

УДК 616.617+616.61–002.3–036.11–089.879

БАРИНОВ Э. Ф., МАЛИНИН Ю. Ю., ГРИГОРЯН Х. В., ГИЛЛЕР Д. И.

ГОСУДАРСТВЕННАЯ ОБРАЗОВАТЕЛЬНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ
ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ «ДОНЕЦКИЙ
НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ М. ГОРЬКОГО»

АНАЛИЗ IN VITRO МЕХАНИЗМОВ РАЗВИТИЯ ОСТРОГО ПИЕЛОНЕФРИТА ПОСЛЕ КОНТАКТНОЙ УРЕТЕРОЛИТОТРИПСИИ В ВЕРХНЕЙ ТРЕТИ МОЧЕТОЧНИКА

РЕФЕРАТ. Цель исследования – выявить факторы риска развития острого пиелонефрита после контактной уретеролитотрипсии в верхней трети мочеточника и установить механизмы поддержания воспаления на фоне введения нестероидных противовоспалительных препаратов.

Материал и методы. В исследование включены пациенты ($n = 21$), у которых на фоне стандартной литокинетической терапии в течение 7 суток по данным визуализационного контроля не произошло перемещение конкремента из пиело-уретеральной зоны в среднюю треть мочеточника. По показаниям проведена контактная уретеролитотрипсия (КУЛТ). Количество циркулирующих тромбоцитарно-лейкоцитарных агрегатов (ТЛА) рассчитывали при микроскопии окрашенных мазков крови. Анализ функциональной активности рецепторов проводили турбидиметрическим методом на анализаторе ChronoLog (США). Статистический анализ осуществлялся с использованием пакета MedCalc.

Результаты. При назначении пациентам нестероидных противовоспалительных препаратов (НПВП) уровень лейкоцитурии через 24 ч и 48 ч после КУЛТ составил, соответственно, $17,5 \pm 0,8$ п/з (95 % ДИ 15,8–19,3 п/з) и $13,6 \pm 0,7$ п/з (95 % ДИ 12,4–14,8 п/з). Поддержание воспалительной реакции в мочевыводящих путях происходило на фоне гиперреактивности α_2 -адренорецептора, нормореактивности ФАТ-рецептора и пуринового $P2X_1$ -рецептора. Моделирование взаимодействия клеток крови in vitro продемонстрировало максимальное формирование ТЛА при взаимодействии α_2 -адренорецептора и $P2X_1$ -рецептора; эффект воспроизводился благодаря преимущественной активации тромбоцитов.

Заключение. При нарушении целостности слизистой оболочки введение НПВП ограничивает активность лейкоцитов; при этом сохраняется потребность в защитной воспалительной реакции направленной на ограничение инвазии микроорганизмов. Защитная реакция запускается активированными тромбоцитами, которые участвуют в рекрутировании лейкоцитов из сосудистого русла путем формирования ТЛА. Оптимальная степень активации тромбоцитов определяется взаимодействием α_2 -адренорецептора и $P2X_1$ -рецептора, при этом ведущую роль в стимуляции тромбоцитов играет адреналин. Выяснение механизмов активации клеток крови на фоне введения НПВП позволит наметить перспективные направления фармакологической коррекции направленной на профилактику послеоперационного пиелонефрита.

Ключевые слова: литокинетическая терапия, контактная уретеролитотрипсия, рецепторы тромбоцитов, тромбоцитарно-лейкоцитарные агрегаты.

В специальной литературе не получили должного освещения причины и механизмы поддержания воспаления в слизистой оболочке органов женской репродуктивной системы при длительном назначении антибиотиков, стероидных и нестероидных противовоспалительных препаратов (НПВП). С аналогичной проблемой часто сталкиваются специалисты при лечении

пациентов с разнообразными заболеваниями почек и мочевыводящих путей, органов пищеварительной системы, кожи и легких [8]. Причины этого явления следует искать не только в резистентности организма к лекарственным препаратам, но и недостаточности знаний, касающихся «поведения» клеток крови на фоне противовоспалительной терапии. Логично предположить, что

при сохраняющемся нарушении барьерной функция эпителиальных тканей (следствие альтерации эпителия слизистой оболочки), назначение НПВП, ингибирующих функциональную активность лейкоцитов, может ограничивать, но не ликвидировать хроническую воспалительную реакцию. Последующая динамика воспаления в органе будет зависеть от эффективности включения компенсаторных реакций, направленных на стимуляцию циркулирующих клеток крови и модуляцию взаимодействия лейкоцитов в зоне инфильтрации. Данная область теоретических знаний остается наименее изученной, но крайне важной для разработки методов «управления» воспалением. Так, остаются не известными факторы риска развития острой воспалительной реакции; а также механизмы, обеспечивающие восстановление функции клеток крови и завершение воспаления при ингибировании циклооксигеназы (ЦОГ) в лейкоцитах. Для формирования соответствующих знаний необходимо привлечение инновационных биотехнологий, разработка которых ведется по нескольким направлениям. С нашей точки зрения, перспективными являются: методы исследования *in vitro* функциональной активности рецепторов на клетках крови, что открывает возможность детекции патогенетических факторов и изучения внутриклеточных сигнальных систем, участвующих в стимуляции клеток крови. Весьма информативными являются также технологии анализа взаимодействия клеток крови в циркулирующей крови, позволяющие мониторить функциональную активность тромбоцитов и лейкоцитов на начальном этапе воспалительной реакции [22]. Основными индикаторами в таких методах являются характеристики тромбоцитарно-лейкоцитарных агрегатов (ТЛА) [18], которые позволяют оценивать: (а) адгезию лейкоцитов к эндотелию и их рекрутирование из сосудистого русла в ткани органов; (б) регуляцию автономных функций лейкоцитов, включая образование и освобождение внеклеточных ловушек нейтрофилов, а также (в) наличие обратной связи, позволяющей ограничивать тяжесть воспаления и защищать орган от вторичной альтерации, вызванной чрезмерной активацией

иммунной системы [20]. Потенциальные возможности использования приведенных выше технологий изучения патогенеза воспаления могут быть проиллюстрированы на примере решения ряда исследовательских задач связанных с изучением молекулярных механизмов, которые контролируют развитие острого пиелонефрита после контактной уретеролитотрипсии в верхней трети мочеточника.

Цель исследования – выявить факторы риска развития острого пиелонефрита после контактной уретеролитотрипсии в верхней трети мочеточника и установить механизмы поддержания воспаления на фоне введения нестероидных противовоспалительных препаратов.

Материал и методы

Исследование носило проспективный характер и включало 61 пациента с визуализационными признаками наличия конкрементов в верхней трети мочеточника. Всем пациентам на этапе госпитализации проведено комплексное клиническое обследование по традиционной схеме, принятой для диагностики мочекаменной болезни (жалобы, сбор анамнеза, физикальный осмотр, клинко-инструментальные исследования, ультразвуковое обследование и компьютерная томография почек, микробиологический посев мочи, лабораторные исследования крови и мочи). В соответствии с поставленной целью отобраны пациенты (10 мужчин и 11 женщин; средний возраст $60,3 \pm 3,5$ года), у которых на фоне стандартной литокINETической терапии (включающей диклофенак натрия, 100–150 мг/сут) в течение 7 суток по данным визуализационного контроля не произошло перемещение конкремента из пиело-уретеральной зоны в среднюю треть мочеточника. Средний размер конкремента составил $14,3 \pm 0,9$ мм (min–max 8,0–30,0 мм). По показаниям проведена антеградная перкутанная уретеролитотрипсия (контактная уретеролитотрипсия (КУЛТ)) с использованием электроимпульсного литотриптера «Уролит» (ООО «МедЛайн»), ультразвукового литотриптера Karl Storz

CALCUSON, гольмиевого лазерного литотриптора KARL STORZ Calculase II или их комбинации. После операции в течении 2 суток сохранялась стандартная противовоспалительная терапия, включающая НПВП и антибиотики. Контрольными точками исследования у пациентов были 24 ч после КУЛТ, 72 ч (последний срок назначения НПВП, общая длительность назначения препарата составила 9 суток). Лейкоцитирию определяли при наличии 11 и более лейкоцитов в поле зрения при микроскопии осадка мочи; при этом выделяли легкую степень – 11–15 п/з, среднюю – 16–25 п/з и тяжелую степень лейкоцитирии – более 25 п/з. Для оценки процесса рекрутирования лейкоцитов из сосудистого русла в ткани рассчитывали количество циркулирующих в крови тромбоцитарно-лейкоцитарных агрегатов (ТЛА). Проводили микроскопию мазков крови окрашенных по методу Паппенгейма; число ТЛА рассчитывали в процентном отношении на 100 клеток.

Группа контроля включала 10 здоровых лиц, у которых при диагностическом обследовании не выявлены клинко-лабораторные признаки сердечно-сосудистой и урологической патологии. Контрольная группа была сопоставима по возрасту с таковой при наличии нефролитиаза; кровь здоровых лиц использовалась для определения контрольных значений ТЛА и агрегации тромбоцитов (АТц). Анализ функциональной активности тромбоцитов (Тц) проводили *in vitro*, для чего из периферической крови путем центрифугирования выделяли обогащенную тромбоцитами плазму. В пробе содержание тромбоцитов в 1 мкл составляло $200\,000 \pm 20\,000$.

В исследовании применяли агонисты рецепторов, участвующих в модуляции воспалительной реакции, в частности: АДФ (лиганд пуриновых P2Y-рецепторов), АТФ (лиганд пуриновых P₁X-рецепторов), ангиотензин-2 (лиганд AT₁-рецептора), адреналин (неселективный лиганд α_2 -адренорецептора), коллаген IV типа (лиганд GPVI-рецептора), фактор актива-

ции тромбоцитов (лиганд ФАТ-рецептора), аденозин (лиганд A2A-рецептора), изадрин (лиганд β_2 -адренорецепторов).

Оценку агрегации АТц проводили турбидиметрическим методом на анализаторе ChronoLog (США). В работе также были использованы субпороговые концентрации агонистов, которые в контрольной группе (5 здоровых доноров) вызывали АТц, не превышающую 10 % (ЕС₁₀). Взаимодействие рецепторов в формировании ТЛА *in vitro* анализировали при совместной инкубации 250,0 мкл периферической крови с каждым агонистом и комбинации агонистов, используемых в концентрации ЕС₁₀. Условия ингибирования ЦОГ в Тц воспроизводились добавлением к суспензии Тц Аспирина (500,0 мкМ). У всех обследованных пациентов получено информированное согласие на участие в исследовании. Статистический анализ осуществлялся с использованием пакета MedCalc 18.10.2. Во всех случаях отличие считалась статистически значимым при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты

На фоне назначения пациентам НПВП через 24 ч после КУЛТ уровень лейкоцитирии уменьшился на 19,4 % ($p < 0,001$) по сравнению с таковой на момент госпитализации, соответственно, $17,5 \pm 0,8$ п/з (95 % ДИ 15,8–19,3 п/з) и $21,7 \pm 0,8$ % (95 % ДИ 20,1–23,4 %). Через 48 ч показатель снизился на 22,3 % ($p < 0,05$) по сравнению с предыдущим сроком наблюдения (до $13,6 \pm 0,7$ п/з (95 % ДИ 12,4–14,8 п/з)).

На первом этапе исследования для установления факторов риска, провоцирующих развитие острого пиелонефрита после КУЛТ, проведено исследование активности рецепторов на Тц, участвующих в реализации воспалительной реакции. Через 48 ч после КУЛТ на фоне введения НПВП выявлена гиперреактивность α_2 -адренорецептора, нормореактивность ФАТ-рецептора и P2X₁-рецептора, а также гипореактивность P2Y-рецепторов, β_2 -адренорецептора, AT₁-рецептора, GPVI-рецептора и A2A-рецептора (табл. 1).

Таблица 1. Функциональная активность рецепторов тромбоцитов (%) у пациентов через 48 ч после выполнения контактной уретеролитотрипсии в верхней трети мочеточника

Тип рецепторов	Среднее значение $\bar{X} \pm SD$	Min–Max	95 % ДИ	
			Левый	Правый
α_2 -адренорецептор	$59,8 \pm 0,9$	55,0–66,0	58,1	61,5
ФАТ-рецептор	$45,6 \pm 1,4$ $P_{\text{Адренал}} < 0,001$	38,0–59,0	42,7	48,4
P2X ₁ -рецептор	$45,6 \pm 1,2$	40,0–57,0	42,9	48,0
P2Y-рецепторы	$41,0 \pm 1,3$ $P_{\text{АТФ}} < 0,05$	34,0–50,0	38,4	43,7
β_2 -адренорецептор	$41,3 \pm 1,1$	34,0–50,0	38,9	43,7
AT ₁ -рецептор	$39,7 \pm 1,2$	33,0–48,0	37,1	42,3
GPVI-рецептор	$36,0 \pm 1,2$ $P_{\text{АТ1}} < 0,05$	30,0–49,0	33,4	38,6
A2A-рецептор	$32,3 \pm 0,6$ $P_{\text{GPVI}} < 0,05$	29,0–37,0	31,1	33,6

Примечание. Р – вероятность различий активности рецептора относительно таковой предыдущего рецептора.

Реактивность рецепторов не отменялась при добавлении в суспензию тромбоцитов Аспирина. Следовательно, в раннем периоде после малоинвазивного оперативного вмешательства при введении пациентам НПВП: (а) сохраняется активность симпато-адреналовой системы (САС), что проявляется перманентной стимуляцией адренорецепторов на клетках крови; (б) гипер- и нормореактивность рецепторов Тц отражает независимость функционирования ряда внутриклеточных сигнальных систем от ингибирования ЦОГ; (в) поддерживается функциональная активность лейкоцитов, секретирующих провоспалительный медиатор – ФАТ; (г) сохраняются процессы ишемии / реперфузии тканей почки, вызывающие повышение внеклеточного содержания АТФ, который является регулятором тяжести воспалительной реакции. Проведенный корреляционный анализ выявил наличие положительной связи между количеством циркулирующих в крови ТЛА (базальный уровень ТЛА) и активностью α_2 -адренорецептора ($r_{\text{ТЛА-}\alpha_2\text{AP}} = 0,577$; $p < 0,05$), пуринового P2X₁-рецептора ($r_{\text{ТЛА-P2X1}} = 0,688$; $p < 0,05$), ФАТ-рецептора ($r_{\text{ТЛА-ФАТ}} = 0,490$; $p < 0,05$). Связь между количеством ТЛА и активно-

стью других рецепторов была либо слабой, как в случае с АТ₁-рецептором ($r_{\text{ТЛА-AT1}} = 0,352$; $p < 0,05$), либо отсутствовала (с активностью GPVI-рецептора, пуриновых P2Y-рецепторов, аденозинового A2A-рецептора и β_2 -адренорецептора; $p > 0,05$). Таким образом, предполагаемыми триггерами формирования ТЛА, обеспечивающими поддержание воспалительной реакции в стенке МВП через 48 ч после КУЛТ, несмотря на введение пациентам НПВП, являются агонисты: АТФ, адреналин и ФАТ.

На *втором* этапе исследования для проверки сформулированной гипотезы использовали метод моделирования взаимодействия тромбоцитов и лейкоцитов *in vitro* путем стимуляции рецепторов субпороговыми дозами агонистов.

Исследовательский вопрос – какие рецепторы участвуют в формировании ТЛА и рекрутировании клеток крови для реализации защитной воспалительной реакции в поврежденной слизистой оболочке мочеточника через 48 ч после КУЛТ на фоне введения НПВП? Установлено, что максимальное количество ТЛА индуцировал адреналин (табл. 2).

Таблица 2. Характеристика показателей функциональной активности тромбоцитов и взаимодействия клеток крови через 48 ч после выполнения контактной уретеролитотрипсии в верхней трети мочеточника

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

Примечания:

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

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

Полученные результаты подтверждают ведущую роль α_2 -адренорецептора и P2X₁-рецепторов в рекрутировании клеток крови из сосудистого русла. Инкубация клеток крови одновременно с несколькими агонистами позволила оценить взаимодействие рецепторов, способное потенцировать формирование ТЛА. Оказалось, что наиболее выраженный эффект формирования ТЛА *in vitro* воспроизводился при взаимодействии α_2 -адренорецептора и P2X₁-рецептора. Количество образовавшихся ТЛА при одновременной стимуляции двух рецепторов превышало таковое при изолированной стимуляции α_2 -адренорецептора на 24,7 % ($p < 0,05$) и P2X₁-рецептора на 63,1 % ($p < 0,001$). Синергичный эффект в процессе формирования ТЛА воспроизводила стимуляция P2X₁-рецептора и ФАТ-рецептора; результат взаимодействия этих рецепторов превосходил эффект изолированной стимуляции P2X₁-рецептора на 38,5 % ($p < 0,001$) и ФАТ-рецептора на 104,5 % ($p < 0,001$). Данная комбинация агонистов воспроизводила меньшее количество ТЛА (на 15,1 %; $p < 0,05$) по сравнению с эффектом α_2 -адренорецептора и P2X₁-рецептора.

Минимальный стимулирующий эффект моделировался при одновременной стимуляции α_2 -адренорецептора и ФАТ-рецептора. Количество ТЛА, которое образовалось при взаимодействии этих рецепторов, превышало таковое при изолированной стимуляции ФАТ-рецептора на 70,4 % ($p < 0,001$) и значительно не различалось при стимуляции только α_2 -адренорецептора. Обращают на себя внимание более низкие цифры ТЛА в случае одновременной стимуляции α_2 -адренорецептора и ФАТ-рецептора: по сравнению с парой P2X₁-рецептор и ФАТ-рецептор – на 16,7 % ($p < 0,05$) и по отношению к эффекту α_2 -адренорецептора и P2X₁-рецептора – на 29,2 % ($p < 0,001$). Моделирование взаимодействия других рецепторов не сопровождалось значимой стимуляцией клеток крови, позволяющей увеличить формирование ТЛА, по сравнению с изолированным эффектом агонистов.

Необходимо было ответить на вопрос – почему именно взаимодействие α_2 -адренорецептора и P2X₁-рецептора

воспроизводило формирование максимального количества ТЛА? Одной из причин этого явления может быть ко-стимуляция новых звеньев внутриклеточных сигнальных путей. Проверить данную гипотезу возможно в исследовании *in vitro* путем регистрации эффектов при изолированной и одновременной стимуляции нескольких рецепторов. В этой связи проведен анализ характеристик агрегации тромбоцитов при активации рецепторов субпороговой дозой агонистов (*третий* этап исследования).

Исследовательский вопрос – в равной ли степени активируются Тц при взаимодействии разных рецепторов? При сравнении параметров кривых агрегации – площадь под кривой (AUC), отражающая степень активации и взаимодействия Тц в процессе агрегации, была максимальной при взаимодействии α_2 -адренорецептора и P2X₁-рецептора (см. табл. 2). Одновременная стимуляция α_2 -адренорецептора и ФАТ-рецептора, а также P2X₁-рецептора и ФАТ-рецептора моделировала сходную, хотя и более низкую активность Тц. Следовательно, на фоне длительного введения больших доз НПВП после КУЛТ два фактора способны усиливать функцию Тц – это повышение уровня адреналина и пуриновых нуклеотидов в крови. Вероятно, нарушение ФАТ-сигнализации в лейкоцитах при назначении НПВП не позволяет достигнуть пороговых значений внутриклеточного Ca²⁺, обеспечивающих паракринную стимуляцию Тц сопоставимую с эффектом одновременной активации α_2 -адренорецептора и P2X₁-рецептора. Таким образом, можно прийти к заключению, что на фоне назначения пациентам НПВП развитие воспалительной реакции после КУЛТ может поддерживаться активированными Тц, которые участвуют в рекрутировании лейкоцитов из сосудистого русла путем формирования ТЛА. Оптимальная степень активации Тц определяется взаимодействием α_2 -адренорецептора и P2X₁-рецептора, при этом ведущую роль в стимуляции Тц играет адреналин. Тяжесть развития послеоперационного острого пиелонефрита

лимитируется нарушением ФАТ-сигнализации в клетках крови, поскольку не воспроизводится потенцирующий эффект при взаимодействии с другими рецепторами участвующими в формировании ТЛА.

Обсуждение

Участие симпато-адреналовой системы в рекрутировании лейкоцитов представляется логичным, поскольку экспрессия α_2 -адренорецепторов на клетках крови и эндотелии [2, 10] создает оптимальные условия для формирования ТЛА при развитии пиелонефрита [4]. Провоспалительный эффект адреналина может быть связан с тем, что: (а) цитокины могут усиливать экспрессию адренорецепторов на лейкоцитах; последние, в свою очередь, способны самостоятельно синтезировать катехоламины при развитии воспалительной реакции [9]; (б) стимуляция α - и β -адренорецепторов сопровождается увеличением фагоцитарной способности макрофагов, экспрессией индуцибельной синтазы оксида азота (iNOS) и повышением продукции NO [19]. В этой связи R. Sud и соавт. [3] предлагают рассматривать активность α_2 -адренорецептора макрофагов как индикатор воспалительной реакции, поскольку соответствующие лиганды индуцируют продукцию фактора некроза опухоли (ФНО α). (в) Адренергическая система клеток крови контролирует адгезию при рекрутировании лейкоцитов из сосудистого русла; в частности, адреналин значительно усиливал экспрессию Р-селектина и гликопротеина IIb / IIIa на тромбоцитах [5]. Опосредованное α -адренорецепторами увеличение экспрессии молекул адгезии на тромбоцитах вносит существенный вклад в активацию лейкоцитов путем формирования ТЛА. Известно, что интегрин-зависимая адгезия лейкоцитов может быстро повышаться за счет передачи сигналов с α_2 -адренорецепторов через Gai-белок; при этом рецепторы, связанные с Gas-белком могут модулировать аффинное состояние адгезивных молекул (VLA-4) через цАМФ-зависимый путь [7]. В частности, цАМФ, действуя через протеинкиназу А,

ингибирует вызванную хемоаттрактантом интегрин-зависимую адгезию лейкоцитов, а также предотвращает обмен гуаниновых нуклеотидов с RhoA, небольшим ГТФ-связывающим белком подсемейства Rho, который активируется хемоаттрактантами [11]. (г) Адренорецепторы могут модулировать трансэндотелиальную миграцию лейкоцитов при реализации воспаления. Эксперименты с эндотелиальными клетками (монослой HUVEC) показали, что агонист α_2 -адренорецептора (UK14304) уменьшал макромолекулярный транспорт через монослой клеток [17]. В посткапиллярных венулах предварительная обработка эндотелиальных клеток посредством α_2 -агонистов снижала трансэндотелиальную миграцию нейтрофилов; эффект связан со снижением экспрессии адгезивных молекул (VE-кадгерина, β -катенина и плакоглобина). Приведенные данные свидетельствуют, что α_2 -адренорецепторы запускают сигнализацию, которая защищает целостность контактов между эндотелиальными клетками во время воспалительного ответа.

В настоящее время внеклеточные нуклеотиды признаны важными медиаторами активации клеток крови посредством P2X-ионотропных рецепторов и метаболитных G-белок-связанные P2Y-рецепторов [15]. Внеклеточный аденозинтрифосфат (АТФ) считается молекулой DAMP (danger-associated molecular pattern DAMP), которая выделяется во внеклеточную среду во время воспаления поврежденными клетками, лейкоцитами и активированными тромбоцитами [6]. Моноциты и макрофаги экспрессируют разнообразные P2-рецепторы на клеточной поверхности, которые способны повысить уровень цитоплазматического Ca^{2+} [12]. Представляет интерес пуринергическая передача сигналов в регулировании функции нейтрофилов [21]. Установлено, что АТФ непосредственно активирует рецептор P2X7 канала плазматической мембраны (P2X7R), что приводит к внутриклеточному притоку K^+ , индуцирующего активацию инфламماسомы NLRP3 [16]. Ключевую роль в АТФ-

индуцированной активации P2X7 рецептора и инфламماسомы NLRP3, играет паксиллин, который облегчает образование комплекса P2X7R–паксиллин–NLRP3. Интегративную роль во взаимодействии клеток крови может играть АТФ-управляемый Ca^{2+} -канал, экспрессируемый как на тромбоцитах, так и на нейтрофилах [13]. Этот ионный канал способствует активации Тц и гемостазу, тогда как на нейтрофилах – участвует в хемотаксисе и модуляции функции. Установлено, что активация пуринового P2X7-рецептора опосредует адгезию лейкоцитов к эндотелию [1]. Выявленное взаимодействие α_2 -адренорецептора и P2X₁-рецептора для обеспечения рекрутирования лейкоцитов и поддержания воспалительной реакции подтверждает возможность конвергенции сигналов, при необходимости модуляции функции клеток крови [14].

Таким образом, при альтерации слизистой оболочки мочеочника введение НПВП ограничивает активность лейкоцитов; при этом сохраняется потребность в защитной воспалительной реакции направленной на ограничение инвазии микроорганизмов. После КУЛТ защитная реакция запускается активированными Тц, которые участвуют в рекрутировании лейкоцитов из сосудистого русла путем формирования ТЛА. Оптимальная степень активации Тц определяется взаимодействием α_2 -адренорецептора и P2X₁-рецептора, при этом ведущую роль в стимуляции Тц играет адреналин. Выяснение механизмов активации клеток крови на фоне введения НПВП в перспективе позволит наметить направления таргетной фармакологической коррекции, направленной на профилактику послеоперационного пиелонефрита.

Заключение

При назначении НПВП у пациентов с нефролитиазом сохраняются защитные механизмы способные усилить функциональную активность клеток крови, если в тканях мочевыводящих путей поддержи-

вается инвазия и размножение микроорганизмов.

Факторами риска развития острого пиелонефрита после малоинвазивного оперативного вмешательства на мочевыводящих путях выступают механическая травма слизистой оболочки после КУЛТ, поскольку нарушается барьерная функция многослойного переходного эпителия. Инфицирование мочевыводящих путей и резистентность к антибиотикам predispose к тяжести пиелонефрита. Триггерами защитных реакций при ингибировании ЦОГ лейкоцитов выступают активация симпатно-адреналовой системы и послеоперационная гипоксия/ишемия в тканях мочеточника. При этом стимуляция α_2 -адренорецептора может повышать адгезию клеток крови к эндотелию, рекрутирование лейкоцитов из сосудистого русла и фагоцитарную способность макрофагов. Роль P2X-рецептора в поддержании воспалительной реакции связана с активацией нейтрофилов и моноцитов, а также усилением трансэндотелиальной миграции лейкоцитов. На фоне введения НПВП включаются аддитивные механизмы стимуляции клеток крови, направленные на повышение уровня внутриклеточного Ca^{2+} , что необходимо для достижения оптимальной функциональной активности тромбоцитов и лейкоцитов. Взаимодействия адренергической и пуринергической сигнализации в клетках крови лежит в основе развития компенсаторной реакции, обеспечивающей завершение воспаления в слизистой оболочке мочевыводящих путей после альтерации эпителия.

Список литературы

1. Abacavir Increases Purinergic P2X7 Receptor Activation by ATP: Does a Pro-inflammatory Synergism Underlie Its Cardiovascular Toxicity? / V. Collado-Díaz [et al.] // *Front Pharmacology*. – 2021. – Vol. 12. – P. 613449.
2. Adrenaline enhances in vitro platelet activation and aggregation in blood samples from ticagrelor-treated patients / S. Singh [et al.] // *Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis*. – 2018. – Vol. 2 (4). – P. 718–725.
3. Antinociception occurs with a reversal in α_2 -adrenoceptor regulation of TNF production by peripheral monocytes/macrophages from pro- to anti-inflammatory / R. Sud [et al.] // *Eur J Pharmacology*. – 2008. – Vol. 588, № 2–3. – P. 217–231.
4. Barinov, E. Role α_2 -adrenergic receptors in regulation platelet reactivity in the elderly at chronic obstructive pyelonephritis / E. Barinov // *Advances Gerontology*. – 2016. – Vol. 29 (1). – P. 189–194.
5. Epinephrine enhances platelet-neutrophil adhesion in whole blood in vitro / N. A. Horn [et al.] // *Anesthesia Analgesia*. – 2005. – Vol. 100 (2). – P. 520–526.
6. Extracellular ATP acts as a damage-associated molecular pattern (DAMP) signal in plants / K. Tanaka [et al.] // *Frontiers Plant Science*. – 2014. – Vol. 5. – P. 446.
7. G α phs-coupled receptor signaling actively down-regulates $\alpha_4\beta_1$ -integrin affinity: a possible mechanism for cell de-adhesion / A. Chigaev [et al.] // *BMC Immunology*. – 2008. – Vol. 9. – P. 26.
8. Glycemic Control and Aspirin Resistance in Patients Taking Low-Dose Aspirin for Pre-eclampsia Prevention / S. Gee [et al.] // *Am J Perinatology*. – 2022. – Vol. 39 (4). – P. 349–353.
9. Guo, Y. Clinical use and mechanisms of infliximab treatment on inflammatory bowel disease: a recent update / Y. Guo, N. Lu, A. Bai / *Biomed Research Int*. – 2013. – Vol. 2013. – P. 581631.
10. Individual variations in platelet reactivity towards ADP, epinephrine, collagen and nitric oxide, and the association to arterial function in young, healthy adults / M. Lindkvist [et al.] // *Thrombosis Research*. – 2019. – Vol. 174. – P. 5–12.
11. Laudanna, C. Elevation of intracellular cAMP inhibits RhoA activation and integrin-dependent leukocyte adhesion induced by chemotactants / C. Laudanna, J. J. Campbell, E. C. Butcher // *J Biological Chemistry*. – 1997. – Vol. 272 (39). – P. 24141–24144.
12. Layhadi, J. A. P2X4 receptor-dependent Ca^{2+} influx in model human monocytes and macrophages / J. A. Layhadi, S. J. Fountain / *Int J Molecular Sciences*. – 2017. – Vol. 18 (11). – E2261.
13. Oury, C. P2X1: a unique platelet receptor with a key role in thromboinflammation. / C. Oury, O. Wéra // *Platelets*. – 2021. – Vol. 32 (7). – P. 902–908.
14. P2X4 forms functional ATP-activated cation channels on lysosomal membranes regulated by luminal pH / P. Huang [et al.] // *J Biological Chemistry*. – 2014. – Vol. 289 (25). – P. 17658–17667.

15. P2X₄: A fast and sensitive purinergic receptor / J. Suurväli [et al.] // *Biomed J.* – 2017. – Vol. 40 (5). – P. 245–256.
16. Paxillin mediates ATP-induced activation of P2X₇ receptor and NLRP3 inflammasome / W. Wang [et al.] // *BMC Biology.* – 2020. – Vol. 18, № 1. – P. 182.
17. Prevention of neutrophil extravasation by α 2-adrenoceptor-mediated endothelial stabilization / A. M. Herrera-García [et al.] // *J Immunology.* – 2014. – Vol. 193 (6). – P. 3023–3035.
18. Ramirez, G. Misunderstandings Between Platelets and Neutrophils Build in Chronic Inflammation / G. Ramirez, A. Manfredi, N. Maugeri // *Frontiers in Immunology.* – 2019. – Vol. 10. – P. 2491.
19. Role of α - and β -adrenoreceptors in rat monocyte/macrophage function at rest and acute exercise / J. da Silva Rossato [et al.] // *J Physiology and Biochemistry.* – 2014. – Vol. 70 (2). – P. 363–374.
20. Rossaint, J. Role of Platelets in Leukocyte Recruitment and Resolution of Inflammation. / J. Rossaint, A. Margraf, A. Zarbock // *Frontiers in Immunology.* – 2018. – Vol. 9. – P. 2712.
21. Wang, X. Purinergic Regulation of Neutrophil Function / X. Wang, D. Chen // *Frontiers in Immunology.* – 2018. – Vol. 9. – P. 399.
22. Whole blood flow cytometry protocol for the assessment of platelet phenotype, function, and cellular interactions / H. Yaw [et al.] // *Platelets.* – 2021. – Vol. 32 (6). – P. 786–793.

Barinov E. F., Malinin Yu. Yu., Grigoryan Kh. V., Giller D. I.

STATE EDUCATIONAL INSTITUTION OF HIGHER PROFESSIONAL EDUCATION
«M. GORKY DONETSK NATIONAL MEDICAL UNIVERSITY»

IN VITRO ANALYSIS OF THE DEVELOPMENT MECHANISMS OF ACUTE PYELONEPHRITIS AFTER CONTACT URETEROLITHOTRIPSY IN THE UPPER THIRD OF THE URETER

SUMMARY. Aim of the study was to identify risk factors for the development of acute pyelonephritis after contact urethrolithotripsy (URLLT) in the upper third of the ureter and to identify the mechanisms for maintaining inflammation with the introduction of non-steroidal anti-inflammatory drugs.

Material and methods. The study included 21 patients after standard lithokinetic therapy in whom, according to imaging control, no calculus moved from the pyelo-ureteral zone to the middle third of the ureter for 7 days. Contact ureterolithotripsy (URLT) was performed according to indications. The severity of leukocyturia was assessed at 24 h, 48 h after URLT. The number of circulating platelet-leukocyte aggregates (PLA) was calculated by microscopy of stained blood smears. The analysis of the functional activity receptors was carried out by the turbidimetric method on a ChronoLog analyzer (USA). Statistical analysis was performed using the MedCalc package.

Results. When NSAIDs were prescribed, the level of leukocyturia 24 and 48 hours after URLT was, respectively, 17.5 ± 0.8 field of view (95 % CI 15.8–19.3 fv) and 13.6 ± 0.7 fv (95 % CI 12.4–14.8 fv). The maintenance of the inflammatory response in the urinary tract with the administration of NSAIDs occurred with hyperreactivity of the α 2-adrenergic receptor, normoreactivity of the PAF receptor and the purine P2X₁ receptor. Modeling the interaction of blood cells in vitro demonstrated the maximum formation of TLA during the interaction of the α 2-adrenergic receptor and the P2X₁ receptor; the effect was reproduced due to the predominant activation of platelets.

Conclusion. When the mucous layer was damaged, the introduction of NSAIDs limited the activity of leukocytes; at the same time, the need for a protective inflammatory response to limit the invasion of microorganisms remained. The protective reaction is triggered by activated platelets, which are involved in the recruitment of leukocytes from the vascular bed by the formation of TPA. The optimal degree of platelet activation is determined by the interaction of the α 2-adrenergic receptor and the P2X₁ receptor, with adrenaline playing a leading role in platelet stimulation. The study of the mechanisms activation of blood cells with the introduction of NSAIDs will outline promising of conservative therapy aimed at preventing postoperative pyelonephritis.

Key words: lithokinetic therapy, contact ureterolithotripsy, leukocyturia, platelet receptors, platelet-leukocyte aggregates.