Карагандинский государственный медицинский университет

УДК 616.61-002.2:576.32/36

На правах рукописи

НУРГАЛИЕВА АСЕЛЬ СЕРИКОВНА

Молекулярно-клеточные предикторы хронической болезни почек

6D110100 - Медицина

Диссертация на соискание степени
доктора философии (PhD)

Научные консультанты:
д.м.н., профессор
Молотов-Лучанский В.Б.

д.б.н., профессор
Муравлева Л.Е.

PhD, ассоциированный профессор
Вайва Хендриксон

Республики Казахстан
Караганда, 2016

СОДЕРЖАНИЕ

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ.....3
ВВЕДЕНИЕ.....4
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....8
1.1 Концептуальные подходы к проблеме хронической болезни почек.....8
1.2 Окислительный стресс при хронической болезни почек.....11
1.3 Современные представления о внеклеточных нуклеиновых кислотах и внеклеточных нейтрофильных ловушках.....14
1.4 Современные представления и роли пуриновых оснований и интермедиатов их катаболизма в норме и при патологических состояниях 17
1.5 Изучение структурообразующих свойств биологических жидкостей в норму и при патологии почек.....18
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....21
2.1 Дизайн исследования.....21
2.2 Специальные методы исследования.....23
3 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....26
3.1 Клиническая характеристика больных.....26
3.2. Биохимические паттерны плазмы крови больных ХБП различных стадий.....33
3.3 Характеристика паттерна биохимических изменений в нейтрофилах крови больных ХБП различной степени тяжести.....42
3.4 Характеристика структурообразующих свойств плазмы крови крови больных ХБП.....52
3.5 Определение молекулярно-клеточных паттернов, характерных для различных стадий хронической болезни почек 71
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....76
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....78

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

AOPP - Advanced oxidative protein products
DAMPs - Damage-associated molecular patterns
NETs - Neutrophil extracellular traps
АФК - Активные формы кислорода
внДНК - Внеклеточная дезоксирибонуклеиновая кислота
ВНЛ - Внеклеточные нейтрофильные ловушки
внНК - Внеклеточные нуклеиновые кислоты
внРНК - Внеклеточная рибонуклеиновая кислота
Г - Гуанин
ГКс - Гипоксантин
КРФ - Кислоторастворимая фракция
Кс - Ксантин
МДА - Малоновый диальдегид
МК - Мочевая кислота
ПОЛ - Перекисное окисление липидов
РКП – Реактивные карбониловые производные
ХБП - Хроническая болезнь почек
ХПН - Хроническая почечная недостаточность

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Хронической болезнью почек (ХБП) в настоящее время страдают более 10% населения земного шара. Такой масштаб распространения болезни позволяет рассматривать её как эпидемию [1].

Развитие ХБП сопровождается мембранодеструктивными процессами, результатом которых является структурно-функциональная дезорганизация почечных мембран. Одной из причин развития мембранодеструкции является окислительный стресс (ОС). Одним из важных выводов исследований последних лет является то, что процессы липопероксидации развиваются на самых ранних стадиях развития ХБП, увеличивая риск формирования дисфункции эндотелия, сердечно-сосудистых заболеваний и других осложнений и сопутствующих заболеваний [1,с.44;2]. Процессы липопероксидации также рассматриваются как один из факторов прогрессирования ХБП и развития терминальной почечной недостаточности [3].

Активные формы кислорода и токсичные продукты липопероксидации способны взаимодействовать с белками и нуклеиновыми кислотами. В первом случае образуются различные окисленные белки, во – втором модифицированные нуклеиновые кислоты. Интенсивное воздействие прооксидантов может привести к фрагментации белков и нуклеиновых кислот [4]. Актуальность исследования в этом направлении документируется тем, что окисленные белки способны оказывать как непосредственный детримальный эффект, так и опосредованный, влияя на редокс-регуляцию или путем стимулирования образования реактивных метаболитов кислорода. С этих позиций предложено, в частности, рассматривать АОРР как новый класс почечных патогенных медиаторов [5]. Соотношение различных типов окисленных белков, а также и направленность их изменения в плазме и клетках крови больных ХБП различной стадии практически не изучены.

Окислительное повреждение нуклеиновых кислот рассматривается как одна из причин увеличения внеклеточных нуклеиновых кислот (вкНК). К другим причинам выхода нуклеиновых кислот в кровоток являются различные формы клеточной гибели, включая образование нейтрофильных внеклеточных ловушек (НВЛ). Исследование НВЛ при хронической болезни почек не проводилось.

Увеличение содержания фрагментов внеклеточной ДНК в циркуляции в настоящее время позиционируется как фактор стресс-сигнализации при окислительном стрессе [6]. Кроме этого, показана роль внНК как модификаторов иммунного ответа, а также их влияние на состояние эндотелия и систему гемостаза [7,8,9,10]. Ранее проведенными исследованиями установлена неоднозначная направленность изменения вкНК у больных с гломерулопатиями и тубулопатиями [11]. При ХБП различной стадии исследования вкНК не проводилось.

Представляется перспективным исследование внеклеточных пуриновых нуклеотидов и продуктов их катаболизма в крови больных ХБП различной стадии. Необходимость исследования внеклеточных пуринов и продуктов их катаболизма обусловлено их участием в регуляции функции почек и сосудистого тонуса, а также выступать в качестве молекул- аларминов [12].

Ранее проведенными исследованиями показано изменение соотношения внеклеточных пуринов и продуктов их катаболизма у больных с тубулопатиями и гломерулопатиями и сформулирована рабочая гипотеза участия внеклеточных пуринов в развитии патологии почек, ассоциированной с артериальной гиепртензией [13, 14].

Практически не изучен метаболизм нейтрофилов крови больных при прогрессировании ХБП. Исследования в этом направлении представляют безусловный интерес, поскольку возможные метаболические изменения в нейтрофилах, в том числе развитие внутриклеточного окислительного стресса, не может не оказывать существенного влияния на поведение этих клеток при прогрессировании ХБП.

Не проводился анализ структурообразующих свойств плазмы крови больных при ХБП различной стадии. Выявление различных паттернов структурообразования, сопоставление с биохимическими параметрами плазмы крови больных ХБП представляет безусловное значение как для понимания механизмов прогрессирования ХБП, так и с поиска новых диагностических и прогностических маркеров.

В целом, следует отметить, что исследования в декларируемых направлениях позволят углубить теоретические представления об особенностях метаболических изменений на различных стадиях ХБП, что является необходимой основой для разработки новых терапевтических подходов к замедлению темпов прогрессирования ХБП.

Цель исследования. Определить молекулярно-клеточные предикторы развития и прогрессирования хронической болезни почек.

Задачи исследования:

1. Определить уровень циркулирующих нуклеиновых кислот, внеклеточных интермедиатов катаболизма пуринов в плазме крови больных с хронической болезнью почек различных стадий.
2. Определить возможность образования внеклеточных нейтрофильных ловушек в крови больных с хронической болезнью почек различных стадий
3. Изучить показатели окислительной модификации белков и перекисного окисления липидов в плазме крови и лизатах нейтрофилов больных с хронической болезнью почек различной стадии
4. Изучить паттерны морфотипов тезиограмм плазмы крови больных с хронической болезнью почек различной стадии.
5. Выявить молекулярные предикторы развития и прогрессирования хронической болезни почек.

Научная новизна. Впервые установлено последовательное увеличение аденина и гуанина, а также ксантина и гипоксантина - интермедиатов катаболизма пуринов в плазме крови больных в зависимости от стадии ХБП.

Впервые установлен достоверный рост вкРНК в плазме крови больных ХБП 1 и 2 стадии. Развитие хронической почечной недостаточности сопровождается резким снижением вкРНК в плазме крови больных.

Впервые установлено, что уровень вкДНК достоверно увеличивается в плазме крови больных ХБП, но резко снижается у больных ХБП 5 стадии при антибатном росте кислоторастворимых предшественников.

Впервые установлено, что у больных ХБП 3 стадии в дебюте хронической почечной недостаточности в плазме крови и лизате нейтрофилов достоверно возрастает содержание реактивных карбониловых производных белков.

Впервые установлено образование спонтанных внеклеточных нейтрофильных ловушек в крови у 33% больных с ХБП 1 стадии, у 5% больных ХБП 2 стадии, у 25% больных ХБП 3 стадии, у 29% больных ХБП 4 стадии и у 35% больных ХБП 5 стадии.

Впервые установлены различия как по количеству морфотипов тезиограмм плазмы крови, так и по паттернам их структуропостроения у больных ХБП различной стадии.

Впервые предложено рассматривать в качестве предикторов развития ХБП такие показатели как внеклеточные нуклеиновые кислоты. Для прогноза хронической почечной недостаточности предложено определять интермедиаты катаболизма пуринов (гипоксантин и ксантин), а также реактивные карбонильные производные белков в плазме крови больных.

Практическая значимость. Для внедрения в практику предлагается определение морфотипов тезиограмм плазмы крови для получения динамической картины изменения биохимического статуса плазмы крови, при прогрессировании ХБП, а также для оценки эффективности гемодиализа у больных с ХБП 5 стадии.

Положения, выносимые на защиту. В плазме крови больных ХБП увеличивается содержание интермедиатов катаболизма пуринов (ксантина и гипоксантина) и внеклеточных пуриновых оснований (аденина и гуанина), при этом степень увеличения зависит от стадии заболевания.

В плазме крови больных ХБП 1 и 2 стадии увеличивается содержание вкРНК. При присоединении и прогрессировании ХПН содержание вкРНК в плазме крови больных резко снижается.

В плазме крови больных ХБП увеличивается содержание вкДНК. При развитии терминальной ХПН уровень вкДНК резко снижается, а уровень кислоторастворимых предшественников возрастает.

В плазме крови и лизате нейтрофилов больных ХБП 3 стадии достоверно увеличивается содержание реактивных карбониловых производных белков

В крови части больных ХБП происходит образование спонтанных внеклеточных нейтрофильных ловушек.

У больных ХБП различной стадии происходит изменение структурообразующих свойств плазмы крови с формированием нескольких динамических типов при разных прогнозах исхода заболевания.

Внеклеточные нуклеиновые кислоты могут рассматриваться как предикторы развития ХБП.

Определение концентрации гипоксантина, ксантина и реактивных карбонильных производных белков в плазме крови больных ХБП может быть использовано для прогноза развития и прогрессирования ХПН.

Связь диссертации с другими научно-исследовательскими работами.

Диссертация выполнялась на кафедре биологической химии в рамках научно-исследовательского проекта МОН РК «Молекулярно-клеточные механизмы развития хронической почечной недостаточности» (2013-2015), ГР №0113РК00410.

Апробация работы. Результаты исследования доложены на Международной конференции молодых ученых «Мир науки и молодежь: традиции и инновации» (19 февраля 2014, Караганда, Казахстан); на научной сессии Пермского государственного медицинского университета имени академика Е.А. Вагнера «Навстречу 100-летию высшего медицинского образования на Урале» Пермь, 2015; на международной конференции «Молодые ученые Оренбуржья – науке 21 века», Оренбург, 2015), на 40 FEBS Congress “The Biochemical basis of life” (Berlin Germany, 4-9 July 2015); на VI Всероссийской школе-конференции с международным участием «Физиология кровообращения» (Москва, Россия, 2-5 февраля 2016 г).

Публикации. По результатам исследования опубликована монография «Структурообразующие свойства крови у больных хронической болезнью почек» (утвержденная Республиканским центром развития здравоохранения), 12 публикаций, в том числе 2 статьи и 1 тезис – в изданиях, индексируемых в Scopus и Thomson-Reuter; 3 статьи в изданиях, входящих в перечень ККСОН, получено 3 свидетельства о регистрации объекта авторского права.

Внедрения результатов в практику. Полученные данные внедрены и используются в учебном процессе кафедры биологической химии при проведении занятий по элективным дисциплинам «Молекулярные основы патологии» (бакалавриат) и «Биохимия патологических процессов» (магистратура).

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 97 страницах, состоит из введения, основной части, заключения и списка использованных источников, 3 приложения. В работе содержится 11 таблиц и 29 рисунков. Список литературы включает 178 источников на русском и английском языках.

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Концептуальные подходы к проблеме хронической болезни почек

Хроническая болезнь почек (ХБП) стала в последние 15 лет общепринятым термином, отражающим понимание высокой актуальности данной проблемы врачами всего мира. ХБП широко распространена, приводит к резкому ухудшению качества жизни, высокой летальности. В терминальной стадии ХБП, означающей фактическую гибель почек, безальтернативными методами являются либо протезирование их функции с помощью аппарата «искусственная почка», либо проведение трансплантации органа [15, 16, 17].

Концепция хронической болезни почек (ХБП) была предложена в 2002 году группой экспертов – комитетом K/DOQI (Kidney Disease Outcomes Quality Initiative). С этого времени началось успешное продвижение инициативы, и в настоящее время концепция принята во всем мире.

ХБП является наднозологическим понятием, объединяющим все виды почечной хронической патологии, приводящей к постепенной утрате функций почек. Все пациенты с признаками повреждения почек и/или снижением функции, оцениваемой по величине скорости клубочковой фильтрации, которые сохраняются в течение 3 и более месяцев [18, 19], могут быть включены в контингент больных ХБП.

К современным критериям диагностики ХБП относят наличие достоверных маркеров повреждения почек или прогрессирующее уменьшение фильтрационной способности почек, определяемое с помощью показателя клубочковой фильтрации, которую называют скоростью (СКФ). Определяющим её значением является 60 мл/мин. Расчетный показатель мл/мин/1,72 м2 , не достигающий величины «60» на протяжении трех месяцев, указывает на сформированную ХБП.

В качестве диагностических маркеров повреждения почек рекомендуется использовать ряд признаков, которые можно объединить в три основные группы: клинико-лабораторные, неоднократно выявляемые в ходе нескольких исследований, проводимых в течение квартала или в разные месяцы, но обще длительностью не менее трех [19].

К клинико-лабораторным маркерам повреждения почек относят дизурические явления, отечный синдром в сочетании с такими показателями анализа мочи, как протеинурия, неоднократно положительный тест микроальбуминурии, гематурия, лейкоцитурия, а также нарушение показателей водно-солевого и кислотно-щелочного баланса крови.

В зависимости от уровня СКФ выделяют 5 стадий ХБП. Стадия 3 поделена на две подстадии (А и Б), так как эта группа может внутри себя дифференцироваться, исходя из стратифицируемых рисков сосудистых или сердечных событий, причем степень риска пропорциональная степени снижения СКФ. Экспертной группой K/DIGO (Kidney Disease Improving Global Outcomes) предложена система стратификации комбинированного риска терминальной почечной недостаточности и сердечно-сосудистых осложнений

у больных ХБП, основанная на определении уровня СКФ и категории альбуминурии/протеинурии [20, 21, 22].

Концептуальный подход к диагностике и тактике ведения больных хронической болезни почек, принятые профессиональными ассоциациями нефрологов, стимулировал интерес к данной проблеме во всем мире. Эпидемиологические исследования показали высокую распространенность ХБП практически во всех государствах, независимо от уровня их экономического развития. В таблице 1 - данные о заболеваемости ХБП по странам мира. [23].

Таблица 1 – Распространенность ХБП в мире

Страна	Распространенность ХБП, %	
	стадии 1 -5	стадии 3-5
США	14,0	6,7
США	23,8	15,7
Нидерланды	17,6	-
Испания	12,7	-
Португалия	-	6,1
Китай	14	6,5
Япония	-	18,7
Индия	17,2	5,9
Австралия	13,4	7,7
Конго	12,4	8,0

По утверждению Швецова М.Ю. [23, с.58], как минимум каждый десятый житель Земли имеет признаки ХБП. По его мнению, в России ХБП страдает не менее 14 миллионов человек, хотя крупных эпидемиологических исследований в Российской Федерации не проводилось. Ряд ученых-нефрологов [24] отмечает, что специальные статистические, эпидемиологические и популяционные исследования 90-х годов прошлого века и первой декады XXI века показали постоянное увеличение доли ХБП в общей структуре заболеваемости и смертности населения. Более того, исследователи всё чаще высказывают мнение о пандемии ХБП.

В Казахстане отмечена такая же тенденция. Так, еще в 2005 году был отмечен рост больных терминальной хронической почечной недостаточностью в г. Астане с 2000 по 2004 год. Наиболее заметный рост заболеваемости гломерулярными болезнями в этот же период был отмечен в Атырауской и Карагандинской областях [25].

ХБП имеет серьезные социально-экономические последствия - огромные финансовые средства, используемые для проведения радикальной или паллиативной терапии, без которой невозможно сохранить жизнь пациентам: хронический гемодиализ и пересадку почек. [23, с.53]. Кроме того, даже медленное умеренное понижение СКФ ведёт к значительному уменьшению ожидаемой продолжительности жизни, ухудшению её качества, ухудшению многих индикаторов других показателей здоровья и, как следствие, возрастанию стоимости. При этом расходы на заместительную почечную терапию и другие виды лечения составляют значительную часть национальных бюджетов здравоохранения.

Основной причиной высокой смертности пациентов с ХБП являются сердечно-сосудистые осложнения, на втором месте стоят инфекционные осложнения [25, с.15; 26, 28].

Данные о нозологической структуре ХБП требуют особого внимания и пристального изучения. Имеющиеся на сегодня данные свидетельствуют о преобладании вторичных нефропатий, развивающихся на фоне, например, сахарного диабета, болезней системы кровообращения (диабетическая нефропатия, поражение почек вследствие длительной артериальной гипертензии, атеросклероза, так называемая ишемическая болезнь почек).

В основе ХБП лежат распространенные нозологические формы, такие как хронический гломерулонефрит, хронический тубуло-интерстициальный нефрит, поликистоз почек. Конечно, самым часто встречающимся заболеванием, запускающим ХБП, является хронический пиелонефрит [26, с.10; 27].

При этом ряд стран отличается по распространенности инициальной патологии почек. Так в ближневосточном регионе планеты превалирует мочекаменная болезнь и вторичный пиелонефрит, по сравнению с европейским субконтинентом.

Однако ведущее место в структуре ХБП и причин развития терминальной почечной недостаточности занимают вторичные нефропатии при СД и артериальной гипертензии.

Кроме этого, к факторам риска ХБП относят нарушения обмена веществ, сердечно-сосудистые заболевания, наследственность и нарушение развития, демографические показатели, образ жизни, характер питания, вредные привычки; другие заболевания, такие как аутоиммунные болезни, вирусные и бактериальные инфекции, острая почечная недостаточность, нефропатии беременных, злокачественные опухоли [26, с.35; 27, с.20092].

Вместе с тем на сегодняшний день специалисты достигли единого понимания того, что патогенетические механизмы, лежащие в основе инициальных нозологических форм, определяют развитие ХБП на её начальной стадии [24, с.174]. Затем, по мере уменьшения массы действующих нефронов, разворачивается цепь молекулярных, клеточных, гемодинамических событий, которые и обусловливают прогрессирование ХБП.

Факторы риска ХБП принято разделять на немодифицируемые и модифицируемые. К первой категории относятся возрастной диапазон, охватывающий лиц старше 65 лет, принадлежность к мужскому полу, врожденная малая масса нефронов и низкий вес ребенка при рождении. Учитывается принадлежность к той или иной расе, этнической группе, играют роль факторы генетической детерминированности, в частности семейная история ХБП. Вторую категорию представляют заболевания сахарным диабетом, артериальной гипертензией, аутоиммунными болезнями. Сюда же относят хронические воспалительные заболевания, уролитиаз, обструктивные поражения мочевыводящих путей. Такого же рода модифицируемые факторы риска представляют собой лекарственные интоксикации, курение табака, метаболические нарушения в виде ожирения, метаболического синдрома, гомоцистеинемии, подагры. Всё большую роль в числе факторов риска играют анемия, ацидоз, дисбаланс в организме кальция и фосфора и их взаимоотношений. Немаловажным фактором остается беременность, в особенности если она протекает на фоне хронической почечной патологии.

Нельзя не отметить высокобелковую диету и повышенное потребление натрия с пищей [27, с.20094; 28, с.80].

Несмотря на успехи медицинской науки и практики, нельзя назвать разрешенными проблемы эффективного лечения ХБП. Актуальными остаются вопросы предотвращения быстрого прогрессирования ХБП и её исхода в гибель почек. На наш взгляд, трудности практической медицины в отношении ХБП связаны с тем, что остаются малоизученными механизмы, запускающие процесс повреждения почечной паренхимы и способствующие неуклонному развитию фибротических изменений в гломерулярном и тубулярном аппарате почек, экспансии интерстциального фиброза, что, собственно, и является основой прогрессии ХБП.

В настоящее время важным направлением современной науки является изучение молекулярно-патогенетических механизмов прогрессирования хронической болезни почек. Ключевым направлением является поиск эндогенных метаболитов, которые оказывают влияние на модифицируемые факторы прогрессирования ХБП.

1.2 Окислительный стресс при хронической болезни почек

Одним из ведущих механизмов развития и прогрессирования ХБП является окислительный стресс (ОС) [29, 30].

Развитие стойкого окислительного стресса обусловлено действием цитокинов (IL-8, IL-1β и TNF-α), уремических токсинов, гемодиализа и других факторов, которые стимулируют образование активных форм кислорода [31]. Активные формы кислорода (АФК) вызывают спектр негативных эффектов, индуцируя структурно-функциональные нарушения белков, липидов и нуклеиновых кислот.

В настоящее время в зоне особого внимания исследователей находятся окислено модифицированные белки [32].

Окислено модифицированные белки могут образовываться результате их прямого повреждения АФК. АФК окисляют радикалы аминокислотных остатков, что приводит к образованию перекрестных связей и сшивок как внутри полипептидной цепи, так и между полипептидными цепями. АФК по данным ряда авторов способны индуцировать фрагментацию полипептидных цепей [33, 34].

Непрямое повреждение белков приводит к образованию широкого спектра модифицированных продуктов: карбониловых производных, гликированных производных, аддуктов с диальдегидами, а также advanced oxidative protein products (AOPP).

AOPP образуются в присутствии перекиси водорода под действием миелопероксидазы из окислено модифицированного альбумина (продуктов его фрагментации или агрегации), а также из фибриногена и липопротеинов. В структуре AOPP в большом количестве присутствуют дитирозины, карбониловые группы и поперечные сшивки. AOPP обладают собственной биологической активностью, схожей с таковой гликированных производных белков, причем AOPP связываются с тем же рецептором, что и гликированные производные [35].

AOPP утилизируются в печени и селезенке [36].

В настоящее время AOPP рассматриваются как маркеры окислительного повреждения белков.

Начато исследование роли AOPP в патогенезе ряда заболеваний. Так, исследованиями [37] показано, что при диабете интенсификация процессов гликоокисления, дисбаланс в системе оксиданты- антиоксиданты и сосуществующее воспаление индуцируют образование AOPP. С другой стороны, AOPP усиливает метаболические нарушения при диабете и прогрессирование его осложнений, в частности, нефропатий. Высказано мнение, что определение AOPP представляет безусловный интерес для мониторинга лечения диабета.

Проводились исследования AOPP при различных видах патологии почек. Так, в крови больных ХБП обнаружено увеличение содержания AOPP. По мнению авторов исследования, поскольку AOPP обладают способностью индуцировать окислительный взрыв в нейтрофилах, то их можно рассматривать как медиаторы воспаления [38].

В эксперименте показано, что при патологии почек негативный эффект AOPP может быть связан с их участием в запуске процесса фиброзообразования [39].

В другом эксперименте показано, что у животных, длительное время получавших AOPP-модифицированный альбумин, уменьшилось количество гломерулярных подоцитов. Предполагаемый механизм негативного влияния AOPP связывают с активацией NADPH оксидазы, внутриклеточным

образованием супероксиданионов, и запуску p53 зависимого пути апопотоза [40, 41].

По мнению других авторов, избыточное образование внутриклеточных супероксиданионов под действием AOPP имеет место не только в подоцитах, но и в эндотелиальных, мезангиальных и тубулярных эпителиальных клетках [42, 43, 44]. AOPPs повышают образование почти всех компонентов ренин-ангиотензиновой системы [45].

Высказано предположение, что повреждающие эффекты AOPP реализуются через стимуляцию редокс-чувствительного пути [46].

Исследования образования AOPP при ХБП немногочисленны и не позволяют дать однозначную оценку их участия на разных стадиях её развития.

Другим продуктом окислено модифицированных белков является реактивные карбониловые производные, характерным признаком которых является образование CO-группы. Реактивные карбониловые производные образуются в результате окисления боковых остатков лизина, аргинина, гистидина, пролина, которое приводит к образованию альдегидных или кетонных производных [47]. Накопление карбониловых производных приводит к развитию карбонилового стресса.

Имеются отдельные исследования содержания реактивных карбониловых производных белков при патологии почек. Так, в крови больных с хроническим гломерулонефритом и пиелонефритом и на фоне артериальной гипертензии обнаружен рост реактивных карбониловых производных белков [48]. Программный гемодиализ индуцирует увеличение уровня реактивных карбониловых производных белков в крови больных с хронической почечной недостаточностью [49]. Показано, что в крови больных, получавших программный гемодиализ, возрастал уровень малонового диальдегида, развивался дисбаланс ферментов супероксиддисмутазы и глутатиопероксидазы [50].

Было высказано предположение, что уремические токсины способны образовывать комплексы с белками. Эти комплексы плохо элиминируются из крови гемодиализом и обладают выраженной эндотелиальной токсичностью. Связанные с белками уремические токсины обладают прооксидантной активностью и способны тормозить репарацию эндотелия [51].

В общем, в процессе окислительной модификации происходят изменения на уровне структурной организации белков. Это приводит к экспозиции гидрофобных радикалов на поверхности глобулы, денатурации белков, их агрегации или фрагментации, что приводит изменению или утрате функций белков. Такие модифицированные белки характеризуются изменением чувствительности к протеолизу.

Таким образом, анализ данных литературы показал, что при ХБП не исследованы превалирующие типы окисленных белков в плазме и клетках крови, в том числе в зависимости от стадии ХБП, что и определило одну из задач нашего исследования.

1.3 Современные представления о внеклеточных нуклеиновых кислотах и внеклеточных нейтрофильных ловушках

Одним из перспективных направлений в медико-биологических исследованиях является изучение внеклеточных нуклеиновых кислот в биологических жидкостях. Внеклеточные нуклеиновые кислоты изучают с разных позиций. Прежде всего, остается открытым вопрос о функциях внеклеточных нуклеиновых кислот и об их происхождении в крови и других биологических жидкостях.

Было показано, что вкДНК может выступать как стресс-фактор и индуцировать адаптивный ответ и «эффект свидетеля» в условиях окислительного стресса, индуцированного ионизирующей радиацией [52]. В этом случае высвобождение внеклеточных нуклеиновых кислот происходит из погибших облученных клеток [53, 54]. Секреция вкДНК облученными клетками стимулирует синтез активных форм кислорода в количествах, сопоставимых с таковыми при действии малых доз радиации [52, с.651], в то время как вкДНК из интактных клеток такой эффект не вызывает. В качестве объяснения было предположено, что при окислительном стрессе, вызванном ионизирующим излучением, наряду с липидами и белками происходит окислительное повреждение ДНК. Окисленная внДНК, взаимодействуя с клетками-мишенями, приводит к умеренному повышению внутриклеточного уровня АФК, способствуя тем самым развитию адаптивного ответа путем активации транскрипционного фактора NRF2, который, в свою очередь, повышает антиоксидантный потенциал [55]. Однако, далеко не все авторы придерживаются этой точки зрения. По мнению Ermakov et al., [52, с.728], взаимодействие окисленных фрагментов вкДНК с TLR9 рецепторами клеток – мишеней индуцирует развитие в них окислительного стресса, что в конечном итоге приводит к апоптозу клеток-мишеней.

Эти результаты позволили сделать вывод о том, что биологическая роль вкДНК может быть опосредована её влиянием на сигнальную трансдукцию, но при условии попадания вкДНК вовнутрь клеток-реципиентов. В качестве механизмов транслокации вкДНК в клетки рассматривают эндоцитоз с участием скавенджер-рецепторов и фагоцитоз с участием рецепторов компонентов системы комплимента [56, 57]. По мнению ряда исследователей, TLR9 являются внутриклеточными рецепторами для вкДНК [58]. Образование комплекса вкДНК и TLR9 запускает сигнальный путь активации NF-kB и его последующего переноса в ядро [59]. Другим вероятным эффектом взаимодействия вкДНК и TLR9 является изменение иммунного ответа [60].

Установлено, что вкДНК влияет на течение клеточного цикла. Это подтверждается исследованиями in vitro, показавшими, образование разрывов в ядерной ДНК в результате активации ОС, вызванного вкДНК. Это приводит к остановке клеточного цикла, активации системы репарации и блокировке апоптоза [61, 62, 63, 64].

Высказано мнение, что вкДНК регулируют экспрессию генов транскрипционных факторов (NF-kB, STAT3, NRF2 и др.), про- и

противовоспалительных цитокинов (TNF, IL-6, IL-10 и др.), адгезионных молекул (ICAM-1, VCAM-1, Е-селектина), некоторых ферментов (каспаза3), белков семейства Bcl (регуляторы апоптоза) [55, с.86; 61, с.7; 64, с.678; 65, 66].

Это позволяет говорить о том, что вкДНК принимают участие в регуляции антиокисидантных и противовоспалительных ответов клеток.

Наряду с изучением биологических функций вкДНК остается открытым вопрос об источниках внеклеточных нуклеиновых кислот в биологических жидкостях. В настоящее время предложено две теории, объясняющие появление в крови внеклеточных нуклеиновых кислот, главным образом, ДНК. К их числу относятся теория клеточной гибели и теория «метаболической ДНК» [67, 68].

Согласно теории клеточной гибели увеличение концентрации внеклеточных нуклеиновых кислот в крови является результатом их выхода вследствие гибели клеток. К основным формам клеточной смерти в настоящее время относят апоптоз, некроз, некроптоз (не зависимая от каспаз, но RIPK и RIPK3 – опосредованная гибель клеток) и нетоз (NETosis) [60, с.458; 69, 70]. Высказано мнение, что основной причиной появления вкДНК в кровотоке является аптотическая гибель клеток, главным образом, лейкоцитов. С другой стороны, ряд исследователей не согласен с этой точкой зрения, мотивируя тем, что для обеспечения физиологического уровня вкДНК необходим единовременный апоптоз 10-50% от общей популяции лейкоцитов, что в нормальных условиях представляется маловероятным [71].

Следовательно, пул вкНК должен поддерживаться помимо лейкоцитов и за счет других клеток, в частности макрофагов. В условиях патологии источником вкНК в крови является апоптоз или некроз. Начаты исследования нетоза как возможного источника вкНК [7, с.17; 72]. Высказано предположение, что одной из причин появления вкНК в крови могут быть нейтрофильные внеклеточные ловушки (neutrophil extracellular traps, NETs). При формировании NETs происходит выброс ДНК из клеток во внеклеточную среду [73].

Другим источником вкДНК является высвобождение последней из клеток (теория «метаболической ДНК») [74]. Есть данные о том, что вкДНК выделяется пролиферирующими клетками и активированными лимфоцитами, особенно интенсивно при патологии [75]. Внеклеточные ДНК и РНК выполняют ряд биологических функций [7, с.18].

По мнению ряда исследователей, в процессе образования NETs во внеклеточную среду высвобождается ДНК из митохондрий, хотя механизм этого процесса не описан [76, 77]. Согласно другой точки зрения, из клеток эвакуируется ядерная ДНК, причем в комплексе с нуклеосомными гистонами [78].

Кроме того, в кровоток могут секретироваться и митохондриальные ДНК. Механизмы секреции митохондриальных ДНК в настоящее время изучаются. Предложено рассматривать митохондриальные ДНК как алармины [79].

При патологических состояниях в кровоток могут секретироваться и комплексы вкДНК и гистонов, причем последние индуцируют повреждение эндотеолиальных клеток [80].

Помимо вкДНК в кровотоке могут присутствовать и внРНК. Получены убедительные данные о том, что вкРНК секретируются во внешнюю среду посредством везикулярного транспорта или в комплексе с белками, защищающими их от эндонуклеаз. Высказано предположение, вкРНК служат внеклеточными коммуникаторами [81].

В системе циркуляции вкНК присутствуют как в свободном виде, так и адсорбированные на эритроцитах и лейкоцитах [82].

ВнНК рассматриваются как достаточно информативные ранние биомаркеры при онкопатологии, заболеваний сердечно-сосудистой системы, болезнях печени, патологии беременности и т.д. [7, с.16; 83-85].

Не менее перспективно исследование вкНК как активных участников реализации молекулярных изменений при развитии ряда патологических состояний, в частности, при воспалении [86].

Ранее проведенными исследованиями отмечено увеличение внРНК в плазме крови больных с хроническим пиелонефритом, тогда как у больных гломерулонефитом основные изменения касались как внДНК, так и внРНК [87]. В другом исследовании обосновывается предложение о внНК как маркеров биосовместимости при гемодиализе [88].

В целом, анализ данных литературы показал отсутствие систематических исследований внеклеточных нуклеиновых кислот в крови больных ХБП различной степени тяжести, что и послужило одной из задач нашего исследования.

Как уже указывалось ранее, одной из причин появления внеклеточных нуклеиновых кислот в циркуляции может быть образование внеклеточных нейтрофильных ловушек (ВНЛ). ВНЛ были впервые описаны в 2004 г. Brinkmann et al [89]. На основании ряда исследований описаны три пути образования НВЛ. Первый путь – медленный (2-3 часа) и ведет лизису и гибели клетки. Второй путь – быстрый, занимает по времени несколько минут и приводит к быстрой эвакуации ядерного материала без лизиса клетки. Третий механизм вовлекает высвобождение митохондриальной ДНК тоже без лизиса клетки [90-92].

Литический механизм НВЛ включает в себя деконденсацию хроматина, дезинтеграцию ядерной оболочки, смешивание нуклеиновых кислот, гистоновых белков и гранулированных белков во внутриклеточной вакуоли. Высвобождению содержимого вакуоли во внеклеточную среду предшествует перфорирование мембраны клеток или лизис [93]. Запуском образования НВЛ является взаимодействие патогена с патоген - распознающим рецептором, что приводит к активации различных внутриклеточных сигнальных механизмов с участием протеинкиназы С, реактивных метаболитов кислорода, ядерного фактора kappa B (NFkB), фосфолипазы С и ионов кальция [94].

Механизм быстрого образования ВНЛ связывают с образованием пузырьков ядерной мембраны, содержащих нуклеиновые кислоты, и экзоцитоз этих пузырьков за пределы нейтрофила. Такой механизм позволяет сохранить жизнеспособный нейтрофил. В тоже время следует отметить, что этот механизм изучен недостаточно. Высказано мнение, что существует субпуляция нейтрофилов, которые специализируется на витальном механизме образования НВЛ, которая считается более физиологичной [95].

Образование митохондриальной НВЛ связывают с активацией NADPH оксидазы, но механизм и регуляция этого процесса, равно как и его физиологическое значение пока изучены очень слабо [96].

Основная биологическая роль НВЛ – участие в уничтожении патогенных микроорганизмов. Киллинговая функция НВЛ осуществляется за счет НВЛ-ассоциированных белков [94, с.3].

В тоже время неуместное и/или избыточное образование НВЛ могут нанести и безусловный вред. Получены данные об участии НВЛ в патогенезе системной красной волчанки, ревматоидного артрита, тромбозе глубоких вен, острых повреждений легких и респираторного дистресс-синдрома, аутоиммунных заболеваниях [97-106].

Безусловный научный интерес представляет изучение NETоза нейтрофилов в крови больных ХБП различной степени тяжести, в том числе как потенциального источники вкНК, что и послужило одной из задач нашего исследования.

1.4 Современные представления и роли пуриновых оснований и интермедиатов их катаболизма в норме и при патологических состояниях

Одним из актуальных направлений в медико-биологических исследованиях является исследование роли пуринов и интермедиатов их катаболизма в регуляции и дизрегуляции биохимических процессов. Наиболее изученным пурином является аденозин. Аденозин образуется в клетках при дефосфорилировании АМФ и при гидролизе S- аденозилгомоцистеина [107]. Кроме того, аденозин может покидать клетки при участии белков-транспортеров. Эффект высвобождения аденозина в кровоток описан для эндотелиоцитов, миоцитов и форменных элементов крови [108].

Установлено присутствие на мембранах клеток белков семейства SLC29, участвующих в антипорте нуклеозидов и азотистых оснований [109]. Также в транспорте нуклеозидов в клетку принимают участие и белки семейства SLC28 [110].

Образование аденозина может иметь место вне клеток при катаболизме АТФ и АДФ при участии эктонуклеозидтрифосфат дифосфогидролазы 1 (CD39) и экто-5′ - нуклеотидазы (CD73). Оба фермента локализованы на мембранах эндотелиоцитов и эпителиоцитов [108, с.678].

Есть данные о присутствии в крови людей других ферментов, участвующих в катаболизме пуринов, в том числе пирофосфатазы, аденилаткиназы и нуклеотиддифосфаткиназы [111, 112]. Внеклеточный

аденозин достаточно быстро транспортируется обратно в клетки, где используется для образования АМФ или вступает в катаболизм [113].

Аденозин выполняет ряд функций, включая участие в процессах сигнализации. Установлено, что внеклеточный аденозин может взаимодействовать с 4 подтипами рецепторов (A_1, A_{2A}, A_{2B}, и A_3). В условиях физиологической нормы аденозин связывается с рецепторами A_1, A_{2A}, A_3, в условиях патологии – с рецептором A_{2B}. Внутриклеточные эффекты аденозина реализуются посредством цАМФ и транскрипционных факторов CREB [114, 115].

Избыточная аккумуляция внеклеточного аденозина происходит в результате в условиях гипоксии, воспаления, повреждения клеток [116]. Основными источниками экстрацеллюлярного аденозина при патологии являются активированные фагоциты, эндотелиоциты и тромбоциты [117, 118].

Биологическое значение повышение внеклеточной концентрации аденозина связано с его участием в ответе системы гомеостаза на повреждение. В этом случае аденозин выполняет функцию молекулы тревоги или алармина, индуцируя спектр защитных реакций, направленных на поддержание гомеостаза.

Эффекты аденозина зависят от типов рецептора. Аденозин способен влиять на созревание моноцитов, взаимодействуя с рецептором A1. Взаимодействуя с рецептором A2A, аденозин влияет на синтез молекул адгезии и лимитируют прилипание нейтрофилов к эндотелию. Аденозин неоднозначно влияет и на процесс фагоцитоза [119, 120].

Начато исследование содержания внеклеточных пуриновых оснований и интермедиатов катаболизма пуринов при разных патологических состояний, в том числе при патологии почек. Так, исследование этих показателей у больных с гломерулопатиями и тубулопатиями показало неоднозначный характер изменения их концентрации в плазме крови больных. По мнению авторов, увеличение содержания гуанина, гипоксантина и аденина следует рассматривать как дополнительные негативные факторы, влияющие на процессы коагуляции и индуцирующие дисфункцию эндотелия [121, 122].

Анализ данных литературы показал отсутствие данных о содержании внеклеточных свободных пуриновых оснований и интермедиатов их катаболизма, а также оценке их роли в механизмах прогрессирования ХБП, что делает проведение исследования в этом направлении актуальным и перспективным.

1.5 Изучение структурообразующих свойств биологических жидкостей в норму и при патологии почек

Феномен структурообразования биологических жидкостей был обнаружен Е.Г. Рапис [123].

При изучении структурообразующих свойств биологических жидкостей оценивается их способность к образованию различных паттернов, которая проводится как в отсутствие, так и присутствие различных

кристаллообразующих соединений. Это позволило выделить рад направлений, отличающихся различными методическими приемами. Наиболее распространенным подходом является метод клиновидной дегидратации, предложенный В.Н. Шабалиным и С.Н. Шатохиной [124].

Метод клиновидной дегидратации достаточно прост в исполнении. Капля биологической жидкости наносится в центр твердой подложки (чашка Петри, предметное стекло) и высушивается в строго горизонтальном положении при комнатной температуре. Образуется сухая пленка или фация. Фация – это структурный макропортрет биологической жидкости. Созданы теоретические представления о процессах самоорганизации биологических жидкостей в процессе дегидратации [125].

На морфотип фации влияют такие параметры как вода, растворенные в ней неорганические и органические соединения, их соотношение, дисперсность, вязкость и т.д. Изменение химического состава биологических жидкостей приводит к изменению фации [126]. Это позволило определить базовые структуры фации для сравнительного анализа и описания. К ним относятся тип растрескивания, локализация, наличия симметрии, отдельности и сектора. Кроме того, анализируются конкреции – включения (по количеству, размерам и форме) [127].

При развитии патологических процессов морфология трещин выраженно меняется: появляется асимметрия вплоть до хаотического расположения, уменьшения числа трещин. Также могут образовываться патологически измененные структуры (языки, морщины бляшки и т.д.) [128].

Проводится изучение возможных взаимосвязей между морфотипами и изменением биохимического состава биологических жидкостей. Исследованиями Л.М. Обуховой и соавт. [129] показано, что при эндогенной интоксикации в центре фации образуются сетевые структуры; при ишемической болезни сердца – структуры типа рыбьей чешуи; при воспалительных заболеваниях менялся рисунок трещин. По мнению этих авторов, различия в морфотипах определяются состоянием белков, составом и степенью аккумуляции продуктов эндогенной интоксикации. По мнению других авторов, на изменение паттернов тезиограмм влияют окисленные белки [130].

Следовательно, изменения структурообразующих свойств плазмы крови отражают совокупность молекулярных событий, определяющих или вовлеченных в развитие патологического процесса. На основании этого разработаны методы диагностики и прогноза течения патологических процессов [124, с.71; 125, с.252].

Проводилось сравнительное изучение фаций различных биологических жидкостей при патологии почек. Показано, что развитие почечной недостаточности и мочекаменной болезни сопровождалось появлением многолучевых трещин в центральной зоне фаций плазмы крови, что, по мнению авторов, связано с модификацией белков плазмы различными субстратами при эндогенной интоксикации [129, с.105].

Выявлены особенности морфотипов фаций плазмы крови, лизата нейтрофилов и мочи больных с тубулопатиями и гломерулопатиями и на фоне артериальной гипертензии [131 – 133]. На основании полученных результатов было предложено использование в качестве маркера прогрессирования тубулопатий и гломерулопатий, ассоциированных с артериальной гипертензией, определение морфотипов лизата нейтрофилов [132, 134].

Вместе с тем, анализ данных литературы показал отсутствуют сведения о морфотипах тезиограмм плазмы крови у больных ХБП различной стадии.

Таким образом, анализ ранее проведенных исследований показал, что не определены молекулярно-клеточные паттерны плазмы крови, ассоциированные с механизмами прогрессирования хронической болезни почек. Исследование в этом направлении будет включать подход, позволяющий оценить направленность и степень изменения показателей плазмы крови и в нейтрофилах, что позволит выявить damage-associated molecular patterns (DAMPs) для различных стадий ХБП.

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Дизайн исследования

Было обследовано 117 больных хронической болезнью почек с применением клинических методов

ХБП, по известному определению, это поражение почек различной этиологии, длительностью более 3-х месяцев, которое проявлялось нарушением их структуры и/или функций, как это следует из определения экспертов программы K/DOQI [135].

Были сформировано 5 групп пациентов с различными стадиями ХБП, выделенными на основании критериев K/DOQI. При формировании групп в них не включались пациенты с ожирением, перенесенными незадолго перед исследованием инфарктом миокарда или инсультом, а также ишемической болезнью сердца. Также были исключены лица с острыми заболеваниями органов дыхания, абсцессами мягких тканей, аутоиммунными заболеваниями в фазе активного

Таким образом, в первую группу ХБП1 вошли 22 пациента с нормальными показателями скорости клубочковой фильтрации (СКФ), но с анамнезом хронического поражения почек. Во вторую группу (ХБП2), определены 15 пациентов с небольшим снижением скорости клубочковой фильтрации (СКФ) от 89 до 60 мл/мин. Уровень креатинина в плазме крови больных 2-й группы не превышал значения нормы, хотя и отмечались единичные эпизоды транзиторной азотемии с преодолением верхней границы нормы на 5-7%. В третью группу (ХБП 3) вошло 20 пациентов с устойчивым снижением скорости клубочковой фильтрации в диапазоне от 59 до 30 мл/мин и как следствие – у них диагностировалась ХПН 1 стадии. 12 больных ХПН 2 стадии составляли четвертую группу, соответствующую, по классификации K/DOQI [136], ХБП 4 стадии. Креатинин крови у больных 4 –й группы достигал значений от 450 мкмоль/л до 690 мкмоль/л, а СКФ была снижена значительно: от 30 до 15 мл/мин. Пятая группа, состоящая из 14 больных терминальной ХПН, соответствовала ХБП 5 стадии. В данной группе наблюдались пациенты как на додиализной стадии, так и получающие программный хронический гемодиализ.

Распределение по возрастным группам практически равномерное. 89,7% от общего числа обследованных составляли лица, находящиеся в трудоспособном возрасте.

Был проведен обязательный стандартный осмотр для всех обследуемых. Мы использовали общепринятые, или основные, методы обследования больного, то есть расспрос о жалобах, об истории настоящего заболевания, последовательный и детальный расспрос о жизни и предшествующих заболеваниях, наличии хронических заболеваний в период исследования. К объективным методам исследования, согласно канонам медицинского освидетельствования мы относили пальпацию, перкуссию, аускультацию внутренних органов). Дополнительные методы исследования включали

(измерение артериального давления, электрокардиографию, специальные пробы мочи по Нечипоренко и Зимницкому) Артериальное давление мы измеряли не менее трех раз при первом знакомстве с больным, используя определялось по общепринятому методу Короткова. Диагноз артериальной гипертензии не представлял трудности, когда мы имели результаты мониторинга артериального давления, проводимого нами и нашими коллегами в группе обследованных больных, и эти результаты подтверждались анамнестическими сведениями, а также данными из медицинских заключений, выписок, карты амбулаторных и стационарных больных с записями лечащих врачей. Зачастую использовались результаты суточного мониторинга АД. Лабораторные исследования были рутинными и специальными. К рутинным относились общие анализы крови, мочи, стандартные биохимические анализы крови, определяющие уровень креатинина, мочевины, трансаминаз, липидов. Оценка скорости клубочковой фильтрации и показателя канальцевой реабсорбции проводилась как методом Реберга-Тареева, так и с помощью формулы Кокрофта и Голта (формула СКФ Cockroft-Gault) [137].

ХБП у пациентов, входивших в группы специального биохимического исследования крови, имела в своей основе такие инициальные заболевания как хронический пиелонефрит (ХПЛ), и хронический гломерулонефрит (ХГН).

Диагностика ХПЛ проводилась на основании критериев, предложенных О.Л. Тиктинским [138-140], Т.З. Сейсембековым, И.А. Борисовым. Бактериурия у больных ХПЛ с активным воспалительным процессом диагностировалась на основании бактериологического исследования. Положительным результат посева мочи считался, если количество бактерий составляло не менее 106 микробных тел. Спектр микрофлоры, высеваемой при ХПЛ, представлен Staph. aureus (57% от общего числа больных), E. coli (24% от общего числа больных), Pseudomonas (2% от общего числа больных), Enterobacter (13% общего числа больных), S.saprophiticus (4% от общего числа больных).

ХГН диагностировался на основании комплексного клинического исследования. Морфологическая верификация с помощью нефробиопсии проведена у 29% больных (в двух случаях обнаружены IgA-депозиты в базальных мембранах клубочков, в остальных выявлена мезангиопролиферативная гломерулопатия).

Гломерулопатия диагностировалась по признаку стойкой протеинурии, эритроцитурии в сочетании с изменениями СКФ или без них. Наряду с этим мы отбирали в данную группу тех пациентов, у которых не было на момент обследования знаков активной мочевой инфекции.

Всем больным проведены ультразвуковые исследования почек, органов брюшной полости. УЗИ почек выявило у всех пациентов с пиелонефритом уплотнение чашечно-лоханочного комплекса, диффузные изменения паренхимы, уменьшение ее толщины в сравнении с поперечным размером чашечно-лоханочного сегмента. У 9 больных обнаружены признаки так

называемого песка в чашечках и лоханках, у двух больных – расширение чашечек и микролиты, дающие акустическую тень.

Для оценки функциональной способности почек проводилась рентгенологическая урография, компьютерная рентгеновская томография брюшного сегмента с применением контрастирования мочевых путей. Консультации врачей узкого профиля назначались и проводились всем обследованным. Например, офтальмологи исследовали глазное дно, выявляли ангиопатию; неврологи оказывали помощь в диагностике дисциркуляторных энцефалопатий, нейропатий.

Забор крови больных осуществляется в процедурных кабинетах филиала городской больницы № 1 г. Караганды (зам. директора по филиалу Ермеков К.А.), клиники ТОО «Гиппократ» (директор Хохлова Н.С.), областной клинической больницы (директор Абеуов М.Е.), поликлиники КГМУ (главные врачи Ульянов А.В., Киверов М.С.) с соблюдением всех правил асептики.

Подбор больных осуществлялся под руководством доктора медицинских наук, профессора В.Б. Молотова-Лучанского с участием ассистентов КГМУ Бобырева С.С.. Халмурадовой С.Е., врачей областной клинической, городских больниц С.С. Сариевой, Л.Ж. Оспановой.

Перед забором крови у всех больных и лиц контрольной группы было получено информированное согласие на участие.

Исследование получило одобрение локального этического комитета Карагандинского государственного медицинского университета.

2.2 Специальные методы исследования

Биохимические исследования проводили на базе научной биохимической лаборатории кафедры биологической химии Карагандинского государственного медицинского университета.

Забор крови осуществлялся в утренние часы с помощью венепункции. Для биохимических исследований кровь стабилизировали гепарином.

Для выделения нейтрофилов и работы с ними использовались автоматические пипетки с пластиковыми наконечниками и пластиковая посуда.

Плазму крови отделяли от эритроцитов центрифугированием. Отбирали верхний слой клеток, содержащий нейтрофилы. Для разрушения единичных эритроцитов использовали 83% раствор хлорида аммония. Нейтрофилы дважды суспендировали фосфатным буфером. Содержание клеток доводили до 100—200 тыс/мкл. Количество клеток определяли на гематологическом анализаторе BC-3200 фирмы Shenzhen Mindray Bio-Medical Electronics.

Взвесь нейтрофилов в концентрации 10^6 клеток/мл лизировали методом замораживания-оттаивания [141].

Исследование плазмы крови проводилось не позднее чем через час после забора крови.

В плазме крови определяли содержание двух типов окисленно модифицированных белков: advanced oxidation protein products (AOPP) и реактивные карбониловые производные белков.

AOPP регистрировали на спектрофотометре Apel 303UV в реакции с хлорамином Т по методу Witko-Sarsat et al. [142]. Результаты выражали в μmol/l. По методу R.L. Levine et al [143] определяли уровень реактивных карбониловых производных белков в реакции с динитрофенилгидразоном. Регистрацию проводили на спектрофотометре Apel 303UV, единицы измерения - нмоль/мл.

В плазме крови регистрировали уровень малонового диальдегида (МДА) в реакции с тиобарбитуровой кислотой по методу Гончаренко М.С., Латиповой А.М. [144]. Единицы измерения – нмоль/мл.

Методом Орешниковой Е.В. и соавт. [145] определяли уровень гуанина (Г), аденина (А), гипоксантина (ГКс), ксантина (Кс) и мочевой кислоты (МК) на спектрофотометре и выражали в единицах экстинкции.

Используя индексы соотношения содержания разных интермедиатов обмена пуринов, оценивали активность ксантиноксидазы. Об общей активности фермента судили по индексу МК/ГКс, об активности ксантиноксидазы на первой и второй фазах – по соотношению Кс/ГКс и МК/Кс, соответственно [145, с.76].

В плазме крови также регистрировали содержание вкДНК, вкРНК и кислоторастворимую фракцию (КРФ) предшественников нуклеиновых кислот по методу Л.И Маркушевой и соавторов [146]. Регистрацию проводили спектрофотометре Apel 303UV, единицы измерения - мкг/мл.

Для определения количества спонтанных внеклеточных нейтрофильных ловушек (ВНЛ) в крови обследованных лиц использовали методический прием И.И. Долгушина и Ю.С. Андреевой [147]. Окраску проводили гематоксилин-эозином, образцы микроскопировали при увеличении 1400. Результаты выражали в % НВЛ от числа нейтрофилов в поле зрения. Фотографии ВНЛ получали с использованием программы ToupView 3,7.

Паттерны структурообразования плазмы крови получали, используя метод клиновидной дегидратации по Шатохиной С.Н. [129, с.106]. При описании фаций использовали набор критериев, включающих в себя оценку зональности, типов и густоты растрескивания, количество, форма и распределение конкреций.

В лизате нейтрофилов определяли содержание реактивных карбониловых производных белков (КПБ) по методу R.L. Levine et al [143, с.465] и AOPP по методу Witko-Sarsat et al. [142, с.1306]. Единицы измерения - nmol/10^6 клеток. В лизате нейтрофилов регистрировали уровень МДА [144, с.61]. Единицы измерения - нмоль/10^6.

Кроме того, оценивали уровень нитрит-ионов – стабильных метаболитов оксида азота [148]. Единицы измерения - мкмоль/10^6.

В лизате нейтрофилов регистрировали содержание гистоновых белков (H2A, H2B, H3 и H4), а также гистона H1 по методу Маркушевой Л.И. и соавт. [149]. Единицы измерения - мг/10^6 клеток.

Статистический анализ полученных данных проводился с использованием пакета программ STATISTICA (версия 7.0) и электронных таблиц Microsoft Excel. Поскольку распределение значений изучаемых показателей не соответствовало нормальному закону (по критерию Шапиро-Уилка, $p>0,05$), то для оценки различий между исследуемыми группами использовали ранговый дисперсионный анализ Краскела-Уоллиса, применяемый для сравнения более двух независимых выборок одинаковой или разной численности (не менее 3 наблюдений в каждой группе) по их центральной тенденции [150]. Различия считали достоверными при уровне статистической значимости $p<0,05$. Для описательной статистики использовали медиану, верхний и нижний квартили.

Для оценки степени взаимосвязи изучаемых показателей проводился непараметрический корреляционный анализ Спирмена, с расчетом коэффициента детерминации ($R^2=r^2*100\%$) для того, чтобы оценить, насколько колебания показателей одной переменной обусловлены влиянием другой. Все выявленные коэффициенты корреляции статистически значимы ($p<0,05$).

3 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Клиническая характеристика больных

При отборе больных мы придерживались принципа охвата всех пациентов в ходе клинического исследования. Таким образом, было обследовано 117 больных хронической болезнью почек (ХБП) в возрастном диапазоне, охватывающим 19 - 67 лет. Мужчины составили 49 обследованных, а женщины – 68.

Вместе с тем только часть больных вошла в когорту обследуемых с помощью специальных методик, использование которых отвечало задачам изучения окислительного метаболизма белков, а также структурообразующих свойств плазмы крови (всего 83 пациента). Поэтому выделены две категории обследованных больных. К первой категории были отнесены пациенты с ХБП на разных стадиях её развития, в основе которой лежали различные нозологические формы хронических заболеваний почек, в частности, хронический пиелонефрит в сочетании с диабетической нефропатией, диабетическая нефропатия как таковая, хронический гломерулонефрит в сочетании пиелонефритом, тубулоинтерстициальный нефрит различной этиологии, не исключая токсическую (лекарственную, алкогольную, IgA-депозитную) нефропатию, хронический пиелонефрит и первичное гипертоническое поражение почек, то есть развитие пиелонефрита на предшествующем фоне артериальной гипертензии, нефропатию, ассоциированную с системными васкулитами). Первую категорию больных обследовали клинически, используя основные методы, такие как осмотр, сбор анамнеза, пальпация и дополнительные, включающие рутинные лабораторные методы и инструментальную диагностику (УЗИ, рентген-урографию), специальные виды исследования (бактериологическое, нефробиопсия и т.д.).

Вторую категорию составили больные ХБП, которые имели мононозологические инициальные варианты развития хронической почечной патологии. При этом были отобраны пациенты с ХБП, в основе которой лежали только хронический пиелонефрит или только хронический гломерулонефрит как наиболее распространенные заболевания, наблюдавшиеся в госпитальных клиниках или в учреждениях первичной медико-санитарной помощи. Эти пациенты были распределены в пять групп, они были обследованы клинически, как и пациенты первой категории. Наряду с клиническим обследованием и динамическим наблюдением им проводились специальные исследования: определение показателей окислительного метаболизма, структурообразующих свойств плазмы крови. Ниже представлено распределение больных в группах, сформированных согласно стадиям развития ХБП. Число пациентов, сгруппированных во вторую категорию, составило 83. В том числе, мужчин – 34, женщин – 49.

В первой категории больных, составляющих меньшинство от общего числа обследованных (n=34), скорость клубочковой фильтрации колебалась от 85 до 20 мл/мин. По данному признаку, пациенты были объединены в

различные группы ХБП. Длительность заболеваний почек данной категории пациентов составляла от 5 до 17 лет. Вторая категория больных была сравнима по возрастно-половому составу с первой категорией.

Наблюдение за пациентами в данной группе проводилось в соответствии с принципами национального протокола диагностики хронического пиелонефрита (ХПл), хронического гломерулонефрита (ХГН), а также хронической почечной недостаточности. Пациенты наблюдались как в условиях стационара, так и на амбулаторном приеме. Морфологическая верификация гломерулонефрита была проведена у 5 пациентов с хроническим гломерулонефритом. У 4 из них диагностирован мезангиопролиферативный вариант ХГН, у одного – фокально-сегментарный гломерулосклероз.

Анализ динамики клинических проявлений, результатов лабораторных исследований мочи и крови, инструментальных данных пациентов первой категории показал зависимость общего состояния больных от стадии развития, или прогрессирования, ХБП без корреляции с нозологической инициальной формой, диагностированной у пациентов. У больных, отнесенных к первой категории, диагностирована ХБП 2, 3 и 4 стадий. С точки зрения общих закономерностей, отмеченных в состоянии пациентов, если говорить о клинической и лабораторной симптоматике, а также данных дополнительных исследований у первой категории больных, можно констатировать постепенное ухудшение их общего состояния. Вместе с тем, по заключениям врачей, зафиксированным в амбулаторных картах, медицинских картах стационарных больных, на протяжении многих лет оно оценивалось как относительно удовлетворительное. В этом не было противоречия с нашими наблюдениями, так как пациенты были трудоспособны, вели активный образ жизни. Однако на момент нашего обследования у большей части больных (более 67%) наблюдались снижение относительной плотности мочи, повышенное артериальное давление (145±5,6/87±3,4 мм рт.ст.). Параметры сердечно-сосудистой системы не выходили за пределы нормы у пациентов с ХБП 2 стадии, тогда как у пациентов с ХБП 3 и 4 стадий зафикисрованы ЭКГ-признаки гипертрофии левого желудочка, подтвержденные Эхо-кардиографически. У пациентов с ХБП 4 стадии, в основе которой был гломерулонефрит в сочетании с пиелонефритом, в 59% случаев отмечены на ЭКГ эпизоды очаговых изменений в миокарде. У пациентов с ХБП 3 стадии отмечались эпизоды изменений сердечного ритма в связи со стрессорными факторами, повышением АД, а также эпизоды экстрасистолии. У 10% больных ХБП 2 стадии выявлялись предсердные экстрасистолы на ЭКГ. При холтеровском мониторировании у пациентов с ХБП 3 и 4 стадий зарегистрирована суправентрикулярная экстрасистолия низких градаций, не требовавшая принятия терапевтических мер. Данные нарушения ритма являлись проявлением дизметаболических изменений в миокарде, нарушений симпатоадреналовых взаимодействий, обусловленных зачастую активностью основного заболевания, а также волнением, напряжением эмоциональной сферы.

Функции пищеварительной системы были нарушены у пациентов с 4 стадией ХБП. Предъявлялись жалобы на тошноту, значительное снижение аппетита. Снижение массы тела на 35-40% отмечено у 76% процентов больных с ХБП 4 стадии.

Характерным для больных ХБП 2 стадии было отсутствие значительных изменений в показателях общего анализа мочи (больных пиелонефритом, алкогольной нефропатией, гипертоническим вариантом хронического гломерулонефрита) или умеренная протеинурия (от 0,57 г/л до 1,3 г/л) со скудным мочевым осадком (больные хроническим гломерулонефритом смашанной формы, диабетическая нефропатия). Неоднократные исследования мочи общеклиническим способом у пациентов с 3 и 4 стадиями ХБП, а также проведением проб Зимницкого, Нечипоренко обнаруживали ряд изменений. Относительная плотность мочи колебалась в пределах 1,002 – 1,012, в мочевом осадке периодически отмечались кристаллы солей (оксалатов, ураты), протеинурия у 69% больных составляла от 0,87 до 2,8±1,4 г/л. Суточная протеинурия у 30% пациентов находилась в пределах 3,2±0,76 граммов. Микрогематурия у 54% пациентов была представлена при микроскопии мочевого осадка количеством от 5 до 25 эритроцитов в полях зрения.

Сопутствующей патологией у ряда пациентов (n=11) был сахарный диабет 2 типа. Однако в данной группе пациенты не имели выраженной декомпенсации диабета.

Пациенты второй категории были объединены в пять групп вне зависимости от начальной нозологической формы. В группу ХБП 1 (n=22) вошли пациенты, длительность заболевания у которых находилась во временном интервале от 5 до 11 лет. Возрастные рамки были широкими, так как возраст пациентов зафиксирован в пределах от 19 до 57 лет. Во второй группе (ХБП 2, n=15) возрастной интервал характеризовался 27- 49 годами. Средний возраст пациентов в среднем составлял 31±6,3 лет. На момент нашего обследования у всех больных данных двух групп была зафиксирована протеинурия, не превышающая 0,2 грамма в литре. Она не имела постоянного характера. У ряда пациентов наблюдалась симптоматика, которую мы расценивали как проявление инфекции мочевых путей, сопровождавшейся дизурическими жалобами, показателями, характерными для мочевого синдрома (наряду с протеинурией зафиксирована лейкоцитурия, незначительная эритроцитурия и салурия, представленная уратами и оксалатами).

У 32% больных в 1 и 2 группах отмечалась транзиторная артериальная гипертензия. Средние значения систолического артериального давления у пациентов с ХБП1 находились в пределах 115±3,2 мм рт.ст., диастолического артериального давления – 72,±4,6 мм рт.ст. Более 40% больных данной группы имели средние значения САД 135± 5,2 мм рт. ст. и ДАД - 84±3,7мм рт.ст. Регулярно принимали гипотензивные средства только 53% пациентов с зафиксированными подъемами АД до уровня 1-й степени артериальной гипертензии. Эффект лечения был положительным, то есть предпринятая коррекция артериального давления была эффективной. Остальные принимали

средства, снижающие АД, только ситуационно. В этой группе предпочтение отдавалось эналаприлу, двое пациентов принимали лизиноприл, четверо - фозиноприл.

Сочетались эти препараты с индапамидом (n=3), амлодипином (n=2), трое пациентов принимали препарат из группы ингибиторов ангиотензинпревращающего фермента с моксонидином (физиотензом) в дозе 0,2 мг/сутки.

В клиническом исследовании, проводимом каждому из пациентов, использовались как рутинные, общепринятые методы обследования, так и специальные дополнительные исследования, такие как бактериологическое исследование мочи, определение лейкоцитарной формулы мочи, нефробиопсия (при необходимости морфологической верификации диагноза хронического гломерулонефрита). Так, например, общий анализ мочи проводился не менее трех раз каждому из пациентов данных групп во время наблюдения в стационаре (при этом длительность стационарного лечения составляла в среднем 9±2,0 суток). После выписки из стационара были рекомендованы контрольные анализы мочи, которые проводились на протяжении времени нашего наблюдения ежемесячно или – при необходимости – ежедекадно. Наше наблюдение за данными пациентами продолжалось в постстационарном периоде на протяжении года. У 34% больных ХБП1 и 15% больных ХБП2 лейкоцитурия в количестве не более 2-4 Le в полях зрения обнаруживалась неоднократно. Эритроцитурия и протеинурия (0-0-2-4 эритроцита в полях зрения и до 1 г/л при общем анализе мочи) отмечались в основном у пациентов с латентным гломерулонефритом, особенно в период острых респираторных инфекций. Показатели общего анализа крови: СОЭ, количество лейкоцитов в микролитре капиллярной крови, - не выходили за пределы нормы. У пациентов 1 и 2 гупп дизурические явления были редкими и относились к никтурии и поллакиурии. Последняя наблюдалась у 30% пациентов с хроническим пиелонефритом. У 22% пациентов 1 и 2 групп отмечалась микрогематурия, более выраженная в количественном отношении. Её значения колебались в пределах от 2-4 до 8-10 эритроцитов в полях зрения. Относительная плотность мочи колебалась в пределах 1,009 – 1,021. В мочевом осадке - соли, преимущественно - ураты.

Метод расчета канальцевой реабсорбции Реберга-Тареева использовался достаточно широко, и индекс реабсорбции, который составлял в среднем по группам 98±1,32%, показывал сохранную канальцевую функцию практически у всех больных 1 и 2 групп.

Таким образом, функции почек больных данных групп можно считать сохранными, несмотря на некоторое снижение СКФ в группе ХБП2, по сравнению с данным показателем у пациентов из группы ХБП1.

УЗИ почек**,** которое было проведено всем пациентам, позволило выявить у 73% больных повышение эхо-плотности чашечно-лоханочного комплекса. Этот сонографический признак является косвенным подтверждением неоднократно перенесенных воспалительных изменений в интерстиции и

собирательной системе почек. Поэтому мы интерпретировали его как одно из свидетельств хронического пиелонефрита, но только в сочетании со всей совокупностью других симптомов и клинических характеристик заболевания. Другими частыми изменениями, отмеченными при УЗИ почек, были в большинстве случаев неоднородность их паренхимы, уменьшение ее толщины в сравнении с поперечным размером чашечно-лоханочного сегмента. Вместе с тем, по нашим наблюдениям, эти признаки далеко не всегда коррелируют со снижением скорости клубочковой фильтрации у пациентов. СКФ у этих пациентов не выходит за пределы нормы, несмотря на изменения, обнаруживаемые при ультразвуковом исследовании почек. Видимо, резервные возможности почек достаточно велики и при патоморфозе, косвенно обнаруживаемом при УЗИ. Очевидно, что нет прямой связи между скоростью патоморфологических изменений и степенью биохимических нарушений в почках. Возможно, имеют место сложные интраренальные и экстраренальные взаимодействия, обеспечивающие компенсацию функции почек при прогрессировании ХБП.

Общая клиническая картина 1 и 2 групп ХБП может быть охарактеризована как относительно стабильная. Общее состояние пациентов было относительно удовлетворительным. Большая часть пациентов работала. Среднее количество дней нетрудоспособности в году не превышало у больных 12±1,1. Ни один из случаев ухода «на больничный лист» не был связан с декомпенсацией почечной патологии. Собственная оценка больными самочувствия колебалась от удовлетворительной до хорошей. Сердечно-сосудистая система исследовалась регулярно. Функциональные показатели сердца и сосудов не выходили за пределы нормы. Ни у одного из пациентов не диагностированы органические поражения сердечной мышцы, не найдено признаков стенозирующего атеросклероза сосудов.

Со стороны органов пищеварения значимых нарушений функционального состояния не было обнаружено. В различные периоды амбулаторного наблюдения жалобы на диспепсические явления предъявлялись пациентами одинаково часто. В основном это были проявления желудочной диспепсии: изжога, отрыжка, - а также ощущения тяжести в правом подреберье, в эпигастральной области. Явления хронического поверхностного гастрита обнаруживались при эндоскопии у 4 больных ХБП1 и 2 больных ХБП2. УЗИ органов брюшной полости выявило утолщение стенок желчного пузыря у 2 больных первой группы, диффузные изменения поджелудочной железы у 5 больных ХБП2.

У пациентов, составивших группы 3 и 4 (ХБП3, n=20; и ХБП4, n=12), отмечены явления хронической почечной недостаточности 1 и 2 стадий соответственно. Длительность заболевания охватывала период от 7 до 19 лет, а в двух случаях превышала 30-летний срок. Возраст большинства пациентов колебался в пределах 47 - 63 лет. Четыре пациента были в возрасте свыше 65 лет. На момент нашего обследования у больных данной группы средняя величина протеинурии (по общему анализу мочи) была равна 1,03±0,37 г/л,

суточная потеря белка с мочой составляла в среднем 0,82±0,11 граммов. Протеинурия была постоянной, то есть обнаруживалась 95 процентами всего количества общих анализов мочи, проведенных на протяжении двух лет до начала нашего исследования и в течение двух лет последующих наблюдений за данными больными. При этом тенденция возрастания степени протеинурии наблюдалась у 63% пациентов данной группы в течение указанного периода наблюдения. Так, у большинства пациентов за два года до включения в наше исследование количество белка, определяемого общим анализом мочи, находилось в пределах от 0,28 до 0,44 г/л. Ежегодный прирост этого показателя составил в среднем 0,21±0,03 г/л. Относительная плотность мочи в среднем была ниже, чем у пациентов в группах ХБП 1 и 2 (1,011±0,002 в сравнении с 1.017±0,009). Мочевой осадок был представлен эритроцитурией, цилиндрурией, салурией. Эритроцитурия (от 2-3-4 до 10-14 клеток в полях зрения) выявлялась у 63% больных данных групп, и этот симптом был лабильным. Эритроцитурия определялась в каждом третьем анализе мочи у 67% пациентов с ХБП 3 и у 51% - с ХБП 4. При амбулаторных исследованиях микрогематурия отмечалась в таком же проценте случаев. Однако в силу более редкого проведения этого исследования в условиях поликлиники можно было говорить только о гематурии в каждом пятом из общих анализов, осуществлявшихся на протяжении года. Цилиндрурия была представлена гиалиновыми, очень редко зернистыми цилиндрами.

Наблюдалось снижение СКФ от 40 мл/мин до 15 мл/мин.

Всем пациентам в разное время проведено ультразвуковое исследование почек. Размеры органов находились в пределах нормы только у 37% больных. У остальных фиксировалось уменьшение одной или обеих почек на 19-28% от первоначальной величины, зафиксированной в пределах 5-7 лет до нынешнего обследования при УЗИ почек. Изменение положения почек у 34% больных интерпретировано врачами, проводившими исследование, как нефроптоз. Однако это заключение не принималось как достоверное в отсутствие рентгенографических доказательств опущения почек. Уплотнение почечного синуса, по эхо-картине, обнаруживалось у 46% пациентов данной группы.

Гидрокаликоз выявлялся только на амбулаторном этапе обследования у 29,7%. У двоих из них найдены кисты в одном из полюсов почек с размерами 0,6×1,1 см и 0,4×0,7 см. Анамнестически у пациентов с изменениями эхо-структуры чашечно-лоханочного комплекса диагностирован хронический пиелонефрит за 4-6 лет до начала нашего обследования, и его обострения подтверждались данными общего анализа мочи и крови. Вместе с тем за два года до нашего осмотра и включения в группу ХБП 3.

Патологических изменений со стороны органов дыхания на момент проведения объективного исследования обнаружено не было. Но анамнестически у 2 больных ХБП 3 и у одного пациента из группы ХБП 4 отмечались явления острого бронхита, ларингита. Три пациента из обеих групп перенесли в прошлом острую очаговую пневмонию.

Изменения со стороны органов системы пищеварения были представлены хроническим гастритом в стадии ремиссии. Небольшая часть пациентов (19%) имела в анамнезе свидетельства эрозивных повреждений слизистой желудка и положительный тест на HP (Helicobacter pylori). В этой связи проводилось эрадикационное лечение, имевшее выраженный положительный эффект. У 65% больных ХБП 4 при ультразвуковом исследовании органов брюшной полости отмечались диффузные изменения печени и поджелудочной железы, уплотнение стенок желчного пузыря, его деформация. Из того же числа двое больных имели УЗИ-признаки гепатомегалии. Клинически были поставлены диагнозы жирового гепатоза, хронического панкреатита в стадии ремиссии и дискинезии желчевыводящих путей.

Группа 5 (ХБП 5) была представлена 14 больными. Максимальный возраст достигал 59 лет, стаж ХБП у всех пациентов превышал 10 лет и располагался в интервале 10,5 до 21,5 лет. Креатинин крови больных СД1 колебался в пределах 0,48-0,89 ммоль/л. Содержание мочевины было более вариабельным: от 19,0 до 47,8 ммоль/, среднее значение равно 30,2±9,95 ммоль/л. Приведенные цифры отражают результаты биохимических исследований, проведенных в начале нашего наблюдения за данной группой больных. Продолжение наблюдения в течение полутора лет обнаружило тенденцию нарастания креатинина крови с большой скоростью. Ставился вопрос о проведении программного гемодиализа; у одного больного креатинин возрос за это время до 0, 63 ммоль/л (в сравнении с 0,38 ммоль/л), но обнаруживалась тенденция к его снижению на фоне проводимой терапии. Так, при повторной госпитализации исходный уровень креатинина крови составлял 0,63, а по выписке – 0,41 ммоль/л. Комплексное лечение было направлено на снижение степени интоксикации, стимуляции альтернативных механизмов выделения азотистых шлаков, поддержания витальных функций, снижения активности и темпов прогрессирования ХПН с помощью метаболической, противовоспалительной терапии.

Общее состояние больных данной группы было неудовлетворительным, основной причиной этого была эндогенная интоксикация конечными метаболитами белкового обмена. Ввиду ограничения белкового состава рациона, прогрессирования ХПН отмечалось снижение массы тела. В среднем у всех пациентов данной группы вес снизился на 9,5±1,4 кг.

Артериальная гипертензия достигала 3 степени у 67% пациентов. Чуть более трети больных имели АГ 2 степени. У двоих зарегистрированы частые гипертонические кризы, которые купировались клофелином, а после присоединения к лечению анагониста кальция продленного действия (амплодипина) прекратились. Ингибиторы АПФ исключались из гипотензивной программы в связи с их известными свойствами, усугубляющими азотемию.

В группу ХБП 5 (n=14) были объединены пациенты, которых мы наблюдали на дому, а также консультировали на выездах по месту жительства или в стационарах города и области. Все они имели терминальную стадию развития хронической почечной недостаточности.

Девять пациентов из данной группы получали лечение гемодиализом. Наблюдение за пациентами данной группы велось в течение ограниченного периода, который составлял от 0,5 года до 1,2 лет.

Таким образом, клиническая картина ХБП на разных стадиях отличалась большим разнообразием и зависела от характера и темпов прогрессирования заболевания. Изменения в самочувствии пациентов, связанные с постепенным снижением клиренса токсичных шлаков, были зафиксированы на тех же стадиях ХБП, что и при ХПН - на 2 и 3, терминальной, стадиях. Уремическая картина и состояние пациентов, получавших программный гемодиализ, не отличались у пациентов, страдавших гломерулонефритом и пиелонефритом. Так же не отличались клинические признаки и динамика состояния пациентов, имевших верифицированные разные морфологические варианты гломерулонефрита или его различные клинические формы.

3.2. Биохимические паттерны плазмы крови больных ХБП различных стадий

Результаты исследования уровня окисленных белков и альдегидов в плазме крови больных ХБП различной стадии приведены в таблицах 2-4 и на рисунках 1-3.

Из данных таблицы 2 и рисунка 1 следует, что у всех больных ХБП выявлена тенденция к увеличению в плазме крови содержания АОРР относительно значений контрольной группы. Так в среднем, в группе больных с ХБП 1 уровень АОРР в плазме крови на 75% превышал значения контрольной группы, в группе с ХБП 2 – на 18%, в группе с ХБП 3- на 50%, в группе с ХБП 4 – на 86% и в группе с ХБП 5 – более чем в 2 раза. Статистически значимое повышение этого показателя зафиксировано только у больных ХБП 5 относительно значений контрольной группы (рисунок 1). Достоверных отличий по данному показателю у лиц с различными стадиями ХБП обнаружено не было.

Таблица 2 - Содержание АОРР в плазме крови (μmol/l) больных с ХПБ различных стадий

Показатель		Группы				
	0 (n=15)	I (n=22)	II (n=15)	III (n=20)	IV (n=12)	V (n=14)
	Контроль	ХБП 1	ХБП 2	ХБП 3	ХБП 4	ХБП 5
Медиана	0,28	0,49	0,33	0,42	0,52	0,64*
Нижний квартиль	0,22	0,30	0,25	0,31	0,23	0,40*
Верхний квартиль	0,37	0,63	0,73	0,66	0,64	1,60*
Примечание - * - Достоверность отличий с контролем p<0,005						

Следовательно, обнаружен отчетливый тренд к увеличению уровня АОРР в плазме крови больных ХБП с достижением статистически значимых отличий у больных с ХБП 5 стадии.

При анализе содержания другого типа окислено-модифицированных белков – реактивных карбонильных производных в плазме крови больных исследуемых групп была выявлена отчетливая тенденция к снижению этого показателя по сравнению с таковым контроля (таблица 3, рисунок 2).

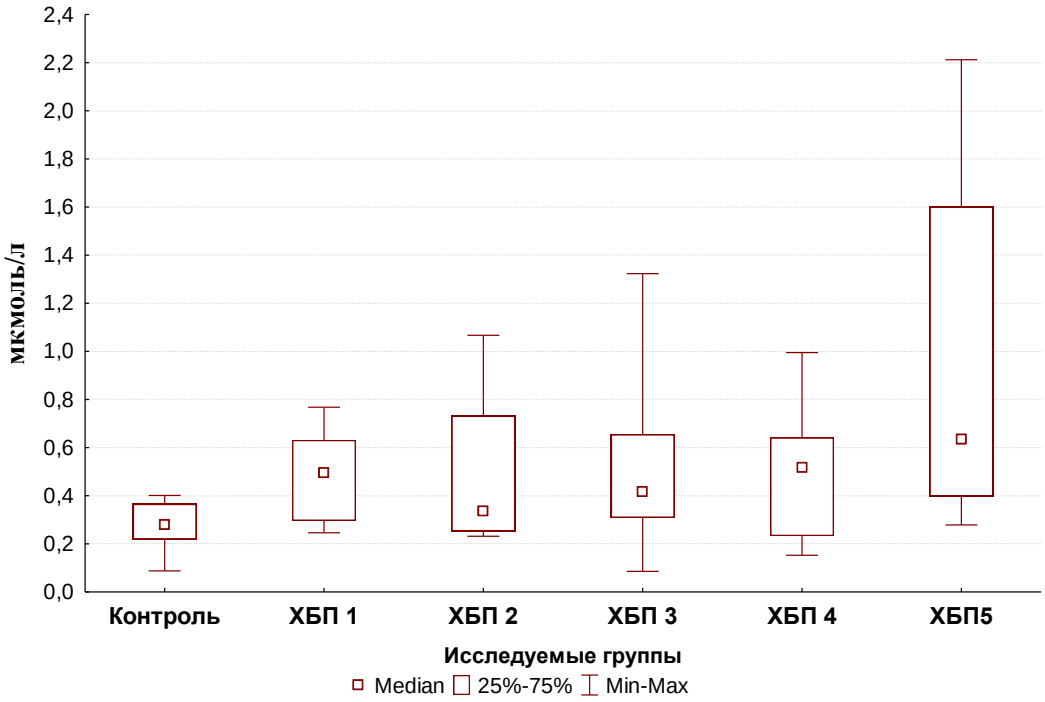


Рисунок 1 - Динамика содержания АОРР в плазме крови при прогрессировании ХБП

Достоверное снижение этого показателя относительно контроля зафиксировано в группе больных с ХБП 3 ($p<0,05$). Статистически значимые отличия по уровню содержания КПБ между группами больных ХБП различных стадий не были зафиксированы.

Таблица 3 - Уровень РКП в плазме крови (нмоль/мл) больных с ХБП 1-5 стадий

Показатель		Группы				
	0 (n=15)	I (n=22)	II (n=15)	III (n=20)	IV (n=12)	V (n=14)
	Контроль	ХБП 1	ХБП 2	ХБП 3	ХБП 4	ХБП 5
Медиана	0,61	0,46	0,46	0,45*	0,53	0,50
Нижний квартиль	0,49	0,39	0,45	0,40*	0,45	0,46
Верхний квартиль	0,68	0,57	0,50	0,51*	0,61	0,59
Примечание - * - Достоверность отличий с контролем $p<0,005$						

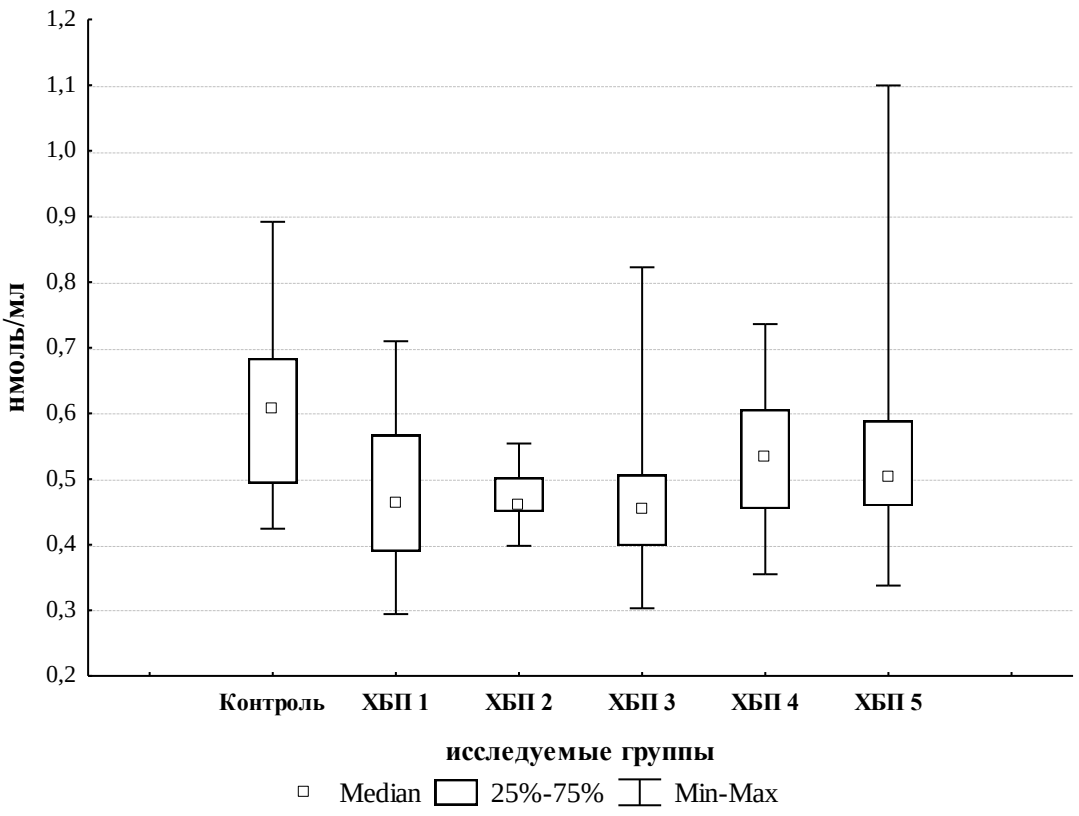


Рисунок 2 - Динамика содержания РКП в плазме крови больных при прогрессировании ХБП

Следовательно, была зафиксирована тенденция к снижению содержания КП в плазме крови больных ХБП различных стадий (достоверная в группе с ХБП 3); не наблюдалась зависимость степени аккумуляции РКП от стадии ХБП.

При сравнении содержания МДА в плазме крови между исследуемыми группами, как индикатора перекисного окисления липидов, было выявлено достоверное его снижение в группе больных ХБП 3 относительно значений контрольной группы ($p<0,05$), а также тенденция к снижению в группах с ХБП 4 и ХБП 5 (таблица 4, рисунок 3).

Следует отметить, что у 20% здоровых доноров содержание МДА в плазме крови находилось в диапазоне от 0,71 до 0,9 нмоль/мл, у 80% содержание МДА варьировало в диапазоне от 0,9 до 1,22 нмоль/мл. В группе с ХБП 3 уже у 70% больных значение МДА было менее 0,9 нмоль/мл с минимальным – 0,63 нмоль/мл. В группах пациентов с ХБП 4 и ХБП 5 также прослеживается тенденция к снижению уровня МДА в среднем на 21% относительно значений контрольной группы. В тоже время в группе с ХБП 4 присутствовали пациенты, у которых значения МДА превышали контроль (16%) (рисунок 3).

Таблица 4 - Содержание МДА в плазме крови (нмоль/мл) больных с ХБП 1-5 стадий

Показатель		Группы				
	0 (n=15)	I (n=22)	II (n=15)	III (n=20)	IV (n=12)	V (n=14)
	Контроль	ХБП 1	ХБП 2	ХБП 3	ХБП 4	ХБП 5
Медиана	1,06	0,95	0,93	0,81*	0,83	0,82
Нижний квартиль	0,98	0,83	0,87	0,74*	0,75	0,77
Верхний квартиль	1,14	1,08	1,01	0,97*	0,95	0,87
Примечание - * - Достоверность отличий с контролем p<0,05						

Следовательно, была зафиксирована тенденция к снижению содержания МДА в плазме крови больных ХБП различных стадий (достоверная в группе с ХБП 3); не наблюдалась зависимость степени аккумуляции МДА от стадии ХБП.

Обращает на себя внимание, что достоверные отличия содержания, как МДА, так и РКП от контроля зафиксированы в плазме крови больных одной группы – ХБП 3, т.е. в дебюте хронической почечной недостаточности.

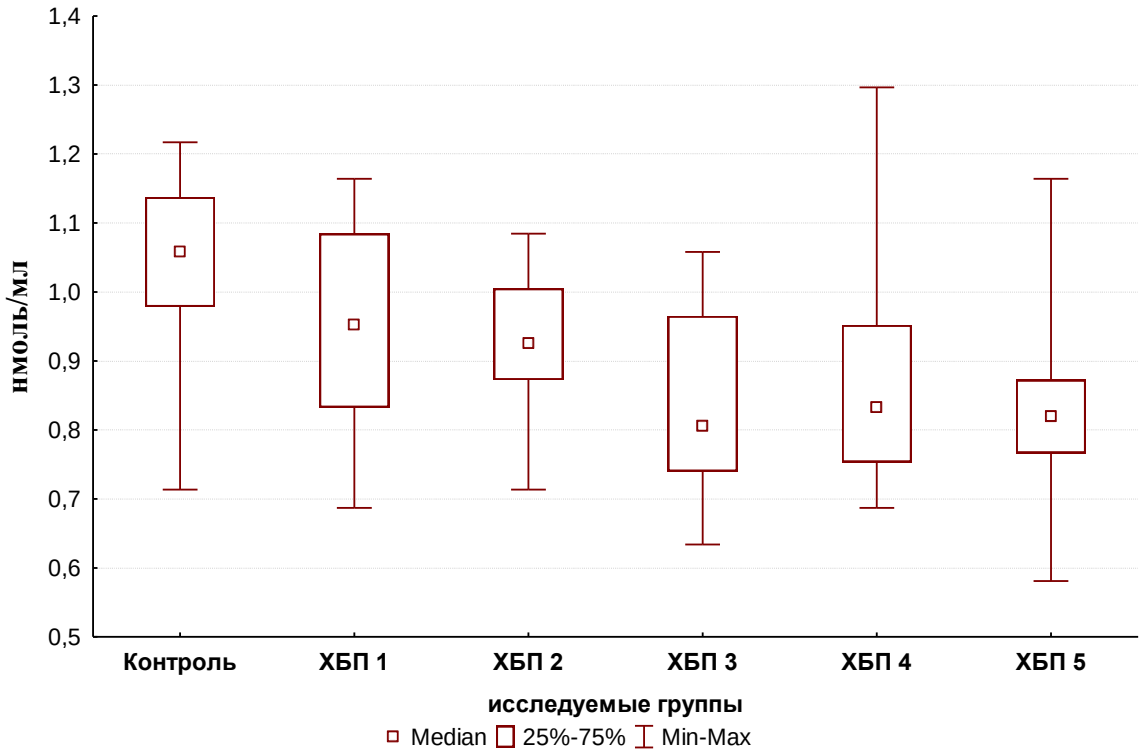


Рисунок 3 - Динамика содержания МДА в плазме крови при прогрессировании ХБП

Результаты исследования концентрации гуанина, гипоксантина, аденина, ксантина и мочевой кислоты в плазме крови больных ХБП различной степени тяжести представлены в таблицах 5, 6 и на рисунках 4 и 5. Для сравнения исследуемых групп и оценки влияния степени тяжести заболевания на содержание пуриновых оснований и интермедиатов катаболизма пуринов в плазме крови использовали однофакторный дисперсионный анализ ANOVA. Для идентификации пар выборок, отличающихся друг от друга, использовали апостериорный критерий парных сравнений (Post Hoc).

Таблица 5 – Содержание свободных пуриновых оснований и интермедиатов катаболизма пуринов в плазме крови больных с ХБП 1-5 стадий (ед.экст)

Группы/Показатели		Гуанин	Гипоксантин	Аденин	Ксантин	МК
Контроль	Медиана	105,0	84,0	73,0	104,0	115,0
	Нижний квартиль	85,0	63,0	51,0	89,0	97,0
	Верхний квартиль	123,0	101,0	93,0	121,0	138,0
ХБП 1	Медиана	138,0	113,0	96,0	137,0	161,0
	Нижний квартиль	111,0	91,0	82,0	119,0	124,0
	Верхний квартиль	186,0	150,0	117,0	193,0	236,0
ХБП 2	Медиана	169,0#	140,0#	109,0#	160,0#	181,0#
	Нижний квартиль	142,0#	117,0#	90,0#	139,0#	178,0#
	Верхний квартиль	178,0#	143,0#	112,0#	184,0#	215,0#
ХБП 3	Медиана	214,0*	167,5*#	136,5*	199,5*#	247,0*#
	Нижний квартиль	155,5*	130,5*#	108,0*	161,5*#	171,0*#
	Верхний квартиль	276,5*	211,5*#	164,0*	236,0*#	275,0*#
ХБП 4	Медиана	307,5*	241,0*	169,5*	255,5*	308,5*
	Нижний квартиль	141,0*	118,0*	105,0*	149,0*	166,0*
	Верхний квартиль	400,5*	333,5*	237,0*	303,5*	350,5*
ХБП 5	Медиана	313,0*$	247,0*$	177,0*$	258,0*$	341,0*$
	Нижний квартиль	252,0*$	203,0*$	145,0*$	220,0*$	293,0*$
	Верхний квартиль	529,0*$	431,0*$	322,0*$	389,0*$	417,0*$
Примечание - * - Достоверность отличий с контролем $p<0,001$; $ - достоверность отличий с группой больных ХБП 1 $p<0,001$; # - достоверность отличий с группой больных ХБП 5 $p<0,05$						

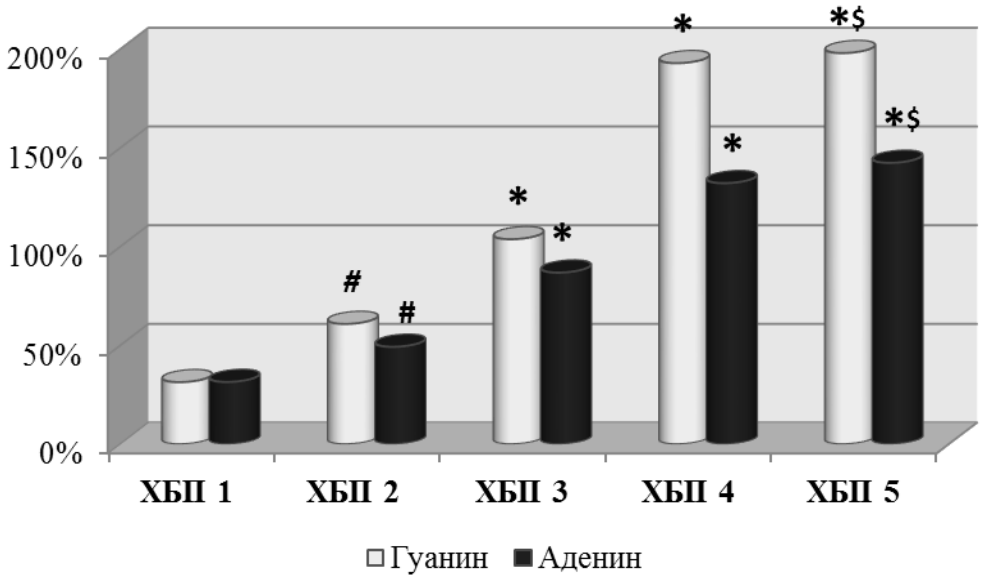
Результаты исследования концентрации пуриновых оснований (гуанина, аденина, гипоксантина) и интермедиатов катаболизма пуринов (ксантина и мочевой кислоты) в плазме крови больных ХБП различной степени тяжести показали, что при прогрессировании ХБП их содержание достоверно возрастало. Зафиксировано значительное повышение уровня гуанина в плазме крови больных с ХБП 3, ХБП 4 и ХБП 5 ($p<0,001$) относительно значений контрольной группы. Уровень гуанина в плазме крови больных ХБП 5 превышал значения таковых у больных ХБП 1 и ХБП 2 ($p<0,001$).

В целом, при прогрессировании ХБП наблюдалась тенденция к увеличению уровня гуанина относительно контроля в группах с ХБП 1 и 2 в среднем на 44% и 53% соответственно, в группах с ХБП 3, 4 и 5 - более чем в 2 раза, в 2,9 раза и более чем в 3 раза, соответственно (Рис. 4 и 5).

Аналогичные изменения и статистически значимые отличия между исследуемыми группами при прогрессировании ХБП были выявлены по уровню гипоксантина, аденина, ксантина и мочевой кислоты (МК) в плазме крови больных (рисунок 4, 5).

У больных ХБП 1 стадии и у больных ХБП 2 стадии была зафиксирована тенденция к увеличению содержания аденина и гипоксантина в плазме крови относительно такового контроля. В плазме крови больных ХБП 3, 4 и 5 стадий наблюдался достоверный рост этих показателей относительно контроля. Следует отметить, что уровень аденина в плазме крови больных ХБП 5 стадии достоверно превышал таковой больных ХБП 2 стадии. Содержание гипоксантина в плазме крови больных ХБП 5 достоверно превышал таковые больных ХБП 2 и 3 стадий.

Содержание гипоксантина в плазме крови больных с ХБП 5 содержание аденина и гипоксантина превышало контроль на 160% и в 4 раза, соответственно.



* - достоверность отличий с контролем p<0,001; $ - достоверность отличий с группой больных ХБП 1 p<0,001; # - достоверность отличий с группой больных ХБП 5 p<0,05;

Рисунок 4 – Содержание свободных пуриновых оснований в плазме крови при прогрессировании ХБП относительно контроля, принятого за 0%.

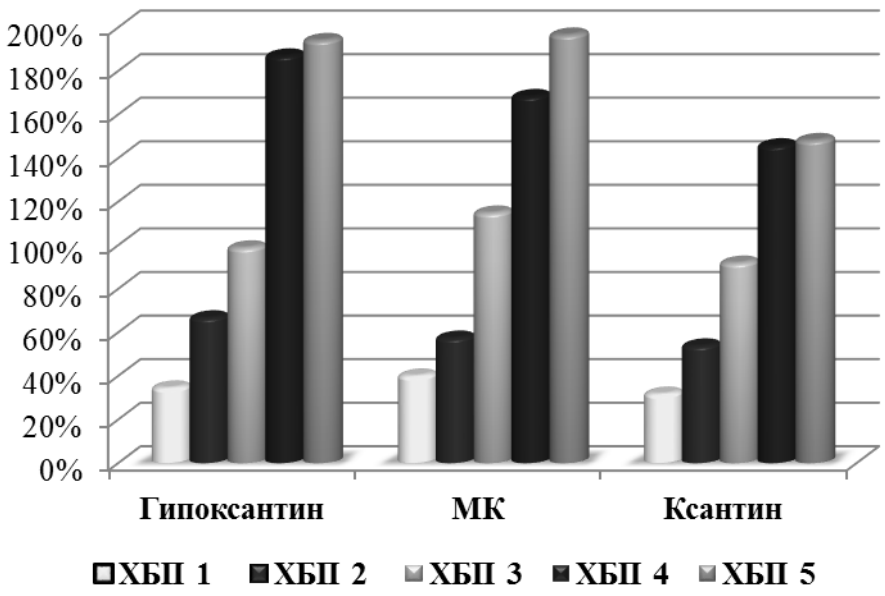


Рисунок 5 - Содержание интермедиатов катаболизма пуринов в плазме крови при прогрессировании ХБП относительно контроля, принятого за 0%

Уровень ксантина в плазме крови у больных ХБП 1 и ХБП 2 в среднем относительно контроля увеличился на 40%, тогда как у больных ХБП 3, 4 и 5 стадий этот показатель превышал таковой контроля более чем в 2 раза (рисунок 5). Аналогичная тенденция прослеживалась и для мочевой кислоты. Следует также отметить, что уровни ксантина и мочевой кислоты в плазме крови больных ХБП 5 достоверно превышали таковые больных с ХБП 2 и 3 стадий.

Следовательно, полученные данные показывают, что у больных ХБП 1 стадии в плазме крови возрастает уровень пуриновых оснований и интермедиатов их катаболизма. Достоверные отличия от контроля зафиксированы у больных ХБП 3 стадии, т.е. в дебюте хронической почечной недостаточности. Выявлены отчетливое нарастание внеклеточных пуринов и интермедиатов их катаболизма в зависимости от стадии ХБП. Максимальное увеличение этих показателей зафиксировано в плазме крови больных ХБП 5 стадии.

Таблица 6 содержит данные по результатам расчета индексов активности ксантиноксидазы в плазме крови больных ХБП различной стадии.

В результате исследования индексов активности ксантиноксидазы в плазме у больных ХБП выявлено значимое снижение активности Кс/ГКс у больных ХБП 3 стадии, ХБП 4 стадии и ХБП 5 стадий относительно значений контрольной группы ($p<0,05$), а также отличия по данному показателю между группами больных с ХБП 1 и ХБП 4, ХБП 5 стадий. Кроме того, в группе больных ХБП 4 стадии соотношение Кс/Г было достоверно ниже значений контрольной группы и группы больных ХБП 1 стадии.

Следовательно, исходя из полученных данных (Таблица 6), наиболее выраженная тенденция к снижению при прогрессировании ХБП отмечается у

индекса Кс/ГКс. По другим расчетным индексам достоверных отличий по индексам обнаружено не было.

Таким образом, полученные нами данные демонстрируют последовательное увеличение содержания пуриновых оснований и продуктов их катаболизма в плазме крови в плазме крови больных ХБП в зависимости от стадии болезни.

Таблица 6 - Расчет индексов ксантиноксидазы у больных с ХБП различной стадии

Группы/Показатели		Кс/Г	Кс/ГКс	МК/ГКс	МК/Кс
Контроль	Медиана	1,02	1,33	1,50	1,12
	Нижний квартиль	1,00	1,27	1,34	1,06
	Верхний квартиль	1,07	1,41	1,69	1,21
ХБП 1	Медиана	1,04	1,30	1,36	1,05
	Нижний квартиль	0,99	1,25	1,27	0,97
	Верхний квартиль	1,10	1,34	1,67	1,22
ХБП 2	Медиана	0,95	1,19	1,50	1,28
	Нижний квартиль	0,95	1,14	1,42	1,17
	Верхний квартиль	0,98	1,21	1,52	1,28
ХБП 3	Медиана	0,99	1,21*	1,30	1,14
	Нижний квартиль	0,88	1,06*	1,17	1,03
	Верхний квартиль	1,06	1,32*	1,52	1,20
ХБП 4	Медиана	0,88*$	1,12*$	1,28	1,17
	Нижний квартиль	0,77*$	0,95*$	1,10	1,06
	Верхний квартиль	0,96*$	1,22*$	1,38	1,21
ХБП 5	Медиана	0,92	1,04*$	1,22	1,18
	Нижний квартиль	0,80	0,94*$	0,94	0,89
	Верхний квартиль	0,97	1,17*$	1,44	1,25
Примечание - * - Достоверность отличий с контролем $p<0,05$; $ - достоверность отличий с группой больных ХБП 1 $p<0,05$					

Результаты исследования содержания кислоторастворимой фракции (КРФ), внеклеточных РНК и ДНК в плазме крови больных ХБП в зависимости от степени тяжести представлены в таблице 7 и рисунке 6. Из полученных данных следует, что концентрация внеклеточных РНК в плазме крови у больных ХБП 1-5 стадий статистически значимо превышала показатель контрольной группы. Зафиксирован феномен снижения содержания вкРНК в плазме крови больных ХБП 3 и 4 стадий (хотя достоверные отличия по сравнению с нормой сохранялись). Подъем вкРНК наблюдался у больных ХБП 5 стадии.

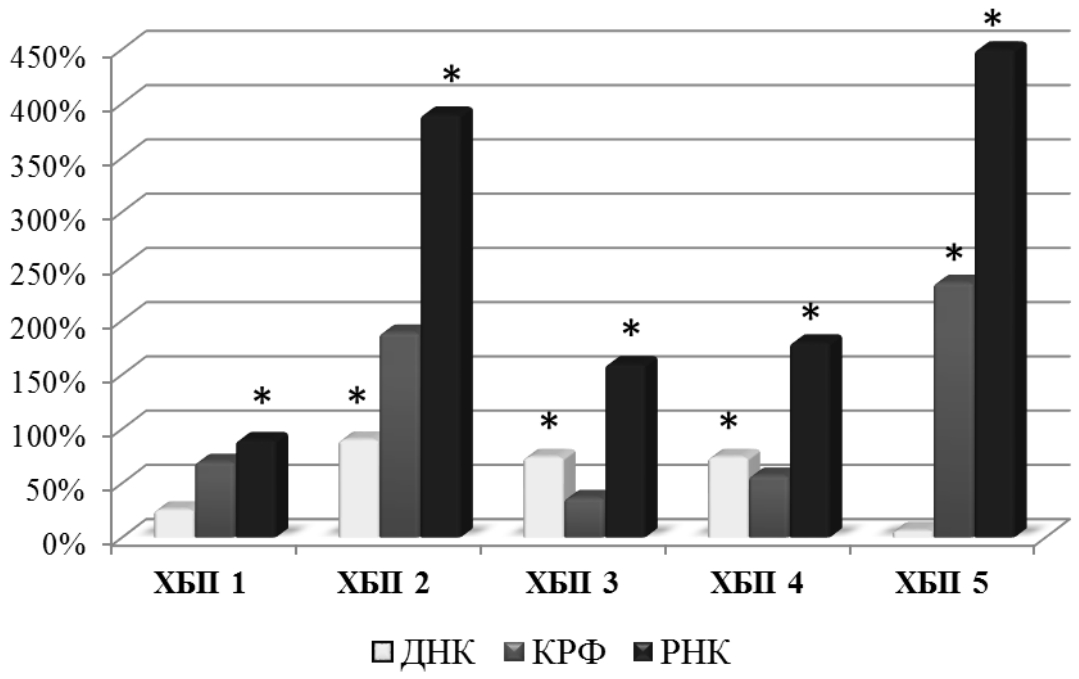
Содержание вкДНК в плазме крови достоверно отличалась от такового контроля у больных ХБП 2-4 стадий, тогда как у больных ХБП 5 стадии

уровень внДНК резко падал до значений контроля. Снижение содержания вкДНК в плазме крови больных этой группы сопровождалось достоверным ростом уровня КРФ. В плазме крови больных ХБП 1-4 стадий достоверных изменений КРФ по сравнению с группой контроля не наблюдалось.

Таблица 7 - Содержание внеклеточных нуклеиновых кислот и КРФ в плазме крови больных с ХБП различных стадий

Группы/Показатели		КРФ, мкг/мл	ДНК, мкг/мл	РНК, мкг/мл
Контроль	Медиана	0,0063	0,0031	0,0010
	Нижний квартиль	0,0049	0,0023	0,0009
	Верхний квартиль	0,0080	0,0037	0,0012
ХБП 1	Медиана	0,0107	0,0039	0,0019*
	Нижний квартиль	0,0046	0,0024	0,0014*
	Верхний квартиль	0,0195	0,0066	0,0055*
ХБП 2	Медиана	0,0182	0,0059*	0,0049*
	Нижний квартиль	0,0047	0,0049*	0,0021*
	Верхний квартиль	0,0682	0,0069*	0,0052*
ХБП 3	Медиана	0,0086	0,0054*	0,0026*
	Нижний квартиль	0,0047	0,0033*	0,0019*
	Верхний квартиль	0,0212	0,0067*	0,0041*
ХБП 4	Медиана	0,0099	0,0054*	0,0028*
	Нижний квартиль	0,0050	0,0034*	0,0015*
	Верхний квартиль	0,0682	0,0075*	0,0061*
ХБП 5	Медиана	0,0211*	0,0033	0,0055*
	Нижний квартиль	0,0086*	0,0029	0,0030*
	Верхний квартиль	0,0578*	0,0065	0,0089*
Примечание - * - Достоверность отличий с контролем $p<0,05$				

Таким образом, полученные нами данные показали, что у больных с ХБП 1-5 стадий зафиксировано достоверное увеличение вкРНК по сравнению с контролем. Межгрупповое сравнение характера изменения этого показателя выявило феномен снижения содержания вкРНК в плазме крови больных ХБП 3 стадии, т.е. в дебюте хронической почечной недостаточности. Этот феномен сохраняется у больных ХБП 4 стадии.



* - достоверность отличий с контролем (p<0,05)

Рисунок 6 - Содержание внеклеточных нуклеиновых кислот и КРФ в плазме крови при прогрессировании ХБП (относительно контроля, принятого за 0%),

Увеличение содержания вкРНК в плазме крови больных ХБП 5 стадии можно, на наш взгляд, объяснить за счет эффекта гемодиализа. Выявлен достоверный рост вкДНК в плазме крови больных ХБП 2-4 стадий по сравнению с контрольной группой, но межгрупповых различий не наблюдалось.

3.3 Характеристика паттерна биохимических изменений в нейтрофилах крови больных ХБП различной степени тяжести

У больных ХБП различной стадии уровень лейкоцитов в крови статистически значимо не отличался и составил в среднем $6,66 \pm 3,06 * 10^9$/л, при этом, у абсолютного большинства пациентов (более 90%) оставался в пределах референтных значений ($4,0-9,0 * 10^9$/л).

Результаты исследования уровня окисленных белков, МДА и нитрит-ионов в нейтрофилах крови больных ХБП различной стадии представлены в таблицах 8-11 и рисунках 7 и 8. При сравнении содержания АОРР в лизатах нейтрофилов крови больных исследуемых групп статистически значимых отличий не выявлено, также отсутствовали достоверные тенденции к изменению при прогрессировании ХБП (Таблица 8).

Таблица 8 - Содержание АОРР в нейтрофилах крови больных с ХБП 1-5 стадий (мкмоль/10^6)

Показатель	Группы					
	0 (n=15)	I (n=22)	II (n=15)	III (n=20)	IV (n=12)	V (n=14)
	Контроль	ХБП 1	ХБП 2	ХБП 3	ХБП 4	ХБП 5
Медиана	0,044	0,038	0,074	0,055	0,045	0,043
Нижний квартиль	0,032	0,032	0,042	0,023	0,033	0,028
Верхний квартиль	0,057	0,041	0,086	0,065	0,071	0,056

При сравнении содержания РКП в лизатах нейтрофилов крови между исследуемыми группами была выявлена статистически значимый рост этого показателя относительно контроля ($p<0,05$) в группах больных ХБП 3 -5 стадий (таблица 9). В контрольной группе содержание РКП варьирует в диапазоне от 0,11 до 0,38 нмоль/10^6. В группе с ХБП 1 стадии только у 27% больных уровень КП превышал значения контроля с максимальным показателем - 0,61 нмоль/10^6. У больных ХБП 2 стадии этот показатель значимо не отличался от контроля. В группе с ХБП 3 стадии уровень РКП в лизатах нейтрофилов крови достоверно превышал таковой контроля более чем в 2 раза. У больных с ХБП 4 стадии уровень РКП в лизатах нейтрофилов крови достоверно превышал таковой контроля на 81%. В лизатах нейтрофилов больных ХБП 5 стадии содержание РКП превышало таковой контроля практически в 2 раза (Рисунок 7)

Таблица 9 - Содержание РКП в нейтрофилах крови больных ХБП 1-5 стадий (нмоль/10^6)

Показатель	Группы					
	0 (n=15)	I (n=22)	II (n=15)	III (n=20)	IV (n=12)	V (n=14)
	Контроль	ХБП 1	ХБП 2	ХБП 3	ХБП 4	ХБП 5
Медиана	0,16	0,26	0,24	0,38*	0,29*	0,33*
Нижний квартиль	0,15	0,13	0,23	0,28*	0,26*	0,29*
Верхний квартиль	0,29	0,41	0,35	0,63*	0,49*	0,48*
Примечание - * - Достоверность отличий с контролем $p<0,05$						

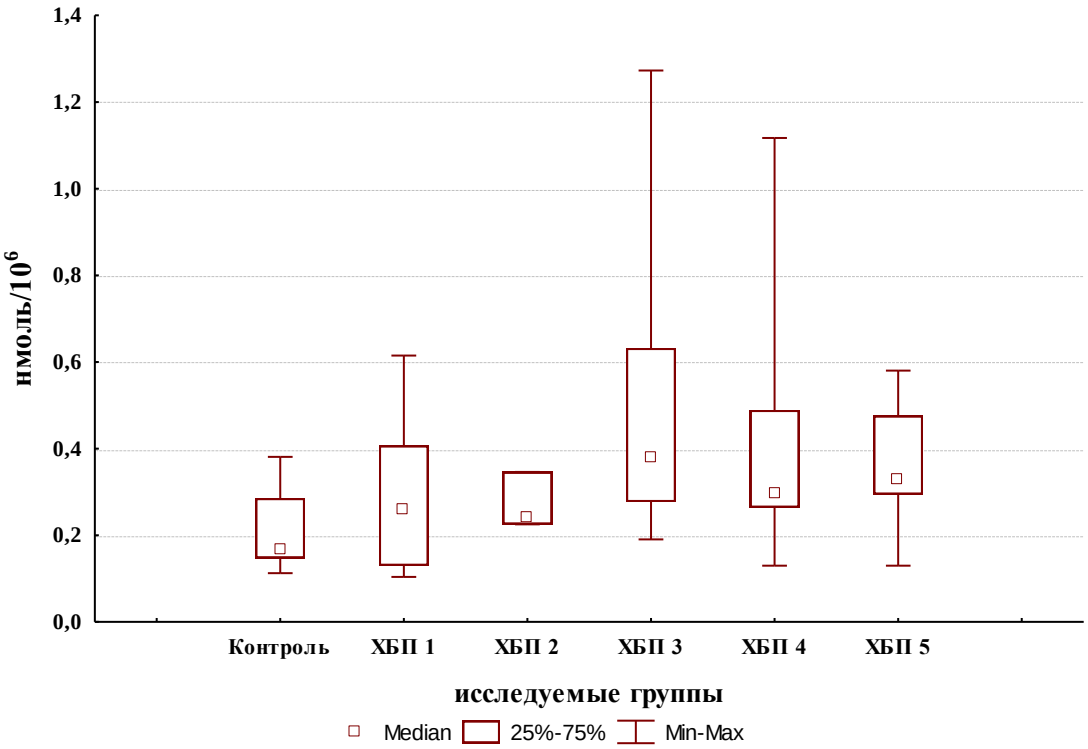


Рисунок 7 - Динамика содержания РКП в нейтрофилах крови при прогрессировании ХБП

При анализе изменения содержания в нейтрофилах одного из стабильных метаболитов оксида азота – нитрит-ионов обнаружено достоверное повышение этого показателя у больных ХБП 5 стадии относительно значения контрольной группы (Таблица 10, рис. 8). В нейтрофилах крови больных с ХБП 1-4 стадий прослеживалась тенденция к увеличению уровня нитрит-ионов. В нейтрофилах крови больных этих групп зафиксированы значения нитрит-ионов как соответствующие контролю, так и превышающие его.

Таблица 10 - Содержание нитрит-ионов в нейтрофилах крови больных с ХПБ 1-5 стадий (мкмоль /10^6 клеток)

Показатель	Группы					
	0 (n=15)	I (n=12)	II (n=5)	III (n=20)	IV (n=12)	V (n=14)
	Контроль	ХБП 1	ХБП 2	ХБП 3	ХБП 4	ХБП 5
Медиана	1,56	1,80	1,89	2,03	2,25	2,32*
Нижний квартиль	0,75	1,20	0,97	1,20	0,97	1,84*
Верхний квартиль	1,70	2,37	2,22	2,32	2,32	2,96*
Примечание - * - Достоверность отличий с контролем $p<0,05$						

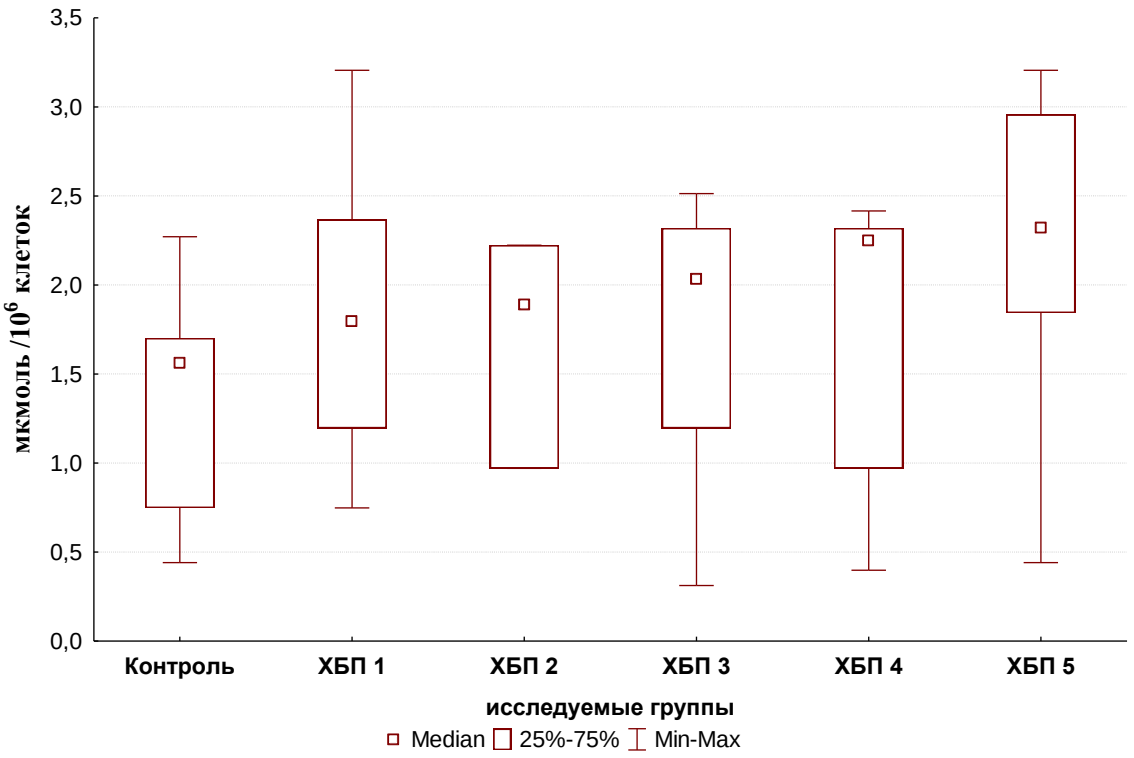


Рисунок 8 - Динамика содержания нитрит-ионов в нейтрофилах крови при прогрессировании ХБП

В таблице 11 представлены данные по содержанию МДА в лизатах нейтрофилов крови больных ХБП 1-5 стадий. При изучении содержания МДА в лизатах нейтрофилах крови больных статистически значимых отличий между исследуемыми группами не выявлено ($p>0,05$). Следует отметить внутригрупповую вариабельность этого показателя. Так, в контрольной группе уровень МДА находится в диапазоне от 0,3 до 1,2 нмоль/10^6. В лизатах нейтрофилов крови больных ХБП 1 стадии и ХБП 2 стадии все значения МДА соответствовали диапазону контрольной группы. У 15% больных ХБП 3 стадии и 9% больных ХБП 4 стадии в лизатах нейтрофилов крови содержание МДА превышало значение контроля.

Таблица 11 - Содержание МДА в нейтрофилах крови больных ХПБ 1-5 стадий (нмоль/10^6)

Показатель	Группы					
	0 (n=15)	I (n=22)	II (n=15)	III (n=20)	IV (n=12)	V (n=14)
	Контроль	ХБП 1	ХБП 2	ХБП 3	ХБП 4	ХБП 5
Медиана	0,69	0,71	0,70	0,77	0,74	0,77
Нижний квартиль	0,58	0,66	0,51	0,71	0,58	0,54
Верхний квартиль	0,79	0,77	0,79	0,79	0,28	0,82

Результаты исследования содержания фракций гистоновых белков в нейтрофилах больных ХБП в зависимости от степени тяжести представлены на рисунке 9. Не обнаружено статистически значимых различий между спектрами нуклеосомных гистонов (H2A, H2B, H3 и H4) и гистона H1 в нейтрофилах крови больных ХБП 1-5 стадии и здоровых лиц. Также не наблюдались достоверные межгрупповые различия между фракциями нуклеосомных гистонов и гистона H1 в нейтрофилах крови больных ХБП.

Следовательно, в лизатах нейтрофилов крови больных ХБП 1-5 стадий зафиксирован рост РКП, причем у больных ХБП 3 стадии, ХБП 4 стадии и ХБП 5 стадии эти отличия носили достоверный характер. Отчетливая тенденция к увеличению прослеживалась и для нитрит-ионов, но достоверные отличия от контроля наблюдались лишь у больных ХБП 5.

Проведено исследование образования спонтанных внеклеточных нейтрофильных ловушек в крови (рисунки 10-14). У лиц группы контроля в крови внеклеточных нейтрофильных внеклеточных ловушек зафиксировано не было, что совпадает с данными литературы [151, 152].

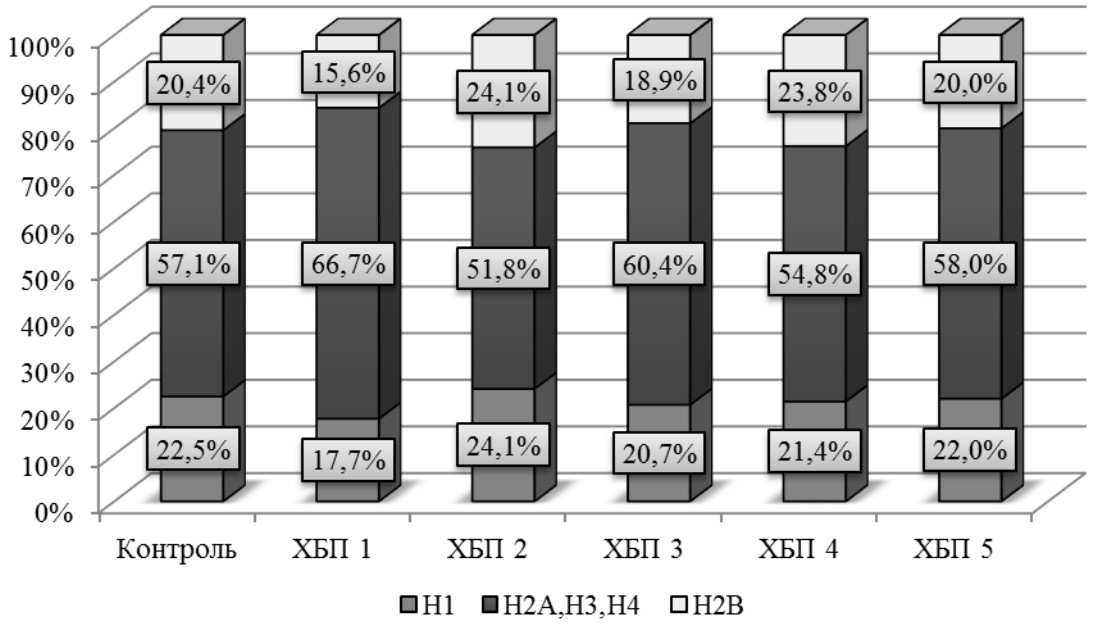


Рисунок 9 - Распределение фракций гистоновых белков больных ХБП в зависимости от степени тяжести.

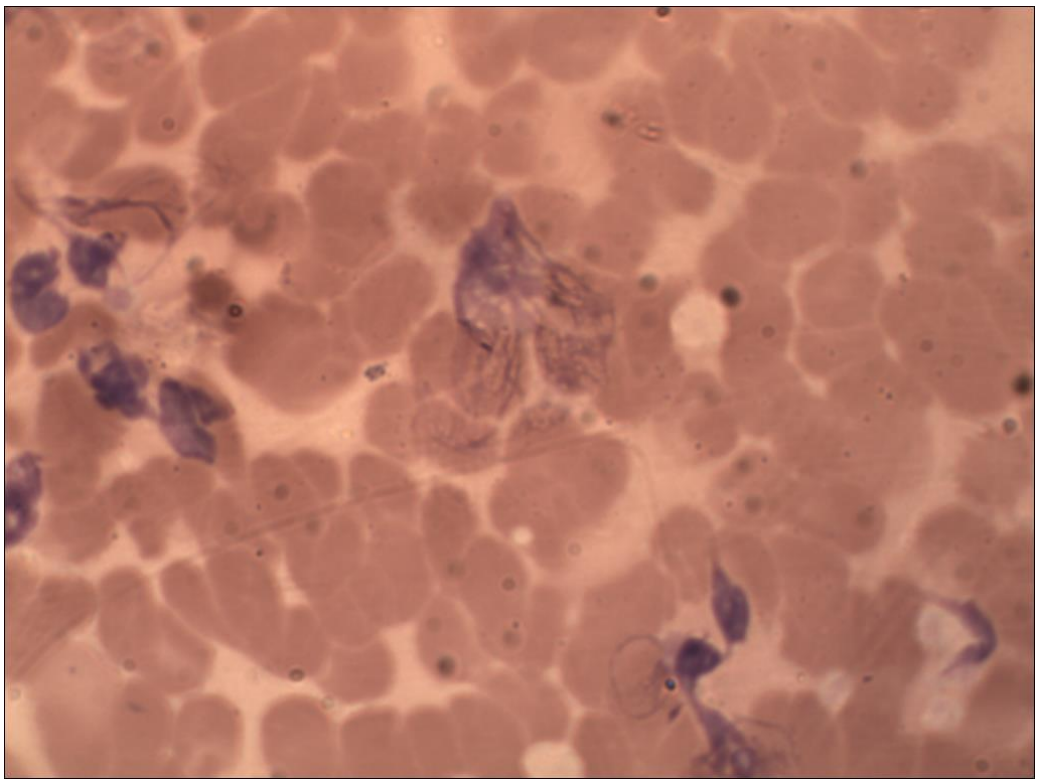


Рисунок 10 - Внеклеточная ловушка в крови больных ХБП 1 стадии
Окраска гематоксилин-эозином, увеличение 1400 х

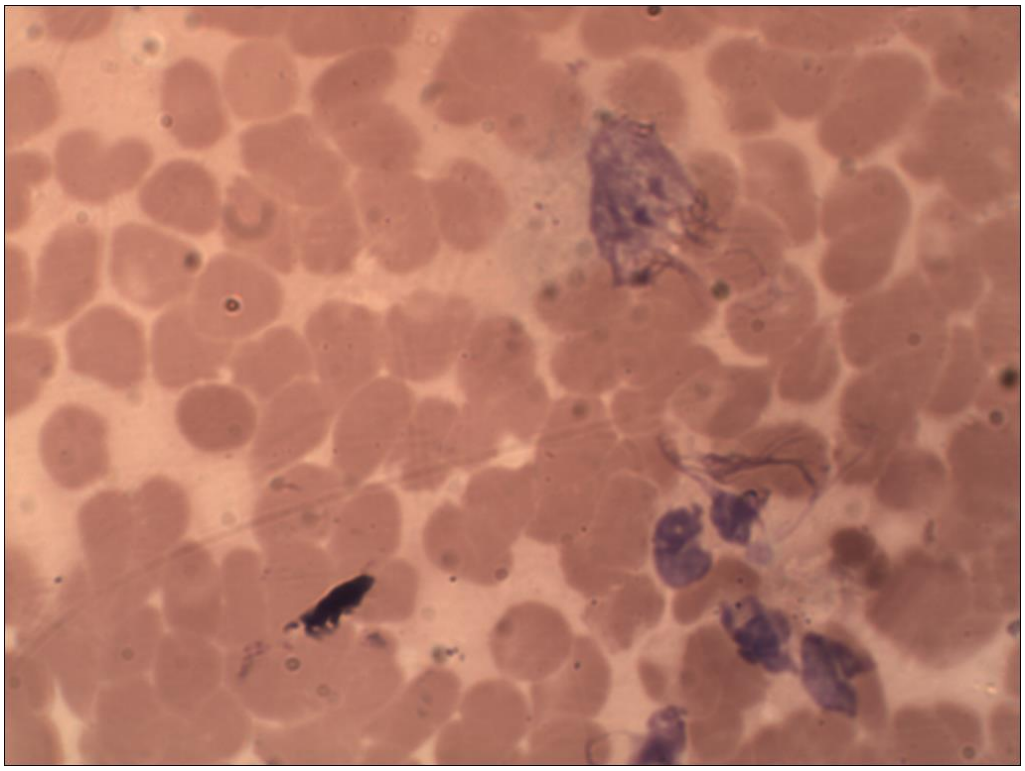


Рисунок 11 - Внеклеточная ловушка в крови больных ХБП 2 стадии
Окраска гематоксилин-эозином, увеличение 1400 х

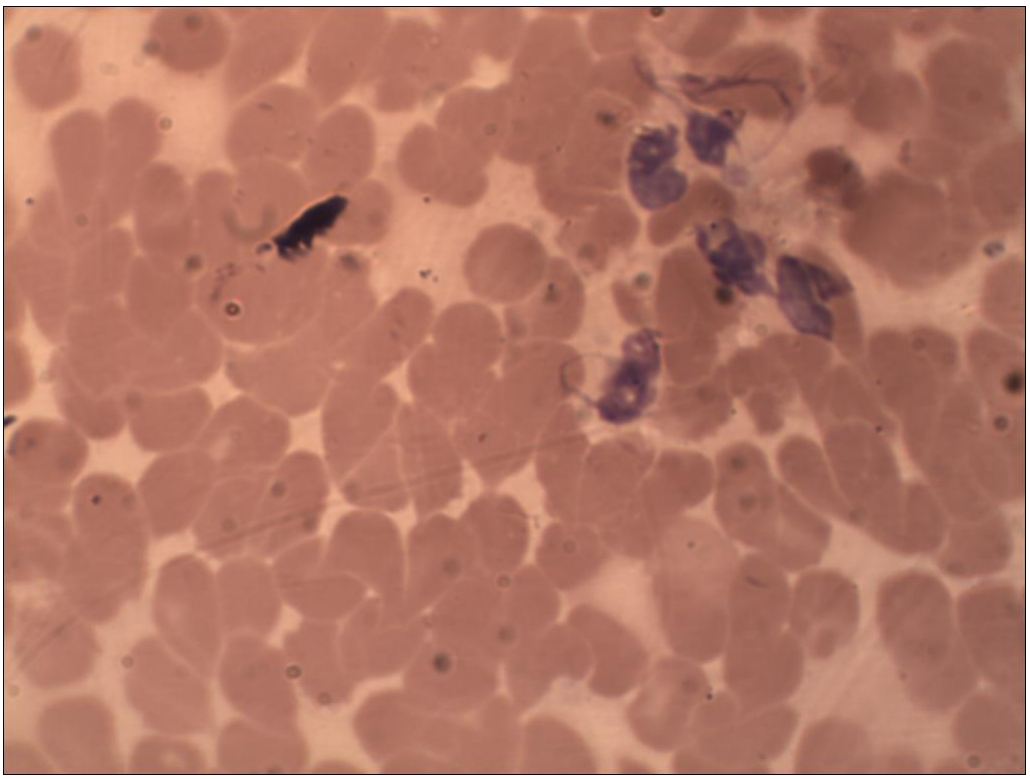


Рисунок 12 - Внеклеточная ловушка в крови больных ХБП 3 стадии
Окраска гематоксилин-эозином, увеличение 1400 х

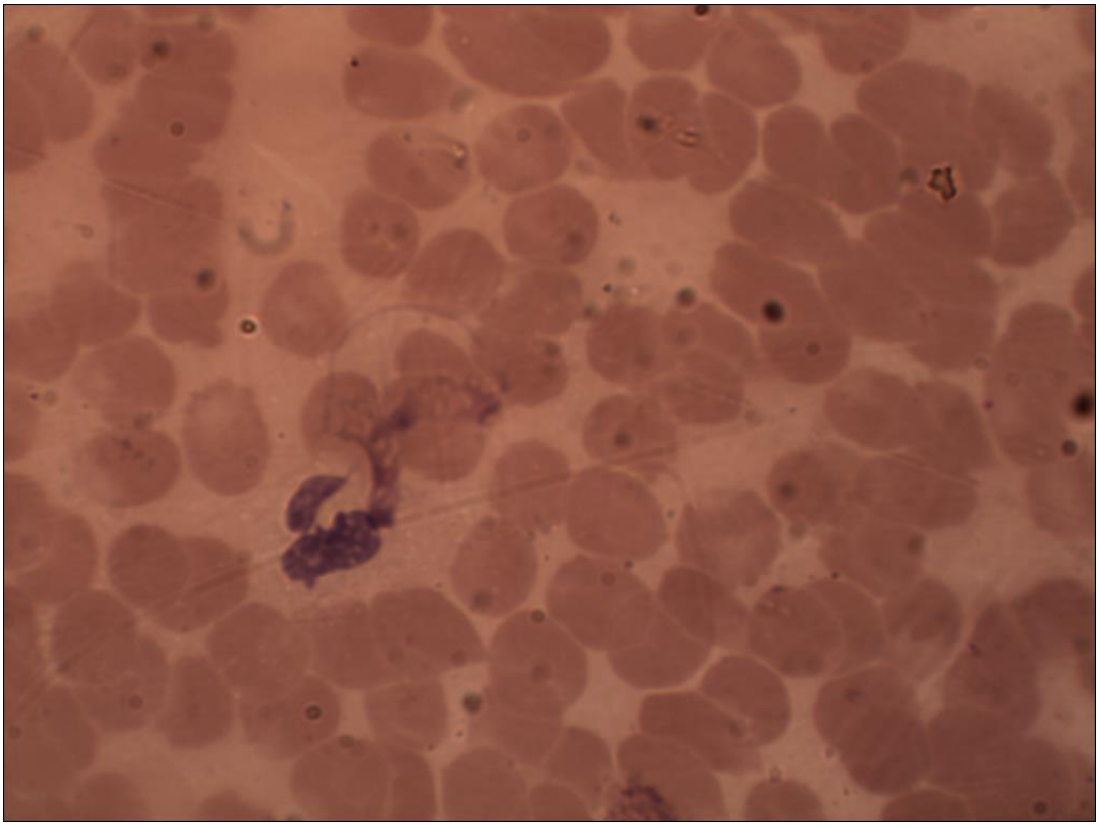


Рисунок 13 - Внеклеточная ловушка в крови больных ХБП 4 стадии
Окраска гематоксилин-эозином, увеличение 1400 х

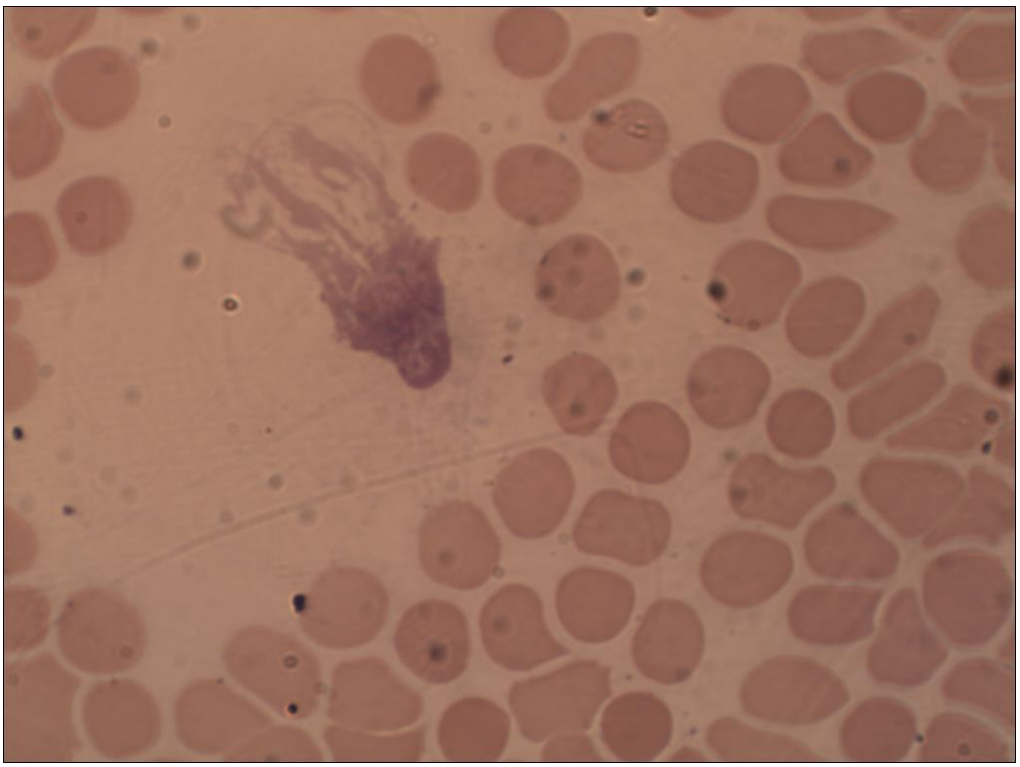


Рисунок 14 - Внеклеточная ловушка в крови больных ХБП 1 стадии
Окраска гематоксилин-эозином, увеличение 1400 х

У 33% больных ХБП 1 стадии в крови обнаружены внеклеточные нейтрофильные ловушки. Количество НВЛ варьировало от 4 до 10. У 5% больных с ХПБ 2 стадии в крови обнаружены ВНЛ, количество которых варьировало от 1 до 7. У 25% больных с ХПБ 3 стадии в крови обнаружены ВНЛ, количество которых варьировало от 1 до 7. В крови 29% больных ХПБ 4 стадии обнаружены ВНЛ, количество которых варьировало от 2 до 12. В крови 35% больных ХПБ 5 стадии обнаружены ВНЛ, количество которых варьировало от 2 до 14.

Обращает на себя внимание достаточно высокий процент больных с ХБП 1, в крови которых выявлено образование ВНЛ. Прослеживается тенденция к увеличению процента больных ХБП 3-5 стадий, в крови которых выявлены ВНЛ.

Как следует из представленных на рисунках 10-14 данных, формирование внеклеточных нейтрофильных ловушек идет по классической схеме: с деконденсацией хроматина, взаимодействием гистонов с ДНК и разрывом ядерной оболочки, затем плазматической мембраны, клеточным лизисом и выбросом сетеподобной ДНК [153].

Таким образом, в нейтрофилах крови больных ХБП различной степени тяжести зафиксированы метаболические нарушения, что документировалось увеличением, главным образом, реактивных карбониловых производных белков. Зафиксировано образование спонтанных внеклеточных нейтрофильных ловушек в крови больных ХБП разной степени тяжести.

При анализе биохимических показателей обращает на себя внимание диапазон и направленность изменения указанных параметров. При едином тренде изменения вариативность внутригрупповых значений ряда показателей не дает статистически значимых отличий. В связи с этим, мы провели оценку степени взаимосвязи изучаемых показателей.

Для оценки степени взаимосвязи изучаемых показателей проводился непараметрический корреляционный анализ Спирмена, с расчетом коэффициента детерминации ($R^2=r^2*100\%$) для того, чтобы оценить, насколько колебания показателей одной переменной обусловлены влиянием другой. Все выявленные коэффициенты корреляции статистически значимы ($p<0,05$).

В контрольной группе отмечалась обратная связь между уровнем АОРР и МДА плазмы крови ($r=-0,7$, $R^2=49\%$), прямая связь между уровнем АОРР нейтрофилов и КП плазмы ($r=0,65$, $R^2=42\%$). Прямая связь выявлена между показателями нитрит-ионов в лейкоцитах и МДА плазмы крови ($r=0,6$, $R^2=36\%$), а также между уровнем нитрит-ионов в лейкоцитах и КП плазмы ($r=0,65$, $R^2=42\%$).

Для больных ХБП 1 характерна прямая связь между показателями МДА и РКП плазмы ($r=0,97$, $R^2=94\%$) (Рис. 8), а также обратная связь между уровнем МДА плазмы и РКП нейтрофилов ($r=-0,77$, $R^2=59\%$). Уровень КП плазмы коррелировал с уровнем КП нейтрофилов ($r=-0,8$, $R^2=64\%$) (рисунок 9).

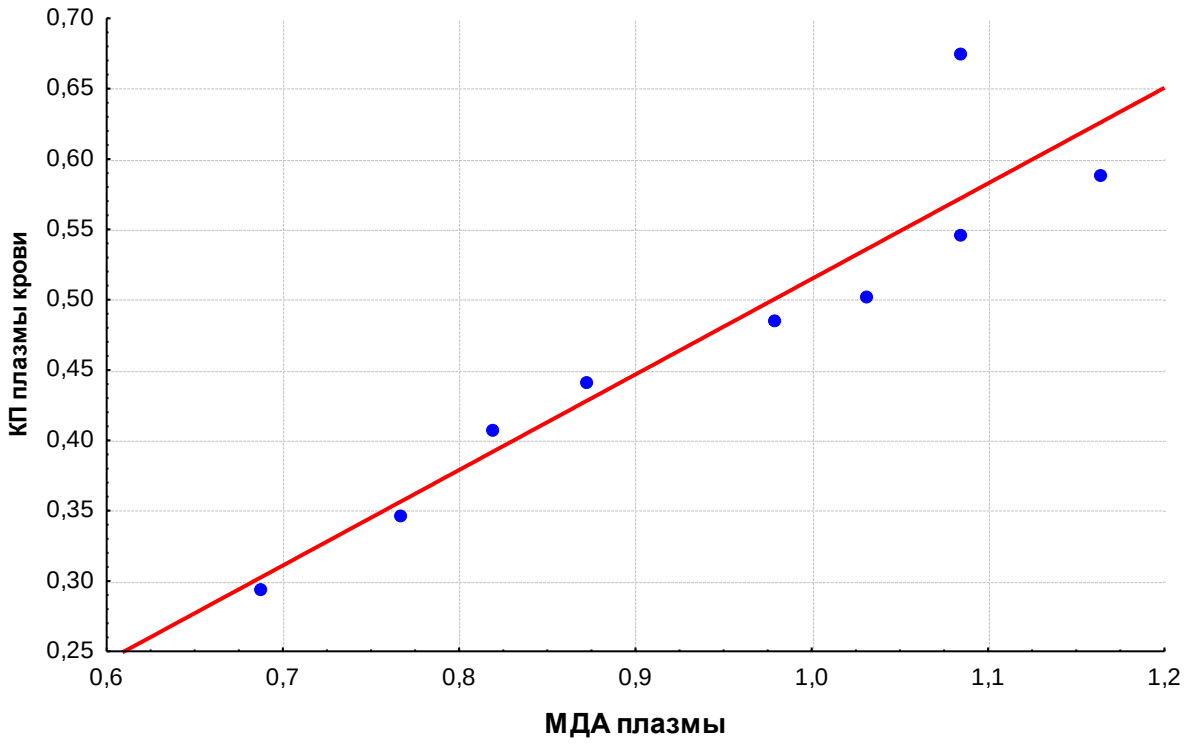


Рисунок 15 - Корреляция между показателями МДА и РКП плазмы крови больных ХБП 1 стадии

В группе больных ХБП 2 статистически значимых корреляционных связей не выявлено. Для больных ХБП 3 характерна обратная связь между

показателями АОРР и нитрит-ионов нейтрофилов (r=-0,7, R^2=49%), прямая связь такой же силы между показателями АОРР и КП нейтрофилов (r=0,67, R^2=45%), а также между РКП и нитрит-ионами нейтрофилов (r=-0,67, R^2=45%). Уровень МДА плазмы коррелировал с уровнем МДА лейкоцитов (r=-0,65, R^2=42%) (Рис. 9).

В группе больных ХБП 4 выявлена обратная связь между уровнем АОРР плазмы и АОРР нейтрофилов (r=-0,76, R^2=57%), а также АОРР лейкоцитов и ОМБ плазмы (r=-0,9, R^2=81%).

В группе больных ХБП 5 наблюдалась обратная связь между уровнем нитрит-ионов и МДА в нейтрофилах (r=-0,7, R^2=49%). Также как у больных с ХБП 3, уровень МДА плазмы коррелировал с уровнем МДА лейкоцитов (r=0,6, R^2=36%).

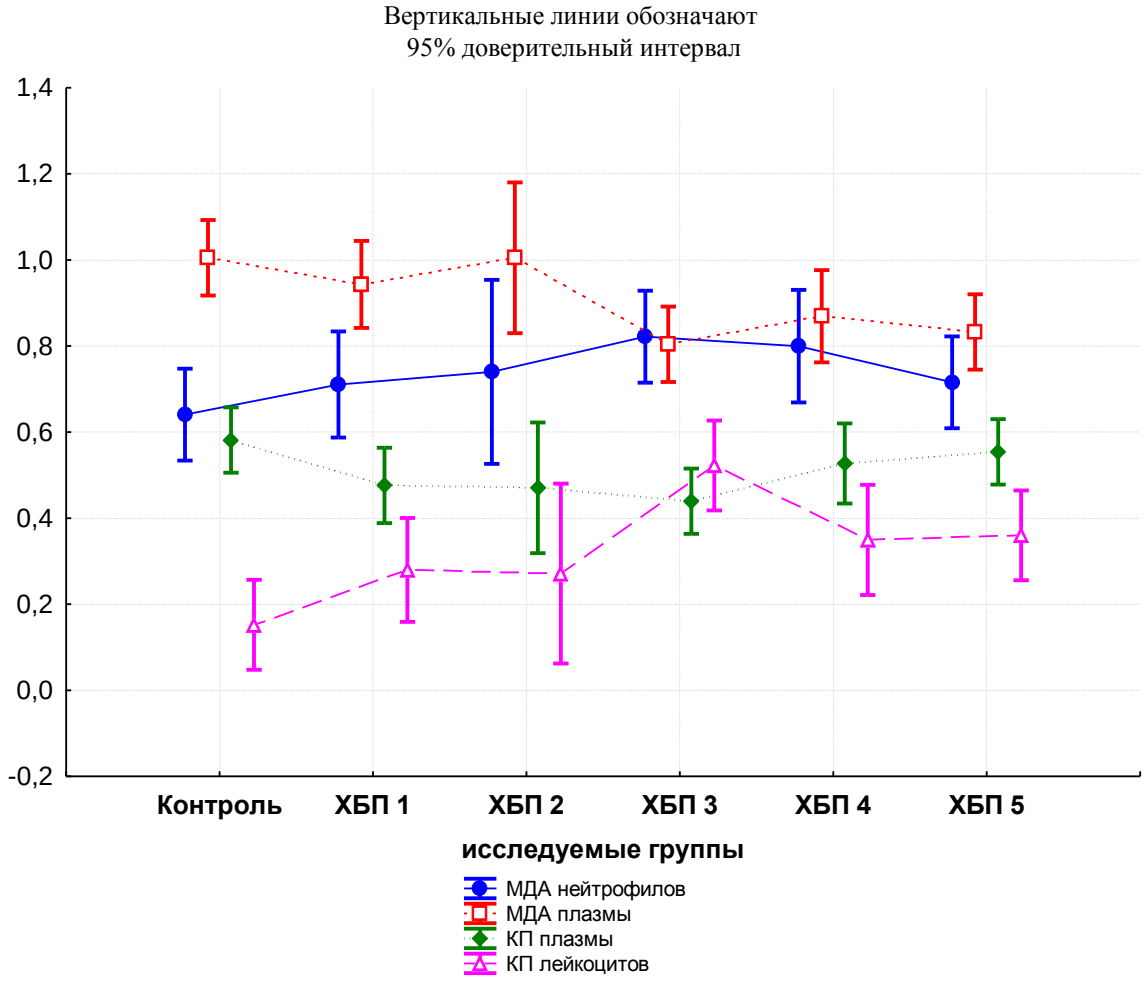


Рисунок 16 – Динамика содержания РКП и МДА в плазме крови и нейтрофилах при прогрессировании ХБП

Полученные нами коррелятивные зависимости показали достаточно высокую взаимозависимость изучаемых показателей в плазме крови и нейтрофилах больных ХБП разных стадий. Это подтверждает наше

предположение о том, что причиной достоверности отличий ряда показателей между группами больных является их внутригрупповая вариативность

3.4 Характеристика структурообразующих свойств плазмы крови больных ХБП

Фация плазмы крови здорового человека характеризуется типичным строением (рисунок 17).

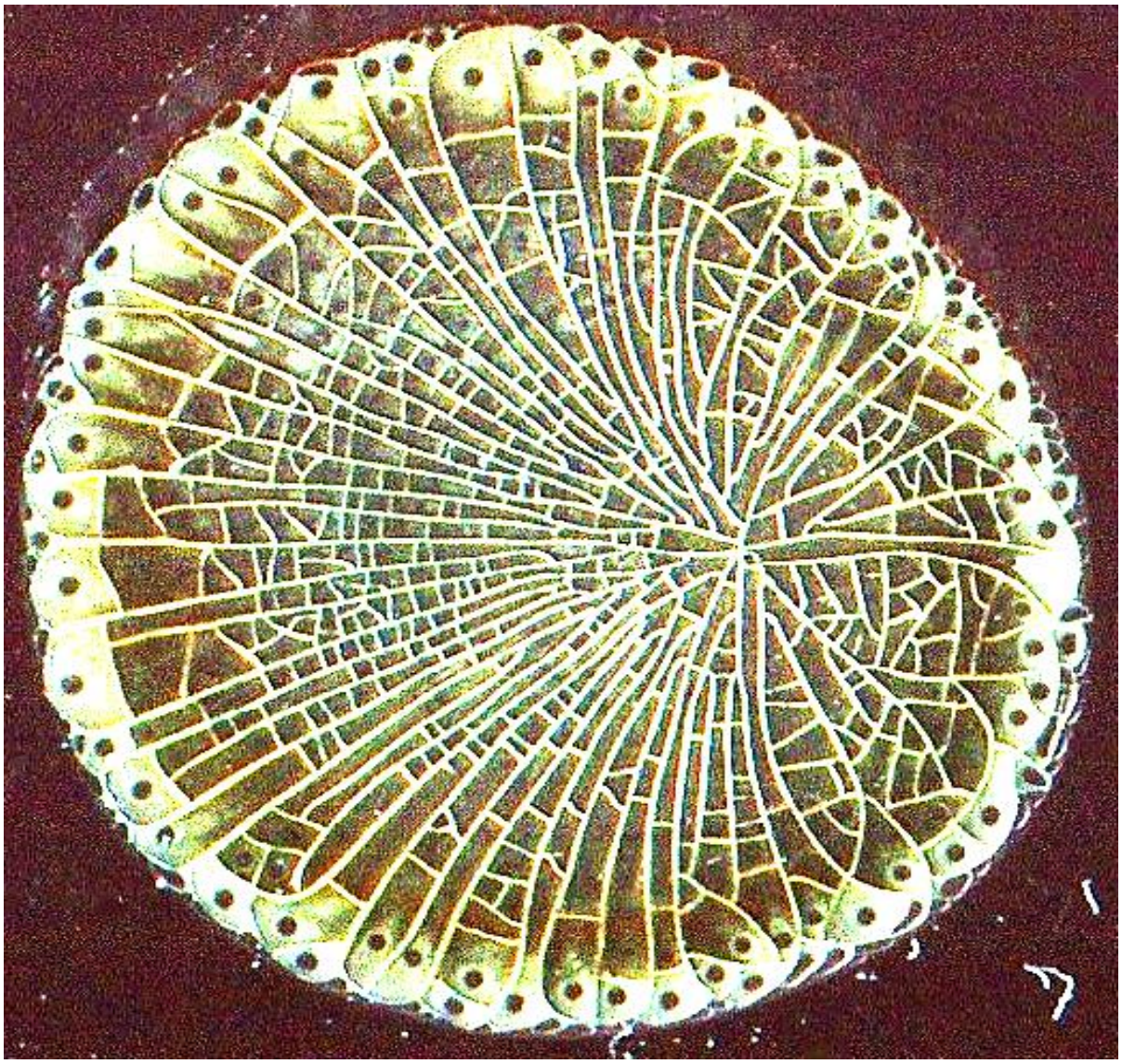


Рисунок 17 – Типичная фация плазмы крови здорового человека

В тезиограмме плазмы крови присутствуют: А) краевая (внешняя, периферическая, В) промежуточная (переходная, средняя) зона и С) центральная (внутренняя) зона. Морфологически фации плазмы крови здоровых людей характеризуются: выраженной краевой очерченностью, радиальным типом растрескивания, высокой густотой растрескивания и мелкими конкрециями округлой формы, равномерно распределенными по всей

площади фации. Атипичные конкреции, аморфные участки и патологические структуры в структуре фаций плазмы крови здоровых людей не формируются.

Особенности структур фаций плазмы крови больных с ХБП 1 стадии (группа 1)

В ходе изучения структуропостроения фаций плазмы крови у больных данной группы выявлено 6 морфотипов тезиограмм.

Частота встречаемости тезиограмм с морфотипом 1.1 (рисунок 18) составила 72,1%.

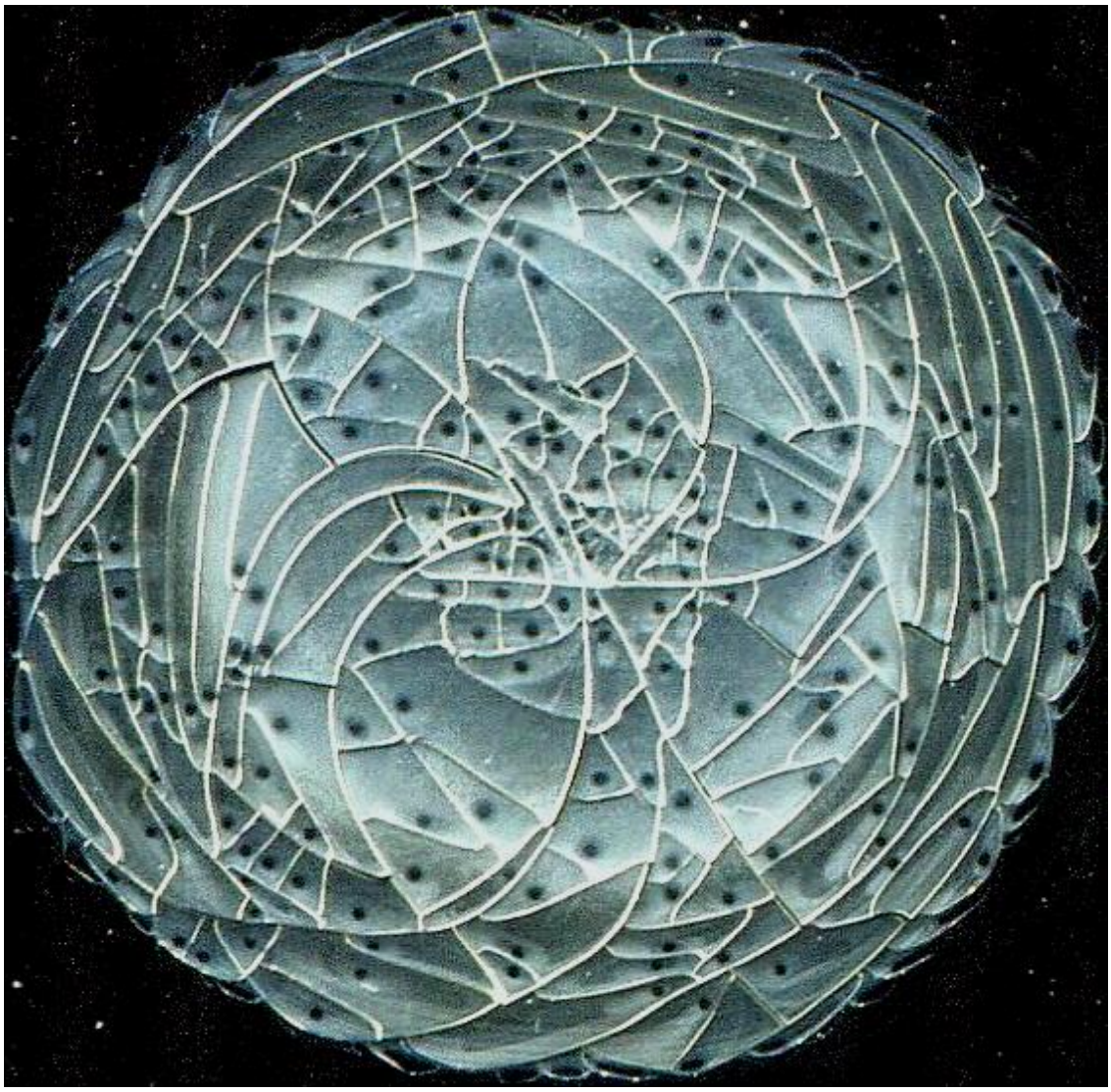


Рисунок 18 – Морфотип 1.1 фации плазмы крови больных с ХБП 1 стадии

Особенности формирования фации плазмы крови у этих больных охватывали в основном системные характеристики, при отсутствии подсистемных нарушений. Сохранена зональность формирования фации – сформированы три зоны: центральная, промежуточная и периферическая, при этом площадь периферической зоны увеличена по сравнению с контрольными показателями. Симметричность растрескивания резко снижена, хотя есть сохранение общего рисунка формирования фации. Густота растрескивания

также снижена, формирование первичных отдельностей происходит не радиально, как в контрольной группе, а дугообразно, преимущественно вдоль окружности фации. Сохраняется количество и форма конкреций с небольшим их перераспределением из периферической зоны в центральную. Подсистемные нарушения в виде сформированных патологических структур отсутствуют.

Частота встречаемости тезиограмм с морфотипом 1.2 составила 9,3%. Особенности формирования фации плазмы крови у этих больных охватывали в основном системные характеристики, при отсутствии подсистемных нарушений. При этом выявлялись особенности формирования фации, отличающие данный морфотип тезиограмм. К таким изменениям относятся уменьшение количества и размеров конкреций, условно радиальный тип растрескивания с резким снижением густоты растрескивания фации и порядка ветвления (рисунок 19).

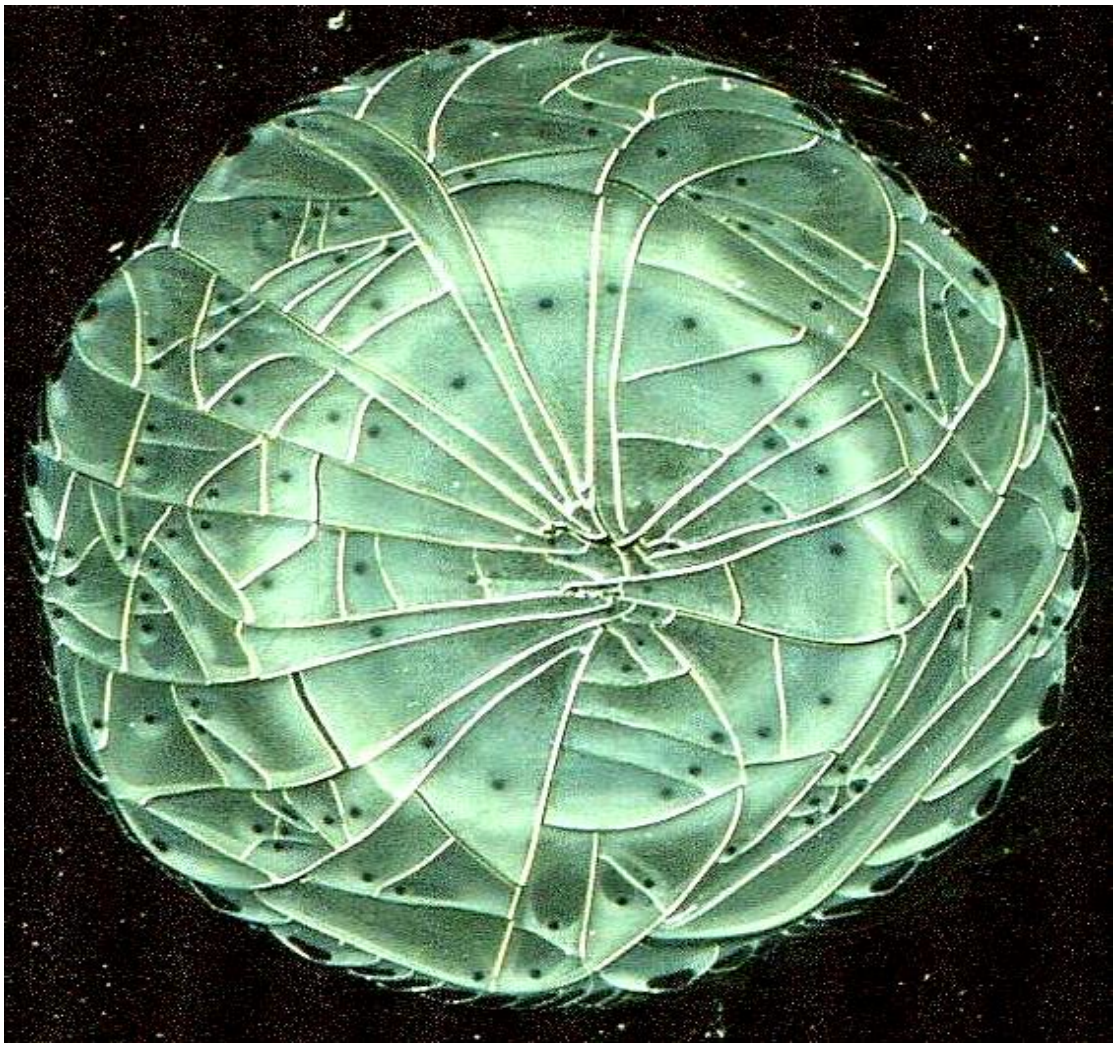


Рисунок 19 – Морфотип 1.2 фации плазмы крови больных с ХБП 1 стадии

В целом особенности структуры фаций с морфотипом 1.2 может свидетельствовать о большей онкотической активности в плазме крови по сравнению с данными контрольной группы.

Частота встречаемости тезиограмм с морфотипом 1.3 составила 6,9%. В тезиограммах данного типа сохранена зональность формирования фации – выделяются центральная, периферическая и промежуточная зоны, но краевая очерченность зон менее выражена, чем в фациях с морфитипами 1.1 и 1.2. Густота растрескивания резко снижена, формирование первичных отдельностей происходит преимущественно дугообразно вдоль окружности фации. В центральной зоне характер растрескивания хаотический, густота растрескивания выше, чем в периферической зоне. Конкреции крупные и неправильной формы, расположены хаотично, преимущественно в центральной зоне фации, при этом их число резко снижено по сравнению с другими морфотипами в данной группе больных. Конкреции характеризуются атипичностью в форме и размерах, так как встречаются как точечные, так и крупные конкреции, как округлой формы, так и палочковидной форм (рисунок 20).

Рисунок 20 – Морфотип 1.3 фации плазмы крови больных с ХБП 1 стадии

В целом, можно представить морфотипы 1.1, 1.2 и 1.3 как отражение однотипных динамических изменений в крови пациентов с ХБП 1. В этом случае мы можем предположить, что изменений химического состава плазмы крови при ХБП 1 приводит к формированию морфотипа 1.1, который при прогрессировании этих изменений будет приобретать характеристики морфотипа 1.2, а затем морфотипа 1.3. При этом клинически картина так и будет соответствовать ХБП 1.

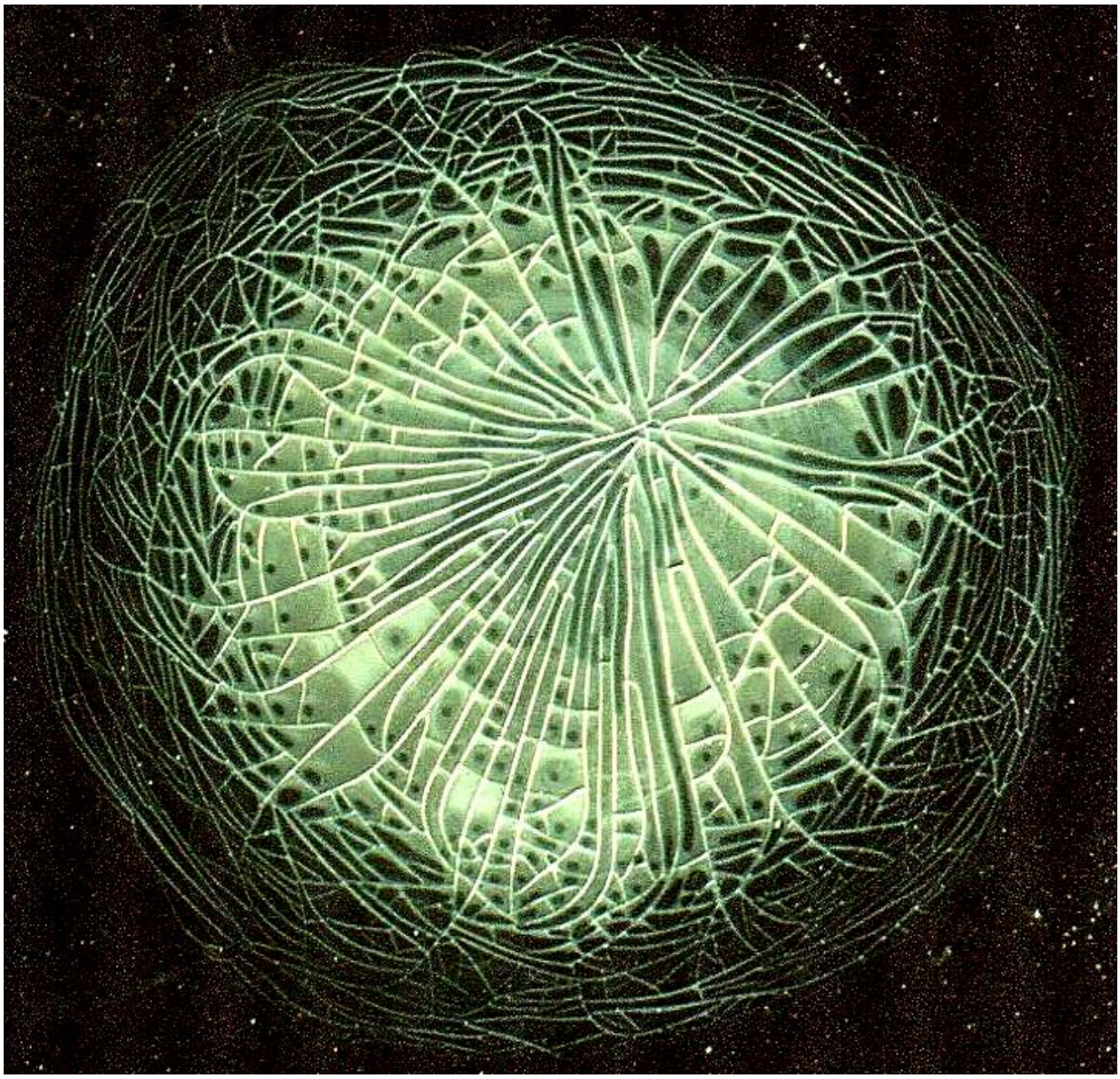


Рисунок 21 – Морфотип 1.4 фации плазмы крови больных с ХБП 1 стадии

Частота встречаемости тезиограмм с морфотипом 1.4 (рисунок 21) составила 6,9% больных группы 1. Особенности морфологической картины этого морфотипа тезиограмм включают в себя как изменения системных характеристик фации, так и подсистемные нарушения. В целом сохранена зональность формирования фации, то есть различаются краевая, центральная и промежуточная зоны, хотя границы между ними менее выражены, чем в

фациях плазмы крови контрольной группы. При сохранении симметричности и радиального характера растрескивания, наблюдается высокий порядок ветвления. Степень растрескивания меняется в зависимости от зоны фации – более низкая в центральной зоне и более высокая в периферической. Количество правильных конкреций – среднее (локализуются преимущественно в промежуточной и центральной зонах), при этом в краевой зоне очень больное число «пустых» отдельностей. К подсистемным нарушениям относится формирование атипичных конкреций в промежуточной и краевой зоне фации.

Частота встречаемости тезиограмм с морфотипом 1.5 (рисунок 22) составила 2,3% больных группы 1.

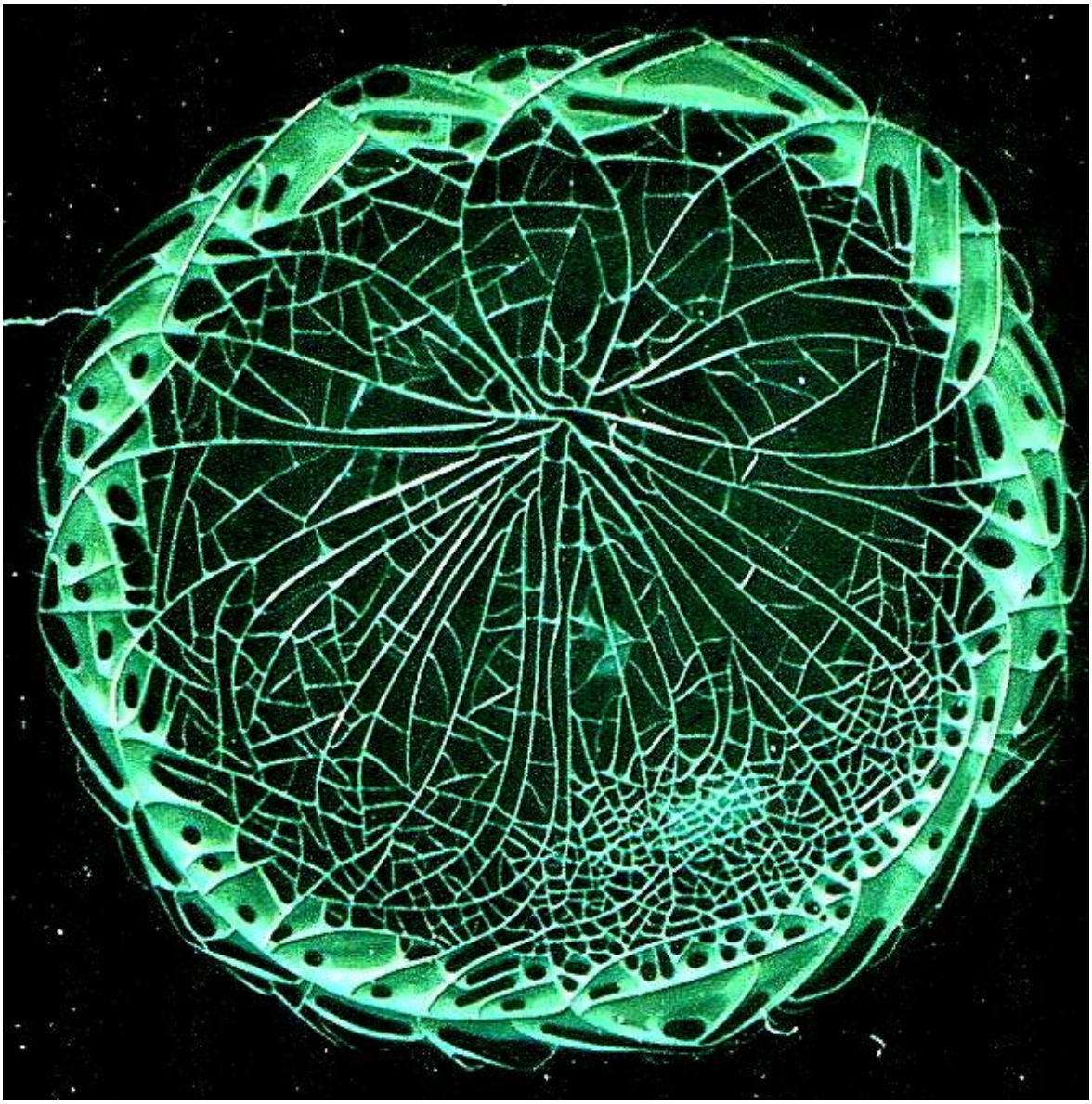


Рисунок 22 – Морфотип 1.5 фации плазмы крови больных группы с ХБП 1 стадии

В фации с морфотипом 1.5 отмечалось нарушение зональности формирования – полностью отсутствовала промежуточная зона.

Симметричность и радиальный характер растрескивания в целом сохранены, но отмечается наличие участков с хаотичным характером растрескивания (преимущественно на границе центральной и краевой зон фации). Вся центральная зона фации сформирована «пустыми» отдельностями. В краевой зоне отмечается формирование атипичных конкреций.

Частота встречаемости тезиограмм с морфотипом 1.6 составила 2,3% больных группы 1. По параметрам структуропостроения фаций можно выделить характерные особенности морфотипа 1.6 (рисунок 23).

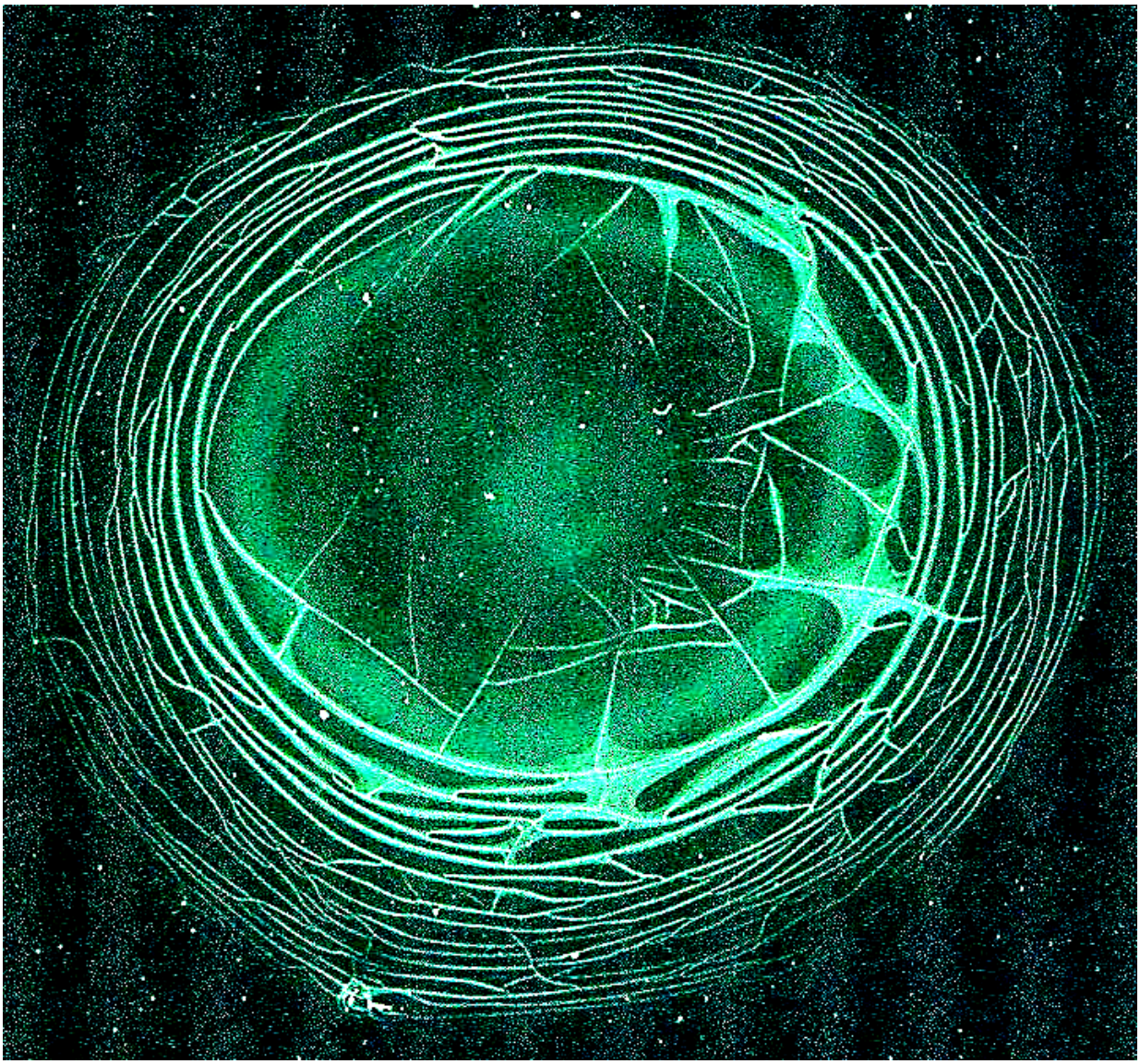


Рисунок 23 – Морфотип 1.6 фации плазмы крови больных ХБП 1 стадии

Морфотип 1.6 характеризуется полным отсутствием сохранения параметров формирования нормальной тезиограммы плазмы крови. Нет четкого разделения фации на зоны, хотя в центре сформирована обширная аморфная область ее нельзя считать полноценной центральной зоной фации. Характер растрескивания полностью замещен на дугообразный вдоль окружности фации, радиальная симметричность отсутствует.

В краевых отдельностях формируются патологические «листовидные структуры». Причиной формирования таких структур считается нарушение соотношения белкового и солевого компонентов в плазме крови

В целом, можно представить морфотипы 1.4, 1.5 и 1.6 как отражение однонаправленных динамических изменений в крови пациентов с ХБП 1. При таком рассмотрении процесса мы можем предположить, что изначальные изменения химического состава крови привели к формированию морфотипа 1.4, прогрессирование этих изменений способствовало появлению характеристик морфотипа 1.5, а затем и 1.6.

Таким образом, при оценке общей картины формирования морфотипов тезиограмм плазмы крови у больных можно выделить два основных направления характеризующие изменения в плазме крови больных с ХБП 1.

Первый тип изменений (морфотипы 1.1, 1.2, 1.3) характеризуется прогрессирующей онкотической активностью плазмы крови при снижении количества свободных осмотически активных веществ. Такой тип метаболических изменений был характерен для 88 % больных с ХБП1. При этом мы отмечаем частичное нарушение онкотической активности белков в исходе этого процесса, что характеризуется увеличением и расположением конкреций в фациях плазмы крови с морфотипом 1.3.

Второе направление изменений (морфотипы 1.4, 1.5, 1.6) связано с увеличением количества свободных осмотически активных веществ либо вследствие неспособности белков их связывать (нарушение структуры белков плазмы крови), либо вследствие изменения соотношения между выбросом веществ в кровь и их элиминаций (нарушение регуляции водно-волевого обмена). Большое количество свободных осмотически активных веществ документируется характером формирования отдельностей фации и изменением количества, формы и размера конкреций. Такой тип метаболических изменений был характерен для 12% больных с ХБП1.

Также отмечая динамическую структуру изменений морфотипов тезиограмм плазмы крови больных с ХБП 1 не следует упускать из виду возможность «слияния» двух типов изменений в результирующих стадиях – морфотипы 1.3 и 1.6 имеют много общих характеристик, позволяющих предположить высокую вероятность взаимного перехода.

Изучение особенностей структуропостроения плазмы крови методом клиновидной дегидратации у больных с ХПБ 2 стадии позволило выявить 2 основных разновидности морфотипов фаций плазмы крови (рисунки 24, 25).

Рисунок 24 – Морфотип 2.1 фации плазмы крови больных с ХБП 1 стадии

Частота встречаемости тезиограмм с морфотипом 2.1 в группе 2 составила 83,3%. Особенности формирования фации плазмы крови у этих больных охватывали в основном системные характеристики, при отсутствии подсистемных нарушений. Сохранена зональность формирования фации – сформированы три зоны: центральная, промежуточная и периферическая, при этом площадь периферической зоны увеличена по сравнению с контрольными показателями. Симметричность растрескивания не выражена, есть сохранение общего радиального рисунка формирования фации. Густота растрескивания также снижена. Отмечается наличие большого количества конкреций по всей площади фации с перераспределением из периферической зоны в центральную. Конкреции нормальной формы, но увеличены в размерах по сравнению с контрольными показателями.

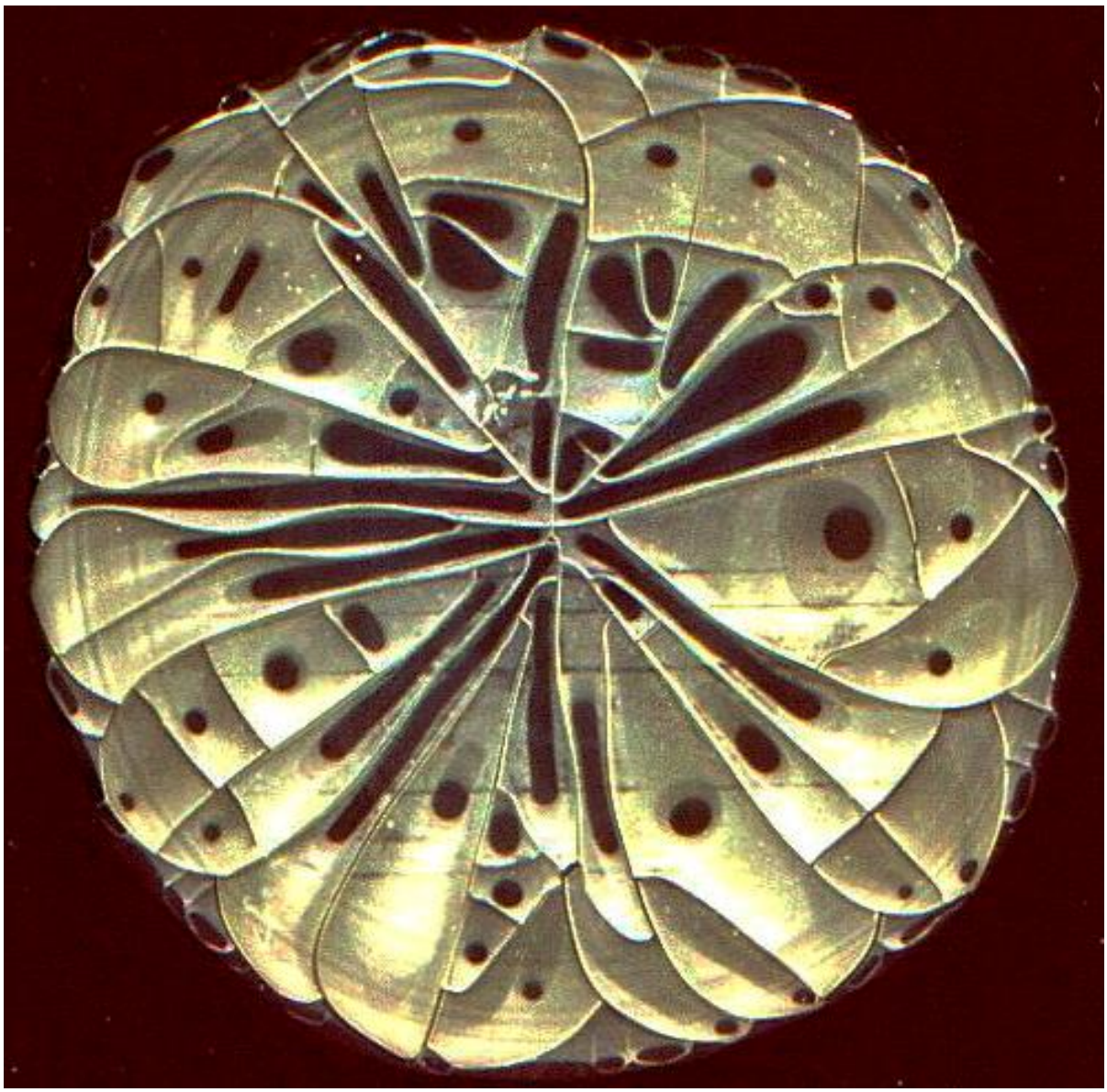


Рисунок 25 – Морфотип 2.2 фации плазмы крови больных с ХБП 2 стадии

Частота встречаемости тезиограмм с морфотипом 2.2 в группе 2 составила 16,7%.

В тезиограммах с морфотипом 2.2 наблюдалось нарушение зональности формирования фаций – в фациях плазмы крови больных данной группы выявлялось только две зоны (краевая и центральная). Характер растрескивания преимущественно хаотический, хотя первичные трещины сохраняют радиальность. По периферии характер растрескивания становился хаотическим, с формирование узких дугообразных аморфных отдельностей. Густота растрескивания снижена по сравнению с контрольными характеристиками, но выше, чем в фациях плазмы крови больных группы 1, имеющих морфотип 1.2 и 1.3. Количество конкреций снижено, отмечается наличие крупных конкреций атипичной формы, основная часть которых сосредоточена в центральной зоне фации.

Сравнивая морфотипы тезиограмм плазмы крови больных групп 1 и 2 можно выделить общие особенности структуропостроения фаций. Так, тезиограммы плазмы крови больных группы 2 с морфотипом 2.1 сформированы по тем же механизмам, что и тезиограммы плазмы крови больных группы 1 с морфотипами 1.1, 1.2 и 1.3, с учетом динамики изменений вследствие ухудшения клинической и биохимической картины (динамический тип I). В свою очередь, тезиограммы плазмы крови больных группы 2 с морфотипом 2.2 сформированы по тем же механизмам, что и тезиограммы плазмы крови больных группы 1 с морфотипами 1.4, 1.5 и 1.6, с учетом динамики развития заболевания (динамический тип II).

Таким образом, мы можем предположить, что несмотря на общность клинических проявлений можно выделить два условно обособленных тренда формирования нарушений в плазме крови больных с ХБП начальных стадий. Учитывая характер изменений формирования морфотипов тезиограмм плазмы крови больных этих групп, можно предположить, что эти различия обусловлены в том числе нарушение структуры белков плазмы крови и их взаимодействием с низкомолекулярными осмотически активными веществами.

В ходе изучения структуропостроения фаций плазмы крови методом клиновидной дегидратации у больных группы 3 с ХБП 2 стадии выявлен общий морфотип тезиограмм (рисунок 26).

В фациях плазмы крови больных данной группы сохранена зональность формирования фации – выделяются три зоны: центральная, промежуточная и периферическая. Характер и густота растрескивания резко отличаются по зонам фации. В центральной зоне формируется большое количество мелких, хаотично расположенных отдельностей, размеры которых увеличиваются по мере приближения к промежуточной зоне фации. В промежуточной зоне отмечается наличие более крупных отдельностей, встречаются аморфные образования, характер растрескивания также хаотичный. На границе промежуточной и периферической зон отмечается формирование дугообразных отдельностей с длинными конкрециями. В периферическая зоне густота растрескивания резко снижена, формирование первичных отдельностей происходит преимущественно дугообразно вдоль окружности фации, при этом сохраняется хаотичный характер растрескивания.

В целом, особенности структуропостроения фаций плазмы крови больных группы 3 позволили выявить компоненты, характерные как для тезиограмм динамического типа I, так и для тезиограмм динамического типа II. Такое «объединение» может быть обусловлено тем, что на этой стадии на первое место выходят нарушения состава плазмы крови, обусловленные присоединением ХПН, что нивелирует индивидуальные проявления влияния первичных механизмов ее развития.

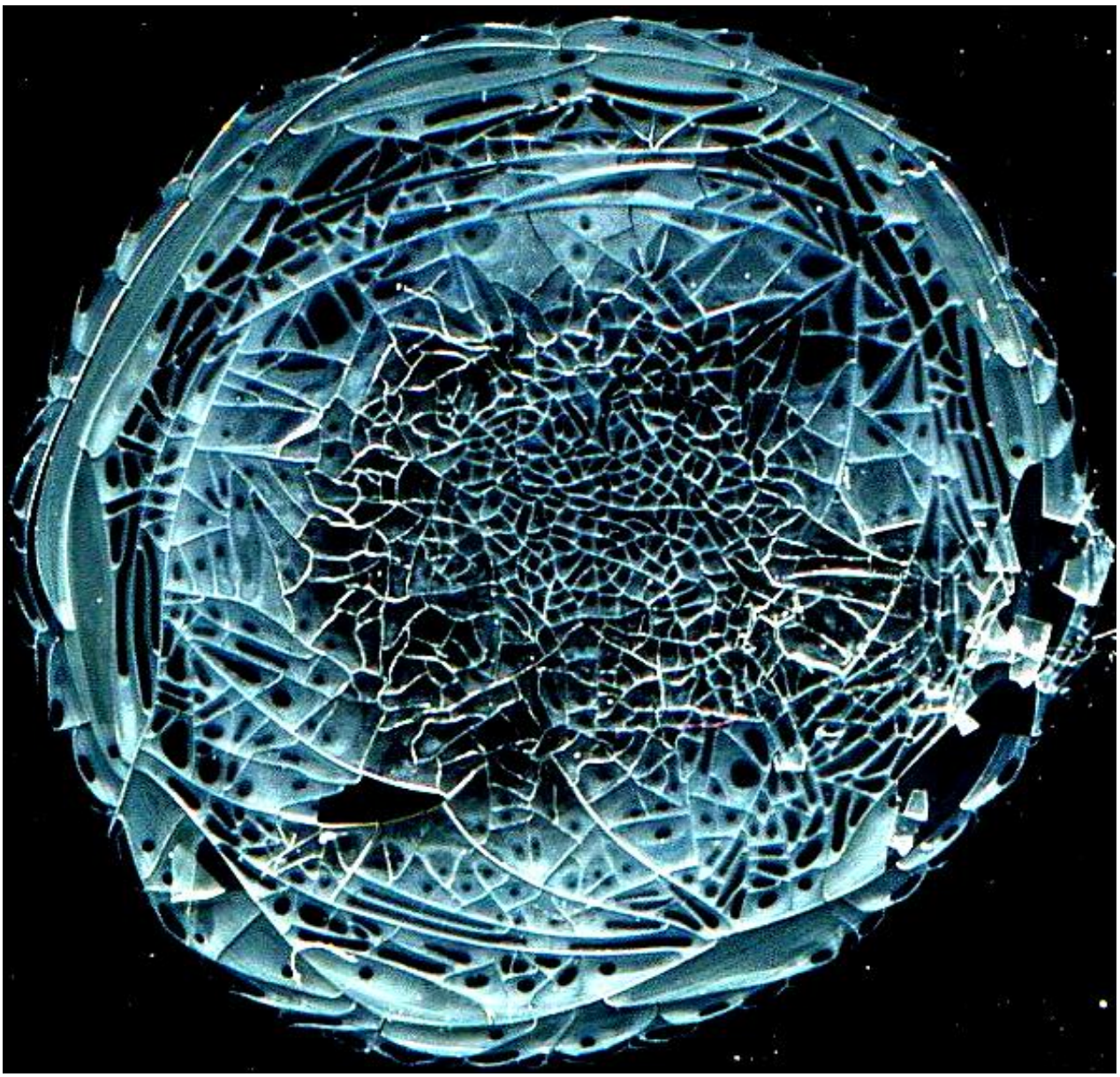


Рисунок 26 – Фация плазмы крови больных группы с ХПБ 3 стадии

В ходе изучения структуропостроения фаций плазмы крови больных с ХБП 4 методом клиновидной дегидратации выявлен один общий морфотип тезиограмм.

Особенности структуропостроения фаций плазмы крови больных с ХБП 4 стадии (группа 4) касались как системных характеристик морфотипов фаций, так и подсистемных структур (рисунок 27).

Наблюдалось нарушение зональности формирования фаций – в фациях плазмы крови больных данной группы выявлялось только две зоны (краевая и центральная). Площадь краевой зоны увеличена по сравнению с контрольными значениями. Характер растрескивания радиальный (центральная зона) с переходом в хаотический (краевая зона). В центральной зоне фации большое количество крупных, атипичных конкреций. Практически вся центральная зона представлена «пустыми» отдельностями, объем заполнения которых

увеличивается по мере приближения к краевой зоне фации. В краевой зоне большое количество обычно расположенных мелких конкреций. На некоторых участках краевой зоны отмечается формирование морщинистых структур, которые представляют собой особые концентрационные волны из белково-пептидных и белково-аминокислотных агрегатов и способны характеризовать их избыток [125.]

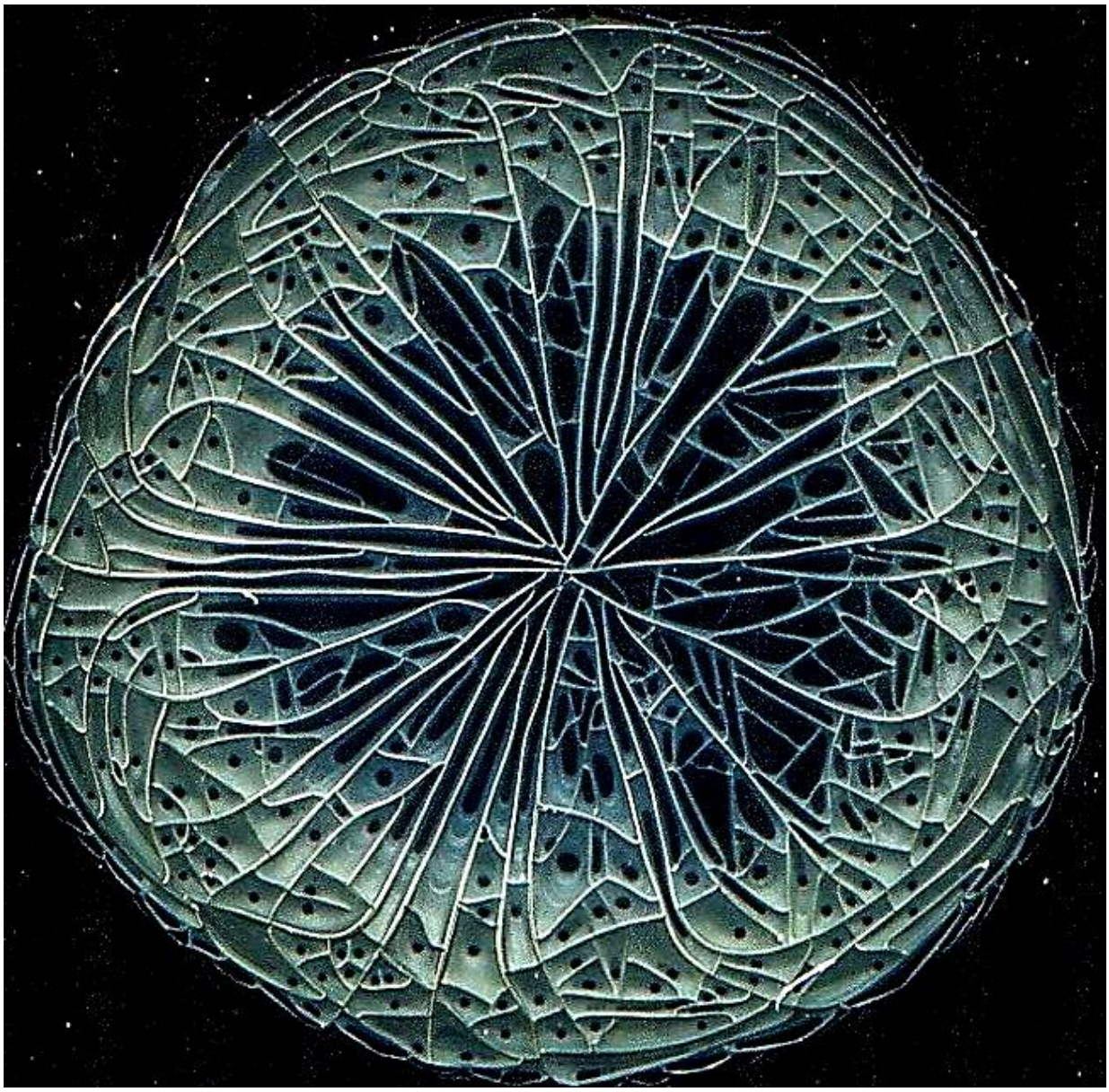


Рисунок 27 – Фация плазмы крови больных группы с ХБП 4 стадии

В целом морфотип фаций плазмы крови больных группы 4 характеризуется высокой степенью симметричности, что может свидетельствовать о более стабильном характере взаимодействия и связывания компонентов плазмы крови больных данной группы в сравнении с группами 2 и 3.

Увеличение краевой зоны может свидетельствовать об сдвиге соотношения осмотического и онкотического компонента связывания растворителя в сторону второго. При этом, формирование больших атипичных конкреций в центральной зоне фации, напротив свидетельствует о большом количестве свободных низкомолекулярных осмотически активных веществ (ионы, глюкоза и т.д.). Такое кажущееся противоречие объясняется изменением силы связывания белков и ионов (например, вследствие модификации белков плазмы крови). В этом случае в начале процесса дегидратации белки могут образовывать комплексы, удерживающие воду, что приводит к увеличению площади краевой зоны, а уже в центре фации, при более низком содержании воды, белкам не «хватает сил» для удержания ионов, которые высвобождаются, что приводит к оттеснению белковых молекул на периферию. Этот же процесс может привести и к формированию «морщинистых структур» на границе между краевой и центральной зонами.

Согласно исследованию В.Н. Шабалина и С.Н. Шатохиной [124], в образовании «морщин» принимает участие высокомолекулярный белок плазмы крови – альбумин, который подвергся денатурации. С нашей точки зрения, о денатурации в этом случае говорить преждевременно, но налицо нарушение как структуры, так и функциональной активности белков плазмы крови. В этом случае, более корректно говорить о преобладании окисленной форм белков.

Таким образом, несмотря на то, что в фациях плазмы крови больных с ХБП 4 стадии отмечается больше симметричности и организованности структуры, это нельзя считать признаком улучшения состояния и стабилизации состава плазмы крови этих больных.

В ходе изучения характера структуропостроения фаций плазмы крови методом клиновидной дегидратации у больных с ХБП 5 стадии выявлены два морфотипа тезиограмм.

Частота встречаемости тезиограмм плазмы крови с морфотипом 1 среди пациентов группы 5 составила 70% (рисунок 28).

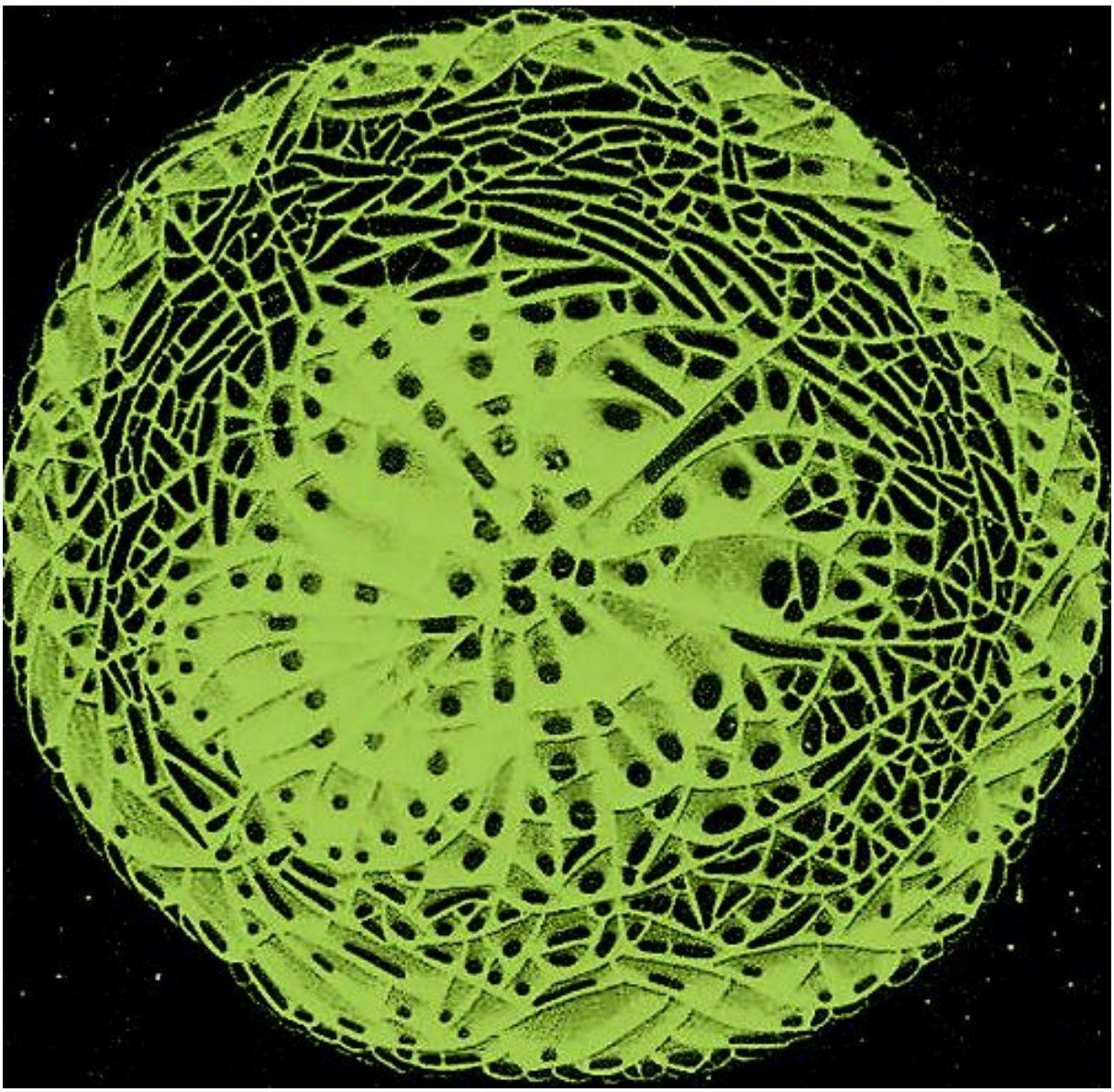


Рисунок 28 – Морфотип 5.1 фации плазмы крови больных с ХПБ 5 стадии

В фациях с морфотипом 5.1 сохранена зональность формирования фации – выделяются три зоны: центральная, промежуточная и периферическая. Характер растрескивания смешанный – близкий к радиальному в центральной зоне фации и хаотический на периферии. Центральная зона фации представлена крупными отдельностями с выраженными округлыми конкрециями по центру. В промежуточной зоне определяется большое число конкреций разной формы и размеров, а также «пустых» отдельностей, дугообразно расположенных вдоль линии окружности фации. Периферическая зона представлена линией отдельностей среднего размера с небольшим количеством мелких конкреций и аморфными областями.

Такие изменения характера структуропостроения фаций плазмы крови могут свидетельствовать об изменении количество осмотически активных веществ в плазме крови и их способности сорбироваться на белках, что приводит к нарушению механизмов поддержания их концентрации в крови.

Частота встречаемости тезиограмм плазмы крови с морфотипом 5.2 среди пациентов группы 5 составила 30% (Рисунок 29.)

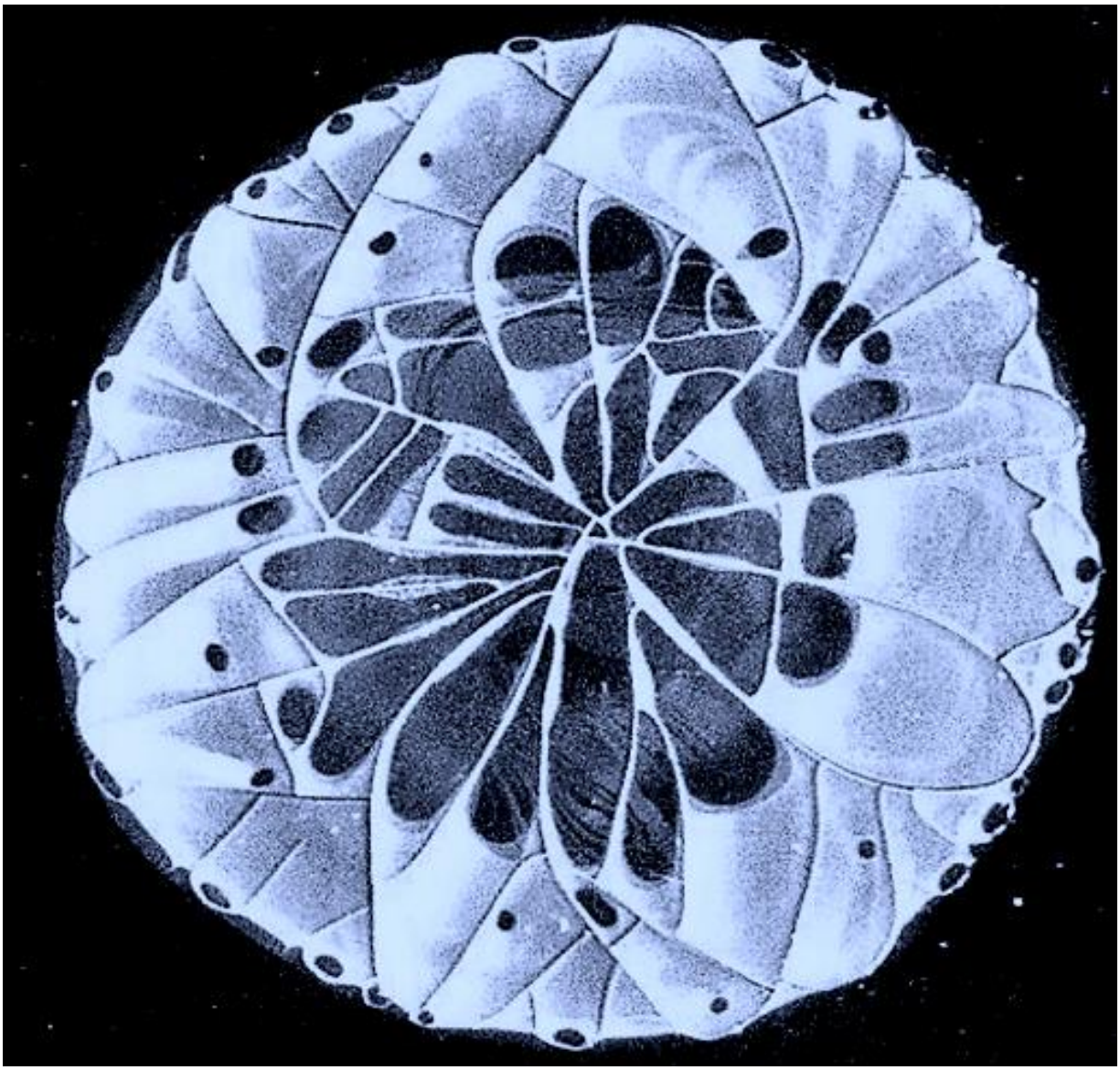


Рисунок 29 – Морфотип 5.2 фации плазмы крови больных группы с ХБП 5 стадии

Особенности формирования фации плазмы крови у этих больных охватывали в основном системные характеристики, при отсутствии подсистемных нарушений. При этом выявлялись особенности формирования фации, отличающие данный морфотип тезиограмм. Зональность формирования фации нарушена – выделяется только две зоны, краевая и центральная. Площадь краевой зоны увеличена по сравнению с контрольными значениями. Характер растрескивания хаотический, но близкий к радиальному. Центральная зона занята крупными отдельностями с огромными конкрециями атипичной формы. Краевая зона, в свою очередь, представлена большими аморфными областями и небольшим количеством отдельностей с округлыми конкрециями

по краю фации. Отмечалось наличие «морщинистых» структур в отдельностях краевой и центральной зон.

Изучение особенностей структуропостроения плазмы крови методом клиновидной дегидратации у больных группы 5 позволило выявить два типа формирования фаций плазмы крови.

В целом, изменения структуропостроения плазмы крови в фациях с морфотипом 5.2 можно расценить, как динамический переход от морфотипа фаций плазмы крови больных группы 4, так как в данном случае фиксируются нарушения того же характера, но более выраженные. Следовательно, можно предположить, что формирование фаций плазмы крови больных с ХБП 5 происходит в двух вариантах условий. Один вариант предполагает динамическое увеличение влияния тех же негативных факторов, которые фиксируются у больных группы 4, без наличия дополнительных факторов воздействия (морфотип 5.2). Второй вариант формирования предполагает, что кроме основных механизмов нарушения взаимодействия компонентов плазмы крови, которые были обозначены как для больных группы 3, так и для больных группы 4, задействуются дополнительные механизмы, приводящие к появлению новых вариантов формирования фаций плазмы крови (морфотип 5.1).

Учитывая условно положительные особенности формирования структуры морфотипа 1 (характер растрескивания, формирования отдельностей и расположения конкреций), можно предположить, что в данной подгруппе превалирует влияние механизмов, направленных на репарацию нарушений, или уменьшения действия повреждающих факторов.

Оценка общей картины изменений структурообразующих свойств в плазме крови больных с ХБП различных стадий позволила сформировать рабочую гипотезу, отражающую динамику изменений взаимодействия активных компонентов плазмы крови у этих больных.

Нами было выявлено несколько ключевых параметров, которые легли в основу данной гипотезы:

– Прослеживается четкая динамическая взаимосвязь между характеристиками тезиограмм разных групп (формируются динамические паттерны изменений).

– Зафиксированные изменения характера формирования тезиограмм позволяют определить вовлеченность разных компонентов плазмы крови в патологический процесс.

– При увеличении степени тяжести ХБП происходит уменьшение количества вариантов формирования тезиограмм и формируется однотипный паттерн фации.

– У больных с ХБП 5 стадии с терминальной ХПН формируются 2 паттерна фаций, что может быть обусловлено различным характером ответа на процедуру гемодиализа.

ХБП является заболеванием многофакторным и полиэтиологическим, что подразумевает различие механизмов и метаболических изменений,

отражающихся на уровне плазмы крови, при начальных стадиях заболевания. В наших исследованиях это документировалось наличием нескольких типов морфотипов тезиограмм плазмы крови у больных ХБП 1 стадии. Несмотря на столь выраженное многообразие вариантов тезиограмм, можно выделить два основных направления характеризующих различные изменения характера взаимодействия компонентов плазмы крови. Первый тип изменений (морфотипы 1.1, 1.2, 1.3) обусловлен прогрессирующим увеличением онкотической активности плазмы крови. Второе направление изменений (морфотипы 1.4, 1.5, 1.6) связано с увеличением количества свободных осмотически активных веществ, что документируется характером формирования отдельностей фации и изменением количества, формы и размера конкреций. Следует отметить, что частота встречаемости изменений, характерных для первого типа, среди больных ХБП 1 стадии была существенно выше (88% от общего количества больных в группе). Этот факт позволяет предположить, что при развитии ХБП на начальных стадиях основные нарушения будут связаны с белковым компонентом плазмы крови, с вторичным вовлечением осмотического компонента.

Анализ тезиограмм плазмы крови больных с ХБП 2 стадии позволил подтвердить предположение о динамическом характере изменений, происходящий в крови больных с ХБП. Было выделено два основных направления изменений, которые биохимически являлись продолжением изменений, характерных для больных ХБП 1 стадии. Это позволило выделить два динамических типа. Динамический тип I сформирован по тем же механизмам, что и фации плазмы крови больных ХБП 1 стадии (морфотипы 1.1-1.3). Динамический тип II фаций плазмы крови больных ХБП 2 стадии сформирован по тем же механизмам, что и у больных ХБП 1 стадии (морфотипы 1.4 – 1.6).

При этом сохраняется тенденция по частоте встречаемости таких типов изменений по всей популяции больных с ХБП начальных стадий. Так, динамический тип I наблюдался у 85% больных с ХБП 1 и 2, а динамический тип II – только у 15%.

Следовательно, несмотря на общность клинических проявлений можно выделить два условно обособленных тренда формирования нарушений в плазме крови больных с ХБП начальных стадий. Учитывая характер изменений формирования паттернов тезиограмм плазмы крови больных этих групп, можно объяснить эти различия нарушением структуры белков плазмы крови и их взаимодействием с низкомолекулярными осмотически активными веществами.

В свою очередь не следует упускать из вида тот факт, что изменения содержания низкомолекулярных веществ и изменения структуры и функциональной активности белков требуют разного количества времени, что влечет за собой разную скорость прогрессирования изменений и разный ответ на проводимую коррекцию. Исходя из этого параметра, динамический тип I представляется более консервативным (медленнее прогрессирующий, но и более стойкий к проводимой коррекции), а динамический тип II – более

лабильный, то есть быстро изменяющийся, но относительно легко поддающийся коррекции.

Сравнение «результирующих» морфотипов (1.3, 1.6, 2.1 и 2.2) позволило выявить ряд характеристик, которые позволяют предположить возможность развития однонаправленных изменений, характеризующихся одним типом нарушений взаимодействия компонентов плазмы крови больных с ХБП. Исходя из этого, следует рассматривать возможность того, что оба динамических типа изменений, которые зафиксированы в тезиограммах плазмы крови больных с ХБП 1 и 2 стадий могут привести к схожим последствиям в итоге заболевания. Такое предположение подтверждается тем, что анализ особенностей структуропостроения фаций плазмы крови больных ХБП3 и ХБП4 позволили выявить только один морфотип для каждой группы больных, в котором выявлялись компоненты характерные как для тезиограмм динамического типа I, так и для тезиограмм динамического типа II с учетом прогрессирования нарушений. В свою очередь, нарушения, приводящие к формированию морфотипа, характерного для ХБП4 рассматриваются, как динамическое продолжение нарушений, зафиксированных при формировании морфотипа, характерного для ХБП 3. Такое «объединение» может быть обусловлено тем, что на этой стадии на первое место выходят нарушения состава плазмы крови, обусловленные присоединением ХПН, что нивелирует индивидуальные проявления влияния первичных механизмов ее развития.

Таким образом, анализ динамической структуры паттернов плазмы крови больных с ХБП позволяет проследить характер изменений в крови этих больных в процессе прогрессирования заболевания, а также предположить характер имеющихся нарушений биохимического состава плазмы крови, скорость их прогрессирования и возможность коррекции.

Характер формирования фаций плазмы крови больных ХБП 5 вновь позволил выявить дополнительный морфотип, не характерный для основной массы больных. По нашему мнению, данный факт не является противоречащим выдвинутой гипотезе, а служит отражением дополнительных изменений, появляющихся на стадии терминальной ХПН, характерной для ХБП 5. Анализируя характер зафиксированных изменений и сравнивая их с трендом динамических изменений в плазме крови больных ХБП более ранних стадий мы предполагаем, что основная группа больных ХБП 5 (морфотип 5.1, 70% больных) находится в условиях, предполагающих воздействие механизмов коррекции и частичной репарации метаболических нарушений. Такое предположение основано на замедлении прогрессирования нарушений, зафиксированных в тезиограммах плазмы крови, а также, появлении компонентов, позволяющих предположить частичную нормлизацию процессов в плазме крови этих больных (количество и форма конкреций, частичное восстановление симметричности растрескивания и т.д.). В свою очередь, при анализе тезиограмм второй группы больных с ХБП5 (морфотип 5.2, 30% больных) таких изменений выявлено не было. Анализ изменений структуропостроения тезиограмм плазмы крови этих больных не позволил

выявить наличие каких-либо стабилизирующих или корректирующих механизмов. Нарушения структурообразующих свойств плазмы крови этих больных показали дальнейшее прогрессирование негативных изменений в плазме крови с ухудшением динамики относительно показателей больных с ХБП более ранних стадий. Следует отметить, что у больных с ХБП5 не было выявлено зависимости формирования определенного морфотипа тезиограмм от проводимого гемодиализа. Таким образом, можно предположить, что прогноз течения заболевания и эффективности проводимого гемодиализа у больных с морфотипом тезиограмм плазмы крови 5.2 будет более негативным, чем у больных с морфотипом тезиограмм плазмы крови 5.2. Данная тенденция может быть связана как с особенностями течения заболевания у этих больных, так и с особенностями проводимого лечения, что требует более детального изучения в дальнейших исследованиях.

3.5 Определение молекулярно-клеточных паттернов, характерных для различных стадий хронической болезни почек

ХБП - это глобальная медицинская проблема, её распространенность в популяции составляет 10-15%. Социально-экономические последствия ХБП связаны с высокими затратами на лечение, утратой больными трудоспособности и смертностью от сердечно-сосудистых заболеваний и терминальной почечной недостаточности [154].

Лечение ХБП и предотвращение развития её прогрессирования и осложнений требует решения комплекса клинических задач, включая контроль и коррекцию обменных нарушений. Метаболические нарушения манифестируют уже на ранних стадиях ХБП и, в свою очередь, вносят вклад в её прогрессирование и формирование осложнений ХПН, таких как терминальная почечная недостаточность, сердечно-сосудистые заболевания и т.д. На ранних стадиях ХПН установлено нарушение метаболизма липидов, развитие гиперурикемии, на 3 и 4 стадиях ХПН - фосфатно-кальциевого обмена, обмена железа и присоединение инсулинорезистентности [23, с.56; 155].

Пациенты с ХБП характеризуются большой неоднородностью по своему прогнозу. У одних больных ХБП через несколько лет приводит к развитию терминальной почечной недостаточности, у других ХБП протекает без развития хронической почечной недостаточности [23, с.61].

Все эти положения в комплексе требуют расширения исследования тех молекулярных нарушений, которые вовлечены в прогрессирование ХБП. Кроме того, исследования в этом направлении позволят определить дополнительные маркеры прогрессирования ХБП.

Как уже указывалось ранее, одним из метаболических расстройств при ХБП является развитие гиперурикемии. Накопление мочевой кислоты, обусловленное снижением её экскреции почками, вызывает нарушение почечной гемодинамики и повреждение интерстиция почек [156].

В наших исследованиях наряду с нарастанием уровня мочевой кислоты по мере прогрессирования ХБП наблюдался последовательный рост содержания внеклеточных пуриновых оснований в интермедиатов пуринового катаболизма (ксантина и гипоксантина) в плазме крови больных.

В числе факторов, обуславливающих внеклеточную аккумуляцию пуриновых оснований и продуктов их катаболизма, рассматривают клеточные повреждения, гипоксию, воспаление и стресс. Определенный вклад в увеличение пула внеклеточных пуринов и продуктов их катаболизма может вносить и усиленная деградация внеклеточных нуклеиновых кислот, а также нарушение их обратного транспорта в клетки. Основными источниками являются эндотелиоциты, нейтрофилы и макрофаги [157].

Аккумулирующиеся в плазме крови пуриновые основания и продукты их катаболизма индуцируют ряд разных эффектов. Ксантин и гипоксантин индуцируют вазоконстрикцию и повреждение эндотелия [158.].

По нашему мнению, внеклеточный аденин также может оказывать прямой детримальный эффект на клетки почек. Подтверждением корректности этого предположения являются экспериментальные исследования, показавшие способность аденина индуцировать различные повреждения в почках и сердечно-сосудистой системы у крыс [159]. Внеклеточный аденин также определяет уровень внутиэритроцитарной АТФ. Этот эффект наблюдался у больных с хронической почечной недостаточностью, получавших гемодиализ [160].

Следовательно, избыточную аккумуляцию пуриновых нуклеотидов можно рассматривать как самостоятельный патогенетический фактор, определяющий повреждение эндотелия, дезорганизацию метаболических процессов в почках, что способствует прогрессированию хронической болезни почек.

Ранее проведенными исследованиями было показано увеличение вкРНК в крови больных с почечной недостаточностью, а также у пациентов, находящихся на гемодиализе и после трансплантации почки. По мнению авторов данного исследования, циркулирующая РНК может вносить вклад в воспаление и нарушение иммунной системы [161, 162]

Нашими исследованиями показано, что достоверное увеличение вкРНК наблюдается уже в плазме крови больных ХБП 1 и 2 стадий. У больных ХБП 3 и ХБП 4 стадий этот показатель снижался относительно таковых у больных ХБП 1 и 2 стадии, но достоверно превышал контроль. У больных ХБП 5 стадии, получавших гемодиализ, уровень вкРНК повторно возрастает. В тоже время уровень вкДНК достоверно возрастает в плазме крови больных ХБП 2 стадии, сохраняется на высоком уровне в плазме крови больных ХБП 3 и 4 стадий и резко снижается в плазме крови больных ХБП 5 стадии при антибатном росте КРФ.

В кровотоке вкНК могут присутствовать в различных формах: в свободном виде, в комплексе с нуклеосомами, в составе везикул и виртосом (последние представлены ДНК/РНК липопротеиновыми комплексами,

содержащими ДНК, РНК, ДНК и РНК-полимеразы, липопротеины). В плазме крови вкДНК чаще всего представлены в составе нуклеосом. вкРНК чаще ассоциированы с экзосомами, в составе которых они высвобождаются в циркуляцию [162, с.1002].

Основными источниками внеклеточных НК, на наш взгляд, являются активированные фагоциты, клетки эндотелия и нефроциты. Механизмы высвобождения разнообразны. По нашему мнению, у больных ХБП 1 и ХБП 2 основными причинами увеличения вкНК является направленная секреция и апоптоз. Корректность последнего предположения подтверждается исследованиями А.В. Смирнова и соавт. [163]. При прогрессировании ХБП вероятно высвобождение вкНК из некротизированных клеток. Частично вкНК могут попадать в кровь в результате образования внеклеточных нейтрофильных ловушек, что подтверждено нашими собственными исследованиями.

ВкНК индуцируют спектр эффектов. На ранних стадиях ХБП увеличение вкРНК можно рассматривать как одного из аларминов для перестройки межклеточной коммуникации в условиях хронизации патологического процесса. В пользу корректности этого предположения свидетельствует снижение вкРНК в крови больных ХПБ 3 и 4 стадий (при прогрессировании почечной недостаточности).

Аккумуляция вкДНК в плазме крови индуцирует развитие окислительного стресса. Кроме того, вкНК влияют на проницаемость эндотелия, обладают прокоагулянтной активностью, являются участниками воспалительного процесса [86, с.145].

Увеличение уровня катаболитов пуриновых оснований, в частности мочевой кислоты, может индуцировать активацию нейтрофилов, что приводит к формированию внеклеточных нейтрофильных ловушек. Другим индуктором выступают АФК [164]. Появление в циркуляции крупных надмолекулярных образований, что, безусловно, можно рассматривать как прокоагулянтный фактор.

При образовании ВНЛ высвобождение ДНК происходит в комплексе с гистонами. Есть данные о том, что внеклеточные гистоны индуцируют повреждение эндотелиоцитов, особенно сосудов почек, участвуют в пропагации воспаления, подавляют ферментативную деградацию вкДНК [165].

Таким образом, нашими исследованиями показан однонаправленный характер изменения внеклеточных пуриновых оснований и интермедиатов катаболизма пуринов, а также внеклеточных нуклеиновых кислот у больных ХБП различных стадий.

Другим важным патогенетическим механизмом ХБП является окислительный стресс [166].

Нашими исследованиями показано, что превалирующим типом окисленных белков в плазме крови больных ХБП 1-5 стадии являются АОРР, достоверное увеличение которых зафиксировано у больных с ХПН 5 стадии, получающих гемодиализ, тогда как у больных ХБП 3 стадии в дебюте хронической почечной недостаточности накапливаются реактивные

карбониловые производные. В нейтрофилах крови больных ХПБ превалирующим типом окисленных белков являются реактивные карбониловые производные, достоверное увеличение которых также зафиксировано у больных ХБП 3 стадии.

АОРР имеют достаточно высокую тропность к клеткам почек. Действуя через НАДФН – оксидазу, они стимулирую внутриклеточное образование активных форм кислорода в подоцитах, мезангиальных и тубулярных эпителиальных клетках почек [44, с.432, 167]

Также АОРР обладают свойствами активировать нейтрофилы и моноциты [168], что создает условия для генерации АФК.

АОРР имеют достаточно высокую тропность к клеткам почек. Действуя через НАДФН – оксидазу, они стимулирую внутриклеточное образование активных форм кислорода в подоцитах, мезангиальных и тубулярных эпителиальных клетках почек [40, с.1152; 44, с.436]

Также АОРР обладают свойствами активировать нейтрофилы и моноциты [168], что создает условия для генерации АФК и персистенции окислительного стресса.

Образование реактивных карбониловых производных в плазме крови приводит к утрате функциональной активности белков. По нашему мнению, основным объектами для карбонилирования являются альбумин и фибриноген. Himmelfarb J, McMonagle E. [169] также высказали предположение, что при уремии именно альбумин наиболее подвержен окислительной модификации. Увеличение реактивных карбониловых производных зафиксировано в крови больных хронической почечной недостаточностью, в том числе, получающих программный гемодиализ [170, 171].

По мнению Kalousová M et al. реактивные карбониловые производные белков участвуют в образовании конечных продуктов гликирования (advanced glycation end-products) и липопероксидации (advanced lipoperoxidation end-products), которые принимают участие в развитии уремических осложнений. [172].

Окислительная модификация альбумина приводит к снижению суммарного антиоксидантного потенциала и транспортных функций плазмы крови. Окисленный фибриноген способен активировать тромбоциты и генерацию АФК нейтрофилами, что можно оценить как прокоагулянтный эффект.

Увеличение реактивных карбониловых производных белков в нейтрофилах свидетельствует о том, что в циркуляции присутствуют клетки, у которых развился внутриклеточный карбониловый стресс. Сопоставление с данными литературы показало, что одновременно в циркуляции присутствуют и эритроциты с внутриклеточным окислительным стрессом [173]. Карбонилирование белков нейтрофилов приводит к изменению функциональных свойств этих клеток. Карбонилирование (другие виды окислительной модификаций) белков способно менять антигенные свойства белков [174].

Окисленные белки менее чувствительны к протеолизу и способны аккумуляции в цитозоле клеток, вызывая тем самым нарушение внутриклеточных метаболических процессов. Все это в совокупности может приводить к циркуляции нейтрофилов с нарушенными эффекторными функциями. Такие нейтрофилы могут атаковать интактные клетки [175], в том числе клетки почек, способствуя тем самым прогрессированию заболевания. В пользу этого предположения свидетельствует тот факт, что достоверные изменения реактивных карбониловых производных белков в нейтрофилах зафиксированы как раз у больных ХБП 3, т.е. в дебюте хронической почечной недостаточности.

Нашими исследованиями зафиксировано образование ВНЛ в крови у части больных с ХБП различной степени тяжести. По нашему мнению, образование ВНЛ у больных служит прогностическим критерием ухудшения течения ХБП, более быстрому развитию и прогрессированию ХПН. В качестве предполагаемых механизмов, лежащих в основе детримального эффекта ВНЛ в крови следует назвать повышение прокоагулянтного потенциала, цитотоксичное воздействие гистонов на клетки эпителия и эндотелия [176], увеличение пула прооксидантов в крови и т.д.

Полученные нами данные показали, что на разных стадиях ХБП происходит преимущественное накопление различных катаболитов или модифицированных молекул. Основываясь на позиции Damage-Associated Molecular Patterns (DAMPs) [177, 178], мы предлагаем включить в перечень DAMPs при ХБП 1 стадии вкРНК. Переход ХБП 1 в ХБП стадии характеризуется увеличением в крови как вкДНК, так и вкРНК, а также ростом внеклеточных пуриновых оснований и продуктов их катаболизма. В дебюте ХБП 3 стадии в перечень DAMPs рекомендуем включить интермедиаты катаболизма пуринов (гипоксантин и ксантин), а также реактивные карбонильные производные белков.

Полученные результаты можно рассматривать как теоретическую базу для последующей разработки методов профилактики развития хронической почечной недостаточности у больных с ХБП. Для практического здравоохранения следует предложить определение морфотипов тезиограмм. Этот метод позволит получить динамическую информацию об интегральном состоянии компонентов плазмы крови при ХБП различных стадий, оценить индивидуальный характер прогрессирования ХБП, а также проводить контроль эффективности лечения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Цель и задачи, сформулированные в диссертационной работе, выполнены полностью. Получены новые результаты, показывающие особенности аккумуляции внеклеточных РНК и ДНК в плазме крови больных ХБП разных стадий. Определено увеличение содержания интермедиатов катаболизма пуринов в плазме крови больных с разными стадиями ХБП. Установлен увеличение реактивных карбониловых производных белков в плазме крови и нейтрофилах больных с ХБП 3 стадии, т.е. в дебюте ХПН. Показано образование внеклеточных нейтрофильных ловушек в крови у части больных с ХБП разных стадий. Определены особенности паттернов структурообразования плазмы крови больных с ХБП разных стадий.

Полученные данные могут быть рекомендованы для оценки прогрессирования ХБП, а также для разработки методов профилактики развития ХПН, а также для использования в учебном процессе.

Сравнение с мировыми достижениями в данной области показало, что проведенное исследование является оригинальным. Полученные результаты углубляют имеющиеся представления о молекулярно-клеточных нарушениях, детерминирующих развитие и прогрессирование ХБП.

На основании проведенного исследования можно сделать следующие выводы:

1. В плазме крови больных увеличивается концентрация внеклеточных нуклеиновых кислот, а также пуриновых оснований, ксантина и гипоксантина в зависимости от стадии хронической болезни почек.

2. В плазме крови больных ХБП зафиксированы неоднозначные тренды изменения внеклеточных нуклеиновых кислот. В плазме крови больных ХБП 1 и 2 стадии достоверное возрастало содержание вкРНК. При присоединении хронической почечной недостаточности этот показатель резко снижался. Уровень вкДНК достоверно превышал значение контроля в плазме крови пациентов с ХБП 2-4 стадий. В плазме крови больных ХБП 5 стадии содержание вкДНК падало ниже значений контроля при достоверном росте кислоторастворимых предшественников.

3. В лизатах нейтрофилов и плазме крови больных ХБП наблюдалась тенденция к увеличению содержание реактивных карбониловых производных белков, но достоверные отличия от контроля зафиксированы у больных ХБП 3 стадии. Уровень АОРР достоверно возрастал в плазме крови больных ХБП 5 стадии.

4. У 33% больных с ХБП 1 стадии, у 5% больных ХБП 2 стадии, у 25% больных ХБП 3 стадии, у 29% больных ХБП 4 стадии и у 35% больных ХБП 5 стадии в крови зафиксировано образование спонтанных внеклеточных нейтрофильных ловушек. Количество внеклеточных нейтрофильных ловушек варьировало от 1 до 14.

5. У больных с ХБП 1 стадии зафиксировано 6 морфотипов тезиограмм плазмы крови, тогда как у больных с ХБП 2 стадии число морфотипов

сократилось до 2. У больных с ХБП 3 и 4 стадий наблюдалось по одному морфотипу тезиограмм, тогда как у больных с ХБП 5 зафиксировано 2 варианта морфотипов тезиограмм.

6. Предложено включить вкРНК в перечень DAMPs при ХБП 1 стадии. При ХБП 2 стадии оптимально добавить в перечень DAMPs вкДНК, вкРНК, пуриновые основания, ксантин, гипоксантин. В дебюте хронической почечной недостаточности целесообразно включить в перечень DAMPs включить гипоксантин, ксантин, реактивные карбонильные производные белков.

7. Предложено определение морфотипов тезограмм в качестве дополнительного критерия прогрессирования ХПН и оценки эффективности проводимого лечения.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1 Тугушева Ф.А., Зубина И. В. Оксидативный стресс и его участие в неиммунных механизмах прогрессирования хронической болезни почек // Нефрология. - 2009. - Т. 13, № 3. - С. 42-48.

2 Gall J., Seibold S. Has the time come to use antioxidant therapy in uraemic patients? // Nefrol. Lial. Transpant. - 2003. – № 18 (8). - P. 1452-1455.

3 Spimizu M.N.M., Coimbra T.M., de Araujo M. et al. Acetylcysteine attenuates the progression of chronic renal failure // Kidney Int. - 2005. - № 68. – P. 2208-2217.

4 Gutowski M., Kowalczyk S. A study of free radical chemistry: their role and pathophysiological significance // Acta Biochimica Polonica. - 2013. - Vol. 60, № 1. - P. 1-16.

5 Плешкова Е.М. Окислительный стресс и его участие в развитии и течении болезней мочевой системы у детей // Российский вестник перинатологии и педиатрии. - 2014. - № 5. - С. 9-14.

6 Ermakov, A.V., Konkova M.S., Kostyuk S.V. et al. Oxidized extracellular DNA as a stress signal in human cells // Oxidative medicine and cellular longevity. – 2013. – Vol. 13. – P. 649-747.

7 Муравлева Л.Е., Молотов-Лучанский В.Б., Клюев Д.А. и др. Внеклеточные нуклеиновые кислоты: происхождение и функции: миниобзор // Современные проблемы науки и образования. - 2010. - № 2. - С. 15-20.

8 Туаева Н.О., Абрамова З.И., Мустафина Д.М. Внеклеточная ДНК в кровотоке человека II. Биологическая роль внеклеточной ДНК // Ученые записки Казанского государственного университета. Серия «Естественные науки». - 2008. - Т. 150, № 2. - С. 59-70.

9 Gahana P B., Swaminathan R. Circulating Nucleic Acids in Plasma and Serum: Recent Developments // Annals of the New York Academy of Sciences. – 2008. - Vol. 1137. - P. 1-6.

10 Pisetsky D. S. The Role of Nuclear Macromolecules in Innate Immunity // The Proceedings of the American Thoracic Society. - 2007. - № 4. - P. 258-262.

11 Муравлева Л.Е., Молотов-Лучанский В.Б., Телеуов М.К. и соавт. Содержание внеклеточных нуклеиновых кислот в плазме крови больных с гломерулопатиями и тубулопатиями // Современные проблемы науки и образования. - 2010. - № 3. - С. 23-27.

12 Муравлева Л.Е., Молотов-Лучанский В.Б., Клюев Д.А. и др. Современные представления о метаболической роли аденозина: сообщение // Матер. междунар. науч.-практ. конф. «Образование и наука XXI века». - Прага, 2010. - С. 35-38.

13 Muravlyova L.E., Molotov-Luchanskiy V.B., Teleuov M.K. et al. Purine metabolism in blood of patients with chronic pyelonephritis associated with arterial hypertension // European Jornal of Natural History. – 2010. - № 3. - P. 36-38.

14 Muravlyova L.E., Molotov-Luchanskiy V.B., Kulmagambetov I.R. et al. Hypothesis about role of purine metabolism in the development of renal disease

associated with hypertension // European Jornal of Natural History. – 2011. - № 1. - P. 8-13.

15 Coresh J., Selvin E., Stevens L. Prevalence of Chronic Kidney Disease in the United States // Jama. – 2007. – Vol. 298, № 17. – P. 2038-2047.

16 Saydah S., Eberhardt M., Rios-Burrows N. et al. Prevalence of Chronic Kidney Disease and Associated Risk Factors - United States, 1999-2004 // MMWR Weekly. – 2007. – № 56 (08). – P. 161-165.

17 Glassock R., Winearls C. An epidemic of chronic kidney disease: fact or fiction? // Nephrol. Dial. Transplant. – 2008. – № 23. – P. 1117–1121.

18 Томилина Н.А., Бикбов Б.Т. Эпидемиология хронической почечной недостаточности и новые подходы к классификации и оценке тяжести хронических прогрессирующих заболеваний почек // Терапевтический архив. – 2005. – № 6. – С. 87–92.

19 Мухина Н.А. Нефрология: национальное руководство. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. – 720 с.

20 Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group. KDIGO 2012 clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease // Kidney Int. – 2013. - № 3 (1). – P. 1-150.

21 Levey A. et al. The definition, classification, and prognosis of chronic kidney disease: a KDIGO Controversies Conference report // Kidney Int. – 2011. - № 80. – P. 17-28.

22 Моисеева В.С., Мухина Н А. Национальные рекомендации. Сердечно-сосудистый риск и хроническая болезнь почек: стратегии кардионефропротекции. // Клин. нефрология. – 2014. - № 2. – P. 4-29.

23 Швецов М.Ю. Хроническая болезнь почек как общемедицинская проблема: современные принципы нефропрофилактики и нефропротективной терапии // Consilium medicum. – 2014. - Т. 16, № 7. - С. 51-64.

24 Добронравов В.А., Смирнов А.В., Томилина Н.А. Хроническая болезнь почек // Нефрология: национальное руководство. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. - С. 169-191.

25 Жузжанов О.Т., Туганбекова С.К., Магзумова Р.З., Баймагамбетова Г.Б. Современные методические подходы к определению потребности взрослого населения города Астаны в специалистах-нефрологах на амбулаторно-поликлиническом этапе // Клиническая медицина Казахстана. – 2005. - № 3 (4). - С. 13-17.

26 Шилов Е.М. Хроническая болезнь почек и нефропротективная терапия: методическое руководство для врачей. – Москва, 2012. - 83 с.

27 Levey A.S., Eckardt K.U., Tsukamoto Y. et al. Definition and classification of chronic kidney disease: a position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) // Kidney Int. – 2005. – № 67 (6). – P. 20089–20100.

28 Арьев А.Л., Овсянникова Н.А., Арьева Г.Т. Факторы риска развития и прогрессирования патологии почек, сердечно-сосудистой и

цереброваскулярной систем едины (взгляд гериатра) // Нефрология. – 2011. – Т. 15, № 1. – С. 76–83.

29 Valko M., Rhodes C.J., Monco J. et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer // Chemico-Biological Interactions. – 2006. - № 160. – P. 1-40.

30 Kuchta A., Pacanis A., Kortas-Stempak B. et al. Estimation of Oxidative Stress Markers in Chronic Kidney Disease // Kidney Blood Press Res. - 2011. – № 34. – P. 12-19.

31 Sung C.C., Hsu Y.C., Chen C.C. et al. Oxidative stress and nucleic acid oxidation in patients with chronic kidney disease // Oxid. Med. Cell Longev. – 2013. - № 11 (8). - P. e0161706- e0161721. https://dx.doi.org/10.1155/2013/301982.

32 Bargnoux A.S., Morena M., Badiou S. et al.Carbonyl stress and oxidatively modified proteins in chronic renal failure // Ann. Biol. Clin. – 2009. – № 67 (2). – P. 153-158.

33 Sarma A.D., Mallick A.R., Ghosh A.K. Free Radicals and Their Role in Different Clinical Conditions: An Overview // International Journal of Pharma Sciences and Research (IJPSR). – 2010. - Vol. 1, № 3. – P. 185-192.

34 Муравлева Л.Е., Молотов-Лучанский В.Б., Клюев Д.А., Танкибаева Н.А. и др. Окислительная модификация белков: проблемы и перспективы исследования // Фундаментальные исследования. - 2010. – № 1. – С. 74-78.

35 Piwowar A. Advanced oxidation protein products. Part I. Mechanism of the formation, characteristics and property // Pol. Merkur Lekarski. – 2010. - № 28 (164). - P. 166-169.

36 Iwao Y., Anraku M., Hiraike M., Kawai K. et al. The structural and pharmacokinetic properties of oxidized human serum albumin, advanced oxidation protein products (AOPP) // Drug Metab. Pharmacokinet. – 2006. - № 21(2). - P. 140-146.

37 Piwowar A. Advanced oxidation protein products. Part II The significance of oxidation protein products in the pathomechanism of diabetes and its complications // Pol. Merkur Lekarski. – 2010. - № 165. – P. 227-230.

38 Descamps-Latscha B., Witko-Sarsat V. Importance of oxidatively modified proteins in chronic renal failure // Kidney Int. Suppl. – 2001. – № 78. – P. 108-113.

39 Li H.Y., Hou F.F., Zhang X. et al. Advanced oxidation protein products accelerate renal fibrosis in a remnant kidney model // J. Am. Soc. Nephrol. - 2007. – № 18 (2). – P. 528-538.

40 Zhou Li Li, Hou Fan Fan, Bao Guo et al. Accumulation of advanced oxidation protein products induces podocyte apoptosis and deletion through NADPH-dependent mechanisms // Kidney International. – 2009. – № 76. – P. 1148–1160.

41 Youhua Liu Advanced oxidation protein products: a causative link between oxidative stress and podocyte depletion // Kidney International. – 2009. – № 76. – P. 1125–1127.

42 Guo Z.J., Niu H.X., Hou F.F. et al. Advanced oxidation protein products activate vascular endothelial cells via a RAGE mediated signaling pathway // Antioxidants & Redox Signaling. – 2008. - № 10. – P. 1699-1712.

43 Zhou L.L., Hou F.F., Wang G.B. et al. Accumulation of advanced oxidation protein products induces podocyte apoptosis and deletion through NADPH-dependent mechanisms // Kidney Int. – 2009. - № 76. – P. 1148-1160.

44 Wei X.F., Zhou Q.G., Hou F.F. et al. Advanced oxidation protein products induce mesangial cell perturbation through PKC-dependent activation of NADPH oxidase // American Journal of Physiology. – 2009. - № 296. – P. 427-443.

45 Cao W., Zhou Q.G., Nie J. et al. Albumin overload activates intrarenal renin-angiotensin system through protein kinase C and NADPH oxidase- dependent pathway // J. Hypertens. – 2011. - № 29. – P. 1411-1421.

46 Nistala R., Whaley-Connell A., Sowers J.R. Redox control of renal function and hypertension // Antioxidants & Redox Signaling. – 2008. - № 10. – P. 2047-2089.

47 Dalle-Donne I., Rossi R., Glustarini D., Colombo R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress // Clin. Chim. Acta. - 2003. - № 329. - P. 23-38.

48 Muravlyova L.E., Molotov-Luchanskiy V.B., Kluyev D. et al. Protein carbonyl products in blood cells at chronic kidney disease // European Journal of Natural History. – 2011. – № 5. – C. 3-5.

49 Locatelli F., Canaud B., Eckardt K.U. et al. Oxidative stress in end-stage renal disease: an emerging threat to patient outcome // Nephrology Dialysis Transplantation. – 2003. – № 18. – P. 1272-1280.

50 Hacişevki A. Effect of hemodialysis on oxidative stress in patients with chronic renal failure // J. Fac. Pharm. – 2008. – № 37 (2). – P. 91-100.

51 Jourde-Chiche N., Dou L., Cerini C. et al. Vascular incompetence in dialysis patients protein bound uremic toxins and endothelial dysfunction // Hemin. Dial. – 2011. – № 24 (3). – P. 327-337.

52 Ermakov A.V., Konkova M.S., Kostyuk S.V. et al. Oxidized extracellular DNA as a stress signal in human cells // Oxid. Med. Cell Longev. – 2013. – Vol. 2013. – P. 649-747.

53 Ermakov A.V., Konkova M.S., Kostyuk S.V. et al. Oxidative stress as a significant factor for development of an adaptive response in irradiated and nonirradiated human lymphocytes after inducing the bystander effect by low-dose X-radiation // Mutat. Res. - Fund. Mol. M. – 2009. – Vol. 669, № 1(2). – P. 155-161.

54 Widel M. Bystander effect induced by UV radiation; why should we be interested? // Postepy. Hig. Med. Dosw. – 2012. – Vol. 14, № 66. – P. 828-837.

55 Loseva P., Kostyuk S., Malinovskaya E. et al. Extracellular DNA oxidation stimulates activation of NRF2 and reduces the production of ROS in human mesenchymal stem cells // Expert Opin. Biol. Th. – 2012. – Vol. 12, № 1. – P. 85-97.

56 Brencicova E., Diebold S.S. Nucleic acids and endosomal pattern recognition: how to tell friend from foe? // Front. Cell. Infect. Microbiol. – 2013. – Vol. 3. – P. 30-37.

57 Gaipl U.S., Beyer T.D., Heyder P. et al. Cooperation between C1q and DNase I in the clearance of necrotic cell derived chromatin // Arthritis Rheum. – 2004. – Vol. 50. – P. 640-649.

58 Li Z., Jiao X., Wang C. et al. Alternative cyclin D1 splice forms differentially regulate the DNA damage response // Cancer Res. – 2010. – Vol. 70, № 21. – P. 8802-8811.

59 Kostyuk S.V., Ermakov A.V., Alekseeva A.Y. et al. Role of extracellular DNA oxidative modification in radiation induced bystander effects in human endotheliocytes // Mutat. Res. - Fund. Mol. M. – 2012. – Vol. 729, № 1(2). – P. 52-60.

60 Griffith T.S., Ferguson T.A. Cell death in the maintenance and abrogation of tolerance: the five Ws of dying cells // Immunity. – 2011. – Vol. 35. – P. 456-466.

61 Kostyuk S.V., Tabakov V.J., Chestkov V.V. et al. Oxidized DNA induces an adaptive response in human fibroblasts // Mutat Res. – 2013. – Vol. 747. – P. 6–18.

62 Glebova K., Veiko N., Kostyuk S. et al. Oxidized extracellular DNA as a stress signal that may modify response to anticancer therapy // Cancer Lett. – 2013. - № 13. – P. 658-667.

63 Malinovskaya E.M., Kostyuk S.V., Ermakov A.V. et al. Fragments of Cell-free DNA (cfDNA) Enhance Transcription Activity in Human Mesenchymal Stem Cells (hMSCs) and Inhibit Their in vitro Differentiation // Circulating nucleic acids in plasma and serum. – 2011. – Vol. 31. – P. 199-205.

64 Костюк С.В., Малиновская Е.М., Ермаков А.В. и др. Фрагменты внеклеточной ДНК усиливают транскрипционную активность генома мезенхимальных стволовых клеток человека, активируют TLR- зависимый сигнальный путь и ингибируют апоптоз // Биомедицинская химия. – 2012. – Т. 58, № 6. – С. 673-683.

65 Kim J., Cha Y.N., Surh Y.J. A protective role of nuclear factor-erythroid 2-related factor-2 (Nrf2) in inflammatory disorders // Mutat. Res. – 2010. – Vol. 690. – P. 12-23.

66 Pedruzzi L.M., Stockler-Pinto M.B., Leite M.Jr., Mafra D. Nrf2-keap1 system versus NF-κB: the good and the evil in chronic kidney disease? // Biochimie. – 2012. – Vol. 94, № 12. – P. 2461-2466.

67 Pisetsky D.S. The origin and properties of extracellular DNA: from PAMP to DAMP // Clin. Immunol. – 2012. – Vol. 144. – P. 32-40.

68 Peters D.L., Pretorius P.J. Origin, translocation and destination of extracellular occurring DNA - a new paradigm in genetic behavior // Clin. Chim. Acta. – 2011. – Vol. 412. – P. 806-811.

69 Yu X., Deng Q., Bode AS.M. et al. The role of necroptosis, an alternative form of cell death, in cancer therapy // Expert Review of Anticancer Therapy. – 2013. – Vol. 13, № 7. – P. 883-893.

70 Stevens J.B., Abdallah B.Y., Liu G. et al. Heterogeneity of cell death // Cytogenet Genome Res. – 2013. – Vol. 139, № 3. – P. 164-173.

71 Gahan P.B., Anker P., Stroun M. The virtosome - a novel cytosolic informative entity and intercellular messenger // Cell. Biochem. Funct. – 2010. – Vol. 28, № 7. – P. 529-538.

72 Peters D.L., Pretorius P.J. Origin, translocation and destination of extracellular occurring DNA - a new paradigm in genetic behavior // Clin. Chim. Acta. – 2011. – Vol. 412. – P. 806-811.

73 Vorobjeva N.V., Pinegin B.V. Neutrophil Extracellular Traps: Mechanisms of Formation and Role in Health and Disease // Biochemistry. – 2014. - Vol. 79, № 12. - P. 1286-1296.

74 Gahan P.B., Anker P., Stroun M. Metabolic DNA as the origin of spontaneously released DNA? // Ann N. Y. Acad. Sci. – 2008. – Vol. 1137. – P. 7-17.

75 Gahan P.B., Anker P., Stroun M. The virtosome - a novel cytosolic informative entity and intercellular messenger // Cell. Biochem. Funct. – 2010. – Vol. 28, № 7. – P. 529-538.

76 Yousefi S. Catapult-like release of mitochondrial DNA by eosinophils contributes to antibacterial defense // Nat. Med. – 2008. – № 14. – P. 949–953.

77 Yousefi S., Mihalache C., Kozlowski E. et al. Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps // Cell. Death. Differ. – 2009. – № 16. – P. 1438–1444.

78 Phillipson M., Kubes P. The neutrophil in vascular inflammation // Nature Medicine. - 2011. – Vol. 17. – P. 1381-1390.

79 Zhang Q., Raoof M., Chen Y. et al. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury // Nature. – 2010. – № 464. – P. 104-107.

80 Mittra I., Nair N.K., Mishra P.K. Nucleic acids in circulation: Are they harmful to the host? // J. Biosci. – 2012. – № 37. – P. 301–312.

81 Hoy A.M., Buck A.H. Extracellular small RNAs: what, where, why? // Biochemical Society Transactions. – 2012. – Vol. 40, № 4. – P. 886-890.

82 Rykova E.Y., Morozkin E.S., Ponomaryova A.A. et al. Cell-free and cell-bound circulating nucleic acid complexes: mechanisms of generation, concentration and content // Expert Opin. Biol. Ther. – 2012. – Vol. 12, № 1. – P. 141-153.

83 Костюк С.В. Роль внеклеточной РНК в функциональной активности генома человека: автореф. … док. биол. наук: 03,02,07. - М., 2014. - 48 с.

84 Gonzalez-Masia J.A., Garcia-Olmo D., Garcia-Olmo D.C. Circulating nucleic acids in plasma and serum (CNAPS): applications in oncology // Onco. Targets Ther. – 2013. – Vol. 8, № 6 – P. 819-832.

85 Tankibayeva N., Kluev D., Muravleva L., Molotov-Lushanskyi V. Determination of extracellular nucleic acids content in blood and urine of patients

with tubulopathy and glomerulopathy // In Vivo. - 2011. - Vol. 25, № 3. - P. 561-562.

86 Nagata S., Kawane K. Autoinflammation by endogenous DNA // Adv. Immunol. – 2011. – № 110. – P. 139–161.

87 Муравлева Л.Е., Молотов-Лучанский В.Б., Телеуов М.К. и др. Содержание внеклеточных нуклеиновых кислот в плазме крови больных с гломерулопатиями и тубулопатиями // Современные проблемы науки и образования. - 2010. - № 3. - С. 23-27.

88 Korabečná M., Hořínek A. Cell-Free Nucleic Acids as Biomarkers of Biocompatibility in Dialytic Process // Technical Problems in Patients on Hemodialysis. – 2011. http://www.intechopen.com/books/technical-problems-in-patients-onhemodialysis/cell-free-nucleic-acids-as-biomarkers-of-biocompatibility-in dialytic-process.

89 Brinkmann V., Reichard U., Goosmann C. et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria // Science. – 2004. - № 303 (5663). – P. 1532-1535.

90 Pilsczek F.H., Salina D., Poon K.K. et al. A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to Staphylococcus aureus // J. Immunol. – 2010. - № 185 (12). – P. 7413-7425.

91 Parker H., Dragunow M., Hampton M.B. et al. Requirements for NADPH oxidase and myeloperoxidase in neutrophil extracellular trap formation differ depending on the stimulus // J. Leukoc Biol. – 2012. - № 92 (4). – P. 841-849.

92 Yousefi S., Mihalache C., Kozlowski E. et al. Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps // Cell Death Differ. – 2009. - № 16 (11). – P. 1438-1444.

93 Fuchs T.A., Abed U., Goosmann C. et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps // J. Cell Biol. – 2007. - № 176 (2). – P. 231-241.

94 Jan G. Nel, Annette J. Theron, Roger Pool et al. Neutrophil extracellular traps and their role in health and disease // South African Journal of Science. – 2016. http://dx.doi.org/10.17159/sajs.2016/20150072.

95 Yipp B.G., Kubes P. NETosis: How vital is it? // Blood. – 2013. - № 122 (16). – P. 2784-2794.

96 Itagaki K., Kaczmarek E., Lee Y.T. et al. Mitochondrial DNA released by trauma induces neutrophil extracellular traps // PLoS One. – 2015. - № 10 (3). – P. e0120549- e0120559. http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0120549.

97 Yu Y., Su K. Neutrophil extracellular traps and systemic lupus erythematosus // J. Clin. Cell Immunol. – 2013. - № 4 (2). – P. 408-418. http://dx.doi.org/10.4172/2155-9899.1000139.

98 Carmona-Rivera C., Kaplan M.J. Low-density granulocytes: A distinct class of neutrophils in systemic autoimmunity // Semin. Immunopathol. – 2013. - № 35 (4). – P. 455-463.

99 Papadaki G., Choulaki C., Mitroulis I. et al. Enhanced release of neutrophil extracellular traps from peripheral blood neutrophils in patients with rheumatoid arthritis // Ann Rheum Dis. – 2012. - № 71 (1). – P. A79-A79. http://dx.doi.org/10.1136/annrheumdis-2011-201238.17.

100 Zawrotniak M., Rapala-Kozik M. Neutrophil extracellular traps (NETs) - Formation and implications // Acta Biochim Pol. – 2013. - № 60 (3). – P. 277-284.

101 Fuchs T.A., Brill A., Wagner D.D. Neutrophil extracellular trap (NET) impact on deep vein thrombosis // Arterioscler Thromb Vasc Biol. – 2012. - № 32 (8). – P. 1777-1783.

102 Cheng O.Z., Palaniyar N. NET balancing: A problem in inflammatory lung diseases // Front Immunol. – 2013. - № 4. - P. 1-14. http://dx.doi.org/ 10.3389/fimmu.2013.00001.

103 Dushianthan A., Grocott M.P., Postle A.D., Cusack R. Acute respiratory distress syndrome and acute lung injury // Postgrad Med. J. – 2011. - № 87 (1031). – P. 612-622.

104 Saffarzadeh M., Juenemann C., Queisser M.A. et al. Neutrophil extracellular traps directly induce epithelial and endothelial cell death: A predominant role of histones // PLoS One. – 2012. - № 7 (2). - P. e32366-e32380. http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0032366.

105 Saffarzadeh M., Preissner K.T. Fighting against the dark side of neutrophil extracellular traps in disease: Manoeuvres for host protection. // Curr. Opin. Hematol. – 2013. – № 20 (1). – P. 3-9.

106 Lapponi M.J., Carestia A., Landoni V.I. et al. Regulation of neutrophil extracellular trap formation by anti-inflammatory drugs // J. Pharmacol. Exp. Ther. – 2013. - № 345 (3). – P. 430-437.

107 Borowiec A., Lechward K., Tkacz-Stachowska K., Składanowski A. Adenosine as a metabolic regulator of tissue function: production of adenosine by cytoplasmic 5’-nucleotidases // Acta Biochimica Polonica. – 2006. - Vol. 53, № 2. - P. 269–278.

108 Yegutkin G.G. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: important modulators of purinergic signalling cascade. // Biochim. Biophys. Acta. – 2008. - № 1783. – P. 673–694.

109 Baldwin S.A., Beal P.R., Yao S.Y. et al. The equilibrative nucleoside transporter family, SLC29 // Pflugers Arch. – 2004. - № 447 (5). – P. 735-743.

110 Gray J.H., Owen R.P., Giacomini K.M. The concentrative nucleoside transporter family, SLC28 // Pflugers Arch. - 2004. - № 447 (5). – P. 728-734.

111 Rutsch F., Vaingankar S., Johnson K. et al.PC-1 nucleoside triphosphate pyrophosphohydrolase deficiency in idiopathic infantile arterial calcification // Am. J. Pathol. – 2001. – № 158. – P. 543 –554.

112 Stefan C., Jansen S., Bollen M. Modulation of purinergic signaling by NPP-type ectophosphodiesterases // Purinergic Signalling. – 2006. - № 2. – P. 361–370.

113 Hasko G., Cronstein B.N. Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity // Trends Immunol. – 2004. - № 25. – P. 33–39.

114 Jacobson K.A., Gao Z.G. Adenosine receptors as therapeutic targets // Nature Rev. Drug Discov. – 2006. - № 5. – P. 247–264.

115 Nemeth Z.H. et al. Adenosine stimulates CREB activation in macrophages via a p38 MAPK-mediated mechanism // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2003. - № 312. – P. 883–888.

116 Fredholm B.B. Adenosine, an endogenous distress signal, modulates tissue damage and repair // Cell Death Differ. - 2007. - № 14. - P. 1315–1323.

117 Eltzschig H.K., Thompson L.F., Karhausen et al. Endogenous adenosine produced during hypoxia attenuates neutrophil accumulation: coordination by extracellular nucleotide metabolism // Blood. - 2004. - № 104. – P. 3986−3992.

118 Eltzschig H.K., Macmanus C.F., Colgan S.P. Neutrophils as sources of extracellular nucleotides: functional consequences at the vascular interface // Trends Cardiovasc. Med. – 2008. - № 18. - P. 103–107.

119 Broussas M., Cornillet-Lefebvre P., Potron G., Nguyen P. Adenosine inhibits tissue factor expression by LPS-stimulated human monocytes: involvement of the A3 adenosine receptor // Thromb Haemost. - 2002. - № 88. - P. 123-130.

120 Zhou H., Wolberg A.S., Roubey R.A. Characterization of monocyte tissue factor activity induced by IgG antiphospholipid antibodies and inhibition by dilazep // Blood. - 2004. - № 104. - P. 2353-2358.

121 Клюев Д.А., Колесникова Е.А., Муравлева Л.Е. и др. Состояние пуринового обмена у больных гломерулонефритом // Современные наукоемкие технологии. – 2010. - № 5. - С. 16-22.

122 Муравлева Л.Е., Молотов-Лучанский В.Б., Клюев Д.А., Колесникова Е.А. Современные представления о метаболической роли аденозина: сообщение // Материалы междунар. науч.-практ. конф. «Образование и наука XXI века». - Прага, 2010. - С. 35-38.

123 Рапис Е. Белок и жизнь (самосборка и симметрия наноструктур белка). - Москва: ЗЛ "Милта-ПКПТИТ", 2002. - 257 с.

124 Шабалин В.Н., Шатохина С.Н. Морфология биологических жидкостей человека. - М.: Хризостом, 2001. – 304 с.

125 Краевой С.А., Колтовой Н.А. Диагностика по капле крови. Кристаллизация биожидкостей. – Москва, 2013. – 480 с.

126 Яхно Т.А., Седова О.А., Санин А.Г., Пелющенко А.С. О существовании регулярных структур в жидкой сыворотке (плазме) крови человека и фазовых переходах в процессе ее высыхания // Журнал технической физики. - 2003. - № 73 (4). - С. 23-27.

127 Шабалин В.Н., Шатохина С.Н. Принципы аутоволновой самоорганизации биологических жидкостей // Вестник РАМН. – 2000. - № 3. - С. 45-49.

128 Шатохина С.Н. Диагностическое значение кристаллических структур биологических жидкостей в клинике внутренних болезней: автореф. … док. мед. наук: 14.00.53. - Москва, 1995. - 40 с.

129 Обухова Л.М., Ведунова М.В., Конторщикова К.Н., Добротина Н.А. Морфофизиологический анализ плазмы крови при эндогенной интоксикации // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. – 2007. - № 6. - С. 104–107.

130 Кулмагамбетов И.Р., Муравлева Л.Е., Койков В.В., Абдрахманова Ю.Э. и др. Состояние окислительного метаболизма и кристаллобразующие свойства крови экспериментальных животных при интоксикации несимметричным диметилгидразином // Биомедицинская химия. - 2007. - Т. 53, вып. 3. - С. 276-284.

131 Муравлева Л.Е., Молотов-Лучанский В.Б., Клюев Д.А. и др. Морфотипы тезиограмм плазмы крови больных хроническим пиелонефритом // Успехи современного естествознания. – 2009. – № 10. – С. 21-24.

132 Muravlyova L.E., Molotov-Luchanskiy V.B., Kluyev D.A. et al. Morphotypes of neutrophil's lyzates of blood of patients with kidney diseases // International Journal Of Applied And Fundamental Research. – 2009. – № 2. – P. 9-11.

133 Кусаинова Д.С. Тезиографическая картина плазмы крови больных хроническим пиелонефритом на фоне артериальной гипертензии // Материалы VI Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы новотехнических наук». – 2010. – № 26. – С. 100-106.

134 Клюев Д.А., Кусаинова Д.С., Муравлева Л.Е., Молотов-Лучанский В.Б. Тезиография лизатов лейкоцитов в диагностике хронического пиелонефрита и интерстициального нефрита // Лаборатория. – 2011. – № 1. – С. 15.

135 National Kidney Foundation KD: Clinical practice guidelines for chronic kidney disease Evaluation, classification and stratification // Am. Kidney Dis. - 2002. - № 39. – P. 266-270.

136 Земченков А.Ю., Томилина Н.А. «К/ДОКИ» обращается к истокам хронической почечной недостаточности (О новом разделе K/DOQI по диагностике, классификации и оценке тяжести хронических заболеваний почек) // Нефрология и диализ. - 2004. - № 6 (3). - С. 204-220.

137 Козловская Л.В., Мухин Н.А., Фомин В.В. Клинические методы диагностики // Нефрология: национальное руководство. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. - С. 49-60.

138 Тиктинский О.Л., Калинина С.Н. – Пиелонефриты. С.-Петерб. мед. акад. последиплом. образования. - СПб.: Медиа-пресс, 1996. – 237 с.

139 Сейсембеков Т.З. Хронический пиелонефрит: учебное пособие. - Караганда, 1979. – 43 с.

140 Борисов В.В., Гордовская Н.Б. Хронический пиелонефрит // Нефрология: национальное руководство. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. - С. 262-272.

141 Федорова М.З., Левин В.Н. Метод комплексного исследования геометрии, площади поверхности, резервных возможностей мембраны и осморегуляции лейкоцитов крови // Клиническая медицина. – 2000. – № 8. – С. 35-38.

142 Witko-Sarsat V., Frielander M., Capeillere-Blandin C. et al. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia // Kidney Int. – 1996. – № 49. – P. 1304-1313.

143 Levine R.L., Garland D., Oliver C.N. et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins // Method Enzymol. - 1990. – № 186. – P. 464-478.

144 Гончаренко М.С., Латипова А.М. Метод оценки перекисного окисления липидов // Лабораторное дело. – 1985. – № 1. – С. 60-61.

145 Орешников Е.В., Гунин А.Г., Мадянов И.В., Орешникова С.Ф. Пурины крови и ликвора при беременности // Проблемы репродукции. – 2008. – № 6. – С. 74-80.

146 Маркушева Л.И., Савина М.И., Решина В.М. и др. Ядерные белки хроматина в оценке эффективности лечения больных псориазом // Клиническая лабораторная диагностика. – 2000. – № 7. – С. 18-20.

147 Пат. 2384844 Российская Федерация, Способ обнаружения НВЛ / Долгушин И.И., Андреева Ю.С.; опубл. 01.04.2008, Бюл. № 8. - 7 с.

148 Голиков П.А., Пахомова Г.В., Утешев Н.С. и др. Динамика содержания конечного продукта оксида азота в различных биологических жидкостях // Вест. интенсивной терапии. – 2000. - № 4. – С. 31-32.

149 Маркушева Л.И., Савина М.И., Решина В.М. и др. Ядерные белки хроматина в оценке эффективности лечения больных псориазом // Клиническая лабораторная диагностика. – 2000. – № 7. – С. 18-20.

150 Унгуряну Т.Н., Гржибовский А. М. Сравнение трех и более независимых групп с использованием непараметрического критерия Краскела Уоллиса // Экология человека. – 2014. - № 6. – С. 55-58.

151 Коротина О.Л., Генералов И.И. Нейтрофильные внеклеточные ловушки: механизмы образования, функции // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2012. - № 4. - С. 23-32.

152 Brinkmann V., Zychlinsky A. Beneficial suicide: why neutrophils die to, make NETs // Nature Rev. – 2007. - № 5. - P. 577-582.

153 Phillipson M., Kubes P. The neutrophil in vascular inflammation // Nature medicine. – 2011. - Vol. 17, № 11. – P. 1381-1390.

154 Швецов М.Ю. Хроническая болезнь почек как общемедицинская проблема: современные принципы нефропрофилактики и нефропротективной терапии // Consilium Medicum. – 2014. - Т. 16, № 7. – С. 51-64.

155 Щербак А.В., Козловская Л.В., Бобкова И.Н. и др. Гиперурикемия и проблема хронической болезни почек // Терапевт. арх. – 2013. - № 86 (6). – С. 100–104.

156 Filippatos G.S., Ahmed M.I., Gladden J.D. et al. Hyperuricaemia, chronic kidney disease, and outcomes in heart failure: potential mechanistic insights from epidemiological data // Eur. Heart. J. - 2011. - № 32 (6). - P. 712-720.

157 Muravlyova L.E., Molotov-Luchanskiy V.B., Kulmagambetov I.R. et al. Hypothesis about role of purine metabolism in the development of renal disease associated with hypertension // European Journal of Natural History. – 2011. - № 1. - P. 8-13.

158 Shahbazian H., Mombini H., Moghaddam A.Z. et al. Changes in Plamsa Concentrations of Hypoxanthine and Xanthine in Renal Vein as an Index of Delayed Kidney Allograft Function // Urol J. (Tehran). – 2006. - № 4. – P. 225-229.

159 Diwan V., Mistry A., Gobe G., Brown L. Adenine-induced chronic kidney and cardiovascular damage in rats // J. Pharmacol. Toxicol. Methods. - 2013. - № 68 (2). - P. 197-207.

160 Slominska E.M., Szolkiewicz M., Smolenski R.T. et al. High Plasma Adenine Concentration in Chronic Renal Failure and Its Relation to Erythrocyte ATP // Nephron. - 2002. - № 91. - P. 286-291.

161 Kocić G., Radenkovic S., Cvetkovic T. et al. Circulating nucleic acids as possible damage-associated molecular patterns in different stages of renal failure // Renal Failure. - 2010. - V. 32, № 4. - P. 486-492.

162 Korabecna M., Pazourkova E., Horinek A. et al. Cell-free nucleic acids as biomarkers in dialyzed patients // J. Nephrol. – 2013. - № 26 (6). - P. 1001-1008.

163 Смирнов А.В., Петрищев Н.Н., Мнускина М.М., Панина И.Ю. и др. Дисфункция эндотелия и апоптоз на ранних стадиях хронической болезни почек / // Тер. архив. - 2013. - Т. 84, № 6. – С. 9-15.

164 Walter Stoiber, Astrid Obermayer, Peter Steinbacher and Wolf-Dietrich Krautgartner The Role of Reactive Oxygen Species (ROS) in the Formation of Extracellular Traps (ETs) in Humans // Biomolecules. – 2015. - № 5. – P. 702-723.

165 Allam R., Kumar S.V.R., Darisipudi M.N., Anders H-J. Extracellular histones in tissue injury and inflammation // Journal of Molecular Medicine. - 2014. – Vol. 92, Is. 5. – P. 465-472.

166 Kao M.P., Ang D.S., Pall A., Struthers A.D. Oxidative stress in renal dysfunction: mechanisms, clinical sequelae and therapeutic options // J. Hum. Hypertens. – 2010. - № 24 (1). – P. 1-8.

167 Zhou L.L., Hou F.F., Wang G.B. et al. Accumulation of advanced oxidation protein products induces podocyte apoptosis and deletion through NADPH-dependent mechanisms // Kidney Int. – 2009. - № 76. – P. 1148-1160.

168 Witko-Sarsat V.R., Gausson V.R., Anh-Thu Nguyen A-T. et al. AOPP-induced activation of human neutrophil and monocyte oxidative metabolism: A potential target for N-acetylcysteine treatment in dialysis patients // Kidney International. - 2003. - Vol. 64. – P. 82–91.

169 Himmelfarb J., McMonagle E. Albumin is the major plasma protein target of oxidant stress in uremia // Kidney Int. - 2001. - № 60. – P. 358–363.

170 Bargnoux A.S., Morena M., Badiou S. et al. Carbonyl stress and oxidatively modified proteins in chronic renal failure // Ann Biol. Clin. – 2009. - № 67 (2). – P. 153-158.

171 Mimić-Oka J., Simić T., Plješa M. et al. Oxidative Modifications of plasma proteins in different stages of chronic renal failure // Fasta Universitatis. Series “Medicine and Biology”. – 2001. - Vol. 8, № 1. - P. 1-5.

172 Kalousová M.,' Zima T., Tesar V., Stípek S. Carbonyl stress and chronic renal failure // Cas. Lek. Cesk. – 2002. - № 141 (5). – P. 143-145.

173 Muravlyova L.E., Molotov-Luchanskiy V.B., Bakirova R.Y. et al. The modified proteins in erythrocytes and regulation of erythrocytes volume in patients with chronic kidney disease // Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci. – 2015. - № 19 (22). – P. 4270-4274.

174 Жаворонок Т.В. Редокс-зависимые механизмы изменений функциональных совйств нейтрофилов при остром воспалении и окислительном стрессе: автореф. ... докт. мед. наук: 14.03.03, 03.01.04. - Томск, 2012. - 48 с.

175 Segel G.B., Halterman M.W., Lichtman M.A. The paradox of the neutrophil's role in tissue injury // Journal of Leukocyte Biology. - 2011. - Vol. 89, № 3. – P. 359-372.

176 Saffarzadeh M., Juenemann C., Queisser M.A., Lochnit G. et al. Neutrophil extracellular traps directly induce epithelial and endothelial cell death: a predominant role of histones // PLoS One. – 2012. - № 7 (2). – P. 32366-32368.

177 Land W.G. The Role of Damage-Associated Molecular Patterns in Human Diseases: Part I - Promoting inflammation and immunity // Sultan Qaboos University Medical Journal - 2015. - № 15 (1). – P. 9-21.

178 Land W.G. The Role of Damage-Associated Molecular Patterns (DAMPs) in Human Diseases: Part II - DAMPs as diagnostics, prognostics and therapeutics in clinical medicine // Sultan Qaboos University Medical Journal. - 2015. - № 15 (2). – P. 157-170.