

41. Toldo S, Seropian IM, Mezzaroma E, Van Tassel BW, Salloum FN, Lewis EC, Voelkel N, Dinarello CA, Abbate A. Alpha-1 antitrypsin inhibits caspase-1 and protects from acute myocardial ischemia-reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol.* 2011 Aug; 51 (2): 244–51.
42. Greene CM, Marciniak SJ, Teckman J, Ferrarotti I, Brantly ML, Lomas DA, Stoller JK, et al. alpha1-Antitrypsin deficiency. *Nat Rev Dis Primers* 2016 и 2: 16051.
43. de Serres FJ. Worldwide racial and ethnic distribution of alpha1-antitrypsin deficiency: summary of an analysis of published genetic epidemiologic surveys. *Chest.* 2002 Nov; 122 (5): 1818–29.
44. Hamesch K, Mandorfer M, Pereira VM et al. European Alpha1-Liver Study Group. Liver Fibrosis and Metabolic Alterations in Adults With alpha-1-antitrypsin Deficiency Caused by the Pi\*ZZ Mutation. *Gastroenterology.* 2019 Sep; 157 (3): 705–719.
45. Regev A, Guequeta C, Molina EG et al. Does the heterozygous state of alpha-1 antitrypsin deficiency have a role in chronic liver diseases? Interim results of a large case-control study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2006 Jul; 43 Suppl 1: S30–5.
46. Valenti L, Dongiovanni P, Piperno A et al. Alpha 1-antitrypsin mutations in NAFLD: high prevalence and association with altered iron metabolism but not with liver damage. *Hepatology.* 2006 Oct; 44 (4): 857–64.
47. Strnad P, Buch S, Hamesch K et al. Heterozygous carriage of the alpha1-antitrypsin Pi\*Z variant increases the risk to develop liver cirrhosis. *Gut.* 2019 Jun; 68 (6): 1099–1107.
48. El-Rayah EA, Twomey PJ, Wallace EM et al. Both alpha-1-antitrypsin Z phenotypes and low caeruloplasmin levels are over-represented in alcohol and nonalcoholic fatty liver disease cirrhotic patients undergoing liver transplant in Ireland. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2018 Apr; 30 (4): 364–367.
49. Valenti L, Dongiovanni P, Fracanzani AL, et al. Increased susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease in heterozygotes for the mutation responsible for hereditary hemochromatosis. *Dig Liver Dis* 2003; 35: 172–178.
50. Dongiovanni P, Valenti L, Ludovica Fracanzani A, et al. Iron depletion by deferoxamine up-regulates glucose uptake and insulin signaling in hepatoma cells and in rat liver. *Am J Pathol* 2008, 172: 738–747.
51. Valenti L, Fracanzani AL, Dongiovanni P, et al. Iron depletion by phlebotomy improves insulin resistance in patients with nonalcoholic fatty liver disease and hyperferritinemia: evidence from a case-control study. *Am J Gastroenterol* 2007, 102: 1251–1258.
52. Facchini FS, Hua NW, Stoohs RA. Effect of iron depletion in carbohydrate-intolerant patients with clinical evidence of nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology.* 2002, 122: 931–939.
53. Bacon B. R., P. C. Adams, K. V. Kowdley, L. W. Powell, and A. S. Tavill. 2011. Diagnosis and management of hemochromatosis: 2011 practice guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology* 54: 328–343.
54. Fleming R. E., and P. Ponka. 2012. Iron overload in human disease. *N. Engl. J. Med.* 366: 348–359.
55. Chua A. C., R. M. Graham, D. Trinder, and J. K. Olynyk. 2007. The regulation of cellular iron metabolism. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 44: 413–459.
56. Cabantchik ZI. Labile iron in cells and body fluids: physiology, pathology, and pharmacology. *Front Pharmacol* 2014, 45, 5.
57. Pietrangelo A. Metals, oxidative stress, and hepatic fibrogenesis. *Semin Liver Dis* 1996, 13–30, 16.
58. Tan TC, Crawford DH, Jaskowski LA et al. Altered lipid metabolism in Hfe-knockout mice promotes severe NAFLD and early fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2011 Nov, 301 (5): G865–76.
59. Wagner J, Fillebeen C, Halliotis T, Charlebois E, Katsarou A, Mui J, Valli H, Pantopoulos K. Mouse models of hereditary hemochromatosis do not develop early liver fibrosis in response to a high fat diet. *PLoS One.* 2019 Aug 23; 14 (8): e0221455.
60. Hanson EH, Imperatore G, Burke W. HFE gene and hereditary hemochromatosis: a HuGE review. *Human Genome Epidemiology.* *Am J Epidemiol.* 2001 Aug 1; 154 (3): 193–206.
61. Ye Q, Qian BX, Yin WL, Wang FM, Han T. Association between the HFE C282Y, H63D Polymorphisms and the Risks of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease, Liver Cirrhosis and Hepatocellular Carcinoma: An Updated Systematic Review and Meta-Analysis of 5,758 Cases and 14,741 Controls. *PLoS One.* 2016 Sep 22; 11 (9): e0163423.
62. Raszeja-Wyszomirska J, Kurzawski G, Lawniczak M, Miezynska-Kurtycz J, Lubinski J. Nonalcoholic fatty liver disease and HFE gene mutations: a Polish study. *World J Gastroenterol.* 2010 May 28; 16 (20): 2531–6.
63. Hemaerz R, Yeung E, Clark JM, Kowdley KV, Brancati FL, Kao WH. Hemochromatosis gene and nonalcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis. *J Hepatol.* 2011 Nov; 55 (5): 1079–85.
64. Первакова МЮ, Чудинов АЛ, Лапин СВ и др. Диагностическая и клиническая значимость определения фенотипа α-1-антитрипсина при системных васкулитах. Научно-практическая ревматология. 2017; 55 (2): 164–168.
65. EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol.* 2016 Jun; 64 (6): 1388–402.

**Для цитирования:** Сидоренко Д. В., Назаров В. Д., Лапин С. В., Эмануэль В. А. Роль молекулярно-генетических факторов в патогенезе и диагностике неалкогольной жировой болезни печени (обзор литературы и собственные данные). Медицинский алфавит. 2020; (5): 13–19. <https://doi.org/10.33667/2078-5631-2020-5-13-19>

**For citation:** Sidorenko D. V., Nazarov V. D., Lapin S. V., Emanuel V. L. Role of molecular genetic factors in pathogenesis and diagnosis of non-alcoholic fatty liver disease (literature review and own data). *Medical alphabet.* 2020; (5): 13–19. <https://doi.org/10.33667/2078-5631-2020-5-13-19>



DOI: 10.33667/2078-5631-2020-5-19-24

## Орфанный рецептор ROR1 для детекции минимальной остаточной болезни при хроническом лимфолейкозе

**Ю. В. Миролюбова**, врач клинической лабораторной диагностики, ассистент кафедры лабораторной медицины и генетики  
**Н. С. Тимофеева**, врач-гематолог  
**В. А. Барт**, к.ф.-м.н., в.н.с. НИЛ биостатистики  
**Е. В. Толстомятова**, врач клинической лабораторной диагностики  
**Е. С. Фетисов**, врач клинической лабораторной диагностики  
**В. В. Стругов**, врач-гематолог  
**В. М. Соловьев**, клинический ординатор кафедры лабораторной медицины и генетики  
**А. Ю. Зарицкий**, д.м.н. проф., директор института гематологии, г.н.с. НИЛ онкогематологии  
**Т. В. Вавилова**, д.м.н. проф., зав. кафедрой лабораторной медицины и генетики

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Минздрава России, г. Санкт-Петербург

### Orphan receptor ROR1 for detection of minimal residual disease in chronic lymphocytic leukemia

Yu. V. Mirolyubova, N. S. Timofeeva, V. A. Bart, V. M. Solovyov, E. V. Tolstopyatova, E. S. Fetisov, V. V. Strugov, A. Yu. Zaritsky, T. V. Vavilova  
 National Medical Research Centre n.a. V. A. Almazov, Saint Petersburg, Russia

## Резюме

Актуальность и цели. Детекция минимальной остаточной болезни (МОБ) при хроническом лимфолейкозе (ХЛЛ) методом многоцветной проточной цитометрии нашла широкое применение в клинических исследованиях для оценки эффективности лечения. Метод совершенствуется в направлении поиска наиболее чувствительных и специфичных маркеров для применения в панели для 6–8 цветных цитометров. По литературным данным, ROR1 демонстрирует высокую экспрессию на ХЛЛ-клетках и отсутствие экспрессии на зрелых лимфоцитах, что отличает его от других маркеров, применяющихся для выявления МОБ при ХЛЛ. Цель исследования: определение информативности маркера ROR1 в четырехцветной панели для оценки минимальной остаточной болезни при ХЛЛ методом проточной цитометрии. Материалы и методы. Проанализировано 64 образца костного мозга 37 пациентов с верифицированным диагнозом ХЛЛ после 3-го и 6-го курса терапии по схеме «бендамустин + ритуксимаб» (BR) – 15 МОБ-отрицательных и 49 МОБ-положительных. Количественное определение МОБ проводилось стандартизованным методом четырехцветной проточной цитометрии по рекомендациям ERIC (Европейская инициатива по изучению ХЛЛ) с включением в диагностическую панель маркера ROR1. Выполнен дискриминационный анализ дифференцирующих свойств диагностических маркеров с помощью программы Statistica 10. Результаты. ROR1 продемонстрировал высокие дифференцирующие свойства в отношении ХЛЛ-клеток и зрелых лимфоцитов. Во всех проанализированных образцах отмечалась яркая мономорфная экспрессия ROR1 на ХЛЛ-клетках и В-клеточных предшественниках и отсутствие его экспрессии на зрелых лимфоцитах. Выводы. ROR1 является высокоспецифичным и чувствительным маркером для выявления ХЛЛ-клеток среди зрелых лимфоцитов. Высокая экспрессия ROR1 на нормальных В-клеточных предшественниках требует применения ROR1 в сочетании с маркером, дифференцирующим ХЛЛ-клетки от клеток-предшественников (CD81).

Ключевые слова: хронический лимфолейкоз, минимальная остаточная болезнь, ROR1.

## Summary

Background and Aims. The detection of minimal residual disease (MRD) of chronic lymphocytic leukemia (CLL) using multicolor flow cytometry has been widely used in clinical studies to evaluate the effectiveness of treatment. The method is being improved by searching for the most sensitive and specific markers for use in panels for 6–8 color cytometers. According to published data, ROR1 shows high expression on CLL cells, and lack of expression on mature lymphocytes, which distinguishes it from other markers used to detect MRD in CLL. Aim: to determine a significance of ROR1 for detection of MRD CLL by flow cytometry in a 4-color panel. Materials and Methods. We analyzed 64 bone marrow samples of 37 patients with a verified diagnosis of CLL after the 3rd and 6th cycles of therapy according to bendamustine and rituximab (BR) regimen – 15 MRD-negative and 49 MRD-positive. Quantitative determination of MRD was carried out by the standardized method of 4-color flow cytometry according to the recommendations of ERIC (European research initiative on CLL) with the inclusion of ROR1 in the diagnostic panel. A discriminatory analysis of the differentiating properties of diagnostic markers was performed using Statistica 10. Results. ROR1 has demonstrated high differentiating properties on CLL cells and mature lymphocytes. All the analyzed samples showed a bright monomorphic expression of ROR1 on CLL cells and B-cell precursors, and the absence of its expression on mature lymphocytes. Conclusion. ROR1 is a highly specific and sensitive marker for the detection of CLL cells among mature lymphocytes. The high expression of ROR1 on normal B-cell precursors requires the use of ROR1 in combination with a marker that differentiates CLL cells from progenitor cells (CD81).

Key words: chronic lymphocytic leukemia, minimal residual disease, ROR1.

## Введение

Хронический лимфолейкоз (ХЛЛ) – это заболевание, характеризующееся пролиферацией злокачественных В-лимфоцитов с иммунофенотипом CD19<sup>+</sup>, CD23<sup>+</sup> и CD5<sup>+</sup>. [5, 9]. В диагностическую панель ХЛЛ входят как обязательные маркеры CD19, CD5, CD23, каппа, лямбда, так и дополнительные для проведения дифференциальной диагностики с другими В-клеточными опухолями: CD20, CD22, CD79b, CD43, CD200, CD10, ROR1 [6].

Важной проблемой лабораторной диагностики при лечении ХЛЛ представляется определение минимальной остаточной болезни (МОБ). Большим клиническим вызовом является тот факт, что эрадикация клеток ХЛЛ любой доступной терапией, кроме аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток, не приводит к излечению от заболевания, а лишь к временной ремиссии, во время которой заболевание не манифестирует клинически, но клетки ХЛЛ продолжают персистировать в организме. В дальнейшем они являются субстратом для прогрессии заболевания, количественно коррелируя со степенью риска рецидива [5–8].

Для выявления МОБ после проведения противоопухолевой терапии используется многоцветная проточная цитометрия в соответствии со стандартизированным протоколом [7, 8]. Этот многопараметрический анализ основан на скрининге антигенного представительства CD19, CD5, CD20, CD22, CD43, CD38, CD45, CD79b и CD81 [7, 8]. До настоящего времени нет единого мнения о том, какие маркеры следует включать в диагностические алгоритмы. Добавление новых высокоспецифичных маркеров к стандартизированным панелям может улучшить точность выявления МОБ. Для ХЛЛ таким маркером может быть подобный рецепторной тирозинкиназе орфанный рецептор-1 (ROR1) [1–3, 10], учитывая его профиль экспрессии на опухолевых клетках.

ROR1 является членом семейства рецепторных тирозинкиназ, состоящего из ROR1 и ROR2. ROR1 широко вовлечен в процессы нормального эмбрионального развития, но его экспрессия на большинстве зрелых клеток отсутствует. Во взрослом организме экспрессия ROR1 обнаружена в жировой ткани, паренхиме поджелудочной железы,

легких, на мезенхимальных клетках и на предшественниках В-лимфоцитов [1–3]. В последнее время возрос интерес к ROR1 в связи с его участием в патогенезе злокачественных новообразований. В большинстве исследований было высказано предположение, что ROR-1 может стимулировать различные сигнальные пути, результатом чего является увеличение выживаемости, пролиферации и метастазирования опухолевых клеток [1–3].

Первоначально отчетливая высокая экспрессия ROR1 была обнаружена на опухолевых клетках при хроническом лимфолейкозе (ХЛЛ), в то время как ROR2 на них не определяется. В дальнейшем экспрессия ROR1 была обнаружена при неходжкинских лимфомах, остром лимфобластном лейкозе, раке легкого, толстой кишки, поджелудочной железы, матки, яичника, молочной железы, яичка, предстательной железы и меланоме [1–3]. В работе Uhrmacher *et al.* [10] уровень ROR1 был определен у 177 пациентов с ХЛЛ: из них 105 пациентов ранее не получали лечение и 72 прошли различное количество курсов противоопухолевой тера-

пии. В ходе анализа полученных данных было выявлено, что ROR1 равномерно и высоко экспрессирован в 96,8 % (80,1–99,8 %) случаев на CD19<sup>+</sup>/CD5<sup>+</sup>-клетках на момент постановки диагноза ХЛЛ. Стадия и сопутствующая патология никак не влияли на профиль экспрессии ROR1, также не было выявлено значимой разницы уровня экспрессии ROR1 на ХЛЛ-клетках на всех стадиях лечения, независимо от режима проводимой противоопухолевой терапии. Уровень экспрессии ROR1 не был ассоциирован с такими прогностическими факторами, как CD38 и ZAP70. В качестве контроля были проанализированы образцы периферической крови здоровых доноров. Для исследования были выбраны популяции Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов, моноцитов, гранулоцитов и NK-клеток. Экспрессия ROR1 была стабильно низкой на всех контрольных группах проанализированных клеток.

Данные о применении ROR1 для детекции МОБ при ХЛЛ впервые были представлены в работе Farren *et al* [4]. Минимальная остаточная болезнь была определена методом проточной цитометрии у 56 больных (86 образцов) с использовани-

Таблица 1  
Четырехцветная панель для диагностики МОБ ХЛЛ (шесть пробирок)

№ пробирки	Флюорохромы для четырехцветной панели			
	FITC	PE	PerCP-Cy5.5	APC
1	CD45	CD14	CD19	CD3
2	CD20	CD38	CD19	CD5
3	CD81	CD22	CD19	CD5
4	CD79b	CD43	CD19	CD5
5	slgk	slgλ	CD19	CD5
6	CD160	ROR1	CD19	CD5

Примечание: (FITC – изотиоцианат флуоресцеина, PE – фикоэритрин, PerCP-Cy5.5 – перидинин хлорофилл протеин-цианин 5.5, APC – аллофикоцианин, CD – кластер дифференцировки).

Таблица 2  
Чувствительность (SE), специфичность (SP) и прогностическая значимость отрицательного и положительного результатов (NPV и PPV) диагностических маркеров для определения МОБ ХЛЛ

	CD20	CD38	CD22	CD81	CD79b	CD43	CD160	ROR1
SE	0,71	1,00	0,18	0,97	0,88	0,97	0,29	0,97
SP	0,43	0,36	0,43	0,50	0,50	0,43	1,00	0,93
NPV	0,81	0,83	0,50	0,86	0,86	0,84	0,93	0,96
PPV	0,50	1,00	0,13	0,88	1,00	0,86	0,29	0,93

ем антител CD2 FITC, CD5 Pe-Cy7, CD19 PerCP5.5, CD45 V500, CD160 PE, ROR-1AF647. В работе отмечались высокая специфичность, экономичность и простота исследования. Вместе с тем количество

проанализированных случаев было ограниченным. A. Rawstron отмечает, что ROR1 является перспективным маркером для детекции МОБ и его применение нуждается в дальнейшем исследовании [8].

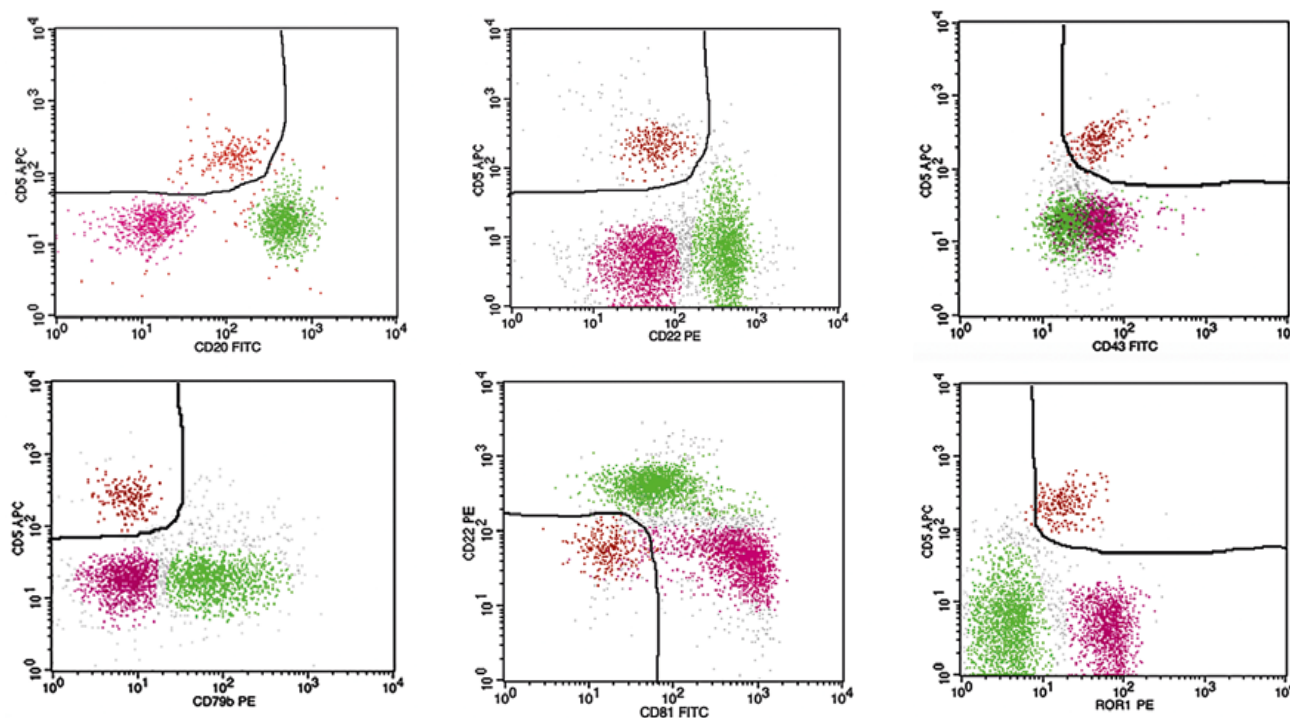


Рисунок 1. Выделение популяции ХЛЛ-клеток (выделены красным цветом) среди всех В-клеток (зеленые – зрелые В-лимфоциты, малиновые – В-клеточные предшественники или гематопоны).



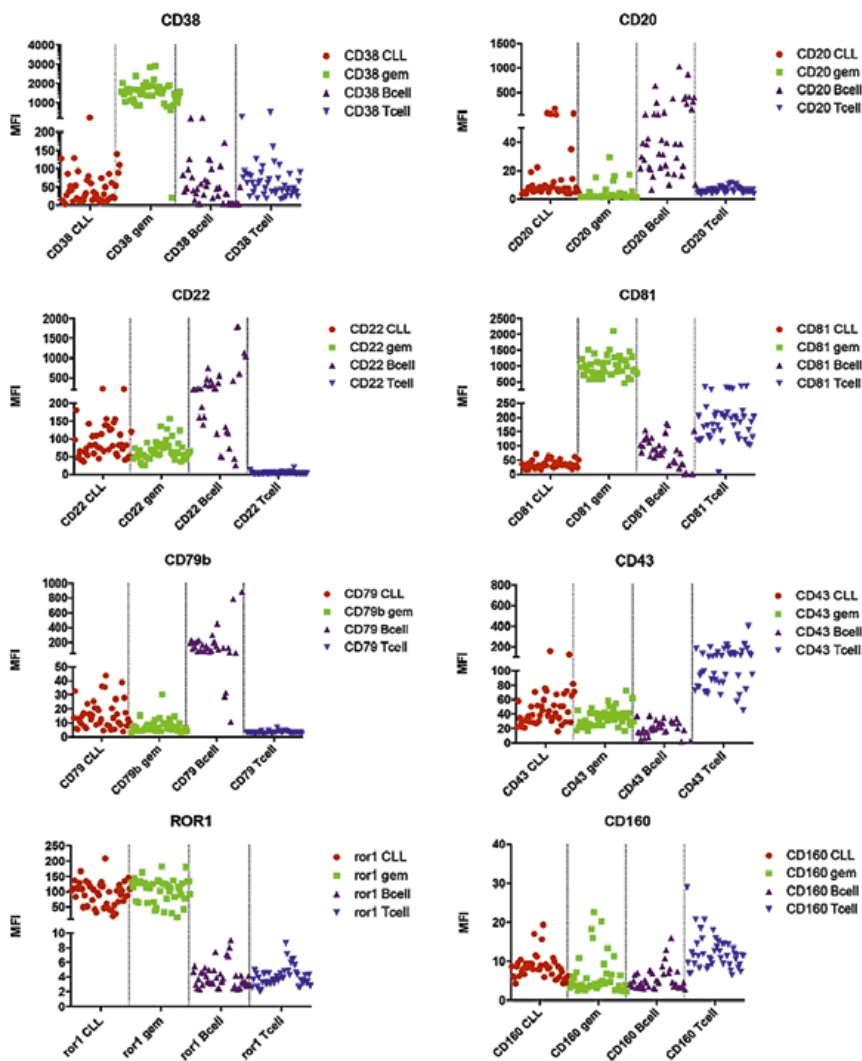


Рисунок 2. Средняя интенсивность экспрессии ROR1 и других диагностических маркеров на популяциях ХЛЛ-клеток (CLL), В-клеточных предшественников (gem), В-лимфоцитов (B-cell), Т-лимфоцитов (T-cell).

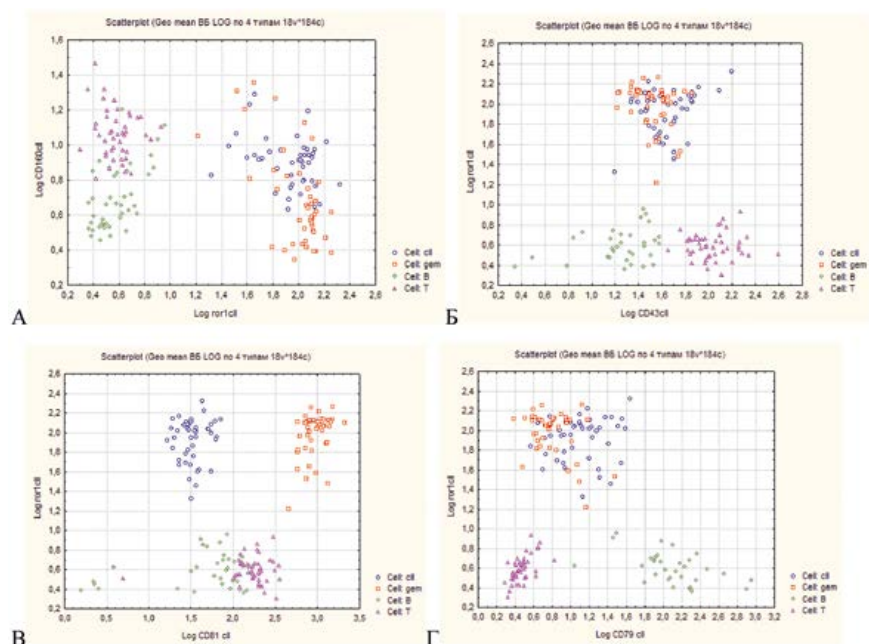


Рисунок 3. Попарные диаграммы рассеяния Geomean в четырех типах клеток: А – ROR1 и CD160; Б – ROR1 и CD43; В – ROR1 и CD81; Г – ROR1 и CD79b. ХЛЛ-клетки выделены голубым цветом, В-клеточные предшественники – красным, В-лимфоциты – зеленым, Т-лимфоциты – фиолетовым.

Целью исследования было определение возможности использования маркера ROR1 в четырехцветной панели проточной цитометрии для оценки МОБ при ХЛЛ.

## Материалы и методы

В исследование были включены 64 образца 37 пациентов с подтвержденным диагнозом ХЛЛ после иммунохимиотерапии по схеме «бендамустин + ритуксимаб». МОБ оценивали после 3-го и 6-го курса лечения стандартизованным методом четырехцветной проточной цитометрии на приборе BD FACS Calibur (США). Материалом для исследования был аспират костного мозга. Протокол подготовки был стандартной и включала в себя следующие этапы: определение клеточности образца с целью установления оптимального объема пробы, мечение (окраска) моноклональными антителами, лизис эритроцитов, отмывку.

Для протокол подготовки использовались реактивы BD FACS Lyse, Cell Wash и моноклональные антитела производства BD Biosciences (США) и Dako (США), в том числе моноклональные антитела к ROR1, меченные фикоэритрином, производства BD Biosciences (США) (клон 4A5) (табл. 1).

Для анализа собиралось 500 тысяч событий в гейте лейкоцитов (CD45<sup>+</sup>). Применялась стратегия гейтирования, рекомендованная ERIC [5], включающая в себя этапы выделения всех В-клеток по маркеру CD 19, исключение контаминации Т-лимфоцитами (по маркеру CD 3), выделение популяции ХЛЛ-клеток из всех В-клеток (пробирки № 2, 3, 4, 6).

Примеры выявления популяции опухолевых ХЛЛ-клеток среди всех CD19<sup>+</sup> В-клеток (зрелых В-лимфоцитов и В-клеточных предшественников) представлены на рис. 1. Результат анализа выдавался в виде процента всех В-клеток и ХЛЛ-клеток от лейкоцитов костного мозга. МОБ-положительными считались образцы, содержащие 0,01 % и более ХЛЛ-клеток (1 и более ХЛЛ-клеток на 10 тысяч нормальных лейкоцитов).

Таким образом, в панели для диагностики МОБ ХЛЛ маркер CD45

обеспечивал подсчет количества проанализированных лейкоцитов, CD19 – выделение всех В-клеток (как опухолевых, так и нормальных), антитела к легким цепям каппа и лямбда – оценку клональности. Антитела CD5, CD38, CD20, CD81, CD79b, CD43, CD22, CD160 и ROR1 служили для выявления ХЛЛ-клеток среди всех В-клеток. Средняя интенсивность экспрессии каждого из диагностических маркеров оценивалась по параметру Geomean в группе МОБ-положительных пациентов в каждой из следующих популяций: ХЛЛ-клетки, В-клеточные предшественники, зрелые В-лимфоциты, Т-лимфоциты. Статистическая обработка полученных данных осуществлялась с помощью программы Statistica 10, графики построены с помощью программного обеспечения GraphPad Prism.

### Результаты исследования

Из 64 проанализированных образцов костного мозга, согласно стандартизированной стратегии и критериям ERIC [7], в 49 пробах была выявлена МОБ и 15 случаев были МОБ-отрицательными. На основании полученных данных по стандартной методике вычислены чувствительность (SE), специфичность (SP) и прогностическая значимость отрицательного и положительного результатов (NPV и PPV) по каждому из восьми маркеров – CD38, CD20, CD81, CD79b, CD43, CD22, CD160 и ROR1 (табл. 2).

Оптимальное сочетание чувствительности и специфичности выявлено у ROR1, CD43, CD81 и CD79b. Во всех проанализированных случаях отмечались яркая мономорфная экспрессия ROR1 на В-клеточных предшественниках и ХЛЛ-клетках и отсутствие экспрессии на зрелых В-лимфоцитах.

Для определения совокупного вклада групп маркеров и их оптимального сочетания был выполнен дискриминантный анализ методом пошагового исключения позиций. Метод позволяет изъять те переменные, которые не несут статистически значимой информации для дискриминации (различения) групп

**Таблица 3**  
Характеристики включения маркеров пошаговым критерием в итоговую дискриминантную комбинацию

Маркер	Частичная лямбда Уилкса	F-статистика	P	Толерантность
ROR1	0,1727	239,5632	0,000000000	0,9535
CD81	0,2042	194,8611	0,000000000	0,8165
CD22	0,6450	27,5249	0,000000000	0,8025
CD43	0,6720	24,4002	0,000000000	0,8469
CD79	0,7597	15,8177	0,000000005	0,8192
CD38	0,8581	8,2145	0,000042755	0,8397
CD160	0,8913	6,0603	0,000639468	0,8977
CD20	0,9313	3,6643	0,013830630	0,7620

**Таблица 4**  
Факторные нагрузки и коэффициенты дискриминантных функций (ДФ) для ХЛЛ-клеток, В-клеточных предшественников, В-лимфоцитов, Т-лимфоцитов

	Факторные нагрузки		
	ДФ1	ДФ2	ДФ3
CD 22	–0,50	–0,64	–0,08
CD81	–0,06	0,29	0,83
CD79b	–0,13	–0,75	–0,12
CD43	0,20	0,34	–0,11
ROR1	–0,77	0,55	–0,20

на основании F-статистики или критерия Фишера. В нашем случае такой переменной являлась средняя интенсивность экспрессии (Geomean) каждого из исследуемых маркеров (CD38, CD20, CD81, CD79b, CD43, CD22, CD160 и ROR1). А группами, которые мы должны различить между собой, были популяции ХЛЛ-клеток, В-предшественников, зрелых В-лимфоцитов и Т-лимфоцитов. Поэтому в качестве предварительной процедуры была оценена средняя интенсивность экспрессии (Geomean) каждого из исследуемых диагностических маркеров (ROR1, CD43, CD81, CD20, CD22, CD38, CD79b и CD160) на популяциях ХЛЛ-клеток, В-предшественников (гематогонов), зрелых В-лимфоцитов и Т-лимфоцитах (рис. 2).

Нами было показано, что разница в экспрессии каждого из маркеров на различных популяциях клеток в части случаев значительна, а на части графиков неочевидна. Разделение всех типов клеток по паре выбранных маркеров графически представлено на диаграмме рассея-

ния. Для восьми исследованных маркеров и четырех типов клеток было построено 28 диаграмм рассеяния, которые представили дискриминирующие качества различных комбинаций маркеров. Примеры наиболее информативных таких комбинаций представлены на рис. 3. Следует отметить, что полного разделения всех четырех типов клеток по изученным парам маркеров не выявлено.

Процедура дискриминантного анализа с пошаговым исключением была применена для построения решающего правила дифференциации клеток ХЛЛ и роли каждого из маркеров в этом процессе. Результаты суммированы в табл. 3.

F-статистика Фишера определяет меру различия между типами клеток для конкретного маркера (его чувствительность), лямбда Уилкса представляет меру сходства, а толерантность демонстрирует степень зависимости маркера от других маркеров, уже включенных в дискриминантные функции. При высокой степени связи всех восьми маркеров друг с другом ROR1 имеет наибольшую чувстви-

тельность (F), три маркера (CD20, CD160, CD38) были исключены пошаговым критерием (табл. 3). В итоговой комбинации осталось пять маркеров из восьми (CD22, CD81, CD79, CD43, ROR1).

Факторные нагрузки дискриминантной функции (ДФ) показывают, какие переменные в данной модели имеют наибольшее дискриминирующее значение для каждой из групп, и поэтому позволяют подобрать наилучшее сочетание переменных. В частности, ДФ1 в нашей модели представляет разделение Т-лимфоцитов от ХЛЛ-клеток и В-предшественников, ДФ2 – В-лимфоцитов от ХЛЛ-клеток и В-предшественников а ДФ3 – дискриминатор ХЛЛ-клеток и В-предшественников друг от друга (табл. 4).

Уровень статистической значимости различий по F-критерию составил  $p < 0,0001$ . Точность классификации по выборке составила 100 % (отсутствие инверсий). При анализе факторных нагрузок видно, что для дифференцировки ХЛЛ-клеток от зрелых лимфоцитов наибольшее значение имеют маркеры ROR1, CD22, CD79b, CD43. Лучшим и единственным маркером в данной панели для разделения ХЛЛ-клеток и В-клеточных предшественников является CD81.

## Обсуждение

Выбор диагностических маркеров для диагностики МОБ при ХЛЛ определен современными протоколами и обусловлен вариабельностью иммунофенотипа при ХЛЛ при первичной диагностике, изменением его после терапии, а также характеристиками проточного цитометра. Так, например, известным фактом является потеря экспрессии CD20 ХЛЛ-клетками на фоне широко применяющейся иммунохимиотерапии анти-CD20 моноклональными антителами (ритуксимаб), которая снижает диагностическую ценность данного маркера [6]. Проблему при выявлении МОБ ХЛЛ представляют случаи со сниженной экспрес-

сией CD5, яркой экспрессией CD20, CD79b, и сниженной экспрессией CD43, особенно когда исследователь не имеет подробной информации о характеристиках первичного иммунофенотипа [1, 3, 6, 7]. На этапе детекции МОБ небольшое количество клеток с подобным фенотипом могут интерпретироваться как нормальные В-лимфоциты. С другой стороны, возможны случаи гипердиагностики МОБ за счет наличия в костном мозге и периферической крови нормальных клеток с ХЛЛ-подобным иммунофенотипом или контаминации В-клеточного гейта Т-лимфоцитами [6].

Поэтому включение в диагностическую панель опухолевоспецифичного маркера, не экспрессирующегося на нормальных клетках, является актуальным. Маркер ROR1 демонстрирует свойства, полезные для детекции МОБ при ХЛЛ: отмечается его мономорфная и стабильная экспрессия на ХЛЛ-клетках и отсутствие экспрессии на зрелых клетках периферической крови [8–10]. В нашем исследовании ROR1 показал высокие дифференцирующие свойства в отношении ХЛЛ-клеток и зрелых В- и Т-лимфоцитов. Во всех случаях наблюдалась его яркая мономорфная экспрессия на ХЛЛ-клетках и В-клеточных предшественниках. Однако именно высокая экспрессия ROR1 на В-клеточных предшественниках оказалась лимитирующим фактором для этого маркера в плане его дифференцирующих свойств. Поэтому в диагностической панели для МОБ ХЛЛ он должен применяться в сочетании с маркером, надежно разделяющим ХЛЛ-клетки и В-клеточные предшественники (CD 81). Примененная процедура дискриминантного анализа позволила определить наиболее информативные цитометрические маркеры для дифференцировки ХЛЛ-клеток от нормальных лимфоцитов. Этот анализ позволил исключить ряд маркеров из панели как не несущих дополнительной информации (CD 20, CD160,

CD38). Вместе с тем он показал высокие дифференцирующие свойства маркеров ROR1, CD79b, CD22, CD81 для выявления МОБ при ХЛЛ.

## Выводы

1. ROR1 является высокоспецифичным и чувствительным маркером для выявления ХЛЛ клеток среди зрелых лимфоцитов.
2. Высокая экспрессия ROR1 на нормальных В-клеточных предшественниках требует применения ROR1 в сочетании с маркером, дифференцирующим ХЛЛ-клетки от клеток-предшественников (CD 81).

## Список литературы

1. Baskar S., Kwong K. Y., Hofer T., Levy J. M., Kennedy M. G., Lee E., Staudt L. M., Wilson W. H., Wiesner A. & Rader C. (2008) Unique cell surface expression of receptor tyrosine kinase ROR1 in human B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Clinical Cancer Research*, 14, 396–404.
2. Broome HE 1, Rassenti LZ, Wang HY, Meyer LM, Kipps TJ. ROR1 is expressed on hematogones (non-neoplastic human B-lymphocyte precursors) and a minority of precursor-B acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res*. 2011 Oct; 35 (10): 1390–4.
3. Daneshmanesh AH, Porwit A, Hajjat-Farsangi M, Jeddi-Tehrani M, Tamm KP, Grandér D, Lehmann S, Norin S, Shokri F, Rabbani H, Mellstedt H, Österborg A. Orphan receptor tyrosine kinases ROR1 and ROR2 in hematological malignancies. *Leukemia Lymphoma*. 2013 Apr; 54 (4): 843–50.
4. Farren T. W. Combined ROR1 and CD160 Detection for Improved Minimal Residual Disease in Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL). / Farren TW, Liu F, Macey MG, et al. // *Blood*. – 2013. – Vol. 22, N21.
5. Hallek M. iwCLL guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment, and supportive management of CLL. / Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, et al. // *Blood*. – 2018. – Vol. 131, N25. – P. 2745–2760.
6. Rawstron AC. Reproducible diagnosis of chronic lymphocytic leukemia by flow cytometry: An European Research Initiative on CLL (ERIC) & European Society for Clinical Cell Analysis (ESCCA) Harmonisation project. / Rawstron AC, Kreuzer KA, Soosapilla A. et al. *Cytometry B Clin Cytom.* – 2018. – Vol. 94, № 1. – P. 121–128.
7. Rawstron A. C., N. Villamor, M. Ritgen, et al. International standardized approach for flow cytometric residual disease monitoring in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. – 2007. – Vol. 21, N5. – P. 956–964.
8. Rawstron AC. A complementary role of multiparameter flow cytometry and high-throughput sequencing for minimal residual disease detection in chronic lymphocytic leukemia: an European Research Initiative on CLL study. / Rawstron AC, Fazi C, Agathangelidis A, et al. // *Leukemia*. – 2016. – Vol. 30, N4. – P. 929–936.
9. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL et al. WHO Classification of Tumors of Hematopoietic and Lymphoid Tissues. WHO Press. 2017.
10. Uhrmacher S, Schmidt C, Erdfelder F, Poll-Wolbeck SJ, Gehrke I, Hallek M, Kreuzer KA. Use of the receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1 (ROR1) as a diagnostic tool in chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Leukemia Research*, Vol. 35, Pages 1360–1366.

**Для цитирования:** Миролюбова Ю. В., Тимофеева Н. С., Барт В. А., Толстопова Е. В., Фетисов Е. С., Стругов В. В., Соловьев В. М., Зарицкий А. Ю., Вавилова Т. В. Орфаный рецептор ROR1 для детекции минимальной остаточной болезни при хроническом лимфолейкозе. *Медицинский алфавит*. 2020; (5): 19–24. <https://doi.org/10.33667/2078-5631-2020-5-19-24>

**For citation:** Mirolyubova Yu. V., Timofeeva N. S., Bart V. A., Solov'yov V. M., Tolstopova E. V., Fetisov E. S., Strugov V. V., Zari'tskiy A. Yu., Vavilova T. V. Orphan receptor ROR1 for detection of minimal residual disease in chronic lymphocytic leukemia. *Medical alphabet*. 2020; (5): 19–24. <https://doi.org/10.33667/2078-5631-2020-5-19-24>

