ↑= АДФ↑		

Примечание: P₁ – сравнение с контрольной группой, P₂ – сравнение с индукцией адреналином у пациентов в фазе рецидива ХОПН, P₃ – сравнение с индукцией АДФ у пациентов в фазе рецидива ХОПН.

7. в контексте трактовки патогенетического механизма реактивности Тц изолировано и Тц, и в кооперации с Лц, при формировании ТЛА, можно заключить: аутокринная активация Тц на значительно уровне подтверждается и данными АТц. При этом происходит поддержание активации и рекрутирование Лц. Тц, активно реагируют на системное действие САС (через Slope), также активированного пула данных форменных элементов достаточно для формирования межклеточных коопераций с Лц.

АНАЛИЗ И ОБОБЩЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Вопрос использования лабораторных критериев в постановке диагноза ХОПН остается дискуссионным [4, 6, 7, 170]. При первичном анализе уровня лейкоцитоза у пациентов с ХОПН установлено отсутствие повышения. Однако обращает на себя внимание диапазон 95% ДИ, а именно его правая граница, которая составила $11,3 \times 10^9/\text{л}$. Относительно уровня СОЭ и СРБ можно констатировать наличие воспаления, исходя из средних значений. Необходимо отметить, что в фазе рецидива ХОПН все же присутствовала группа пациентов (15%, $n=37$), которые не имели лейкоцитоза. При этом в фазе ремиссии у 15 % пациентов лейкоцитоз присутствовал. Можно заключить, что уровень Лц и его низкая информативность связаны с системной ошибкой, либо неучтенным фактором влияния на показатель. Анализ лейкоцитарной формулы закономерно выявил повышение сегментоядерных Нф ($P = 0,022$) у пациентов в фазе рецидива ХОПН и повышение Лфц ($P = 0,017$) и Эо ($P < 0,05$) в фазе ремиссии. Данные факты дают основания констатировать о количестве сегментоядерных Нф как индикаторе острого воспаления, а хронического – количество Лф и Эо.

Одним из факторов, определяющих вариабельность гемограммы у пациентов, является гендерный и возрастной показатель [14, 15, 16]. Установлено, что среди мужчин в когорте пациентов с ХОПН преобладали группы 55-65 лет (38,05%) и старше 65 лет (38,9%). Больше половины пациентов при этом находились в фазе рецидива – 62 (54,9%). Среди особенностей показателей гемограммы обращает на себя внимание наличие лейкоцитоза (за счет количества сегментоядерных Нф) в фазе рецидива у пациентов младше 55 лет. Для возрастных групп 55 – 65 лет и старше 65 лет характерным было увеличение уровня СОЭ. Уровень сегментоядерных Нф оставался повышенным. Кроме того, у группы старше 65 лет наблюдалось на себя внимание незначительное отклонение правой границы относительного количества Лфц, что могло быть отображением хронизации воспалительного процесса или адаптационных реакций [8].

Анализируя группу женщин, можно отметить, что наиболее численной возрастной когортой стали женщины старше 65 лет (36,8%, n=28). В возрастной группе младше 55 лет характерным было повышение общего уровня Лц, однако в данном случае соотношение было распределено между всеми видами Лц в фазе рецидива. Примечательно, что у женщин старше 65 лет в фазе рецидива произошло повышение всех гематологических показателей, относительно фазы ремиссии. Таким образом, можно сделать вывод, что все же вариабельность показателей гемограммы определяется гендерным и возрастным фактором у пациентов с ХОПН [15, 24].

Вопросом, требующим дополнительного рассмотрения, является изменение реактивности форменных элементов крови и других провоспалительных индикаторов после проведения малоинвазивного оперативного вмешательства (КФУЛТ) [12, 42]. Необходимо отметить, что даже минимальная травматизация с нарушением целостности тканей имеет влияние на активация и изменение исследуемых индикаторов [43]. Так через 6 часов после проведения КФУЛТ реактивность Лц у пациентов с предшествующей ремиссией изменилась на 64,8% ($P < 0,01$). В этой же временной точке исследования у пациентов фазы рецидива произошло снижение СОЭ (на 55,5%; $P = 0,034$) и повышение СРБ (на 37,5%; $P < 0,01$). Таким образом, можно заключить, что лейкоцитоз, СОЭ и СРБ не являются равноценными индикаторами в анализе динамики развития и качественных изменений при обострении и хронизации воспаления [20, 22]. Вопрос о корректности диагностической эффективности и ее индикаторов у пациентов с ХОПН остается открытым.

Анализ диагностической эффективности лабораторных индикаторов включает в себя не только чувствительность (истинноположительные случаи, по сути пациенты, у которых был превышен референс) и специфичность (истинно отрицательные случаи или пациентов, не превышавших референсное значение показателя), но и AUC (как интегральный показатель эффективности «прогноза») [27]. Показатель точки отсечения (точка crit.) исследуемых индикаторов у пациентов с ХОПН на протяжении динамики пребывания в стационаре (на этапе госпитализации, после КФУЛТ в первые 6 часов, а также на этапе выписки)

являлся значением, превышая которое результат пациента расценен как положительный. Индекс Юдена в данном контексте является отображением коррекции результатов данной классификации на положительные и отрицательные случаи.

Исходя из вышесказанного, лейкоцитоз_{crit.} в динамике наблюдения за пациентами с ХОПН практически не менялся и был сопоставим с правой границе диапазон нормы ($9 \times 10^9/\text{л}$). Необходимо отметить, что на этапе госпитализации чувствительность лейкоцитоза была достаточно низкой (33,3%), что отразилось на AUC (0,646; $P < 0,0001$) и индексе Юдена (0,294). Количество истинноположительных случаев среди пациентов было наиболее низким на этапе выписки. СОЭ_{crit.} имела наиболее высокое значение на этапе госпитализации ($>16\text{мм/ч}$) с постепенным снижением после КФУЛТ ($>7\text{мм/ч}$) и на этапе выписки ($>5\text{мм/ч}$). Это согласуется с показателями снижения СОЭ после КФУЛТ в фазе рецидива и ремиссии, о чем было указано ранее. Заподозрить после КФУЛТ истинноположительные случаи было достаточно проблематично, судя из чувствительности (57,1%). Показатель специфичности на этапе выписки также не был информативен относительно истинноотрицательных случаев (50,0%). Данный тренд отразился на снижении AUC (0,65) и показателе индекса Юдена (0,3). Относительно СРБ можно отметить неизменность СРБ_{crit.} ($>3\text{мг/л}$). При этом показатели чувствительности имел «провал» (42,8%) после проведения КФУЛТ с восстановлением тренда на этапе выписки (80,0%). Относительно специфичности можно констатировать обратную тенденцию – после КФУЛТ индикатор СРБ позволял «не выявить» с большей вероятностью (75,0%). AUC имел сопоставимую динамику, при этом индекс Юдена оставлял вопрос использования СРБ в динамике исследования у пациентов с хроническим воспалением неоднозначным, ввиду низкого показателя на этапе госпитализации (0,284) и выписки (0,371).

Указанные лабораторные показатели констатируют наличие воспаления при состоявшейся клинической картине [88, 160, 188]. По сути, можно сделать вывод, что эти показатели являются как инициаторами и провокантами симптоматики (уровень Лц), которая развивается у пациента при рецидиве ХОПН, так и

следствие уже запущенного воспалительного каскада (СОЭ, СРБ) [57, 220]. как уже было указано ранее, формирование ТЛА является индикатором взаимодействия форменных элементов, которые задействованы в процессах, являющихся основополагающими в патогенезе ХОПН [19, 21, 25]. Так Тц участвуют в процессах гемостаза, однако, в настоящее время известно, что это не является их единственно основополагающей функцией [9, 32, 76, 225]. Помимо того известно об участии Тц в воспалении, а так при наличии антигенного фактора воздействия [132, 135, 169, 236]. При этом, нужно подчеркнуть, что Лц, в составе маргинального пула, вступают в молекулярные взаимодействия с Тц, посредством адгезивных молекул, что в дальнейшем определяет их функциональную направленность (inside-out и outside-in сигнальный каскады, хемотаксис, секреция протеолитических ферментов и активация оксидативных реакций, выбрасывание нейтрофильных ловушек и др.) [79]. При этом механизм активации определяется видом (для Нф, Мц и Лц они могут иметь специфический характер). Поэтому формирование ТЛА можно предложить, как один из провоспалительных индикаторов инициации, специализации и дальнейшего развития воспалительного процесса в зависимости от органных особенностей [41, 56, 57, 238].

На сегодня не имеется четкого референсного значения количества ТЛА [3, 5, 10]. Установлено, что у здоровых лиц контрольной группы имеется около 5% клеток, которые связаны с Тц. Закономерным было повышение количества ТЛА у пациентов в фазе рецидива относительно здоровых лиц в 2,64 раза ($P=0,001$). В фазе ремиссии ХОПН пациенты также продемонстрировали повышение числа ТЛА, относительно здоровых лиц на 25,4% ($P<0,001$). Таким образом, на этапе госпитализации у пациентов фазах ХОПН формирование ТЛА констатировало наличие воспаления, вне зависимости от результатов других лабораторных маркеров. Интересным представляется факт повышения ТЛА после КФУЛТ у пациентов с предсуществующей ремиссией ХОПН (прирост составил 37,7%; $P = 0,023$), что можно объяснить активацией Лц из мобилизационного пула в ответ на травматизацию с нарушением целостности тканей после КФУЛТ [26].

Исследование диагностической эффективности ТЛА показало, что TLA_{crit} была сопоставима на всех временных точках исследования пациентов с стационаре (>5-6%). При этом, обращает на себя внимание высокий показатель чувствительности и специфичности на этапе госпитализации (96,3% и 93,3%, соответственно) с незначительным снижением после КФУЛТ (78,5% и 80,0%, соответственно) и периода выписки (75,0% и 87,5%, соответственно). AUC и индекс Юдена отражали данную тенденцию. Исходя из сопоставления индикаторов лейкоцитоза, СОЭ, СРБ и ТЛА, можно заключить, что ТЛА возможно рассматривать, как дополнительный провоспалительный индикатор [47, 50, 53, 193], а механизмы его формирования требуют рассмотрения для детализации патогенетического профиля пациентов с ХОПН [49].

После установления факта наличия формирования ТЛА в цельной крови здоровых лиц и пациентов с ХОПН логичным представляется изучение влияния адреналина, как системного регулятора симпатoadреналовой системы (САС), активация которой происходит при травматизации тканей почки и МВП конкрементами [94, 173, 203]. При этом рассмотрение влияния АДФ, стимулирующего $P2Y$ -рецепторы Тц и Лц [87, 109, 140, 184], также представляется актуальным в контексте аутокринного влияния на Тц и паракринного влияния на Лц. ФАТ был рассмотрен, как агонист действующий аутокринно на Лц [113, 123, 152, 201] и паракринно на Тц [93, 166, 281, 289, 297]. При этом необходимо акцентировать, что данные агонисты реализуют свое влияния на рецепторный аппарат и запускают дальнейшие сигнальные каскады посредством G-белковые рецепторы плазмолеммы (GPCR) [127, 214, 266]. Адреналин реализует системное влияние через G_i -сигнальный путь, с последующим ингибированием аденилатциклазы (Ац) [122, 287]. ФАТ реализует свое действие через G_q -сигнальный путь, который ниже будет активировать фосфолипазу С (ФЛС) [171, 176, 178]. $P2Y_1$ и $P2Y_{12}$ -рецепторы, наиболее изученными на сегодня на Тц, к АДФ реализуют дальнейшую передачу внутриклеточного сигнала параллельно через G_i и G_q -сигнальные пути [175, 219, 234, 250].

У здоровых лиц, анализируя индуктивное влияние агонистов на формирование ТЛА, активация P2Y- и ФАТ-рецепторов были сопоставимы между собой ($P=0,09$) и превалировали, по сравнению с ТЛА, индуцированными адреналином на 48,1% ($P=0,021$) и на 44,8% ($P=0,005$) соответственно. Таким образом, можно заключить, что паракринные и аутокринные механизмы у здоровых лиц являлись доминирующими и более эффективными посредством Gq-сигнального пути [121]. Среди Лц, формирующих агрегаты с Тц преобладали Нф до инкубации агонистами у здоровых лиц. $\alpha 2$ -адренорецепторы Нф были чувствительны к адреналину, что было продемонстрировано формированием ТцНфА (прирост составил 36,5%; $P=0,026$). Стимулирующее влияние ФАТ было на 63,5% больше ($P=0,02$), чем при индукции адреналином и на 13,75% ($P=0,019$) меньше, чем при индукции АДФ при формировании ТцНфА. Таким образом, был активирован спектр рецепторов на Нф к указанным агонистам, что было подтверждено приростом формирования ТцНфА [89, 95, 145, 146, 185].

Суммарный кластер рецепторов у пациентов с ХОПН в фазе ремиссии был определен как ФАТ > активности адреналина = активности АДФ. Данный факт был установлен на основании повышения формирования ТЛА в данной группе пациентов в 2,35 раза ($P<0,001$) после индукции ФАТ и на 17,9% относительно контрольной группы ($P=0,01$), а также как превалирующий агонист относительно действия АДФ (на 46,03%; $P=0,035$) и адреналина (на 31,4%; $P=0,008$). Факт сопоставимость результатов при индукции АДФ и адреналином говорит о сохранения адаптационных возможностей паракринной регуляции Тц [86, 119].

Закономерным вопросом является наличие гетерогенности клеточного состава ТЛА у пациентов с ХОПН в фазе ремиссии? Авторами указывается фенотипическая гетерогенность и функциональная пластичность иммунных клеток при воспалительном процессе [134]. Уже до инкубации агонистами было установлено преобладание Нф в ТЛА [131, 168]. Примечательно, что в составе агрегатов также присутствовали Эо, что может подтверждать факт хронизации процесса [157]. Интересна тенденция повышения Мц в составе агрегатов (в 3 раза; $P= 0,083$) при индукции адреналином, что может быть связано с активацией α/β адренорецепторов [107, 144, 150]. При этом паракринная стимуляция АДФ

активировала пул Мц в составе агрегатов в 2 раза ($P=0,049$), а Нф – на 37,5% ($P=0,048$), что говорит о чувствительности Gq-ФЛС-пути [101, 154].

Как уже было указано, количественные показатели форменных элементов крови у пациентов с ХОПН имели гендерные и возрастные различия. Таким образом, фактор индивидуальной реактивности был актуален для формирования ТЛА в данной группе пациентов в фазе ремиссии. Установленная градация на гипо-, нормо-, гипердренореактивные фенотипы позволила выделить соответствующие кластеры рецепторов у каждого из фенотипов.

Гиподренореактивный фенотип продемонстрировал кластер рецепторов как АДФ>адреналин>ФАТ. Была выявлена взаимосвязь между формированием ТЛА при трех агонистах ($r_{\text{АДФ-Адрен}}=0,916$; $r_{\text{АДФ-ФАТ}}=0,893$, $r_{\text{ФАТ-Адрен}}=0,78$), которая дала основания предполагать потенцирование сигнальных путей. Несмотря на то, что результаты на трех агонистах были ниже относительно контрольной группы здоровых лиц, было продемонстрировано низкое индуцирующее влияние САС на $\alpha 2$ -адренорецепторы Лц и Тц с последующей секрецией ими ФАТ и АДФ. Последние поддерживают взаимные паракринные влияния при формировании ТЛА [143, 161, 195, 196]. При этом, снижение аутокринной стимуляции Тц может быть причиной ограничения формирования ТЛА, поскольку индуцирующий эффект адреналина и ФАТ базируется на секреции АДФ из плотных гранул Тц [110, 196, 240].

При исследовании нормодренореактивного фенотипа клеток крови у пациентов в фазе ремиссии обращало на себя внимание высокая реактивность ФАТ-рецептора, который воспроизводил формирование ТЛА на 75,5% ($P=0,002$) больше, чем пуриновые P2Y-рецепторы и на 58,0% ($P=0,014$) больше, чем $\alpha 2$ -адренорецептор. Кластер рецепторов может быть представлен следующим образом: ФАТ-рецептор> P2Y-рецепторы = $\alpha 2$ -адренорецептор. Таким образом, в МВП возрастала модулирующая роль Лц, за счет секреции ФАТ, при этом снижение аутокринной стимуляции Тц не имело критического значения и не оказывало влияния на реактивность ФАТ-рецептора и $\alpha 2$ -адренорецептора [111, 118, 119]. То есть Лц играют ведущую роль в формировании ТЛА, причем их активация не связана с влиянием Тц, секретирующих АДФ, и состоянием САС

[133]. Возможными факторами могут быть сами аутокринные механизмы влияния на Лц за счет секреции ФАТ, а также других факторов, обеспечивающих рекрутирование резервного пула Лц (цитокины, лейкотриены, факторы хемотаксиса) [194, 239].

У пациентов в фазу ремиссии ХОПН гиперадренореактивный фенотип клеток крови характеризуется высокой реактивностью в отношении адреналина, что отражает ведущую роль САС при активации Тц и Лц [146]. При анализе кластера активности рецепторов установлено, что наиболее высокий показатель проявлял $\alpha 2$ -адренорецептор, активность которого в отношении формирования ТЛА превышала таковую P2Y-рецепторов и ФАТ-рецептор примерно на 42% ($P = 0,007$ и $P < 0,0001$, соответственно). Кластер рецепторов был установлен как активность $\alpha 2$ -адренорецептор > P2Y-рецепторы = ФАТ-рецептор, при этом все показатели коррелировали между собой. Указанные факты подтверждают доминирование системной активации Тц и Лц, которые обеспечивали взаимную индукцию паракринно, а также аутокринно.

Таким образом, определение клеточного состава гиперадренореактивного фенотипа может указать на действующие звенья и их взаимодействие в инициации перехода хронического воспаления в состояние рецидива. При индукции адренорецептора произошла активация Нф, Мц, Лфц и Эо. При этом эффект синергизма был между Нф и Мц ($r=0,9$; $P < 0,001$), а антагонизма между Нф и Лф ($r = -0,896$; $P = 0,003$), Нф и Эо ($r = -0,923$; $P < 0,001$), что отражает включение компенсаторных реакций посредством ограничения функции Нф и наоборот [155, 198]. Появление Эо в составе агрегатов подтверждает реакцию, направленную на ограничение воспаления и Нф [110]. P2Y-рецепторы на Мц активировались и взаимодействовали с Тц на 53,84% ($P = 0,004$) больше, посредством CD62P и PSGL-1, с дальнейшей возможной секрецией IL-1 β , TNF- α , PGE2 [216] а также появление ТЭоА, отсутствовавших до стимуляции агонистом. Действие Тц на Эо продолжают изучаться [157]. Снижение влияния пуринаргической сигнализации в Нф связано с функциональной активностью Мц ($r = -0,98$; $P = 0,02$) и Эо ($r = -0,9$; $P < 0,001$). Активация ФАТ-рецепторов имела место на Нф ($\alpha 2$ -адренорецептор) и Лфц (β -адренорецептор) [193, 296], причем эти виды Лц могут стимулироваться

САС, а значит, возможно потенцирование эффектов ФАТ-рецептора и $\alpha 2$ -адренорецептора. Примечательно, что усиление стимуляции Нф посредством ФАТ-рецептора может ограничивать активность Лф ($r = -0,871$; $P = 0,024$), тем самым, ингибируется поддержание хронического воспаления в МВП. Концепция механизмов контроля активности Лц при выборе направления и скорости развития воспалительной реакции в МВП может включать в себя факт того, что в фазе ремиссии клетки крови динамически поддерживают баланс между активацией (аутокринное действие ФАТ и/или действие САС путем активации $\alpha 2$ -адренорецептор на поверхности Нф) и торможением (посредством Лфц ($\alpha 2$ -адренорецептор/ФАТ-рецептор) и Мц (P2Y-рецептор), Эо ($\alpha 2$ -адренорецептор и P2Y-рецептор)) [11, 94, 144]. При это Нф играют первостепенную роль во взаимодействии с практически всеми видами Лц путем синергизма и антагонизма [106, 148, 149].

У пациентов в фазе рецидива рекрутирование Лц при остром воспалении в МВП воспроизводилось путем активации $\alpha 2$ -адренорецепторов на клетках крови [102, 148, 158]. При этом происходит с участием активированных Тц, секретирующих АДФ, что сопровождалось гиперреактивностью рецепторов P2Y₁- и P2Y₁₂-рецепторов на Лц [92, 104]. Примечательно, эффект паракринной регуляции посредством Тц сопоставим с эффектом системной регуляции катехоламинов, обеспечивающей активацию Лц посредством $\alpha 2$ -адренорецептора ($P = 0,471$). Повышение реактивности ФАТ-рецептора клеток крови имеет место при наличии острого воспаления в МВП и функционировании паракринного механизма стимуляции Лц при формировании ТЛА [90, 120]. Суммарный кластер рецепторов у пациентов в фазе рецидива ХОПН можно представить как ФАТ>АДФ=Адреналин. Установлено, что в фазе ремиссии и рецидива ХОПН формирование ТЛА и рекрутирование Лц крови из циркулирующей крови в очаг воспаления достигается посредством включения системного (влияние адреналина) и паракринных механизмов (секреция АДФ и ФАТ), зависит от активности $\alpha 2$ -адренорецептора, P2Y-рецепторов и ФАТ-рецептора клеток крови [162, 191, 273]. Причем аутокринная стимуляция Лц посредством ФАТ воспроизводила большее количество агрегатов, по сравнению с системным механизмом адреналина и

паракринным механизмом Тц. Таким образом, анализируя показатели формирования ТЛА при индукции ФАТ, можно заключить, что паракринная стимуляция Тц и аутокринная активация Лц являются стереотипным регулятором клеток крови в фазе ремиссии и рецидива ХОПН [222, 223, 262].

При выборе информативного индикатора, который позволяет объективно разграничивать реактивность клеток определена реактивность P2Y-рецепторов, поскольку внутриклеточная сигнализация сопряжена как с Gi-, так и с Gq-белками [30, 121]. При исследовании гипопуринергического фенотипа клеток по степени влияния на формирование ТЛА был выделен кластер рецептор: P2Y-рецепторы=ФАТ-рецептор > $\alpha 2$ -адренорецептор. Корреляционная связь между активностью P2Y-рецепторов и $\alpha 2$ -адренорецептора ($r=0,9$; $P<0,0001$); между активностью P2Y-рецепторов и ФАТ-рецептора ($r=0,89$; $P<0,0001$), а также между активностью ФАТ-рецептора и $\alpha 2$ -адренорецептора ($r=0,98$; $P<0,001$) свидетельствовала о синергизме Gq-Gi-сигнальных путей [125, 129, 208]. Взаимодействие P2Y-рецепторов, ФАТ-рецептора и $\alpha 2$ -адренорецептора может при необходимости усиливать рекрутирование Лц [212]. Если ведущим являлся Gq-путь с последующей активацией PLC RAR/RhoA-сигнализации, то можно предположить активацию дальнейшего каскада inside-out и outside-in, что приводит к экспрессии высокоафинных связей интегринов на поверхности Лц и как следствие возможность миграции [172, 215, 226, 294]. Данный процесс в условиях фенотипа может говорить о состоянии «прекондиционирования» Лц с помощью Тц, то есть состояние готовности к обострению воспаления [189, 218, 228, 231]. Десенситизация P2Y-рецепторов и ФАТ-рецептора на клетках крови может быть следствием ограничения компенсаторных реакций Тц [61].

При наличии нормопуринергического фенотипа системная регуляция клеток крови при активации САС может усиливать эффект паракринной стимуляции посредством влияния на $\alpha 2$ -адренорецептор Лц (синергия с ФАТ-рецептором) [94, 144]. Последующая секреция ФАТ может быть аутокринным самоподдержанием Лц [257, 275]. Аналогичная тенденция может быть при индуцировании через $\alpha 2$ -адренорецептор Тц, которые в потенцировании с P2Y-рецепторами (усиливая Gq-путь, который ведет к секреции из плотных гранул

АДФ) при формировании ТЛА, аутокринно стимулирует резерв Тц [217, 120, 286]. Об этом свидетельствуют корреляционные связи между ФАТ-рецепторов и $\alpha 2$ -адренорецептора ($r_{\text{ФАТ-адреналин}} = 0,863$; $P < 0,001$), а также активностью Р2У-рецепторов и $\alpha 2$ -адренорецептора ($r_{\text{АДФ-адреналин}} = 0,542$; $P = 0,03$). Кластер рецепторов фенотипа можно представить, как Р2У-рецепторы= ФАТ-рецептор= $\alpha 2$ -адренорецептор.

При наличии гиперпуринергического фенотипа клеток крови кластер активности рецепторов можно представить в виде: активность Р2У-рецепторы= ФАТ-рецептор > $\alpha 2$ -адренорецептор. Корреляционная связь между активностью Р2У-рецепторов и $\alpha 2$ -адренорецептора ($r = 0,899$; $P = 0,001$), а также между $\alpha 2$ -адренорецептором и ФАТ-рецептором ($r = 0,847$; $P = 0,001$) и между Р2У-рецепторами и ФАТ-рецептором ($r = 0,732$; $P = 0,025$), свидетельствуют, что у пациентов с гиперпуринергическим фенотипом клеток крови поддержание острой воспалительной реакции связано с синергией $\alpha 2$ -адренорецептора с Р2У-рецепторами и ФАТ-рецептором клеток крови в увеличение количества ТЛА при кооперации Тц и Лц. Похожий механизм патогенетических взаимодействий имел место при нормопуринергическом фенотипе. Данный механизм может с помощью поддержки САС потенцировать паракринные и затем аутокринные влияния на Тц и Лц. Однако, в данном случае можно заметить, что количество ТЛА, образованных посредством стимуляции $\alpha 2$ -адренорецептора было ниже. Следовательно, сила влияния САС ниже, чем при нормопуринергическом фенотипе. Данный факт может объясняться повышением чувствительности адренорецепторов [100, 142].

Гипер- и нормопуринергические фенотипы клеток крови характеризовались сходной активностью ФАТ-рецептора и $\alpha 2$ -адренорецептора. Логично предположить, что клетки крови, участвующие в острой воспалительной реакции, обладают сходной реактивностью в отношении адреналина и ФАТ, позволяющей поддерживающих воспаление в МВП [91, 128, 159]. При этом фактором ограничивающим формирование ТЛА и рекрутирование клеток крови может являться различная реактивность Р2У-рецепторов Тц. В сущности, повышение аутокринной стимуляции активности Р2У-рецепторов может быть механизмом

усиления острой воспалительной реакции, отражением чего является гиперпуринергический фенотип клеток крови [128, 214]. Нормореактивность P2Y-рецепторов на Тц при наличии гиперреактивности ФАТ-рецептора и $\alpha 2$ -адренорецептора позволяет «запускать» формирование ТЛА для поддержания острой воспалительной реакции [110, 186]. В этом случае аутокринная стимуляция Тц является триггером развития воспаления в фазе рецидива [127, 286].

При наличии нормопуринергического фенотипа клеток крови стимуляция рецепторов, связанных с индукцией воспалительной реакции, сопровождается повышением рекрутирования Нф, тем самым подтверждается возможность развития ранней фазы острой воспалительной реакции [193]. При этом ведущую роль в активации Тц и Нф играет активность ФАТ-рецептора [229]. Вероятно, сигнальный путь, связанный с ФАТ-рецептором является ведущим рекрутирования «интактных» Нф и Тц [207]. Следовательно, у пациентов с нормопуринергическим фенотипом клеток крови активация ФАТ-рецептора является триггером вовлечения в воспалительный процесс интактных Нф [270]. При этом стимуляция $\alpha 2$ -адренорецептора является ведущим механизмом взаимодействия активированных Тц и Нф [147, 211]. Отрицательная корреляционная связь между количеством Нф и Эо в составе ТЛА ($r = -0,829$; $P = 0,021$) и положительная связь – между количеством Мц и Лфц в составе агрегатов ($r = 0,809$; $P = 0,002$). Что говорит о конкуренции Нф и Эо за кооперацию с Тц, тогда как Мц и Лфц поддерживают формирование ТЛА с их участием [46, 59, 67]. Можно сделать вывод, что стимуляция $\alpha 2$ -адренорецептора на клетках крови проявлялась преимущественной активацией Нф, взаимодействием Мц и Лфц, направленным на ограничение формирования агрегатов Нф и Тц [60, 67, 223].

У контингента больных с гиперпуринергическим фенотипом увеличено количество интактных Нф в составе ТЛА, по сути создается пул этих Лц, необходимый для реализации острой воспалительной реакции [192]. Наличие гиперпуринергического фенотипа клеток крови отражает возможность участия всех исследованных рецепторов в мобилизации интактных Нф, причем доминирующую роль в этом процессе играют ФАТ-рецепторы [242, 243]. Так при

нормопуринергическом фенотипе клеток крови ведущую роль в трафике Нф играл $\alpha 2$ -адренорецептор [94]. Если руководствоваться предназначением этих двух фенотипов клеток, то можно прийти к заключению, что на ранней стадии обострения воспалительной реакции (нормопуринергический фенотип) инициация рекрутирования Нф обеспечивается посредством адренорецепторов, тогда как на поздней стадии – поддержание стабильного пула Нф, мигрирующих в ткани МВП регулируется ФАТ-рецепторами, т.е. механизмом аутокринной стимуляции Лц [132]. При стимуляции $\alpha 2$ -адренорецептора количество Нф в составе ТЛА возросло в 2,0 раза ($P=0,002$), P2Y-рецепторов – на 38,7% ($P = 0,018$) и ФАТ-рецептора – на 53,3% ($P=0,042$), по сравнению с их количеством в контрольной группе. Следовательно, у пациентов с гиперпуринергическим фенотипом клеток возрастает роль сигнализации, связанной с $\alpha 2$ -адренорецептором на Нф и/или Тц [72, 290]. В этой связи отмеченный эффект стимуляции ФАТ-рецептора при мобилизации Нф может быть следствием синергизма ФАТ-рецептора и $\alpha 2$ -адренорецептора [104, 254]. Различная реактивность клеток крови в фазе ремиссии и рецидива ХОПН позволяет наблюдать за развитием и моделированием регуляции воспалительной реакции в МВП.

Вопрос селективности Тц в рекрутировании Лц из сосудистого русла при реализации хронической и острой воспалительной реакции в слизистой оболочке МВП под влиянием агонистов различного механизма действия на Тц является актуальным [1, 2, 13]. В этих условиях может определяться состав и количество Лц, а также механизмы рекрутирования Лц в патологический очаг МВП. Причем Тц в этом контексте являются определяющими [17, 23]. Активация Тц может рассматриваться как ранний индикатор прекондиционирования Лц, а сами агонисты – как патогенетические факторы, индуцирующие агрегацию [28]. Тогда амплитудные характеристики связаны с количеством Лц и составом ТЛА, что позволит идентифицировать внутриклеточную сигнализацию в Тц при рекрутировании Лц [62, 63].

При анализе амплитуды агрегации Тц (АТц) контрольной группы была констатирована нормореактивность при индукции тремя агонистами. Скорость

протекания внутриклеточных реакций ожидаемо была выше при индукции АДФ, поскольку посредством включения P2Y-рецепцию происходит потенцирования Gq+Gi-сигнального пути [13, 33, 34]. В данном случае, у здоровых лиц как преобладал Gq-путь (через фосфолипазу C). Закономерным считается положительная зависимость между Slope и AUC, в то время как Lag-time обратно пропорционален упомянутым показателям. Таким образом, чем быстрее произойдет активация рецепторного аппарата на поверхности плазмолеммы Тц, тем быстрее наступит внутриклеточный сигнальный каскад у значительного количества Тц [18, 31, 232]. Можно заключить, что данная закономерность присуща Тц, которые не скомпрометированы патологическим процессом, либо дополнительными факторами влияния. Подтверждалось участие Тц в формировании ТЛА зависимостью амплитудных характеристик от формирования межклеточных коопераций. При этом количество ТЛА зависело от функциональной активности Тц и определяется адгезивными взаимодействиями и паракринной стимуляцией Лц посредством пуриновых P2Y₁-рецепторов (Gq-сигнальный путь) [37].

Для пациентов с гипoadренореактивным фенотипом в фазе ремиссии ХОПН ожидаемым ожидаемо было установлено снижение амплитуды Атц на всех агонистах. При этом плотность и сенситивность рецепторов была представлена АДФ> адреналин>ФАТ. Таким образом, можно говорить о десенситизации ФАТ-рецепторов и адренорецепторов. Причиной этого могло быть нарушение сигнализации на уровне связывания рецептора с G-белком. В клетках данного фенотипа присутствовало снижение скорости внутриклеточных реакций, что в меньшей степени отразилось на стимуляции P2Y-рецепторов. Наличие сильной корреляционной связи между значениями AUC при индукции Тц адреналином, АДФ и ФАТ ($r=0,987$; $P<0,001$) и количеством ТЛА, сформировавшихся при стимуляции α 2-адренорецептора, P2Y-рецепторов и ФАТ-рецептора, одновременно на Тц и Лц, позволяет заключить, что Тц участвуют в формировании ТЛА, а адреналин, АДФ и ФАТ могут быть факторами риска восстановления воспалительной реакции в почке [41, 43]. Таким образом, наличие гипoadренореактивного фенотипа клеток крови в фазе ремиссии ХОПН связано с

функционированием защитных механизмов, ограничивающих функциональную активность Тц, следствием чего является снижение количества циркулирующих ТЛА и рекрутирования Лц из сосудистого русла в ткани почки и МВП.

Для нормоадренореактивного фенотипа было характерно наличие незначительной гиперреактивности ФАТ-индуцированной амплитуды ($P=0,0007$). Необходимо отметить, что ФАТ-стимуляция, судя по амплитуде, доминирующей относительно адреналина (на 12,99% больше; $P=0,0007$) и АДФ (на 14,89% больше; $P=0,003$). Плотность и чувствительность рецепторов в данной группе пациентов с ХОПН можно представить, как $\text{адреналин} \geq \text{АДФ} \geq \text{ФАТ}$. При этом скорость внутриклеточных сигнальных механизмов функционировала на сопоставимом уровне с контрольной группой здоровых лиц. ФАТ активировал наиболее высокое количество Тц (AUC), относительно адреналина ($P=0,0007$) и АДФ ($P=0,012$), что может быть подтверждением влияния паракринного влияния Лц на Тц, в том числе при формировании ТЛА. При сравнении корреляционных связей, которые демонстрируют согласованность работы сигнальных путей Тц, у пациентов с нормоадренореактивным фенотипом ремиссии ХОПН при анализе аутокринной индукции АДФ на Тц была определена отрицательная связь сильной степени ($r=-0,813$; $P=0,0142$) между Lag-time и AUC. Несмотря на факт наличия десенситизации пуриновых рецепторов и снижение функционально активированных Тц, возможность частичного сохранения паттерна взаимодействия амплитудных характеристик осталась. Объяснением этому может быть потенцирующий эффект Gq- и Gi-сигнальных путей, которые реализуются при индукции пуриновых рецепторов Тц [116]. Паракринная стимуляция Тц ФАТ, при исследовании корреляционных связей амплитудных характеристик продемонстрировала тесное взаимодействие Slope с AUC Тц ($r=0,756$; $P=0,03$). Таким образом, у пациентов ремиссии ХОПН, которые демонстрировали нормореактивный ответ клеток крови переход к рецидиву обеспечивался активными Лц, которые секретируют ФАТ и индуцируют Тц, что способствует формированию ТЛА [10]. Функциональная активность Тц характеризуется снижением аутокринной стимуляции посредством АДФ, что обуславливает ограничение количества Тц, способных участвовать во взаимодействии с Лц

[130]. То есть, Тц являются «слабым» звеном воспалительной реакции, лимитирующим возникновение рецидива ХОПН.

У пациентов с гиперадренореактивным фенотипом ХОПН в порядке убывания уровень амплитуды можно представить, как адреналин > АДФ > ФАТ. В то время как, плотность рецепторов можно представить в виде: адреналин = АДФ = ФАТ. Это можно объяснить сопряженностью Gi- и Gq-белков при стимуляции P2Y-рецепторов и $\alpha 2$ -адренорецепторов (сопряженность Gi-белком), что обуславливало высокую скорость сигнализации, нежели стимуляция ФАТ-рецептора.

Можно сделать вывод, что у пациентов в фазе ремиссии САС участвует как в индукции Тц, так и развитии воспаления (рекрутирование Лц). Каждый из фенотипов, которые были выявлены, отличались реактивностью рецепторного аппарата и реализацией определенного механизма воспаления. Так гипoadренореактивный фенотип был направлен на механизмы ограничения воспаления. Нормoadренореактивный фенотип участвовал в поддержании хронического воспаления, а гиперадренореактивный фенотип был связующим звеном перехода от хронического к обострению. Адаптационные механизмы аутокринной и паракринной стимуляции клеток крови, связанные со стимуляцией P2Y-рецепторов и ФАТ-рецептора, обеспечивают взаимную индукцию Тц и Лц, однако локальная регуляция при формировании ТЛА менее эффективна, чем системная адренергическая стимуляция [114, 204].

У пациентов с гипопуринергическим фенотипом ХОПН показатели амплитуды на трех агонистах находились в значениях гипореактивности. Плотность рецепторов у пациентов с гипопуринергическим фенотипом можно представить в виде: адреналин > ФАТ > АДФ. Скорость внутриклеточных реакций была снижена на 85,43% ($P < 0,0001$) при воздействии АДФ, а при стимуляции ФАТ – снижение в 2 раза ($P < 0,0001$). Сравнивая показатели между собой можно отметить, что они находились на одном уровне значений. Таким образом, можно констатировать, что произошла адаптация на уровне внутриклеточной сигнализации имело место в Gi-системе, в то время как Gq-сигнальный путь работал не эффективно. Суммируя результаты относительно формирования ТЛА

можно заключить, что аутокринная активация (АДФ) Тц поддерживала на низком уровне кооперации Тц и Лц. При этом системного влияния адреналина оказалось достаточно для поддержания агрегатообразования. Это соотносилось скоростью включения рецепторов, которая сохранилась только при стимуляции адреналином, похожая тенденция отмечалась и при измерении количества активированных Тц. Возможно, потенцирующий эффект АДФ, но за счет Gi-системы активации (адреналин), а не Gq-эффекта [120, 121,154].

У пациентов с нормопуринергическим фенотипом клеток крови амплитуда АТц была сопоставима среди агонистов и со значениями контрольной группы здоровых лиц. В порядке длительности активацию рецепторов у данного контингента больных можно представить следующим образом: ФАТ-рецептор> α 2-адренорецептор>P2Y-рецепторы. Только пуриновые рецепторы сохранили адаптационные свойства у пациентов данной группы исследования, в то время как α 2-адренорецептор и ФАТ-рецептор были подвержены десенситизации, что могло объясняться потенцированием сигнальных систем [266]. Десенситизация рецепторов также отразилась на скорости внутриклеточных реакций. Сопоставимость была только при активации адренорецепторов Gi- пути, несмотря на отсрочку их реакции. Сопоставляя данные формирования ТЛА и АТц – аутокринная регуляция Тц в достаточной мере стимулировала активность Лц (по уровню формирования ТЛА при индукции ФАТ и восприимчивости ФАТ-рецепторов на Тц) и также оказывала компенсирующее влияние на Тц. Системная активация САС стимулировала и Тц (судя по уровню AUC) и Лц (уровень формирования ТЛА).

Гиперпуринергический фенотип клеток характеризуется также гиперреактивностью α 2-адренорецептора и ФАТ-рецептора, а также пуриновых рецепторов. Данный феномен представляется логичным, учитывая, что сигнализация α 2-адренорецептора и ФАТ-рецептора связана, соответственно, с Gi- и Gq-белком, а, следовательно, модулируется активностью P2Y-рецептора [120, 121]. Анализ показателя Lag-time свидетельствовал о равнозначности продолжительности времени необходимого для связывания агониста с рецептором с данными контрольной группой здоровых лиц. Можно

констатировать усиление скорости компенсаторной реакции Тц, в основе которой лежит аутокринная стимуляция P2Y-рецептора, поскольку скорость сигнализации $\alpha 2$ -адренорецептора и ФАТ-рецептора посредством Gi- и Gq-белков соответствовала физиологическим значениям [177, 274]. Количество активированных Тц было сопоставимо со здоровыми лицами при активации адреналином и ФАТ. АДФ стимулировал активацию повышенного числа Тц относительно контрольной группы здоровых лиц. Таким образом, аутокринная активация Тц на значительно уровне подтверждается и данными АТц. При этом происходит поддержание активации и рекрутирование Лц. Тц, активно реагируют на системное действие САС (через Slope), также активированного пула данных форменных элементов достаточно для формирования межклеточных коопераций с Лц.

ВЫВОДЫ

В диссертации проведен анализ влияния нефролитиаза на функциональную активность клеток крови и достигнуто решение актуальной задачи в области патологической физиологии – изучить молекулярные механизмы инициации и ограничения воспаления, обусловленные индивидуальной реактивностью организма, у пациентов с ХОПН, что позволит персонифицировать схему консервативной терапии посредством модуляции внутриклеточной сигнализации Тц и Лц.

1. Анализ построенных однофакторных моделей логистической регрессии подтвердил, что на этапе госпитализации пациентов наиболее информативным индикатором фазы ХОПН является критический уровень циркулирующих в крови ТЛА. При значении показателя (TLA_{crit}) $>5\%$ у пациентов имела место фаза рецидива ХОПН, а при значении $TLA_{crit} \leq 5\%$ – фаза ремиссии заболевания. Для выбранного порога чувствительность предлагаемого диагностического теста составляет $96,3\%$ (95% ДИ 81,0 – 99,9%) и специфичность – $93,3\%$ (95% ДИ 68,1 – 99,8%), АUC – 0,965 (95% ДИ 0,858 – 0,998).

2. У здоровых лиц формирование ТЛА обеспечивается паракринными механизмами секреции АДФ и ФАТ. При ХОПН рекрутирование Лц из сосудистого русла достигается путем стимуляции $\alpha 2$ -адренорецептора, пуриновых P2Y-рецепторов и ФАТ-рецептора. Наиболее выраженный эффект формирования ТЛА воспроизводит ФАТ, эффект которого в фазе ремиссии превосходит влияние адреналина и АДФ соответственно на $31,4\%$ и $46,0\%$ ($P < 0,05$); в фазе рецидива заболевания соответственно на $29,6\%$ и $23,5\%$ ($P < 0,05$).

3. Индивидуальная реактивность организма пациентов с ХОПН проявляется наличием гипо-, нормо- и гиперреактивного фенотипов клеток крови, отличающихся реакцией на провоспалительные стимулы (адреналин, АДФ и ФАТ). В фазе ремиссии ХОПН информативным показателем фенотипа является реактивность $\alpha 2$ -адренорецептора. При гипoadренореактивном фенотипе стимуляция $\alpha 2$ -адренорецептора воспроизводила меньше ТЛА, чем ФАТ-рецептор и P2Y-рецепторы ($P = 0,001$); при нормoadренореактивном – эффект $\alpha 2$ -

адренорецептора сопоставимым с таковым P2Y-рецепторов и на 26,8% ($P < 0,05$) меньше, чем ФАТ-рецептора; при гиперадренореактивном фенотипе – индуцирующее влияние $\alpha 2$ -адренорецептора на формирование ТЛА выше, чем при стимуляции P2Y-рецепторов и ФАТ-рецептора ($P < 0,01$).

4. В фазе рецидива ХОПН наиболее информативным индикатором реактивности клеток крови является активность пуриновых P2Y-рецепторов, сопряженных с Gi-, и Gq-белками. Анализ активности P2Y-рецепторов позволяет выделять гипо-, нормо- и гиперпуринореактивные фенотипы клеток крови. При нормопуринергическом фенотипе эффект P2Y-рецепторов сопоставимым с таковым $\alpha 2$ -адренорецептора и меньше чем ФАТ-рецептора ($P < 0,05$); при гипо- и гиперпуринергическом фенотипах стимуляция P2Y-рецепторов индуцировала такое же количество ТЛА, как ФАТ-рецептор, но больше, чем $\alpha 2$ -адренорецептор ($P < 0,01$).

5. Активность рецепторов может рассматриваться как ранний индикатор провоспалительной функции Тц, связанной с формированием ТЛА. При гипoadренореактивном фенотипе клеток крови у пациентов с фазой ремиссии ХОПН снижение активности рецепторов Тц обеспечивает ограничение рекрутирования Лц; при нормoadренореактивном – стимуляция ФАТ-рецептора воспроизводит доминирующий вид сигнализации в Тц; при гиперадренореактивном фенотипе компенсаторная реакция Тц, связанная со стимуляцией $\alpha 2$ -адренорецептора, P2Y-рецепторов и ФАТ-рецептора, обеспечивают максимальное вовлечение Тц в формирование ТЛА.

6. В фазе рецидива ХОПН у пациентов с гипопуринергическим фенотипом клеток крови регистрируется десенситизация рецепторов, при этом сниженная внутриклеточная сигнализация ограничивает триггерную функцию Тц, следствием чего является снижение количества ТЛА. При нормо- и гиперпуринергическом фенотипах компенсаторные реакции Тц, связанные с пуринергической сигнализацией, обеспечивают вовлечение Тц в рекрутирование Лц из сосудистого русла для поддержания острой воспалительной реакции в МВП.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.

1. Анализ количества ТЛА в циркулирующей крови у пациентов с ХОПН позволяет оценить индивидуальную выраженность воспалительной реакции в МВП.

2. Исследование активности ФАТ-рецептора, $\alpha 2$ -адренорецептора и P2Y-рецепторов *in vitro* на выделенных из крови Тц позволяет контролировать механизмы регуляции рекрутирования Лц из сосудистого русла в зону воспаления.

3. Установление фенотипов клеток крови, отличающихся реакцией на адреналин и АДФ, способствует пониманию особенностей развития хронической и острой воспалительной реакции при ХОПН; позволяет контролировать эффективность противовоспалительной терапии и при необходимости корректировать схему лечения.

4. Численность ТЛА при стимуляции $\alpha 2$ -адренорецептора на клетках крови у пациентов с фазой ремиссии является индикатором влияния стресс-реакции на развитие воспаления при ХОПН.

5. У пациентов с фазой рецидива ХОПН, можно прогнозировать исход пиелонефрита путем сопоставления количества ТЛА в крови и активности пуринового P2Y-рецептора.

6. Модуляция функциональной активности Тц при медикаментозной терапии у пациентов с МКБ, изменяющей внутриклеточную сигнализацию, сопряженную с Gi- и Gq-белками, позволяет управлять процессом рекрутирования Лц в зону воспаления.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Ал-Амуш А. Влияние катионов на агрегацию тромбоцитов. Вісник Харківського національного університету імені В.Н.Каразіна. Серія: біологія. 2006: 5-9.
2. Афанасьева А. Н. Исследование функциональной активности тромбоцитов в онкологической практике. Сибирский онкологический журнал. 2002;2:67-68.
3. Балыкина А.О. Вариабельность формирования межклеточных агрегатов тромбоцитов и лейкоцитов у пациентов с уролитиазом. Материалы 80-го медицинского конгресса молодых ученых. Актуальные проблемы теоретической и клинической медицины.2018:41.
4. Балыкина А.О. Роль показателя лейкоцитарного индекса интоксикации в диагностике хронического обструктивного пиелонефрита. Материалы XIX международной медико-биологической конференции молодых исследователей. Фундаментальная наука и клиническая медицина – человек и его здоровье. 2016: 86-87
5. Балыкина А.О., Реутова Н. О. Гендерные отличия формирования межклеточных коопераций у пациентов с уролитиазом. Фундаментальная наука и клиническая медицина — Человек и его здоровье: тезисы XXI. Международной медико-биологической конференции молодых исследователей. 2018;21:49.
6. Балыкина А.О., Реутова Н.О., Жеденова А. А. Гендерные различия показателей периферической крови у пациентов с хроническим обструктивным пиелонефритом. Актуальные вопросы реабилитологии и педагогики. 2016;1(2):81-85.
7. Балыкина А.О., Реутова Н.О., Жеденова А.А. Анализ гематологических показателей у пациентов с обструктивным пиелонефритом при различной локализации конкрементов. Труды XI Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Здоровье – основа человеческого потенциала: проблемы и пути их решения». Санкт-Петербург. 2016: 78-79
8. Балыкина А. О., Баринов Э. Ф., Фабер Т. И., Григорян Х. В. Почему преклонный возраст может быть фактором риска рецидива при хроническом

- обструктивном пиелонефрите? *Journal of Education, Health and Sport*. 2017;7(12): 644-655.
9. Баринов Э. Ф., Григорян Х.В. Фабер Т.И., Сохина В.С., Перенесенко А.О. Молекулярные механизмы регуляции функциональной активности клеток крови: совершенствование таргетной противовоспалительной терапии. *Врач*. 2019;30 (11);15-22.
10. Баринов Э. Ф., Малинин Ю.Ю., Григорян Х.В. Перенесенко А.О. Циркулирующие тромбоцитарно-лейкоцитарные агрегаты - индикатор раннего этапа лейкоцитурии после контактной уретеролитотрипсии. *Университетская клиника*. 2022;2(43):5-10.
11. Баринов Э. Ф., Сулаева О. Н., Делий В. Ю. Реакция тромбоцитов на коллаген и пурины от трактовки механизмов агрегации к прогнозированию рецидива язвенного кровотечения. *Вісник проблем біології і медицини*. 2012; 2.
12. Баринов Э.Ф., Кравченко А.Н., Твердохлеб Т.А., Балыкина А.О. Анализ факторов риска осложнений, индуцированных литотрипсией. *Український журнал хірургії*. 2014;1(24):123-127.
13. Баринов Э.Ф. Мамедалиева С.А., Твердохлеб Т.А., Балыкина А.О. Взаимодействие адреналина и АДФ в регуляции функциональной активности тромбоцитов при хронической ишемии мозга. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2017;2:51-55.
14. Баринов Э.Ф., Балыкина А.О., Кравченко А.Н., Твердохлеб Т.А. Возрастные особенности адаптационной реакции клеток крови у женщин при рецидиве хронического обструктивного пиелонефрита. *Успехи геронтол*. 2014;27 (3): 472-476.
15. Баринов Э.Ф., Кравченко А.Н., Твердохлеб Т.А., Балыкина А.О. Гендерные особенности лейкоцитопоеза при хроническом обструктивном пиелонефрите. *Вестник неотложной и восстановительной медицины*. 2014; 15(2): 258-260.
16. Баринов Э.Ф., Кравченко А.Н., Балыкина А.О. Гендерные различия формирования тромбоцитарно - лейкоцитарных агрегатов при обструктивном пиелонефрите. *Морфологические основы научных исследований в медицине*.

Научно-практическая конференция, посвященная 110-летию со дня рождения Н.И. Зазыбина. 2013:94-95.

17. Баринов Э.Ф., Сулаева О.Н., Прилучкая И.А., Канана Н.Н. Роль и механизмы участия тромбоцитов в воспалении. 2014; 4(60):27-33.

18. Баринов Э.Ф., Твердохлеб Т.А., Кравченко А.Н., Балыкина А.О., Черкасова Н.А. Информативность показателей агрегатограммы для трактовки механизмов формирования агрегатов. Материалы VII Национального конгресса патофизиологов Украины с международным участием «Патофизиология и фармация: пути интеграции». 2016.

19. Баринов Э.Ф., Балыкина А.О., Кравченко А.Н. Механизмы формирования тромбоцитарно-лейкоцитарных агрегатов при хроническом обструктивном пиелонефрите. Клиническая нефрология. 2015;5-6:3-7.

20. Баринов Э.Ф., Кравченко А.Н., Твердохлеб Т.А., Балыкина А.О. Модуляция функции тромбоцитов после литотрипсии. Фундаментальна та клінічна медицина. Наукова конференція, присвячена 90-річчю з дня народження К.С. Кабака. 2014:59-60.

21. Баринов Э.Ф., Перенесенко А.О., Григорян Х.В. Молекулярная активация и формирование тромбоцитарно-лейкоцитарных агрегатов при реализации острого и хронического воспаления в мочевыводящих путях. Университетская клиника. 2019;2 (31):12-19.

22. Баринов Э.Ф., Твердохлеб Т.А., Кравченко А.Н., Балыкина А.О., Черкасова Н.А. Молекулярные механизмы индивидуальной реактивности тромбоцитов при гематурии, ассоциированной с литотрипсией. Урология. 2016;5:4-8.

23. Баринов Э.Ф., Балыкина А.О., Фабер Т.И., Григорян Х.В. Молекулярные основы тромбоцитарной активации. Архив клинической и экспериментальной медицины. 2018;27 (2):79 – 84.

24. Баринов Э.Ф. Твердохлеб Т.А., Кравченко А.Н., Балыкина А.О., Баринова М.Э. Особенности реакции клеток крови у женщин при хроническом обструктивном пиелонефрите. Journal of Health Sciences. 2014;4(2):201-218.

25. Баринов Э.Ф. Григорян Х.В., Балыкина А.О., Фабер Т.И. Тромбоцитарно-лейкоцитарные агрегаты циркулирующей крови как ранний индикатор рецидива

- хронического обструктивного пиелонефрита. Клиническая нефрология. 2017;4:37-41.
26. Баринов Э.Ф., Балыкина А.О. Влияние литотрипсии на формирование межклеточных коопераций тромбоцитов и лейкоцитов у пациентов с хроническим обструктивным пиелонефритом. Материалы VII Национального конгресса патофизиологов Украины с международным участием «Патофизиология и фармация: пути интеграции». 2016.
27. Баринов Э.Ф., Балыкина А.О., Фабер Т.И., Юрьева А.С. Информативность и специфичность лабораторных показателей в диагностике фаз хронического обструктивного пиелонефрита Профилактическая медицина-2018: сборник научных трудов Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. 2018.
28. Баринов Э.Ф., Николенко О.И., Кравченко А.Н., Твердохлеб Т.А., Балыкина А.О. Анализ причинно-следственных связей, формирующихся при агрегации тромбоцитов. Бюллетень XV чтений им. В.В. Подвысоцкого. 2016.
29. Баринов Э.Ф., Николенко О.И., Черкасова Н.А., Перенесенко А.О., Гиллер Д.И. Определение функциональной активности тромбоцитов и лейкоцитов в группе здоровых лиц. В сборнике: Донецкие чтения 2020: образование, наука, инновации, культура и вызовы современности. Материалы V Международной научной конференции. 2020:332-334.
30. Баринов Э.Ф., О.Н. Сулаева, Н.Н. Канана, Т.А. Твердохлеб. Пуриновые рецепторы и сопряженные внутриклеточные сигнальные системы в регуляции функции тромбоцитов. Кардиология.2014;2:56-62
31. Баринов Э.Ф., О.Н. Сулаева. Агрегационная активность тромбоцитов при кровотечении из язв гастродуоденальной зоны. Медицинский вестник Башкортостана.2009;4(2);41-44.
32. Баринов Э.Ф., Перенесенко А.О., Крахоткина Е.Д., Ахундова С.А. Определение провоспалительной активности тромбоцитов у пациентов с хроническим обструктивным пиелонефритом.От фундаментальных знаний "к тонкому владению скальпелем", посвященная памяти профессора В.Ф. Войно-

- Ясенецкого. Сборник научных трудов по материалам II Международной научно-практической конференции. 2021:56-57.
33. Баринов Э.Ф., Сулаева О.Н., Делий В.Ю. Вариабельность ответа тромбоцитов на агонисты у пациентов с различной адренореактивностью при кровотечениях из язв гастродуоденальной зоны. 2011;8(2):121-123.
34. Баринов Э.Ф., Сулаева О.Н., Киреева М.А. Динамика агрегации тромбоцитов у пациентов с острым инфарктом миокарда на фоне патогенетической терапии. 2011;2(92):029-031.
35. Баринов Э.Ф., Сулаева О.Н., Лам М.М. Метаболиты арахидоновой кислоты – детерминанты паренхиматозно-стромальных отношений в почках в норме и при патологии. Нефрология. 2006; 3(10):14-22.
36. Баринов Э.Ф., Сулаева О.Н., Гнилорыбов А.М. Тромбоциты. Донецк. 2012:316.
37. Баринов Э.Ф., Перенесенко А.О., Юрьева А.С., Васильченко А.И. Анализ активации агрегационной способности тромбоцитов. Материалы Международного медицинского форума Донбасса «Наука побеждать... болезнь». 2022:62-63.
38. Баринов Э.Ф. Функциональное состояние тромбоцитов при ишемической болезни сердца. Вестник неотложной и восстановительной медицины. 2013;14(2): 278-282.
39. Баринов Э.Ф., Крахоткина Е.Д., Перенесенко А.О. Юрьева А.С., Определение амплитудных характеристик агрегации тромбоцитов здоровых лиц. Донецкие чтения 2022: образование, наука, инновации, культура и вызовы современности Материалы VII Международной научной конференции, посвящённой 85-летию Донецкого национального университета. 2022; 3:267-269.
40. Баринов Э.Ф., Перенесенко А.О., Крахоткина Е.Д., Гиллер Д.И. Анализ зависимости амплитудных характеристик агрегации тромбоцитов как способ оценки сигнальных путей. Материалы Международного медицинского форума Донбасса «Наука побеждать... болезнь». 2022:63-64.

41. Барінов Е.Ф., Кравченко А.Н., Твердохліб Т.О., Баликіна А.О. Механізми ініціації рецидиву хронічного обструктивного пієлонефриту. Актуальные проблемы транспортной медицины. 2014;1 (36-I):130- 134.
42. Барінов Е.Ф.,Кравченко А.Н., Твердохліб Т.О., БаликінаА.О. Індивідуальна реактивність тромбоцитів у пацієнтів після літотрипсії. Світ медицини та біології. 2014; 2 (44): 9-12.
43. Барінов Е.Ф. Кравченко А. Н., Твердохліб Т.О., БаликінаА.О. Ініціації рецидиву хронічного обструктивного пієлонефриту. Теоретические основы клинической и профилактической медицины: Научно-практическая конференція XIII – е чтения им. В.В. Подвысоцкого. 2014.
44. Бондаренко И. З., Ширшина И. А. Механизмы тромбообразования, ассоциированные с сахарным диабетом: что определяет прогноз интервенционного вмешательства? Сахарный диабет. 2013. 3 (60): 58-63.
45. Бондарь Т.П., Муратова А.Ю., Мельченко Е.А. Спонтанная и индуцированная агрегация тромбоцитов при беременности и родах. Общая реаниматология. 2016;5:16-22.
- 46.Гагаркина Л. С., Царенок С. Ю., Горбунов В. В. Лейкоцитарно-тромбоцитарные взаимоотношения у больных с хронической коронарной недостаточностью, подвергнутых ангиопластике со стентированием. Acta Biomedica Scientifica. 2010;3: 43-46.
47. Гергесова Е. Е. Лимфоцитарно-тромбоцитарная адгезия, тромбоцитарно-лейкоцитарные, тромбоцитарно-лимфоцитарные отношения и агрегация тромбоцитов у мужчин и женщин в зависимости от групповой принадлежности крови. Кубанский научный медицинский вестник. 2009; 7: 38-41.
48. Горохова В.С., Черновол П.А., Черновол В.П., Сулаева О. Н. Вариабельность ответа тромбоцитов на адф: от теории тромбогенеза к практическому применению богатой тромбоцитами плазмы. 2016;6 (61): 363-367.
49. Жеденова А.А., Балыкина А.О. Влияние агонистов различного действия на формирование межклеточных коопераций. Фундам.наука клин.мед. 2017;20:1-680.
50. Козловский В. И., Дубас И. О. Агрегация лейкоцитарно-тромбоцитарной суспензии и деформируемость эритроцитов у пациентов с артериальной

- гипертензией после перенесенной внегоспитальной пневмонии. Вестник ВГМУ. 2011;1:54-61.
51. Крюк Ю. Я., Кривобок Г. К., Бондаренко Н. Н., Стрельченко Ю. И., Фабер А. И. Особенности иммунологической реактивности при экспериментальной ожоговой травме. Актуальные вопросы реабилитологии и педагогики. 2016; 2 (3):328-334.
52. Кузник Б. И., Витковский Ю. А., Захарова М. Ю., Ключерева Н. Н., Роднина О. С., Солпов А. В. Агрегационная активность форменных элементов крови у больных сахарным диабетом 1 и 2 типа. Сахарный диабет. 2012; 2:49-53.
53. Любин, А. В., Солпов, А. В., Шаповалов, К. Г. Агрегация тромбоцитов и лимфоцитарно-тромбоцитарная адгезия при электротравме в эксперименте. Дальневосточный медицинский журнал. 2012; 1:112-114.
54. Медведев, И. Н., Брюховецкий, А. Г. Динамика агрегационной способности тромбоцитов у больных с неполным вариантом метаболического синдрома на фоне диуретической терапии. Медицинский альманах. 2012; 4: 100-103.
55. Медяникова, И. В. Гемостазиологический контроль при беременности. Клиницист. 2014; 1: 47-52.
56. Морозова И. Ю., Страмбовская Н.Н., Терешков П.П., Кузник Б.И..Методы оценки агрегационной активности форменных элементов крови в норме и у больных ишемическим инсультом. Клиническая лабораторная диагностика. 2016; 61 (5): 295-298.
57. Морозова, И. Ю., Страмбовская, Н. Н. Лейкоцитоз и агрегационная активность тромбоцитов в прогнозировании исходов острых нарушений мозгового кровообращения. Дальневосточный медицинский журнал. 2013; 4: 13-17.
58. Муратова А. Ю., Бондарь Т. П., Мельченко Е. А. Применение сканирующей зондовой микроскопии при исследовании спонтанной агрегации тромбоцитов у пациенток с мутацией в гене гликопротеина рецептора тромбоцитов P_{IIb/IIIa}. Наука. Инновации. Технологии. 2014; 4:199-207.
59. Муха Н. В., Говорин А. В., Перевалова Е. Б. Лимфоцитарно-тромбоцитарная адгезия у пациентов с сахарным диабетом 1 типа, осложненным кетоацидозом. Байкальский медицинский журнал. 2016; 147 (8): 39-41.

60. Павлов О. В., Чепанов С. В., Селютин А. В., & Сельков С. А. Тромбоцитарно-лейкоцитарные взаимодействия: иммунорегуляторная роль и патофизиологическое значение. *Медицинская иммунология*. 2022; 24 (5): 871-888.
61. Перенесенко А.О. Анализ гипореактивного фенотипа тромбоцитов и лейкоцитов у пациентов с хроническим обструктивным пиелонефритом. В сборнике: *Донецкие чтения 2021: образование, наука, инновации, культура и вызовы современности. материалы VI Международной научной конференции*. 2021: 289-291.
62. Перенесенко А.О. Провоспалительная реактивность тромбоцитов у пациентов с хроническим обструктивным пиелонефритом. *Материалы 81-го медицинского конгресса молодых ученых «Актуальные проблемы теоретической и клинической медицины»*. 2019: 223-224.
63. Перенесенко А.О., Юрьева А.С. Анализ адренореактивности тромбоцитов у пациентов с хроническим обструктивным пиелонефритом. *Материалы 81-го медицинского конгресса молодых ученых «Актуальные проблемы теоретической и клинической медицины» – Донецк*. 2019: 224-225.
64. Перенесенко А. О., Ахундова С.А. Анализ нормореактивного фенотипа тромбоцитов у пациентов с хроническим обструктивным пиелонефритом. *Международный молодежный форум «Неделя науки»*. 2021:107-108
65. Порушничак, Д. Е., Порушничак, Е. Б., Кузник, Б. И. Агрегационная активность тромбоцитов в артериальной и венозной крови при стабильной и нестабильной стенокардии. *Кубанский научный медицинский вестник*. 2012; 2: 150-154.
66. Порушничак, Д. Е., Порушничак, Е. Б., Кузник, Б. И. Состояние сосудисто-тромбоцитарного гемостаза в различных бассейнах сосудистого русла при стабильной и нестабильной стенокардии. *Дальневосточный медицинский журнал*. 2013; 1: 17-20.
67. Рабко, А. В., Громов, А. А., Кручинина, М. В., Баум, В. А. (2005). Показатели лейкоцитарно-тромбоцитарной агрегации - вероятный маркер воспалительного процесса при ибс. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2005; 4(22):270-271.

68. Реутова Н.О., Балыкина А.О. Агрегация форменных элементов как маркер воспаления у пациентов с мочекаменной болезнью. Донецкие чтения 2017: Русский мир как цивилизационная основа научно-образовательного и культурного развития Донбасса: Материалы Международной научной конференции студентов и молодых ученых. 2017; 2: 418с.
69. Романюк Светлана Владимировна. Лимфоцитарно-тромбоцитарная адгезия и уровень sP-СЕЛЕКТИНА у больных с инфарктом миокарда. Символ науки. 2017; 2 (1):174-177.
70. Симоненко, В. Б., Медведев, И. Н., Брюховецкий, А. Г. Диуретическая терапия и функциональная активность тромбоцитов у больных с артериальной гипертонией в сочетании с абдоминальным ожирением. Клиническая медицина, .2012; 90 (11):54-56.
71. Сулаева О.Н. Получение богатой тромбоцитами плазмы: мифы и реальность. Мир медицины и биологии. 2017; 3(61): 150-153.
72. Сулаева О.Н., Прилуцкая И.А., Кит А.М., Рябчук Ю.И. Механизмы тромбоцитарно-лейкоцитарных взаимодействий в норме и при сердечно-сосудистой патологии. Кардиология. 2017; 6(57): 76-83.
73. Твердохлеб Т.А. Балыкина А.О., Кравченко А.Н. Реактивность клеток периферической крови у пациентов с хроническим обструктивным пиелонефритом. XVII Всероссийская медико-биологическая конференция молодых исследователей (с международным участием): Фундаментальная наука и клиническая медицина- человек и его здоровье. 2014: 438-439.
- 74.Тютюмова Е. А., Соловьева Э.Ю., Карнеев А.Н., Джутова Э.Д. Механизмы активизации сосудисто-тромбоцитарного звена гемостаза в восстановительном периоде инсульта и способы их коррекции. Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика. 2019; 11 (1): 72-78.
75. Усачева, Е. В., Бунова, С. С., Заворотняя, Н. Л., Бордадымова, С. С., Сукончик, А. О., Замахина, О. В., Зуева, И. М., Мажбич, С. М. Оценка эффективности антитромбоцитарной терапии у пациентов с коронарным атеросклерозом по показателям спонтанной агрегации тромбоцитов. Байкальский медицинский журнал.2013; 123 (8): 67-70.

76. Хитрик А.И., Макеева Л.В., Завгородняя М.И., Сулаева О.Н. Морфогенетические эффекты тромбоцитов на течение раневого процесса. Вестник проблем биологии и медицины. 2015; 4 (125): 54-58.
77. Чепис М. В., Ральченко Е. С., Клименова А. А., Ральченко И. В. Агрегационная активность тромбоцитов при гипотиреозе и диффузном токсическом зобе. Казанский медицинский журнал. 2015; 96 (5): 742-744.
78. Шатурный В.И. Активаторы, рецепторы и пути внутриклеточной сигнализации в тромбоцитах крови. Биомедицинская химия, 2014; 60 (2): 182-200.
79. Юрьева А. С., Балыкина А.О. Роль семейства селектинов в каскаде адгезивных процессов форменных элементов крови. Донецкие чтения 2017: Русский мир как цивилизационная основа научно-образовательного и культурного развития Донбасса: Материалы Международной научной конференции студентов и молодых ученых. 2017. 2: 418.
80. Alawrie S. The automation of routine light transmission platelet aggregation. *Int J Lab Hematol*. 2014 Aug; 36(4): 431–438.
81. Abraham SN., Yuxuan M. The nature of immune responses to urinary tract infections. *Nat Rev Immunol*. 2015;15(10): 655–663.
82. Adamzik M. et al. Whole blood impedance aggregometry as a biomarker for the diagnosis and prognosis of severe sepsis. *Critical Care* 2012, 16: 204.
83. Aggarwal K.P. et al. Nephrolithiasis: Molecular Mechanism of Renal Stone Formation and the Critical Role Played by Modulators. *Biomed Res Int*. 2013: 292953.
84. Aley K. O., Jon D. L. Role of Protein Kinase A in the Maintenance of Inflammatory Pain *Journal of Neuroscience*. 1999; 19 (6): 2181-2186.
85. Algahtani, M., Heptinstall, S. Novel strategies for assessing platelet reactivity. *Future Cardiology*. 2017; 13 (1): 33–47.
86. Amison Richard T. et al. RhoA signaling through platelet P2Y1 receptor controls leukocyte recruitment in allergic mice. 2015; 135(2): 528-38.
87. Amison RT et al. Diverse signalling of the platelet P2Y1 receptor leads to a dichotomy in platelet function. *Eur J Pharmacol*. 2018; 827: 58-70.

88. Amison RT 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.
89. Andréasson E. et al. The subcellular localization of the receptor for platelet-activating factor in neutrophils affects signaling and activation characteristics. *Clinical and Developmental Immunology.* 2013; Art.456407: 11.
90. Androulakis N. et al. Molecular and mechanistic characterization of platelet-activating factor-like bioactivity produced upon LDL oxidation. *Journal of Lipid Research.* 2005; 46: 1923-1932.
91. Angiolillo, D. J. et al. Impact of Chronic Kidney Disease on Platelet Function Profiles in Diabetes Mellitus Patients With Coronary Artery Disease Taking Dual Antiplatelet Therapy. *Journal of the American College of Cardiology.* 2012; 55(11), 1139–1146.
92. Arvanitidis E. et al. Reduced platelet hyper-reactivity and platelet-leukocyte aggregation after periodontal therapy. *Thrombosis Journal.* 2017; 15: 5.
93. Bagga H.S. New Insights Into the Pathogenesis of Renal Calculi. *Urol Clin North Am.* 2013; 40(1): 1–12.
94. Bai A. et al. Modulation of inflammatory response via α 2-adrenoceptor blockade in acute murine colitis. *Clinical and Experimental Immunology.* 2009; 156: 353–362.
95. Baker, P. R. et al. Regulation of platelet-activating factor synthesis in human neutrophils by MAP kinases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research.* 2002; 1592(2), 175–184.
96. Barzilai Sagi et al. Leukocytes Breach Endothelial Barriers by Insertion of Nuclear Lobes and Disassembly of Endothelial Actin Filaments. *Cell Reports.* 2017;18 (3):685-699.
97. Bekkering S., Ruurd T.. Another look at the life of a neutrophil. *World J Hematol.* 2013; 2(2): 44-58.
98. Bennett, J. S., Berger, B. W., Billings, P. C. (2009). The structure and function of platelet integrins. *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* 2009; 7: 200–205.

99. Beretta L. et al. A polymorphism in the human serotonin 5-HT_{2A} receptor gene may protect against systemic sclerosis by reducing platelet aggregation. *Arthritis Research & Therapy*. 2008; 10 (5): 1-7.
100. Becker, R. C. et al. Hyperreactive platelet phenotypes: Relationship to altered serotonin transporter number, transport kinetics and intrinsic response to adrenergic co-stimulation. *Thrombosis and Haemostasis*. 2013; 109(01); 34–38.
101. Bigby TD, Meslier N. Transcellular lipoxygenase metabolism between monocytes and platelets. *J Immunol*. 1989;143(6):1948-54.
102. Brady J. Leukocyte adhesion molecules and kidney diseases. *Kidney International*. 1994;45:1285—1300.
103. Brass L. Understanding and Evaluating Platelet Function. *Hematology*. 2010; 387-396
104. Bray PF. Platelet Hyperreactivity: Predictive and intrinsic properties. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2007;21(4):633–vi.
105. Breddin, H. K. Can platelet aggregometry be standardized? *Platelets*. 2005;16(3-4):151–158.
106. Bronze-da-Rocha Elsa et al. Neutrophil Elastase Inhibitors and Chronic Kidney Disease. *Int. J. Biol. Sci*. 2018;14:1343-1360.
107. Brunskole HI 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. 2013.
108. Campo G. et al. Platelet aggregation values in patients with cardiovascular risk factors are reduced by verbascoside treatment. A randomized study. *Pharmacological Research*. 2015; 97: 1–6.
109. Cardoso TC et al. The P2Y₁ receptor-mediated leukocyte adhesion to endothelial cells is inhibited by melatonin. *Purinergic Signal*. 2017;13(3):331-338. doi: 10.1007/s11302-017-9565-4. Epub 2017 May 29.
110. Cerletti C. et al. Platelet – leukocyte interactions: multiple links between inflammation, blood coagulation and vascular risk. *Medit J Hemat Infect Dis*. 2010; 2(3).

111. Cerletti C. et al. Platelet-leukocyte interactions in thrombosis. *Thrombosis Research*. 2012; 129: 263–266.
112. Chandrashekar, V. Does platelet count in platelet-rich plasma influence slope, maximal amplitude and lag phase in healthy individuals? Results of light transmission aggregometry. *Platelets*. 2015; 26(7), 699–701.
113. Chao W. and Merle S. O. Platelet-activating factor: receptors and signal transduction. *Biochem. J.* (1993);292: 617-629.
114. Chelvarajan, L., Popa, D., Liu, Y., Getchell, T. V., Stromberg, A. J., & Bondada, S. Molecular mechanisms underlying anti-inflammatory phenotype of neonatal splenic macrophages. *Journal of Leukocyte Biology*. 2007; 82(2): 403–416.
115. Chen, R., Chen, X., Salomon, R. G., McIntyre, T. M. Platelet Activation by Low Concentrations of Intact Oxidized LDL Particles Involves the PAF Receptor. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2008; 29(3): 363–371.
116. Clemetson, K. J. Platelet receptors and patient responses: The contributions of Professor Stan Heptinstall to platelet research. *Platelets*. 2015; 26(5): 382–385.
117. Coêlho Maria José Dantas 1 et al. Platelet aggregation and quality control of platelet concentrates produced in the Amazon Blood Bank. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2011;33(2):110-114.
118. Cognasse, F., Laradi, S., Berthelot, P., Bourlet, T., Marotte, H., Mismetti, P., ... Hamzeh-Cognasse, H. Platelet Inflammatory Response to Stress. *Frontiers in Immunology*. 2019; 10.
119. Daniel JL et al. Molecular Basis for ADP-induced Platelet Activation. Evidence for three distinct adp receptors on human platelets. *The journal of biological chemistry*. 1998; 273(4):2024–2029.
120. Dayanand Deo D. et al. Activation of platelet-activating factor receptor-coupled g-q leads to stimulation of src and focal adhesion kinase via two separate pathways in human umbilical vein endothelial cells. *The journal of biological chemistry*. 2004; 279, (5): 3497–3508.
121. Deo DD. et al. Activation of platelet-activating factor receptor-coupled gq leads to stimulation of src and focal adhesion kinase via two separate pathways in human

- umbilical vein endothelial cells. *The journal of biological chemistry*.2004; 279 (5): 3497–3508.
122. Devanathan V et al. Platelet Gi protein $G\alpha_i2$ is an essential mediator of thrombo-inflammatory organ damage in mice. *Pnas*.2015; 112 (20): 6491-6496.
123. Drolet AM et al. Platelet-Activating Factor Induces Th17 Cell Differentiation. 2011; Article ID 913802:
124. Eicher JD et al. Replication and hematological characterization of human platelet reactivity genetic associations in men from the Caerphilly Prospective Study (CaPS) *J Thromb Thrombolysis*. 2016; 41(2):343-50.
125. Eichmann TO, Achim L. DAG tales: the multiple faces of diacylglycerol—stereochemistry, metabolism, and signaling. *Cell Mol Life Sci*. 2015; 72: 3931–3952.
126. Ellinor I. B. et al. Reference Range Determination for Whole-Blood Platelet Aggregation Using the Multiplate Analyzer. *American Journal of Clinical Pathology*. 2014; 142 (5): 647–656,
127. Erb L, Gary A. W. Coupling of P2Y receptors to G proteins and other signaling pathways. *Wiley Interdiscip Rev Membr Transp Signal*. 2012; 1(6): 789–803.
128. Esmon, C. T. Inflammation and thrombosis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2003; 1(7), 1343–1348.
129. Estevez B, Xiaoping D. New Concepts and Mechanisms of Platelet Activation Signaling. *Physiology (Bethesda)*. 2017; 32(2): 162–177.
130. Finsterbusch, M., Schrottmaier, W. C., Kral-Pointner, J. B., Salzman, M., Assinger, A. Measuring and interpreting platelet-leukocyte aggregates. *Platelets*. 2018;1–9.
131. Fong W. L et al. Platelets enhance neutrophil transendothelial migration via P-selectin glycoprotein ligand-1. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011; 300(2): 468–475.
132. Fox E A., Susan R. K. The relationship between inflammation and venous thrombosis. A systematic review of clinical studies. *Thromb Haemost*; 2005; 94: 362-5.
133. Foxman EF et al. Integrating conflicting chemotactic signals: the role of memory in leukocyte navigation. *J Cell Biol*. 1999;147(3):577-88.

134. Galli S J et al. Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils. *Nat Immunol.* 2011; 12(11): 1035–1044.
135. Ghasemzadeh M. Platelet-leukocyte crosstalk: Linking proinflammatory responses to procoagulant state. *Clin Respir J.* 2013;131(3):191-197
136. Gibson PG. Inflammatory phenotypes in adult asthma: clinical applications. 2009;3(4):198-206.
137. Goudevenos J. et al. Platelet aggregability to platelet activating factor at rest and after exercise in patients with coronary artery disease. *European Heart Journal.* 1995; 16(8), 1036–1043.
138. Gros A. et al. 2015. Platelets in inflammation: regulation of leukocyte activities and vascular repair. *Front Immunol.* 2015; 6;5:678. doi: 10.3389/fimmu.2014.00678. eCollection 2014.
139. Hanke A. A. et al. Impact of platelet count on results obtained from multiple electrode platelet aggregometry. *Eur J Med Res.* 2010; 15: 214-219.
140. Harden, T. K., Sesma, J. I., Fricks, I. P., Lazarowski, E. R. Signalling and pharmacological properties of the P2Y₁₄ receptor. *Acta Physiologica.* 2010; 199(2), 149–160.
141. Hasna A et al., High Sensitivity C – Reactive Protein and Interleukin-6 in Diabetic Urolithiasis Patients *Journal of Clinical and Diagnostic Research.* 2015; Vol-9(3): BC01-BC03.
142. Hayes C. et al. Decreased Threshold of Aggregation to Low-Dose Epinephrine is Evidence of Platelet Hyperaggregability in Patients with Thrombosis *Hematol Rep.* 2014; 6(3): 5326.
143. Hechler B, Gachet C. Purinergic Receptors in Thrombosis and Inflammation. 2015; 35(11):2307-15.
144. Herrera-García AM et al. Prevention of neutrophil extravasation by α ₂-adrenoceptor-mediated endothelial stabilization. *J Immunol.* 2014;193(6):3023-35.
145. Hinchado A 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):604-8.

146. 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):520-6.
147. Htun, P., Fateh-Moghadam, S., Tomandl, B., Handschu, R., Klinger, K., Stellos, K., ... Gawaz, M. Course of Platelet Activation and Platelet-Leukocyte Interaction in Cerebrovascular Ischemia. *Stroke.* 2009; 37(9): 2283–2287.
148. Huang H и соавт. Circulating adhesion molecules and neutral endopeptidase enzymuria in patients with urolithiasis and hydronephrosis. *Urology.* 2000;55(6):961-5.
149. Hochholzer I et al. Impact of Cytochrome P450 2C19 Loss-of-Function Polymorphism and of Major Demographic Characteristics on Residual Platelet Function After Loading and Maintenance Treatment With Clopidogrel in Patients Undergoing Elective Coronary Stent Placement. *Journal of the American College of Cardiology.* 2010; 55(22), 2427–2434.
150. Bloemen P.G. et al. Increased cAMP levels in stimulated neutrophils inhibit their adhesion to human bronchial epithelial cells. *Am J Physiol.* 1997;272(4-1): 580-7.
151. Isaacson B. et al. Stromal Cell-Derived Factor 1 Mediates Immune Cell Attraction upon Urinary Tract Infection. *Cell Reports.* 2017; 20 (1), 5: 40-47.
152. Ishii S et al. Platelet-activating factor receptor. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2002;68-69:599-609.
153. Jackson S. P. The growing complexity of platelet aggregation. *Blood.* 2007; 109 (12): 5087–5095.
154. Jin J et al. Coactivation of two different G protein-coupled receptors is essential for ADP-induced platelet aggregation *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998; 95: 8070–8074.
155. Jungi TW и соавт. Platelet-leukocyte interaction: selective binding of thrombin-stimulated platelets to human monocytes, polymorphonuclear leukocytes, and related cell lines. *Blood.* 1986;67:629-636;
156. Kabbani S S. et al. Platelet Reactivity Characterized Prospectively A Determinant of Outcome 90 Days After Percutaneous Coronary Intervention. *Circulation.* 2001; 10;104(2):181-6.
157. Kato M et al. Platelet-Activating Factor Activates Two Distinct Effector Pathways in Human Eosinophils. *J Immunol.* 2002; 169 (9): 5252-5259.

158. Khan Saeed R. Is oxidative stress, a link between nephrolithiasis and obesity, hypertension, diabetes, chronic kidney disease, metabolic syndrome? *Urol Res.* 2012; 40(2): 95–112.
159. Kiister L.J. et al. Mechanism of paf-induced platelet aggregation in man. *Thrombosis research.*1986; 43; 425-433.
160. Kim Nancy D., Andrew D. Luster. The role of tissue resident cells in neutrophil recruitment. Ding Luo et al. 2015. *Plos one. Trends Immunol.* 2015; 36(9): 547–555.
161. King BF., Burnstock G. Purinergic receptors. <https://www.ucl.ac.uk/ani/GB's%20PDF%20file%20copies/CV1215.pdf>
162. Kitchen E. et al. Demonstration of reversible priming of human neutrophils using platelet-activating factor. *Blood.* 1996; 88(11):4330-7.
163. Knoll T. Epidemiology, Pathogenesis, and Pathophysiology of Urolithiasis.. 2010; 9 (12): 802–806.
164. Koltai K. et al. Platelet Aggregometry Testing: Molecular Mechanisms, Techniques and Clinical Implications. *Int J Mol Sci.* 2017; 18(8): 1803.
165. Kopeć, G., Moertl, D., Steiner, S., Stępień, E., Mikołajczyk, T., Podolec, J., ... Podolec, P. Markers of Thrombogenesis and Fibrinolysis and Their Relation to Inflammation and Endothelial Activation in Patients with Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension. *PLoS ONE.* 2013; 8(12), e82628.
166. Koupenova, M., Ravid, K. Biology of Platelet Purinergic Receptors and Implications for Platelet Heterogeneity. *Frontiers in Pharmacology.* 2018; 9.
167. Kuebler WM.. Selectins revisited: the emerging role of platelets in inflammatory lung disease *J Clin Invest.* 2006; 116(12): 3106–3108.
168. Kuijpers T W. The impact of platelet-activating factor (PAF)-like mediators on the functional activity of neutrophils: anti-inflammatory effects of human PAF-acetylhydrolase. *Clin Exp Immunol.* 2001; 123(3): 412–420.
169. Kulkarni, S., Woollard, K. J., Thomas, S., Oxley, D., & Jackson, S. P. Conversion of platelets from a proaggregatory to a proinflammatory adhesive phenotype: role of PAF in spatially regulating neutrophil adhesion and spreading. *Blood.* 2007; 110(6), 1879 - 1886.

170. Kurts, C., Panzer, U., Anders, H.-J., & Rees, A. J. The immune system and kidney disease: basic concepts and clinical implications. *Nature Reviews Immunology*, 2013; 13(10), 738–753.
171. Küster, L. J., Filep, J., & Frölich, J. C. (1986). Mechanism of PAF-induced platelet aggregation in man. *Thrombosis Research*. 1986; 43(4), 425–433.
172. Lam Fong W. et al. Platelets enhance neutrophil transendothelial migration via P-selectin glycoprotein ligand-1. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011; 300(2): H468–H475.
173. Landmann R. Beta-adrenergic receptors in human leukocyte subpopulations. *Eur J Clin Invest*. 1992;22 (1):30-6.
174. Laudanna Carlo et al. Elevation of Intracellular cAMP Inhibits RhoA Activation and Integrin-dependent Leukocyte Adhesion Induced by Chemoattractants. *The Journal of Biological Chemistry*. 1997; 272:24141-24144.
175. Lauri D et al. Contribution of ADP to the amplification of primary platelet aggregation by platelet activating factor (PAF): modulatory role of aspirin. *Agents and Actions*. 1995;17: 5-6.
176. Lautenschläger, I., Wong, Y.L., Sarau, J. *et al.* Signalling mechanisms in PAF-induced intestinal failure. *Sci Rep*. 2017; 7: 13382.
177. Lawrie A S et al. The automation of routine light transmission platelet aggregation *Int J Lab Hematol*. 2014; 36(4): 431–438.
178. Lecrubier C. et al. Study of platelet aggregation induced by platelet activating factor (PAF) after administration of ticlopidine or aspirin. 1983;13 (1): 77–80.
179. Lescano C H. et al.. Effect of Polyphenols From *Campomanesia adamantium* on Platelet Aggregation and Inhibition of Cyclooxygenases: Molecular Docking and in Vitro Analysis. *Frontiers in Pharmacology*. 2018; 9 (617):1-13.
180. Li Y, Alam HB. Creating a pro-survival and anti-inflammatory phenotype by modulation of acetylation in models of hemorrhagic and septic shock. *Adv Exp Med Biol*. 2012;710:107-33.
181. Lian L et al. The relative role of PLC β and PI3K γ in platelet activation *Blood*. 2005; 106(1): 110–117.

182. Ling LQ, Liao J, Niu Q, Wang X, Jia J, Zuo CH, Jiang H, Zhou J. Evaluation of an automated light transmission aggregometry. *Platelets*. 2017 Nov;28(7):712-719.
183. Lipp P. Protein kinase c: the “masters” of calcium and lipid. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011. 1-17.
184. Liverani E et al. P2Y12 Receptor Modulates Sepsis-Induced Inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2016; 36 (5): 961–971.
185. Liverani E et al. Prasugrel Metabolites Inhibit Neutrophil Functions. *J Pharmacol Exp Ther*. 2013; 344(1): 231–243.
186. Lorenzet R, Napoleone E, Celi A, Pellegrini G, Di Santo A. Cell-cell interaction and tissue factor expression. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 1998;9(1):49-59.
187. Catherine A. et al. PGE2 production at sites of tissue injury promotes an anti-inflammatory neutrophil phenotype and determines the outcome of inflammation resolution in vivo. *BioRxiv* 205997.
188. Ma B et al. Underlying chronic inflammation alters the profile and mechanisms of acute neutrophil recruitment. *J Pathol*. 2016; 240(3): 291–303.
189. Maas SL. et al. Organ-Specific Mechanisms of Transendothelial Neutrophil Migration in the Lung, Liver, Kidney, and Aorta. *Front. Immunol*.2018; 17.
190. Marcus AJ.. New approaches for measurement of platelet reactivity. *Blood*. 2012; 119 (15): 3378-3379.
191. Maugeri N, Brambilla M, Camera M, Carbone A, Tremoli E, Donati MB, de Gaetano G, Cerletti C. Human polymorphonuclear leukocytes produce and express functional tissue factor upon stimulation. *J Thromb Haemost*. 2006;4(6):1323-30.
192. Maugeri N, Evangelista V, Celardo A, Dell'Elba G, Martelli N, Piccardoni P, de Gaetano G, Cerletti C. Polymorphonuclear leukocyte-platelet interaction: role of P-selectin in thromboxane B2 and leukotriene C4 cooperative synthesis. *Thromb Haemost*. 1994;72(3):450-6.
193. McGettrick Helen M et al. Stromal cells differentially regulate neutrophil and lymphocyte recruitment through the endothelium. *Immunology*. 2010; 131(3): 357–370.
194. McGettrick Helen M. et al. Tissue stroma as a regulator of leukocyte recruitment in inflammation. *Journal of Leukocyte Biology*. 2012; 91: 385 – 400

195. McIntyre TM. et al. The emerging roles of PAF acetylhydrolase. *Journal of Lipid Research*. 2009; 255-259.
196. McManus L M 1, D S Woodard, S I Deavers, R N Pinckard PAF molecular heterogeneity: pathobiological implications. *Lab Invest* 1993;69(6):639-50.
197. Michelson AD, Barnard MR, Krueger LA, Frelinger AL III, Furman MI. Flow cytometry. In: Michelson AD, ed. *Platelets*. Academic/Elsevier Science, New York, 2002: 297–315.
198. Michelson AD, Barnard MR, Krueger LA, Valeri CR, Furman MI. Circulating monocyte-platelet aggregates are a more sensitive marker of in vivo platelet activation than platelet surface P-selectin: studies in baboons, human coronary intervention, and human acute myocardial infarction. *Circulation*. 2001;104(13):1533-7.
199. Miller CH, Rice AS, Garrett K, Stein SF. Gender, race and diet affect platelet function tests in normal subjects, contributing to a high rate of abnormal results. *Br J Haematol*. 2014;165(6):842-53.
200. Miller VM, Jayachandran M, Hashimoto K, Heit JA, Owen WG. Estrogen, inflammation, and platelet phenotype. *Gend Med*. 2008;5: 91-S102.
201. Mocsai Attila et al. Intracellular signalling during neutrophil recruitment. *Cardiovascular Research*. 2015; 107: 373–385.
202. Moenen FCJI, Vries MJA, Nelemans PJ, van Rooy KJM, Vranken JRRA, Verhezen PWM, Wetzels RJH, Ten Cate H, Schouten HC, Beckers EAM, Henskens YMC. Screening for platelet function disorders with Multiplate and platelet function analyzer. *Platelets*. 2019; 30(1):81-87.
203. Mueller H, Motulsky HJ, Sklar LA. The potency and kinetics of the beta-adrenergic receptors on human neutrophils. *Mol Pharmacol*. 1988 Sep;34(3):347-53.
204. Mulay SR et al. Molecular mechanisms of crystal-related kidney inflammation and injury. Implications for cholesterol embolism, crystalline nephropathies and kidney stone disease. *Nephrol Dial Transplant*. 2014; 29(3):507-14.
206. Musiał K, Zwolińska D, Berny U, Polak-Jonkisz D, Szprynger K, Szczepańska M. Soluble adhesion molecules in children and young adults with chronic renal failure treated conservatively. *Rocz Akad Med Białymst*. 2004;49:209-12.

206. Mercimek MN, Ender O. Effect of urinary stone disease and its treatment on renal function. *World J Nephrol.* 2015;4(2):271-6.
207. Neuwirth D Schlondorff, R Platelet-activating factor and the kidney. *Am J Physiol.* 1986;251(1 Pt 2):F1-11.
208. Newton, K., Dixit, V. M. Signaling in Innate Immunity and Inflammation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology.* 2012: 4(3): doi: 10.1101/cshperspect.a006049
209. Newton AC. Protein kinase C: structure, function, and regulation. *J Biol Chem.* 1995;270(48):28495-8.
210. Nguyen Philippe et al. Mechanisms of the platelet aggregation induced by activated neutrophils and inhibitory effect of specific paf receptor antagonists. *Thrombosis Research.* 1995;Vol. 78, No. 1:3342.
211. Nicholls AJ. et al. Activation of the sympathetic nervous system modulates neutrophil function. *J Leukoc Biol.* 2018;103:295–309.
212. Nick JA et al. Common and distinct intracellular signaling pathways in human neutrophils utilized by platelet activating factor and FMLP. *J Clin Invest.* 1997;99(5):975-986.
213. Niemetz J, Marcus AJ. The stimulatory effect of platelets and platelet membranes on the procoagulant activity of leukocytes. *J Clin Invest.* 1974;54(6):1437-43.
214. Nishimura A et al. Purinergic P2Y receptors: Molecular diversity and implications for treatment of cardiovascular diseases. *Pharmacology & Therapeutics.*2017; 180: 113-128.
215. Oakes PW. et al. Neutrophil morphology and migration are affected by substrate elasticity. *Blood* 2009;114:1387-1395.
216. Oestvang J et al. Lysopc and paf trigger arachidonic acid release by divergent signalingmechanisms in monocytes. *Journal of Lipid.* 2011: 11.
217. Ohlmann P et al. ADP induces partial platelet aggregation without shape change and potentiates collagen-induced aggregation in the absence of Gαq. *Hemostasis, thrombosis, and vascular biology.* *Blood.* 2000;96 (6): 2134-2139.
218. Oliveira S de et al. Neutrophil migration in infection and wound repair: going forward in reverse. *Nat Rev Immunol.* 2016; 16(6): 378–391.

219. Olivier, C. B. et al. The Ratio of ADP- to TRAP-Induced Platelet Aggregation Quantifies P2Y₁₂-Dependent Platelet Inhibition Independently of the Platelet Count. *PLOS ONE*. 2016; 11(2), e0149053.
220. Demiray O, Cevik E, Cuce F. Association Between Complete Blood Count Parameters and Urinary Stone Disease. *Iran Red Crescent Med J*. 2016;18(7):e24319.
221. Paniccia Rita et al. Platelet function tests: a comparative review. *Vasc Health Risk Manag*. 2015; 11: 133–148.
222. Park TS, Gonzales ER, Gidday JM. Platelet-activating factor mediates ischemia-induced leukocyte-endothelial adherence in newborn pig brain. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1999;19(4):417-24.
223. Passacquale G, Vamadevan P, Pereira L, Hamid C, Corrigan V, Ferro A. Monocyte-platelet interaction induces a pro-inflammatory phenotype in circulating monocytes. *PLoS One*. 2011;6(10):e25595.
224. Peerschke EI et al. Reference Range Determination for Whole-Blood Platelet Aggregation Using the Multiplate Analyzer. *Am J Clin Pathol*. 2014;142:647-656.
225. Pitchford S et al. Platelets in neutrophil recruitment to sites of inflammation. *Curr Opin Hematol*. 2017; 24(1): 23–31.
226. Putney JW. Phospholipase C Signaling and Calcium Influx. *Adv Biol Regul*. 2012; 52(1): 152–164.
227. Radomski, A. et al. Nanoparticle-induced platelet aggregation and vascular thrombosis. *British Journal of Pharmacology*. 2015; 146(6), 882–893.
228. Rainger GE, Buckley CD, Simmons DL, Nash GB. Neutrophils sense flow-generated stress and direct their migration through α V β 3-integrin. *Am J Physiol*. 1999;276(3):H858-64.
229. Ramakrishnan AV et al. Platelet activating factor: A potential biomarker in acute coronary syndrome? Anand Vijaya Kumar Palur Ramakrishnan et al. *Cardiovascular Therapeutics* 2017; 35: 64–70.
230. Rao AK, Jalagadugula G, Sun L. Inherited defects in platelet signaling mechanisms. *Semin Thromb Hemost*. 2004;30(5):525-35.
231. Rao Yi et al. Neuronal migration and molecular conservation with leukocyte chemotaxis. *Genes & Dev*. 2002. 16: 2973-2984.

232. Ren, R. et al. Modulation of platelet aggregation-related eicosanoid production by dietary F-fucoidan from brown alga *Laminaria japonica* in human subjects. *British Journal of Nutrition*. 2013;110(05): 880–890.
233. Reznichenko A, Korstanje R. The role of platelet-activating factor in mesangial pathophysiology. *Am J Pathol*. 2015;185(4):888-96.
234. Riegel AK, Faigle M, Zug S, Rosenberger P, Robaye B, Boeynaems JM, Idzko M, Eltzschig HK. Selective induction of endothelial P2Y6 nucleotide receptor promotes vascular inflammation. *Blood*. 2011;117(8):2548-55.
235. Rodríguez-Azúa, R. et al. Effect of Tomato Industrial Processing (Different Hybrids, Paste, and Pomace) on Inhibition of Platelet Function In Vitro, Ex Vivo, and In Vivo. *Journal of Medicinal Food*. 2014;17(4), 505–511.
236. Rong MY, Wang CH, Wu ZB, Zeng W, Zheng ZH, Han Q, Jia JF, Li XY, Zhu P. Platelets induce a proinflammatory phenotype in monocytes via the CD147 pathway in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2014;16(6):478.
237. Rosales Carlos. Neutrophil: A Cell with Many Roles in Inflammation or Several Cell Types? *Front Physiol*. 2018; 9: 113.
238. Rossaint J, Zarbock A. Platelets in leucocyte recruitment and function. *Cardiovascular Research*. 2015; 107, 386–395.
239. Rossaint J, Margraf A, Zarbock A. Role of platelets in leukocyte recruitment and resolution of inflammation. *Frontiers in Immunology*. 2018;9:1-13.
240. Rotllan E, G Escolar, A Ordinas, E Bastida. Effect of PAF (platelet-activating factor) on hemostasis. *Studies on endothelial cells and platelets Sangre (Barc)*. 1993;38(2):115-9.
241. Rubak P et al. Reference intervals for platelet aggregation assessed by multiple electrode platelet aggregometry. *Thrombosis Research*. 2012;130:420–423
242. Ruhnau J, Schulze J, Dressel A, Vogelgesang A. Thrombosis, Neuroinflammation, and Poststroke Infection: The Multifaceted Role of Neutrophils in Stroke. *J Immunol Res*. 2017;2017:5140679.
243. Rumbaut RE, Thiagarajan P. *Platelet-Vessel Wall Interactions in Hemostasis and Thrombosis*. San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences; 2010.

244. Sala A, Folco G, Murphy RC. Transcellular biosynthesis of eicosanoids. *Pharmacol Rep.* 2010;62(3):503-10.
245. Sangkuhla K et al. Platelet aggregation pathway. *Pharmacogenetics and Genomics.* 2011; 21(8):516 – 521.
246. Sapey E et al. Red, amber and green: the role of the lung in de-priming active systemic neutrophils. *Thorax.* 2014;69(7): 606 – 608.
247. Scanzano A et al. Adrenergic regulation of innate immunity: a review. *Front Pharmacol.* 2015; 6: 171.
248. Schanze, N., Bode, C., Duerschmied, D. Platelet Contributions to Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury. *Frontiers in Immunology.* 2019; 10.
249. Schneider Dj. Factors Contributing to Increased Platelet Reactivity in People With Diabetes. *Diabetes care.* 2009;32(4): 525 – 527.
250. Scrivens M et al. Functional expression of the P2Y₁₄ receptor in human neutrophils. *JM. Eur J Pharmacol.* 2006;543(1-3):166-73.
251. Semeraro N, Locati D, Colucci M. Leucocyte-dependent platelet activation: an alternative pathway for initiation of blood clotting in inflammation. *Agents Actions.* 1981;11(6-7):553-5.
252. Serebruany, V. L., Malinin, A. I., Bhatt, D. L. Paradoxical Rebound Platelet Activation After Painkillers Cessation: Missing Risk for Vascular Events? *The American Journal of Medicine.* 2006; 119(8), 707.e11–707.e16.
253. Sfoungaristos S, Kavouras A, Katafigiotis I, Perimenis P. Role of white blood cell and neutrophil counts in predicting spontaneous stone passage in patients with renal colic. *BJU Int.* 2012;110(8 Pt B):E339-45.
254. Shah BH. et al. Molecular mechanisms involved in human platelet aggregation by synergistic interaction of platelet-activating factor and 5- hydroxytryptamine. *Exp. Mol. Med.* 2001; Vol. 33(4), 226-233.
255. Shoag, J., Eisner, B. H. Relationship between C-reactive Protein and Kidney Stone Prevalence. *The Journal of Urology.* 2014; 191(2), 372–375.
256. Silvestri M. et al. β 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. 1999; 93(6): 416–423. DOI:

257. Smalley DM, Wood JG, Childs EW, Frank LL, Cheung LY. Platelet activating factor (PAF) increases leukocyte adhesion but does not alter vessel diameter in the rat mesenteric microcirculation. *Microvasc Res.* 1998;56(3):271-6.
258. Soehnlein O et al. Neutrophils as protagonists and targets in chronic inflammation. *Nature Reviews Immunology.* 2017;17:248–261.
259. Spencer JD et al. The innate immune response during urinary tract infection and pyelonephritis. *Pediatr Nephrol.* 2014; 29(7): 1139–1149.
260. Sreeramkumar V et al. Neutrophils scan for activated platelets to initiate inflammation. *Science.* 2014; 346 (6214): 1234-1238. DOI: 10.1126/science.1256478
261. Stalker TJ. et al. Platelet Signaling. *Handb Exp Pharmacol.* 2012; 210: 59–85. d
262. Stephen M et al. Platelet-activating factor November *Journal of Biological Chemistry.* 1990; 265(29):17381-4.
263. Stock AJ. et al. The role of neutrophil granule proteins in neuroinflammation and Alzheimer’s disease. *J Neuroinflammation.* 2018; 15: 240.
264. Sturk Auguste et al. Platelet-activating Factor: Mediator of the Third Pathway of Platelet Aggregation? A Study in Three Patients with Deficient Platelet-activating Factor Synthesis. *J. Clin. Invest.* Volume 79, February 1987, 344-350
265. Summers C et al. Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends Immunol.* 2010; 31(8): 318–324.
266. Sun, L., Ye, R. D. Role of G protein-coupled receptors in inflammation. *Acta Pharmacologica Sinica.* 2012; 33(3): 342–350.
267. Taylor Kirk A. et al. Extracellular chloride is required for efficient platelet aggregation. *Platelets,* 2018; 29(1): 79–83.
268. Thibert C et al. Molecular Requirements for the Interaction of Thrombospondin With Thrombin-Activated Human Platelets: Modulation of Platelet Aggregation. *Blood.* 1992; 79 (8): 1995–2003.
269. Ting LH, Fegghi S, Taparia N, Smith AO, Karchin A, Lim E, John AS, Wang X, Rue T, White NJ, Sniadecki NJ. Contractile forces in platelet aggregates under microfluidic shear gradients reflect platelet inhibition and bleeding risk. *Nat Commun.* 2019;10(1):1204.

270. Tintinger GR, Theron AJ, Steel HC, Cockeran R, Pretorius L, Anderson R. Protein kinase C promotes restoration of calcium homeostasis to platelet activating factor-stimulated human neutrophils by inhibition of phospholipase C. *J Inflamm (Lond)*. 2009;6:29.
271. Rossaint J, Zarbock A. Tissue-specific neutrophil recruitment into the lung, liver, and kidney. *J Innate Immun*. 2013;5(4):348-57.
272. Tsai HM. The molecular biology of thrombotic microangiopathy. *Kidney Int*. 2006;70(1):16-23.
273. Tselepis, A. Platelet aggregatory response to platelet activating factor (PAF), ex vivo, and PAF-acetylhydrolase activity in patients with unstable angina: effect of c7E3 Fab (abciximab) therapy. *Cardiovascular Research*. 1999; 43(1), 183–191.
274. Tsujino T, Isobe K, Kawabata H, Aizawa H, Yamaguchi S, Kitamura Y, Masuki H, Watanabe T, Okudera H, Nakata K, Kawase T. Spectrophotometric Determination of the Aggregation Activity of Platelets in Platelet-Rich Plasma for Better Quality Control. *Dent J (Basel)*. 2019;7(2):61.
275. Turner NC, Wood LJ, Foster M, Gueremy T. Effects of PAF, FMLP and opsonized zymosan on the release of ECP, elastase and superoxide from human granulocytes. *Eur Respir J*. 1994;7(5):934-40.
276. Tuszynski GP et al. Thrombospondin Promotes Platelet Aggregation *Blood*. 1988; 72 (1): 109–115.
277. Ueha, S. et al. Cellular and Molecular Mechanisms of Chronic Inflammation-Associated Organ Fibrosis. *Frontiers in Immunology*. 2012; 3. doi:10.3389/fimmu.2012.00071
278. Vasudevan V et al. The genetic framework for development of nephrolithiasis. *Asian J Urol*. 2017; 4(1): 18–26.
279. Vianna, M.R., Izquierdo, I. *Protein Kinase*. 2020.
280. Wahle M et al. Influence of catecholamines on cytokine production and expression of adhesion molecules of human neutrophils in vitro. *Immunobiology*. 2005; 210(1):43-52.
281. Walterscheid JP. et al. Platelet-activating factor, a molecular sensor for cellular damage, activates systemic immune suppression. *J. Exp. Med*. 2002;195 (2): 171–179.

282. Wang J. Neutrophils in tissue injury and repair. *Cell Tissue Res.* 2018; 371(3): 531–539.
283. Wang Y et al. Platelet-Leukocyte Interaction in Atherosclerosis and Atherothrombosis: What We Have Learnt From Human Studies and Animal Models. *Journal of Cardiology and Therapy.* 2014; 1 (5): 92-97.
284. Wilson EH. et al. Trafficking of immune cells in the central nervous system. *J Clin Invest.* 2010;120(5):1368-1379.
285. Wisman PP, Teraa M, de Borst GJ, Verhaar MC, Roest M, Moll FL. Baseline Platelet Activation and Reactivity in Patients with Critical Limb Ischemia. *PLoS One.* 2015;10(7):e0131356.
286. Woulfe D et al. ADP and platelets: the end of the beginning. *The Journal of Clinical Investigation.* 2001. 107 (12):1503-1505.
287. Yang J, Wu J, Jiang H, Mortensen R, Austin S, Manning DR, Woulfe D, Brass LF. Signaling through Gi family members in platelets. Redundancy and specificity in the regulation of adenylyl cyclase and other effectors. *J Biol Chem.* 2002;277(48):46035-42.
288. Yee DL, Sun CW, Bergeron AL, Dong JF, Bray PF. Aggregometry detects platelet hyperreactivity in healthy individuals. *Blood.* 2005;106(8):2723-9.
289. Yost, C. C., Weyrich, A. S., & Zimmerman, G. A. The platelet activating factor (PAF) signaling cascade in systemic inflammatory responses. *Biochimie.* 2010. 92(6), 692–697.
290. Yun SH, Sim EH, Goh RY, Park JI, Han JY. Platelet Activation: The Mechanisms and Potential Biomarkers. *Biomed Res Int.* 2016;2016:9060143.
291. Zago Alexandre C. et al. The Importance of the Interaction between Leukocyte Integrin Mac-1 and for the Inflammatory Response to Vascular Injury. *Arq Bras Cardiol* 2008; 90(1) 52-60.
292. Zakynthinos E, Pappa N. Inflammatory biomarkers in coronary artery disease. *J Cardiol.* 2009;53(3):317-33.
293. Zenaro E. et al. Could Neutrophils Be the Newest Players in Neurodegenerative Disease? *Nat Med.* 2015;21(8):880-6

294. Zhenyu Li et al. Signaling during platelet adhesion and activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010; 30 (12): 2341–2349.
295. Zhou L. Platelet Aggregation Testing in Platelet-Rich Plasma Description of Procedures With the Aim to Develop Standards in the Field. *Am J Clin Pathol* 2005;123:172-183. 172.
296. Zhuang Q, Bastien Y, Mazer BD. Activation via multiple signaling pathways induces down-regulation of platelet-activating factor receptors on human B lymphocytes. *J Immunol.* 2000;165(5):2423-31.
297. Zimmerman Guy et al. The platelet-activating factor signaling system and its regulators in syndromes of inflammation and thrombosis. *Critical Care Medicine.* 2002; 30(5):S294-S301.