

УДК 616.62/63-002-036, 11/12;616.155.2/.3
DOI: 10.26435/UC.V012(31).313

Э.Ф. Баринов, А.О. Перенесенко, Х.В. Григорян

ГОО ВПО «Донецкий национальный медицинский университет имени М. Горького», Донецк

МОЛЕКУЛЯРНАЯ АКТИВАЦИЯ И ФОРМИРОВАНИЕ 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 [10]. Считается, что миграции Лц предшествует формирование тромбоцитарно-лейкоцитарных агрегатов (ТЛА), обеспечивающих преколонизацию тромбоцитов (Тц) и/или Лц [8]. Если участие адгезивных молекул (Р-селектин), секретируемых клетками крови, не вызывает сомнений при формировании циркулирующих агрегатов, то сами механизмы активации клеток остаются малоизученными [2, 7]. 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, Ca^{2+} , ФАТ и пр.) механизмов регуляции на функциональную активность Лц и Тц, а также роли гуморальных факторов в детерминации клеточного состава ТЛА.

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 в условиях взаимодействия данных структур с последующей индукцией [8]. Сложность анализа кооперации Тц и Лц заключается в параллельном включении каскада паракринных механизмов, которыми обмениваются клетки крови [4, 8]. Необходимость изучения данной проблемы открывает возможность управления (амплификация или ингибирование) взаимодействием клеток крови на ранних этапах развития воспалительной реакции [1, 3, 5]. Исследования *in vitro* на цельной крови позволяют моделировать условия взаимодействия системных и паракринных регуляторов Тц в формировании ТЛА и рекрутировании Лц [1, 6].

Цель исследования – изучить влияние адреналина, АДФ и ФАТ на формирование и состав

ТЛА у пациентов с ХОПН при одновременной стимуляции Тц и Лц в цельной крови.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Обследовано 38 пациентов (в фазе рецидива (n=25) и в фазе ремиссии (n=13)) на этапе госпитализации в урологический стационар с верифицированным диагнозом ХОПН. Диагноз ХОПН был поставлен на основании данных анамнеза и объективного осмотра, лабораторных и инструментальных исследований. Инструментальная диагностика пациентов включала ультразвуковое исследование, компьютерную томографию (с целью оценки анатомического статуса почки, локализации конкремента и наличия аномалий развития, патологических образований и осложнений). Для оценки функционального статуса проводилась экскреторная урография.

Для фазы ремиссии критериями были отсутствие изменений лабораторных и клинических критериев, которые характеризуют острое воспаление. Диагноз фазы рецидива ХОПН был основан на наличии, по крайней мере, одного из трех симптомов (лихорадка, боль в реберно-позвоночном угле). Лабораторными критериями воспаления являлись лейкоцитоз и уровень С-реактивного белка (СРБ); лейкоцитурия или бактериурия стали вспомогательными критериями, подтверждающими наличие инфекции мочевыводящих путей. Критериями исключения пациентов из исследования стали: а) наличие онкологической патологии; б) тромбозы; в) нарушения системы гемостаза; г) беременность; д) отказ от участия в исследовании. Исследование проводилось при отсутствии приема медикаментозных препаратов (ГЛКС, НПВП). Контрольной группой стали 10 условно-здоровых волонтеров, не имеющих воспалительной патологии мочевыделительной системы.

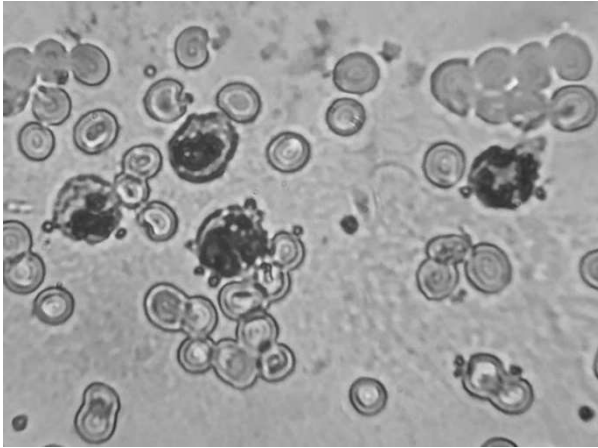


Рис. 1. Формирование ТЛА с одиночными нейтрофилами и несколькими тромбоцитами. Окраска по методу Паппенгейма. Ув. $\times 40$.

Исследование формирования ТЛА. Для анализа формирования ТЛА проводили инкубацию 500 мкл цельной крови с адреналином (концентрация 5 мкМ – 1 мкл), АДФ (5 мкМ – 1 мкл) и ФАТ (150 мкМ – 1 мкл) 10 минут при $t +38$ С. 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 осуществлялась при увеличении $\times 40$ и $\times 100$. При подсчете ТЛА оценивали наличие и размер межклеточных агрегатов. Критерием подсчета являлось формирование ТЛА – кооперации клеток 1 и более Лц и нескольких Тц и рассчитывали в процентном отношении на 100 клеток (Лц) (рис. 1.). В составе межклеточных агрегатов оценивалось соотношение различных видов Лц, что также выражалось в процентном соотношении.

Этическая экспертиза. Все клинические исследования выполнены с согласования комиссии по биоэтике ГОУ ВПО «Донецкий национальный медицинский университет имени М. Горького» и отвечают этическим принципам проведения клинических исследований, а также положениям Хельсинской декларации. Исследования выполнены согласно принципам надлежащей лабораторной практики (ГОСТ Р 53434 – 2009).

Статистическая обработка данных. Анализ проведен с использованием статистического пакета MedCalcSoftware, 2010. Оценка величин проводилась путем расчета среднего арифметического признака (\bar{X}) и медианы (Me) и соответственной стандартной ошибки (m). Для качественных характеристик использовали показатель частоты признака (%) и его стандартную ошибку (m%). При анализе межгрупповых различий в случае двух групп использовали критерий Стьюдента (при нормальном законе распределения и количественных характеристиках), критерий Вилкоксона и критерий U Манна-Уитни (в случае отличий закона распределения от нормального и количественных характеристик), метод углового преобразования Фишера (в случае сравнения частоты качественных характеристик). Во всех случаях отличия считались статистически значимыми при уровне значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Реализация цели достигалась постановкой перечня исследовательских вопросов.

1. *Отличается ли формирование ТЛА in vitro у здоровых лиц при инкубации агонистами?* Уровень ТЛА до инкубации с агонистами варьиро-

Таблица 1.

Уровень межклеточных агрегатов в циркулирующей крови у здоровых лиц

| Условия исследования | $\bar{X} \pm m$ |
|-------------------------------------|--|
| | 95% ДИ (левый-правый) |
| До стимуляции клеток крови | 4,364 \pm 0,3636 3,553 – 5,174 |
| Стимуляция клеток крови адреналином | 5,400 \pm 0,541 4,175 – 6,625 |
| Стимуляция клеток крови АДФ | 8,000 \pm 1,923***♦♦ 2,659 – 13,341 |
| Стимуляция клеток крови ФАТ | 7,818 \pm 0,536***♦♦♦ 6,623 – 9,013 |

Примечание: *** – вероятность различий количества ТЛА, сформировавшихся при инкубации агонист-индуцированных Тц и интактных лейкоцитов, и ТЛА, сформировавшихся при инкубации интактных лейкоцитов и Тц, на уровне $p < 0,001$; ♦♦ – вероятность различий по сравнению с адреналин-индуцированными ТЛА на уровне $p < 0,01$. ♦♦♦ – вероятность различий по сравнению с АДФ-индуцированными ТЛА на уровне $p < 0,05$.

вал в диапазоне от 3,5 до 5,1% (табл. 1.) При стимуляции Тц адреналином выявлена тенденция к повышению количества ТЛА – на 23,7% ($p > 0,05$). Использование АДФ и ФАТ в качестве индукторов активации клеток крови связано с необходимостью анализа паракринных механизмов, участвующих в формировании ТЛА. При этом происходит активация Тц и секреция ими АДФ и АДФ, которые связываются с пуриновыми рецепторами лейкоцитов (P_2X и P_2Y) [9], тогда как Лц выделяют ФАТ, мишенью для которого являются Тц [10].

АДФ воспроизводил прирост ТЛА на уровне 83,3% ($p = 0,001$), по сравнению с уровнем до инкубации. Относительно системного эффекта инкубации адреналина – формирование агрегатов увеличилось на 48,1% ($p = 0,021$). Для паракринного регулятора ФАТ эти показатели составили 79,1% ($p < 0,01$) и 44,8% ($p = 0,005$), соответственно. Стимулирующее воздействие АДФ и ФАТ на клетки крови, которое проявлялось активацией Тц, Лц и формированием ТЛА, совпало ($p > 0,05$).

Клеточный состав ТЛА в группе здоровых лиц. При исследовании клеточного состава ТЛА в контрольной группе здоровых лиц до инкубации с агонистами, преобладали тромбоцитарно-нейтрофильные агрегаты (Тц-НФа), составившие $3,091 \pm 0,31\%$ (95% ДИ 2,389 – 3,793%) (рис. 2.). Тромбоцитарно-моноцитарные агрегаты (ТМА) составили лишь 2,0 % (95% ДИ 2,0 – 2,0 %) среди всего количества межклеточных коопераций. Лимфоциты в составе агрегатов (Тц-ЛФА) были в количестве 1%, а эозинофилы (Тц-ЭоА) – 2%. После индукции адреналином Тц-НФа группы здоровых лиц повысились на 36,5 %, что составило $4,222 \pm 0,862$ (95% ДИ 2,233 – 6,211%) ($p = 0,026$) (рис. 3.). Уровень моноцитов, лимфоцитов и эозинофилов был равнозначен и между собой клеточный состав агрегатов достоверно не отличался. Обращал на себя внимание незначительный прирост лимфоцитов, что можно трактовать широкий спектр межклеточного взаимодействия посредством адренорецепторов.

Индукция с АДФ выявила формирование Тц-НФа – $8,0 \pm 0,59$ (95% ДИ 6,701 – 9,299%); другие Лц зафиксированы не были. Таким образом, по сравнению с уровнем до инкубации прирост данных агрегатов увеличился почти в 2 раза ($p < 0,0001$); а по сравнению с ТЛА, индуцированными адреналином, прирост составил 89% ($p = 0,0014$).

При индукции ФАТ клеточный состав ТЛА относительно нейтрофилов был выше, чем до индукции с агонистами в 2 раза ($p < 0,0001$) и на 27,7 % ($p = 0,02$) больше, чем при индукции адреналином. ТЛА с эозинофилами отсутство-

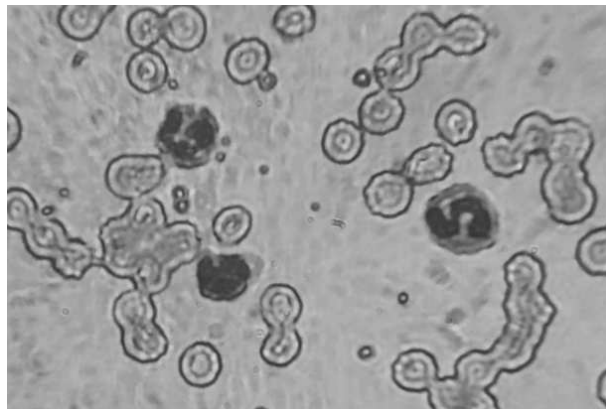


Рис. 2. Формирование тромбоцитарно-нейтрофильных агрегатов в контрольной группе здоровых лиц. Окраска по методу Паппенгейма Ув.×40.

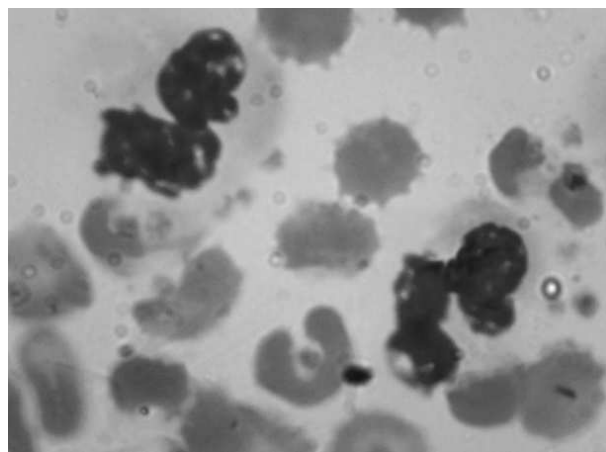


Рис. 3. Формирование тромбоцитарно-нейтрофильных агрегатов в контрольной группе. Окраска по методу Паппенгейма Ув.×1000.

вали. Формирование ТЛА с моноцитами было наиболее многочисленным среди данных проб – $3,0 \pm 1,0\%$ (95% ДИ 2,0 – 4,0%). Примечательно, что данный показатель не отличался достоверностью от формирования ТЛА с другими агонистами.

2. Отличается ли уровень ТЛА до инкубации агонистами в циркулирующей крови у пациентов с ХОПН? Результаты морфометрического исследования мазков крови свидетельствуют, что количество ТЛА до инкубации с агонистами в фазе ремиссии ХОПН соответствует таковому в контрольной группе ($p = 0,384$). В фазе рецидива ХОПН содержание ТЛА в цельной крови превышает уровень агрегатов в контрольной группе ($p = 0,002$) и в фазе ремиссии примерно в 2,2 раза ($p < 0,001$) (рис. 4.).

Вероятно, в фазе рецидива ХОПН интенсивное рекрутирование Лц крови достигается посредством включения механизмов, которые не проявляются у здоровых лиц и пациентов с ре-

Таблица 2.
Уровень межклеточных агрегатов в циркулирующей крови у пациентов с ремиссией ХОПН

| Условия исследования | $\bar{X} \pm m$ 95% ДИ (левый-правый) |
|-------------------------------------|--|
| До стимуляции клеток крови | 3,909±0,31 3,207 – 4,611 |
| Стимуляция клеток крови адреналином | 7,000±0,940*** 4,867 – 9,133 |
| Стимуляция клеток крови АДФ | 6,333±2,33** 3,250 – 9,250 |
| Стимуляция клеток крови ФАТ | 9,200±1,775*** 5,184 – 13,216 |

Примечание: ** – вероятность различий по сравнению с индуцированными ТЛА контрольной группы на уровне $p < 0,01$; * – вероятность различий на уровне $p < 0,05$. *** – вероятность различий количества ТЛА, сформировавшихся при инкубации агонист-индуцированных Тц и интактных лейкоцитов, и ТЛА, сформировавшихся при инкубации интактных лейкоцитов и Тц на уровне $p < 0,01$; ♦♦ – вероятность различий по сравнению с адреналин-индуцированными ТЛА на уровне $p < 0,01$. ●● – вероятность различий по сравнению с АДФ-индуцированными ТЛА на уровне $p < 0,01$;

миссией заболевания. Выяснение данных механизмов активации клеток крови при формировании ТЛА в разных фазах ХОПН позволит приблизиться к пониманию причин рецидива острого воспаления в мочевыводящих путях (МВП).

3. Отличается ли формирование ТЛА при стимуляции Тц и Лц у пациентов в фазе ремиссии ХОПН? Установлено, что количество ТЛА при введении адреналина в цельную кровь возросло относительно контрольной группы на 29,6% ($p=0,049$) и на 79% ($p=0,003$) относительно уровня ТЛА до инкубации (табл. 2.). Следовательно, рекрутирование Лц при хроническом воспалении в МВП обеспечивается системным механизмом активации САС, причем степень воспроизводимости количества агрегатов зависит от активности $\alpha 2$ -адренорецепторов клеток крови.

При стимуляции форменных элементов крови посредством АДФ количество ТЛА повысилось на 62% ($p=0,002$) относительно их численности до инкубации, что свидетельствует об участии пуриновых рецепторов клеток крови во взаимодействии Лц и Тц. В тоже время, отсутствие значимой разницы ТЛА при воздействии АДФ на цельную кровь у пациентов в фазе ремиссии ХОПН и у лиц контрольной группы свидетельствует о нормореактивности P_2Y -рецепторов Тц и Лц, а также сохранении адаптационных возможностей паракриной регуляции Тц. Поскольку не выявлена существенная разница между количеством ТЛА, сформировавшихся при воздействии АДФ и адреналина, то можно заключить, что эффект паракриной регуляции активированных Тц сопоставим с эффектом системной регуляции, обеспечивающей

активацию Лц посредством повышения концентрации адреналина в крови.

При стимуляции клеток крови агонистом 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% ($p=0,01$) число ТЛА в контрольной группе. Таким образом, можно констатировать, что имело место повышение реактивности ФАТ-рецепторов клеток крови при наличии хронического воспаления в МВП и участие Лц, секретирующих ФАТ, в активации Тц, а также в формировании ТЛА. Тем самым, подтверждается функционирование паракриного 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, паракриная стимуляция активированных Лц при формировании ТЛА воспроизводила эффект выше, чем системный механизм, обеспечивающий активацию клеток крови посредством адреналина.

Выявлена тенденция более выраженного формирования ТЛА при воздействии на клетки крови ФАТ, по сравнению с АДФ (на 46,03%; $p > 0,05$), что отражает преобладание паракриного влияния Лц при взаимодействии клеток крови.

Клеточный состав ТЛА у пациентов в фазе ремиссии ХОПН. Анализируя клеточный со-

став ТЛА группы пациентов в фазе ремиссии до инкубации было выявлено, что преобладающей популяцией Лц, которые образовывали ТЛА стали нейтрофилы – $3,222 \pm 0,433\%$ (95% ДИ – 2,222 – 4,223%). Кроме того, агрегаты формировали эозинофилы. Число тромбоцитарно-эозинофильных агрегатов составило $3,0 \pm 1,0$ (95% ДИ 2,0 – 4,0%) (рис. 5). Лимфоциты также образовали межклеточные кооперации – $2,0 \pm 1,0\%$ (95% ДИ 1,0 – 3,25%). Наименьшее число ТЛА было сформировано с моноцитами – 1% агрегатов.

При индукции адреналином было выявлено, что количество нейтрофилов имело тенденцию к повышению на 37,5% ($p = 0,087$), по сравнению с уровнем до инкубации. Количество моноцитов в составе ТЛА повысилось в 3 раза при воздействии адреналина – $4,0 \pm 2,0$ (95% ДИ 2,0 – 6,5%) ($p = 0,083$). Лимфоциты и эозинофилы не продемонстрировали достоверных изменений после инкубации с адреналином ($p = 0,644$ и $p = 0,148$, соответственно).

Индукция с АДФ повысила уровень нейтрофилов в составе ТЛА на 37,5% – $4,4 \pm 0,61$ (95% ДИ 3,00 – 5,76%) ($p = 0,266$). Однако, по сравнению с ТЛА, инкубированными на адреналине, достоверных различий выявлено не было ($p = 0,448$). Примечательно, что моноциты показали увеличение в 2 раза и составили $2,0 \pm 0,0$ (95% ДИ 2,0 – 2,0) ($p = 0,049$). Статистически значимых различий с инкубированными на адреналине моноцитами выявлено не было ($p = 0,377$). Лимфоциты не формировали ТЛА при индукции с адреналином в данной исследуемой группе, показатель эозинофилов остался неизменным.

Уровень нейтрофилов в составе ТЛА при индукции с агонистом ФАТ увеличился почти в 2 раза ($P = 0,002$) и составил $6,9 \pm 1,4\%$ (95% ДИ 3,711 – 10,089%). Моноциты достоверно не отличались после проведения индукции с агонистами ($P = 0,121$). Эозинофилы ($P = 0,414$) и лимфоциты в составе ТЛА также не выявили достоверных различий.

4. Отличается ли формирование ТЛА при стимуляции Тц и Лц 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 (табл. 3.) ($p = 0,049$). Следовательно, рекрутирование Лц при остром воспалении в МВП может воспроизводиться адреналином, поскольку имеет место гиперреактивность $\alpha 2$ -адренорецепторов на клетках крови.

Стимуляция клеток крови посредством АДФ сопровождалась повышением количества ТЛА

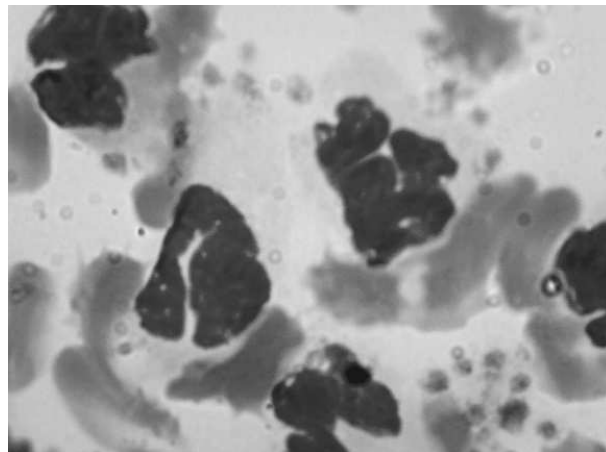


Рис. 4. Тромбоцитарно-нейтрофильные агрегаты в фазе рецидива у пациентов с хроническим обструктивным пиелонефритом. Окраска по методу Паппенгейма Ув. $\times 100$.

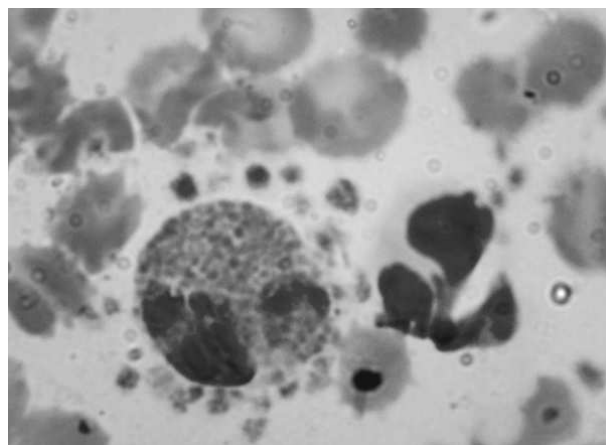


Рис. 5. Взаимодействие тромбоцитов, эозинофила и нейтрофила в межклеточных кооперациях. Окраска по методу Паппенгейма Ув. $\times 100$.

на 22,9% ($p = 0,022$) по сравнению с контрольной группой и на 21,2% по сравнению с их содержанием в мазках крови до стимуляции данным агонистом ($p = 0,028$). Не выявлена существенная разница между количеством ТЛА, образованными при воздействии АДФ и адреналина ($p = 0,471$). Относительно фазы ремиссии ХОПН количество ТЛА при влиянии экзогенного АДФ возросло на 56,03% ($p = 0,019$). 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 конста-

Количество ТЛА при стимуляции Тц и лейкоцитов *in vitro* у пациентов с рецидивом ХОПН Таблица 3.

| Условия исследования | $\bar{X} \pm m$ 95% ДИ (левый-правый) |
|-------------------------------------|--|
| До стимуляции клеток крови | 8,118±0,528 ^{×*} ■ 6,999-9,236 |
| Стимуляция клеток крови адреналином | 9,375±0,746 ^{×*} ■ 7,784- 10,966 |
| Стимуляция клеток крови АДФ | 9,833±0,767 ^{×*} ■ 8,145-11,522 |
| Стимуляция клеток крови ФАТ | 12,143±1,162 ^{×*} ■ 9,633-14,653 |

Примечание: ^{××} – вероятность различий по сравнению с индуцированными ТЛА контрольной группы на уровне $p < 0,01$; ^{*} – вероятность различий на уровне $p < 0,05$; [■] – вероятность различий по сравнению с индуцированными ТЛА у пациентов с ХОПН в фазе ремиссии на уровне $p < 0,05$

тировать, что повышение реактивности ФАТ-рецепторов клеток крови при наличии острого воспаления в МВП и эффективное функционирование паракринного механизма Лц при формировании ТЛА.

Обращает на себя внимание, что количество ТЛА в фазу рецидива ХОПН при инкубации крови с ФАТ, совпадает с таковым при воздействии адреналина (табл. 3.). 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 агрегаторформирующего 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.

Клеточный состав ТЛА у пациентов с ХОПН в фазе рецидива. Анализируя клеточный состав до инкубации с агонистами выявлено, что нейтрофилы составили 6,357±0,6304% (95% ДИ 5,064 – 7,651%), для моноцитов был характерен уровень 2,286±0,644% (95% ДИ 0,709 – 3,862%), лимфоциты в составе ТЛА – 2,333±0,3098% (95% ДИ 1,652 – 3,015%), а эозинофилы – 1,667±0,333% (95% ДИ 0,232 – 3,101%). Таким образом, исходно клеточный состав у пациентов фазы рецидива был достаточно гетерогенным – все виды Лц участвовали в формировании ТЛА.

При индукции с адреналином у пациентов данной группы было выявлено снижение количества нейтрофилов в составе ТЛА на 4 % (p

$= 0,041$). Уровень моноцитов и лимфоцитов статистически значимо не изменялись ($p = 0,751$ и $p = 0,668$, соответственно), а эозинофилы отсутствовали. Складывается впечатление, что произошло перераспределение Лц в составе ТЛА. Однако, адреналин являлся недостаточно сильным агонистом для того, чтобы индуцировать образование межклеточных коопераций.

При индукции с АДФ картина была иная: нейтрофилы формировали ТЛА на 26% больше, чем до индукции ($p = 0,0433$), при этом их количество было на 38% выше, чем при индукции адреналином ($p = 0,004$). Результат с моноцитами был аналогичен – после инкубации с АДФ произошло снижение на 35 % ($p = 0,007$). Сравнивая с адреналином индукцию АДФ, было выявлено снижение образования Тц-моноцитарных агрегатов почти в 2 раза ($p = 0,009$). Достоверных различий Лфц и Эо выявлено не было.

При индукции ФАТ количество нейтрофилов увеличилось на 50,9 % ($p = 0,031$), по сравнению с уровнем до инкубации. Отмечалось повышение реактивности нейтрофилов на 52 %, по сравнению с стимулированными адреналином нейтрофилами ($p < 0,001$). При индукции АДФ различий выявлено не было между группами данного вида Лц ($p = 0,261$). Анализируя количество моноцитов в составе ТЛА, произошло увеличение уровня данных клеток на 66,6 %, по сравнению с моноцитами, инкубированными с АДФ ($p = 0,032$). Лимфоциты увеличились на 56,6 % ($p = 0,012$), по сравнению с уровнем до инкубации у пациентов фазы рецидива. При индукции ФАТ уровень лимфоцитов имел самый высокий уровень и статистически значимо отличался от уровня Лмф при инкубации адреналином ($p = 0,002$) и АДФ ($p = 0,039$).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, у **здоровых лиц** (а) индукция адреналином существенно не влияла на формирование ТЛА; (б) моделирование *in vitro* паракринных механизмов взаимодействия Тц и Лц путем введения АДФ и ФАТ в цельную кровь свидетельствует о сопоставимости взаимного влияния Тц и Лц при формировании ТЛА; (в) влияние адреналина на формирование ТЛА в цельной крови меньше, чем у АДФ и ФАТ – 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 тромбоцитарно-лейкоцитарных агрегатов, чем системный механизм адреналина. Наибольшее количество нейтрофилов формировали агрегаты при индукции с ФАТ и АДФ. Преобладающее число моноцитов формировали ТЛА до инкубации с агонистами, что может трактоваться рецепторным перераспределением тромбоцитов, а после индукции агонистами наиболее специфичный был ФАТ; лимфоциты также были наиболее специфичны при инкубации с ФАТ.

В фазе ремиссии и рецидива ХОПН формирование ТЛА и рекрутирование лейкоцитов 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 P_2X -, P_2Y -рецепторов и ФАТ-рецепторов клеток крови. Причем стимуляция активированных лейкоцитов воспроизводила большее количество агрегатов, по сравнению с системным механизмом адреналина и паракринным механизмом тромбоцитов.

У пациентов **в фазе ремиссии** (а) влияние АДФ на формирование ТЛА более эффективно, что подчеркивает аутокринный адаптационный потенциал тромбоцитов в условиях хронического латентного воспаления; (б) индукция с ФАТ продемонстрировала активацию паракринного провоспалительного сигнала, который проявлялся наиболее выражено в межклеточных агрегатах с нейтрофилами.

Формирование тромбоцитарно-лейкоцитарных агрегатов **в фазу рецидива ХОПН**: (а) происходит с участием активированных тромбоцитов, секретирующих АДФ; (б) сопровождается гиперреактивностью пуриновых рецепторов $P2Y1$ и $P2Y12$ на лейкоцитах; (г) эффект паракринной регуляции посредством активированных тромбоцитах сопоставим с эффектом системной регуляции, обеспечивающей активацию лейкоцитов с участием адреналина; (г) ведущим агонистом, повышающим формирование тромбоцитарно-нейтрофильные агрегаты стал ФАТ.

Э.Ф. Баринов, А.О Перенесенко., Х.В. Григорян

ГОО ВПО «Донецкий национальный медицинский университет имени М. Горького», Донецк

МОЛЕКУЛЯРНАЯ АКТИВАЦИЯ И ФОРМИРОВАНИЕ ТРОМБОЦИТАРНО-ЛЕЙКОЦИТАРНЫХ АГРЕГАТОВ ПРИ РЕАЛИЗАЦИИ ОСТРОГО И ХРОНИЧЕСКОГО ВОСПАЛЕНИЯ В МОЧЕВЫВОДЯЩИХ ПУТЯХ

В публикации рассматривается влияние молекулярной индукции тромбоцитов и лейкоцитов в цельной крови. Цель исследования состояла в изучении влияния агонистов на формирование межклеточных агрегатов. Использовались агонисты адреналин, фактор активации тромбоцитов (ФАТ) и аденозиндифосфат (АДФ), воздействующие через различные внутриклеточные сигнальные пути и механизмы взаимодействия между форменными элементами. Исследуемой группой стали пациенты с хроническим обструктивным пиелонефритом (ХОПН). Патологическое

основой состояния данной группы исследования являлось систематическое повреждение мягких тканей конкрементами и, как следствие, активация системы гемостаза, а также развитие хронического воспалительного процесса. В контрольной группе здоровых лиц и в группе пациентов с ХОПН выявлено формирование межклеточных агрегатов, которые различались по количеству и клеточному составу.

Ключевые слова: тромбоциты, агрегация форменных элементов, реактивность, молекулярная активация, хроническое воспаление.

E.F. Barinov, A.O. Perenesenko, H.V. Grigoryan

SEI HPE «M. Gorky Donetsk National Medical University», Donetsk

MOLECULAR ACTIVATION AND FORMATION OF PLATELET-LEUKOCYTE AGGREGATES IN REALIZATION OF ACUTE AND CHRONIC INFLAMMATION IN URINARY TRACT

The publication discusses the effect of molecular induction of platelets and leukocytes in whole blood. The aim of research was to study effect of agonists on intercellular aggregates formation. Such agonists as epinephrine, platelet activating factor (PAF) and adenosine diphosphate (ADP) were used and acted through various intracellular signaling pathways and mechanisms of interaction between blood elements. Study group included patients with chronic obstructive pyelonephritis (COPN). The pathophysiological basis of condition of this

research group was systematic damage to soft tissues by stones and as a result activation of hemostasis system as well as the development of a chronic inflammatory process. In control group of healthy individuals and in group of patients with COPN formation of intercellular aggregates was detected which differed in their count and cellular composition.

Key words: platelets, aggregation of blood elements, reactivity, molecular activation, chronic inflammation.

ЛИТЕРАТУРА

1. Балькина А.О., Фабер Т.И., Юрьева А.С. Кинетика формирования межклеточных коопераций крови у пациентов с хроническим обструктивным пиелонефритом. Неделя науки 2018: материалы Международного молодежного форума, посвященного 80-летию юбилею Ставропольского государственного медицинского университета. 22-23 ноября 2018. Ставрополь: Изд-во СтГМУ; 2018: 427-428.
2. Баринов Э.Ф., Балькина А.О., Кравченко А.Н. Механизмы формирования тромбоцитарно-лейкоцитарных агрегатов при хроническом обструктивном пиелонефрите. Клиническая нефрология. 2015; 5-6: 3-7.
3. Баринов Э.Ф., Балькина А.О., Фабер Т.И., Григорян Х.В. Молекулярные основы тромбоцитарной активации. Архив клинической и экспериментальной медицины. 2018; 27 (2): 79-84.
4. Баринов Э.Ф., Балькина 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. 29-30 ноября 2018 года. СПб.: Изд-во СЗГМУ им. И.И. Мечникова; 2018: 60-65.
5. Баринов Э.Ф., Григорян Х.В., Балькина А.О., Фабер Т.И. Тромбоцитарно-лейкоцитарные агрегаты циркулирующей крови как ранний индикатор рецидива хронического обструктивного пиелонефрита. Клиническая нефрология. 2017; 4: 37-41.
6. Юрьева А.С., Балькина А.О. Роль семейства селективных в каскаде процессов форменных элементов крови. Русский мир как цивилизационная основа научно-образовательного и культурного развития Донбасса: материалы Международной научной конференции студентов и молодых ученых. 17-20 октября 2017. Донецк; 2017: 247-248.
7. Alberts B., Johnson A., Lewis J. et al. Molecular Biology of the Cell. 4th edition. New York: Garland Science; 2002. 1616.
8. Finsterbusch M., Schrottmaier W.C., Kral-Pointner J.B., Salzmann M., Assinger A. Measuring and interpreting platelet-leukocyte aggregates. Platelets; 29 (7), 677-685. doi: 10.1080/09537104.2018.1430358
9. Hechler B., Gachet C. Purinergic Receptors in Thrombosis and Inflammation. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2015; 35 (11) : 2307-2315. doi: 10.1161/ATVBAHA.115.303395.
10. Kim N.D., Luster A.D. The role of tissue resident cells in neutrophil recruitment. Trends Immunol. 2015; 36 (9): 547-555. doi: 10.1016/j.it.2015.07.007

REFERENCES

1. Balykina A.O., Faber T.I., Yur'eva A.S. Kinetika formirovaniya mezhkletochnykh kooperatsii krovi u patsientov s khronicheskim obstruktivnym pielonefritom. Nedelya nauki 2018: materialy Mezhdunarodnogo molodezhnogo foruma, posvyashchennogo 80-letnemu yubileyu Stavropol'skogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta. 22-23 noyabrya 2018. Stavropol': Izd-vo StGMU; 2018: 427-428 (in Russian).
2. Barinov E.F., Balykina A.O., Kravchenko A.N. Mekhanizmy formirovaniya trombositarno-leikotsitarnykh agregatov pri khronicheskom obstruktivnom pielonefrite. Klinicheskaya nefrologiya. 2015; 5-6: 3-7 (in Russian).
3. Barinov E.F., Balykina A.O., Faber T.I., Grigoryan Kh.V. Molekulyarnye osnovy trombositarnoi aktivatsii. Arkhiv klinicheskoi i eksperimental'noi meditsiny. 2018; 27 (2): 79-84 (in Russian).
4. Barinov E.F., Balykina A.O., Faber T.I., Yur'eva A.S. Informativnost' i spetsifichnost' laboratornykh pokazatelei v diagnostike faz khronicheskogo obstruktivnogo pielonefrita. Profilakticheskaya meditsina – 2018: sbornik nauchnykh trudov Vserossiiskoi nauchno-prakticheskoi konferentsii s mezhdunarodnym uchastiem. 29-30 noyabrya 2018 goda. SPb.: Izd-vo SZGMU im. I.I. Mechnikova; 2018: 60-65 (in Russian).
5. Barinov E.F., Grigoryan Kh.V., Balykina A.O., Faber T.I. Trombositarno-leikotsitarnye agregaty tsirkuliruyushchei krovi kak rannii indikator retsidiva khronicheskogo obstruktivnogo pielonefrita. Klinicheskaya nefrologiya. 2017; 4: 37-41 (in Russian).
6. Yur'eva A.S., Balykina A.O. Rol' semeistva selektivnykh v kaskade protsessov formennykh elementov krovi. Russkii mir kak tsivilizatsionnaya osnova nauchno-obrazovatel'nogo i kul'turnogo razvitiya Donbassa: materialy Mezhdunarodnoi nauchnoi konferentsii studentov i molodykh uchenykh. 17-20 oktyabrya 2017. Donetsk; 2017: 247-248 (in Russian).
7. Alberts B., Johnson A., Lewis J. et al. Molecular Biology of the Cell. 4th edition. New York: Garland Science; 2002. 1616.
8. Finsterbusch M., Schrottmaier W.C., Kral-Pointner J.B., Salzmann M., Assinger A. Measuring and interpreting platelet-leukocyte aggregates. Platelets; 29 (7), 677-685. doi: 10.1080/09537104.2018.1430358
9. Hechler B., Gachet C. Purinergic Receptors in Thrombosis and Inflammation. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2015; 35 (11) : 2307-2315. doi: 10.1161/ATVBAHA.115.303395.
10. Kim N.D., Luster A.D. The role of tissue resident cells in neutrophil recruitment. Trends Immunol. 2015; 36 (9): 547-555. doi: 10.1016/j.it.2015.07.007