

**Summary**

**MECHANISMS OF RELAPSE INITIATION  
IN COURSE OF CHRONIC OBSTRUCTIVE  
PYELONEPHRITIS**

*Barinov E.F., Kravchenko A.N.,  
Tverdokhleba T.A., Balykina A.O.*

*M. Gorky Donetsk National Medical  
University*

Aim of research: evaluate modulating affect of adrenaline on platelets' activation during remission and relapse of chronic obstructive pyelonephritis (COP). Blood of 18 patients at the time of admission to hospital was used for investigation. Platelets' aggregation was performed at aggregometer Chrono-Log (USA) using subthreshold concentration of PAF, ADP, adrenaline, whose stimulation in control group did not exceed 10 % aggregation. During relapse of COP (8 patients), stimulating effect of adrenaline on platelets was somewhat higher than during remission, but still lower than in control ( $p < 0.05$ ). ADP induced an effect lower than

during remission and in control group. Simultaneous action of ADP and adrenaline exceeded action of ADP alone ( $p < 0.001$ ). Nevertheless, during relapse of COP no significant differences in adrenaline action on ADP-stimulated platelets as compared to remission phase was observed ( $p < 0.01$ ). PAF induced platelets' aggregation higher than in control and during remission ( $p < 0.01$ ). Synergism of action of adrenaline and PAF was most marked and exceeded that of control and remission phase group ( $p < 0.001$ ). Thus, during COP relapse, adrenaline potentiates PAF affect, while action of ADP on platelets decreases, as well as potentiating effect of adrenaline, which implies restriction of stimulatory effect of platelets on leukocytes.

**Key words:** *platelet aggregation, pathogenesis, chronic obstructive pyelonephritis, inflammation.*

*Впервые поступила в редакцию 24.04.2014 г.  
Рекомендована к печати на заседании  
редакционной коллегии после рецензирования*

УДК 616-006.446.1-053.2-037

**АНАЛИЗ ПОПУЛЯЦИИ БЛАСТНЫХ КЛЕТОК С ЛЕЙКОЗ-  
АССОЦИИРОВАННЫМ ИММУНОФЕНОТИПОМ У ПАЦИЕНТОВ С  
ОСТРЫМ В-ЛИМФОБЛАСТНЫМ ЛЕЙКОЗОМ**

***Вильчевская Е.В., Михайличенко В.Ю., Конашенкова В.В., Букалова  
Т.Н., Тетюра С.А., Бахчиванжи И.А.***

*ГУ «Институт неотложной и восстановительной хирургии им. В.К.Гусака  
НАМН Украины», г. Донецк; e-mail:pancreas1978@mail.ru*

Мониторинг минимальной резидуальной болезни (МРБ) основан на выявлении популяции клеток с лейкоз-ассоциированным иммунофенотипом (ЛАИФ), характерным для опухолевых клеток и никогда не встречающийся на нормальных. В данной работе проанализирована экспрессия применяемых для мониторинга МРБ антигенов CD10, CD58, CD34, CD38 на бластных клетках В-лимфобластного лейкоза детского возраста до начала и в ходе антилейкемического лечения. Установлено, что данные антигены не всегда гомогенно экспрессированы на лимфобластах: встречаются варианты с отсутствием какого-либо антигена, а также с гетерогенной экспрессией. Популяция В-лимфоидных опухолевых клеток в начале заболевания неоднородна, существуют субпопуляции с различными физическими и функциональными характеристиками. В ходе антилейкемического лечения происходит снижение показателей средней интенсивности флюоресценции лейкоз-ассоциированных антигенов.

**Ключевые слова:** *острый лейкоз, лейкоз-ассоциированный иммунофенотип, минимальная резидуальная болезнь, средняя интенсивность флюоресценции*

В большинство современных протоколов терапии детского острого лейкоза введен мониторинг минимальной резидуальной болезни (МРБ) как независимый критерий оценки ответа на терапию и полноту ремиссии [1, 2, 3, 5, 6, 7]. Определение МРБ заключается в выявлении остаточных лейкоэмических бластов, нераспознаваемых морфологически, но способных дать рост опухолевому клону. Метод иммунофенотипирования позволяет охарактеризовать клетку по ее функциональным рецепторам и дает возможность распознать морфологически недифференцируемые нормальные и патологические клетки. Принцип выявления популяции резидуальных клеток основан на том, что лейкозный клон клеток, имеющий однородные морфоцитохимические характеристики, является гетерогенным по антигенной структуре бластных элементов, с уникальной экспрессией в норме не встречающихся антигенов [4]. Совокупность таких признаков называют лейкоз-ассоциированный иммунофенотип (ЛАИФ) [8]. Для мониторинга МРБ при остром В-лимфолейкозе (В-ОЛЛ)

применяют различные комбинации моноклональных антител, к числу которых относятся CD10, CD58, CD34, CD38.

**Целью** настоящей работы была оценка экспрессии применяемых для мониторинга МРБ антигенов в ходе антилейкемического лечения.

#### Материалы и методы

Объект исследования – костный мозг 68 пациентов с CD10-положительным вариантом острого В-лимфобластного лейкоза (38 мальчиков и 30 девочек) в возрасте от 1 месяца до 16 лет (средний возраст — 5,7 лет), проходивших лечение в ДОГЦ с октября 2009 г по ноябрь 2013

г. Материал для анализа — костный мозг. Иммунофенотипирование на проточном цитометре FACSCalibur (BD). Анализ данных с помощью программного обеспечения FACSComp (BD) — программа CellQUEST.

#### Результаты и их обсуждение

На момент установления диагноза всем пациентам было проведено иммунофенотипирование с установлением количества позитивных по экспрессии лейкоз-ассоциированных антигенов CD10, CD58, CD34, CD38 бластных клеток. Данные антигены, являясь диагностически-значимыми при выявлении популяции лимфоидных бластов, не всегда были экспрессированы гомогенно: так, антиген CD10 в 9 % (6 из 68 обследованных образцов) отсутствовал на бластных клетках. В 26 % случаев ( $n = 18.$ ) отсутствовала экспрессия CD34 (рис. 1).

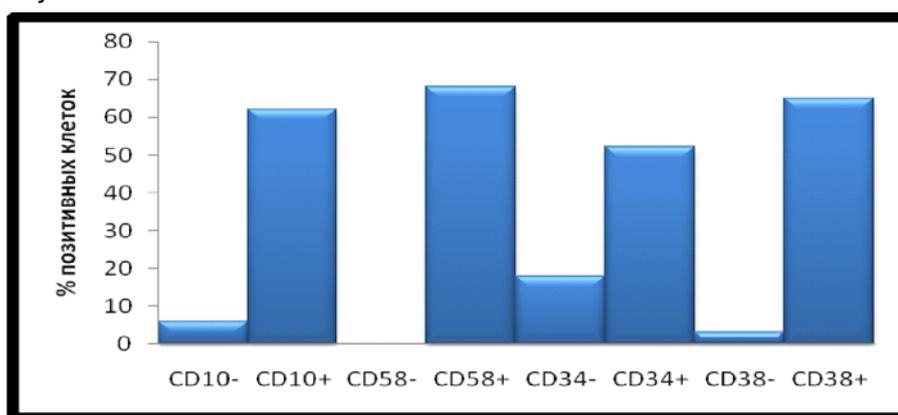


Рис. 1. Гетерогенность экспрессии антигенов

При этом в подгруппе CD10+ позитивных бластов, в 50 образцах из 62 CD10+ (80 %), экспрессия антигена была гомогенной, а в 12 образцах (20 %) присутствовали как CD10-положительные, так и CD10-отрицательные клетки. Во всех образцах с CD34-положительными бластами ( $n = 50$  или 74 %), в общем пуле бластных клеток определялись как CD34-положительные, так и CD34-отрицательные клетки. В 48 случаях (74 %) все опухолевые клетки одновременно экспрессировали CD10 и CD34. В костном мозге 2 образцов (3 %) определялись бласты, не экспрессирующие

вавшие ни CD10, ни CD34. Во всех случаях (100 %) на бласных клетках на момент установления диагноза наблюдали позитивную экспрессию антигена CD58 (от 28 до 83 %).

При выявлении у пациента популяции клеток с ЛАИФ, экспрессию данных антигенов/их сочетаний определяли при мониторинге МРБ. Также регистрировали среднюю интенсивность флюоресценции (СИФ) маркера, которая выражается в условных единицах (усл.ед.) и отражает плотность его распределения на мембране лимфобласта. Для изучения воздействия антилейкемического лечения на опухолевые клетки, мы оценили параметры интенсивности флюоресценции во временных точках контроля ответа на терапию, предусмотренных ALL IC-BFM 2009 протоколом [11]. Из всех обследованных нами пациентов, ни один не вошел в группу высокого риска (МРБ > 10 %). 47 пациентов (69 %) составили группу стандартного риска (0,1 % < МРБ < 10 %) и 21(31 %) — низкого риска (МРБ < 0,1 %). Полученные результаты представлены в табл. 1.

ванные комбинации маркеров на мембране опухолевых клеток, определить неклассические фенотипы (bright/dim), функциональная значимость которых не установлена. В нашем исследовании, при проведении множественного окрашивания ЛАИФ-антигенов с другими диагностическими маркерами, было выявлено разнообразие распределения клеток в опухолевой популяции с позитивной экспрессией CD10, CD34, CD38, CD58. Было установлено, что при наличии гомогенной коэкспрессии со стандартными «якорными» диагностическими маркерами (CD10<sup>+</sup>/CD19<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup>), хотя бы один из антигенов CD10, CD34, CD58 или CD38 неравномерно распределялся в популяции В-лимфоцитов (CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>dim</sup> или CD34<sup>dim</sup>/CD38<sup>+</sup> и т.д.). В подгруппе с уровнем МРБ < 0,1 % распределение клеток с позитивной экспрессией CD10, CD34 было более однородным: из 21 образца только в 4 случаях наблюдали гетерогенность распределения на точечном графике при окрашивании с антигеном CD38. Антиген CD58 демонстрировал гетерогенность

распределения на точечном графике при множественном окрашивании с антигенами CD9 CD19, CD38. При этом в подгруппе с более высоким значением МРБ, в ходе лечения наблюдали изменения в распределении CD58-позитивных клеток при двойном окрашивании с антигеном CD9 (рис. 2). В одном и том же образце костного мозга на 15 и 33 дни контроля, фиксировали наличие субпопуляций с различными фенотипами: CD9/CD58: CD9<sup>dim</sup>/CD58<sup>bright</sup>, CD9<sup>dim</sup>/CD58<sup>dim</sup>, CD9<sup>bright</sup> /CD58<sup>bright</sup>.

Таблица 1.

**Изменения параметров интенсивности флюоресценции антигенов в ходе терапии**

Антиген	СИФ в усл.ед					
	МРБ стандартный риск			МРБ низкий риск		
	0 день	15 день	33 день	0 день	15 день	33 день
CD 10	595	87	75	378	47	44
CD 34	280	80	207	122	29	29
CD 38	380	507	300	621	127	80
CD 58	102	92	90	309	233	122

Из таблицы видно, что в подгруппе с хорошим ответом на терапию (МРБ < 0,01 %), наблюдали снижение плотности распределения маркеров на мембране в ходе терапии. В подгруппе стандартного риска данная тенденция наблюдалась только для антигенов CD10 и CD58.

Метод проточной цитометрии позволяет проводить одновременно анализ нескольких параметров, что позволяет выявлять некоторые несистематизиро-

**Заключение**

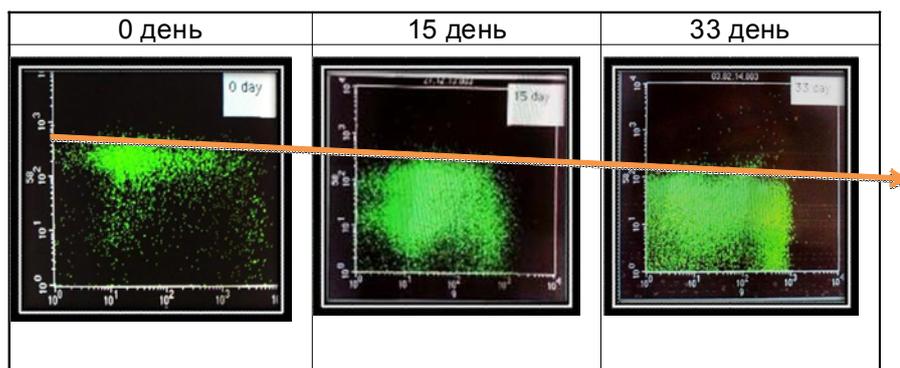
Любые изменения параметров экспрессии мембранных антигенов отражают процессы, происходящие внутри

клетки. Таким образом, возможно предположить, что популяция b-лимфоидных опухолевых клеток в начале заболевания неоднородна, существуют субпопуляции с различными физическими и функциональными характеристиками, с различной степенью

восприимчивости и резистентности к проводимой терапии. В ходе антилейкемического лечения происходит снижение показателей средней интенсивности флуоресценции лейкоз-ассоциированных антигенов. Это следует учитывать при проведении мониторинга МРБ: применять многоцветные комбинации антител, учитывать интенсивность флуоресценции маркеров, контролировать популяции с нестандартным фенотипом.

#### Литература

1. Савва Н.Н. Прогностическое значение минимальной остаточной болезни для безрецидивной выживаемости детей с острым лимфобластным лейкозом на протоколе ОЛЛ-МБ-2002 (однофакторный и многофакторный анализ) / Н.Н. Савва, О.В. Красько, М.В. Белевцев и др. // Онкогематология. -2009.-№2.-С. 17-21.
2. Borowitz M.J. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia and its relationship to other prognostic factors: a Children's Oncology Group study / M.J. Borowitz, M. Devidas, S.P. Hunger et al. // Blood. — 2008. — Vol. 111.- N12. — P. 5477-5485.
3. Vidriales M.B. Minimal residual disease in adolescent (older than 14 years) and adult acute lymphoblastic leukaemias: early immunophenotypic evaluation has high clinical value / M.B. Vidriales, J.J. Perez, M.C. Lopez-Berges et al. // Blood.- 2003. -Vol. 101.- N12. — P. 4695-4700.
4. Borowitz M.J. Minimal residual disease detection in childhood ALL / M.J. Borowitz // Haematopoiesis Immunology. -2010. - Vol. 7.- N1. — P. 24-35.



Линия указывает снижение интенсивности флуоресценции

Рис. 2. Изменение распределения CD58-позитивных клеток в опухолевой популяции на бластных клетках (Пациентка Н. МРБ = 5,8 %)

5. Bruggemann M. Standardized MRD quantification in European ALL trials: Proceedings of the Second International Symposium on MRD assessment in Kiel, Germany, 18-20 September 2008 / M. Bruggemann, A. Schrauder, T. Raff // Leukemia. — 2010. — Vol. 24. — P. 521-535.
6. Campana D. Progress of minimal residual disease studies in childhood acute leukemia / D. Campana // Curr. Hematol. Malig. Rep. — 2010. — Vol. 5.- N3. — P.169-176.
7. Coustan-Smith E. Clinical importance of minimal residual disease in children with acute lymphoblastic leukaemia / E. Coustan-Smith, J. Sancho, M.L.Hancock et al // Blood. — 2000. — Vol. 96, N8. — P. 2691-2696.
8. McKenna RW, Asplund SL, Kroft SH. Immunophenotypic analysis of hematogones (B-lymphocyte precursors) and neoplastic lymphoblasts by 4-color flow cytometry. Leuk Lymphoma. 2004;45:277-285.)
9. Campana, D. Minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia / D. Campana // Hematology Am Soc Hematol Educ Program. — 2010. — P. 7–12.
10. J.J.M van Dongen, L.Lhermitte,, EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes / Leukemia (2012) 26, www.nature.com/leu

#### References

1. Savva N.N. Prognostic meaning of minimal residual disease for relapse-free survival of children with acute lymphoblastic leucosis by the ALL-MB-2002 protocol (single-factor and multiple-factor analysis) / N.N. Savva,

O.V. Krasko, M.V. Belevtsev and colleagues  
// Oncohematology -2009.-№2.-P. 17-21.  
[Rus.]

2. Borowitz M.J. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia and its relationship to other prognostic factors: a Children's Oncology Group study / M.J. Borowitz, M. Devidas, S.P. Hunger et al. // Blood. — 2008. — Vol. 111.- N12. — P. 5477-5485.
3. Vidriales M.B. Minimal residual disease in adolescent (older than 14 years) and adult acute lymphoblastic leukaemias: early immunophenotypic evaluation has high clinical value / M.B. Vidriales, J.J. Perez, M.C. Lopez-Berges et al. // Blood.- 2003. -Vol. 101.- N12. — P. 4695-4700.
4. Borowitz M.J. Minimal residual disease detection in childhood ALL / M.J. Borowitz // Haematopoiesis Immunology. -2010. - Vol. 7.- N1. — P. 24-35.
5. Bruggemann M. Standardized MRD quantification in European ALL trials: Proceedings of the Second International Symposium on MRD assessment in Kiel, Germany, 18-20 September 2008 / M. Bruggemann, A. Schrauder, T. Raff // Leukemia. — 2010. — Vol. 24. — P. 521-535.
6. Campana D. Progress of minimal residual disease studies in childhood acute leukemia / D. Campana // Curr. Hematol. Malig. Rep. — 2010. — Vol. 5.- N3. — P.169-176.
7. Coustan-Smith E. Clinical importance of minimal residual disease in children with acute lymphoblastic leukaemia / E. Coustan-Smith, J. Sancho, M.L.Hancock et al // Blood. — 2000. — Vol. 96, N8. — P. 2691-2696.
8. McKenna RW, Asplund SL, Kroft SH. Immunophenotypic analysis of hematogones (B-lymphocyte precursors) and neoplastic lymphoblasts by 4-color flow cytometry. Leuk Lymphoma. 2004;45:277-285.)
9. Campana, D. Minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia / D. Campana // Hematology Am Soc Hematol Educ Program. — 2010. — P. 7-12.
10. J.J.M van Dongen, L.Lhermitte,, EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes / Leukemia (2012) 26, www.nature.com/leu

## Резюме

### АНАЛІЗ ПОПУЛЯЦІЇ БЛАСТНИХ КЛІТИН З ЛЕЙКОЗ-АСОЦІЙОВАНИМ ІМУНОФЕНОТИПОМ У ПАЦІЄНТІВ З ГОСТРИМ В-ЛІМФОБЛАСТНИМ ЛЕЙКОЗОМ

*Вільчевская Е.В., Михайліченко В.Ю.,  
Конашенкова В.В., Букалова Т.Н.,  
Тетюра С.А., Бахчіванжі І.А.*

Моніторинг мінімальної резидуальної хвороби (МРБ) заснован на виявленні популяції клітин з лейкоз-асоційованим імунофенотипом (ЛАІФ), характерним для пухлинних клітин і який ніколи не зустрічається на нормальних. У даній роботі проаналізована експресія застосовуваних для моніторингу МРБ антигенів CD10, CD58, CD34, CD38 на бластних клітинах В-лімфобластного лейкозу дитячого віку до початку і в ході антлейкемічного лікування. Встановлено, що данні антигени не завжди гомогенно експресовані на лімфобластах: зустрічаються варіанти з відсутністю будь-якого антигену, а також з гетерогенною експресією. Популяція В-лімфоїдних пухлинних клітин на початку захворювання неоднорідна, існують субпопуляції з різними фізичними та функціональними характеристиками. У ході антлейкемічного лікування відбувається зниження показників середньої інтенсивності флюоресценції лейкоз-асоційованих антигенів.

**Ключові слова:** *гострий лейкоз, лейкоз-асоційований імунофенотип, мінімальна резидуальна хвороба, середня інтенсивність флюоресценції*

## Summary

### ANALYSIS OF THE POPULATION WITH LEUKEMIA-ASSOCIATED IMMUNOPHENOTYPE BLAST CELLS FROM PATIENTS WITH ACUTE B- LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA

*Vilchevskay E.V., Mikhailichenko V.Yu.,  
Konashenkova V.V., Bukalova T.N.,  
Tetura S.A., Bahchivangi I.A.*

Monitoring of minimal residual disease (MRD) is based on the identification of cell population with leukemia-associated immunophenotype (LAIF), which is in-

herent for tumor cells and has never found on normal ones. This study we analyzed the expression of antigens, CD58 CD10, CD34, CD38 which are used for the monitoring MRD on blast cells children's B-lymphoblastic leukemia before and during antileukemic treatment. Found that these antigens are not always homogeneously expressed on lymphoblasts: there are variants with the absence of any antigen and with heterogeneous expression. The population-lymphoid tumor cells at the beginning of the disease

is heterogeneous, there are subpopulations with different physical and functional characteristics. During antileukemic treatment the average fluorescence intensity leukemia-associated antigens is decrease.

**Key words:** *acute leukemia, leukemia-associated immunophenotype, minimal residual disease, mean fluorescence intensity*

*Впервые поступила в редакцию 25.02.2014 г. Рекомендована к печати на заседании редакционной коллегии после рецензирования*

УДК 616.233 – 02 – 053.2 – 092 : 612.017] – 085 : 615.8

## ТЕОРЕТИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ НОВОГО КОМПЛЕКСНОГО МЕТОДА ЛЕЧЕНИЯ РЕЦИДИВИРУЮЩЕГО БРОНХИТА У ДЕТЕЙ

**Нечипуренко О.Н., Пархоменко Л.К.**

*Харьковская медицинская академия последипломного образования;  
shonik@list.ru*

Увеличение количества детей, получающих лечение по поводу рецидивирующего бронхита в условиях поликлиники, диктует необходимость разработки новых комплексных схем лечения данной патологии.

**Ключевые слова:** *дети, рецидивирующий бронхит, новый способ лечения, динамика клинических симптомов.*

### Введение

Ухудшение экологической обстановки, общепопуляционное снижение резистентности к воздействиям неблагоприятных факторов внешней среды продолжают способствовать росту заболеваемости бронхитами у детей. Увеличивается количество рецидивирующих форм данной патологии [1, 2].

Увеличивается количество больных, получающих лечение по поводу рецидивирующего бронхита (РБ) в условиях детской поликлиники [3].

Современные проблемы, тенденции развития бронхитов у детей, свидетельствуют о необходимости создания новых схем их профилактики и лечения с включением комплексных физиотерапевтических методов, которые обладают возможностью позитивного влияния как на этиопатогенез заболевания, так и на различные звенья физиологических мер

защиты организма [4].

### Цель

Разработать новый комплексный метод лечения рецидивирующего бронхита у детей с учетом возможности влияния физиотерапии, как на патогенез патологического процесса, так и на физиологические меры защиты организма.

### Материалы и методы

Нами был разработан новый комплекс физиотерапии РБ (фаза обострения) у детей (Патент України «Спосіб лікування рецидивуючого бронхіту у дітей» М.кл. А61В 5/00, № 32631, бюл. № 10. Нечипуренко О.М.), который состоит из последовательного применения теплового воздействия на ЛОР-органы, сочетанного воздействия низкочастотного ультразвука, оптического потока красного диапазона спектра и низкочастотного магнитного поля, ингаляции синглетно-кислородной смесью.