

ЛИМФОИДНЫЕ ОПУХОЛИ

LYMPHOID TUMORS

Экспрессия ROR-1 в диагностике и мониторинге минимальной остаточной болезни при хроническом лимфолейкозе

ROR-1 Expression in the Diagnosis and Monitoring of Minimal Residual Disease in Chronic Lymphocytic Leukemia

Е.В. Почтарь¹, С.А. Луговская¹, Е.В. Наумова¹,
Е.А. Дмитриева², В.В. Долгов¹

EV Pochtar¹, SA Lugovskaya¹, EV Naumova¹,
EA Dmitrieva², VV Dolgov¹

¹ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России, ул. Баррикадная, д. 2/1, Москва, Российская Федерация, 125993
²ГБУЗ «Городская клиническая больница им. С.П. Боткина ДЗМ», 2-й Боткинский пр-д, д. 5, Москва, Российская Федерация, 125284

¹Russian Medical Academy of Postgraduate Education, 2/1 Barrikadnaya ul., Moscow, Russian Federation, 125993
²SP Botkin City Clinical Hospital, 5 2-i Botkinskii pr-d, Moscow, Russian Federation, 125284

РЕФЕРАТ

ABSTRACT

Актуальность. Учитывая тот факт, что некоторые В-клеточные лимфопролиферативные заболевания имеют сходные морфологические и фенотипические характеристики, а также несмотря на известный фенотип опухолевых клеток, в настоящее время продолжается поиск новых диагностических маркеров, экспрессия которых остается стабильной при лечении пациентов с хроническим лимфолейкозом (ХЛЛ) и может быть использована как в диагностике, так и в оценке остаточной опухолевой популяции. Одним из таких маркеров является ROR-1.

Background. In view of similar morphological and phenotypic characteristics of some B-cell lymphoproliferative diseases and despite the known phenotype of tumor cells, a search is currently underway for new diagnostic markers, the expression of which remains stable during chronic lymphocytic leukemia (CLL) treatment and can be used for both diagnosis and assessment of residual tumor population. One of such markers is ROR-1.

Цель. Оценка экспрессии и возможность использования маркера ROR-1 на В-лимфоцитах в динамике течения и мониторинге минимальной остаточной болезни (МОБ) при ХЛЛ.

Aim. To assess the expression and feasibility of the ROR-1 marker using B-lymphocytes in minimal residual disease (MRD) dynamics and monitoring in CLL.

Материалы и методы. Гематологические и иммунофенотипические исследования проведены у 110 пациентов с ХЛЛ (50 — с первично выявленным заболеванием, 60 — на фоне терапии). Дополнительно обследованы 20 пациентов с реактивным лимфоцитозом и 32 донора. Экспрессию ROR-1 на В-лимфоцитах оценивали на проточном цитометре FACS Canto II с использованием следующей панели моноклональных антител: CD45, CD19, CD20, ROR-1.

Materials & Methods. Hematological and immunophenotypic analyses were performed in 110 CLL patients (50 of them with newly diagnosed disease and 60 on therapy). In addition to that, 20 patients with reactive lymphocytosis and 32 donors were examined. The ROR-1 expression in B-lymphocytes were measured with FACS Canto II flow cytometer using the following monoclonal antibody panel: CD45, CD19, CD20, and ROR-1.

Результаты. Исследование показало, что ROR-1 практически не экспрессируется на нормальных и реактивных В-лимфоцитах и определяется на 100 % опухолевых клеток ХЛЛ как в начале заболевания, так и на фоне проводимой терапии. Экспрессия ROR-1 не изменяется при лечении ХЛЛ и может быть использована не только для диагностики ХЛЛ, но и для определения МОБ. Для оценки МОБ у пациентов с ХЛЛ использовались образцы аспирата костного мозга ($n = 64$) и периферической крови ($n = 6$) двумя методами: согласно стандартизованному протоколу, рекомендованному ERIC (European Research Initiative on CLL) в 2007 г., на проточном цитометре FACS Canto II (BD Biosciences) и с использованием набора DuraClone RE CLB (Beckman Coulter) на проточном цитометре Navious (Beckman Coulter).

Results. The analysis showed that ROR-1 is essentially not expressed in normal and reactive B-lymphocytes and is detected in 100 % of CLL tumor cells both at disease onset and on therapy. The ROR-1 expression does not change during CLL treatment and can be used not only for CLL diagnosis but also for detection of MRD. Bone marrow aspirates ($n = 64$) and peripheral blood samples ($n = 6$) were analysed for MRD assessment by two methods: according to the standardized protocol, recommended by ERIC (European Research Initiative on CLL) in 2007, with FACS Canto II flow cytometer (BD Biosciences) and using DuraClone RE CLB Tube (Beckman Coulter) with Navious flow cytometer (Beckman Coulter).

Заключение. Сравнение двух методов оценки МОБ: стандартизованного (ERIC) и набора DuraClone RE CLB (Beckman Coulter), включавшего ROR-1, показало высокую их корреляцию ($r = 0,9936$).

Ключевые слова: ROR-1, хронический лимфолейкоз, минимальная остаточная болезнь.

Получено: 27 декабря 2021 г.

Принято в печать: 18 марта 2022 г.

Для переписки: Евгений Владимирович Почтарь, ул. Верхняя Масловка, д. 12, кв. 53, Москва, Российская Федерация, 127083; тел.: +7(917)550-06-38; e-mail: pochtar_ev@mail.ru

Для цитирования: Почтарь Е.В., Луговская С.А., Наумова Е.В. и др. Экспрессия ROR-1 в диагностике и мониторинге минимальной остаточной болезни при хроническом лимфолейкозе. Клиническая онкогематология. 2022;15(2):148–55.

DOI: 10.21320/2500-2139-2022-15-2-148-155

Conclusion. The comparison of the two methods for MRD assessment, i.e., the standardized (ERIC) one and DuraClone RE CLB (Beckman Coulter) including ROR-1, yielded a high correlation between them ($r = 0.9936$).

Keywords: ROR-1, chronic lymphocytic leukemia, minimal residual disease.

Received: December 27, 2021

Accepted: March 18, 2022

For correspondence: Evgenii Vladimirovich Pochtar, 12 apt. 53 Verkhnyaya Maslovka, Moscow, Russian Federation, 127083; Tel.: +7(917)550-06-38; e-mail: pochtar_ev@mail.ru

For citation: Pochtar EV, Lugovskaya SA, Naumova EV, et al. ROR-1 Expression in the Diagnosis and Monitoring of Minimal Residual Disease in Chronic Lymphocytic Leukemia. Clinical oncohematology. 2022;15(2):148–55. (In Russ).

DOI: 10.21320/2500-2139-2022-15-2-148-155

ВВЕДЕНИЕ

Согласно классификации ВОЗ 2016 г., диагностическим критерием хронического лимфолейкоза (ХЛЛ) считается наличие более 5000/мкл моноклональных В-лимфоцитов с характерным иммунофенотипом: CD19+CD5+CD23+CD79b+^{dim}CD20+^{dim}CD22+^{dim}CD81^{dim}CD160^{dim} [1].

Учитывая тот факт, что некоторые В-клеточные лимфолиферативные заболевания имеют сходные морфологические и фенотипические характеристики, и несмотря на известный фенотип опухолевых клеток, в настоящее время продолжается поиск новых диагностических маркеров, экспрессия которых остается стабильной при лечении пациентов с ХЛЛ и может быть использована как в диагностике, так и оценке остаточной опухолевой популяции.

Одним из таких маркеров является ROR-1 (receptor tyrosine kinase like orphan receptor-1), который относится к семейству рецепторов с тирозинкиназной активностью (RTK — receptor tyrosine kinase) [2, 3]. Он синтезируется во многих эмбриональных тканях, в т. ч. в течение короткого периода времени экспрессируется на клетках-предшественниках В-лимфоцитов. ROR-1 активирует сигнальные молекулы, такие как RAC-1 (Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1) и контрактин [4, 5], способствующие пролиферации, выживанию и миграции опухолевых клеток [4–6]. Как отмечалось в некоторых исследованиях [7–9], ROR-1 служит рецептором для Wnt5a. Активация сигнального пути Wnt через комплекс с TCL1 (T-Cell Leukemia/Lymphoma 1A oncogene) и коактиватор АКТ (RAC-alpha serine/threonine-protein kinase, protein kinase B alpha) усиливает миграцию, пролиферацию и выживание лейкозных ROR-1-позитивных клеток ХЛЛ и, как следствие, влияет на прогрессирование заболевания [7–9].

Согласно немногочисленным исследованиям, экспрессия ROR-1 регистрируется на В-клетках различных злокачественных опухолей, включая ХЛЛ/

лимфоцитарную лимфому, лимфому из клеток мантии, лимфому из клеток маргинальной зоны, диффузную В-крупноклеточную, фолликулярную лимфомы, а также В-клеточный острый лимфобластный лейкоз. В то же время на нормальных зрелых В-лимфоцитах данный антиген практически не обнаруживается [10–12]. В исследованиях М.К. Hasan и соавт. [4, 5] показано, что ROR-1 является доминирующим маркером ХЛЛ. Экспрессия белка ROR-1 при ХЛЛ была подтверждена и в других исследованиях [2, 13]. ROR-1 экспрессируется практически во всех случаях ХЛЛ независимо от установленных прогностических маркеров, таких как мутационный статус генов варибельной области тяжелых цепей иммуноглобулина или экспрессия ZAP-70 [14–16].

Появление новых схем терапии ХЛЛ способствует увеличению продолжительности и улучшению качества жизни пациентов, но не приводит к полной эрадикации опухолевых клеток (за исключением трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток). Остаточная опухолевая популяция как субстрат может служить причиной развития рецидива заболевания [17, 18]. Внедрение таргетной терапии ХЛЛ приводит к изменению экспрессии отдельных антигенов на поверхности В-лимфоцитов и требует поиска новых маркеров, сохраняющих стабильную экспрессию на фоне проводимой терапии для оценки минимальной остаточной болезни (МОБ).

Цель данного исследования — оценка экспрессии маркера ROR-1 на В-лимфоцитах в динамике течения ХЛЛ и возможность использования его в оценке МОБ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом исследования для оценки экспрессии маркера ROR-1 служила венозная кровь, стабилизированная K₂ЭДТА. Все образцы крови исследовались в тот же день, в течение 2 ч после забора.

В исследование включено 110 пациентов с ХЛЛ и 20 пациентов с реактивным лимфоцитозом на фоне

Таблица 1. Показатели общего анализа крови пациентов

Показатель	Доноры (n = 32)	Реактивный лимфоцитоз (n = 20)	ХЛЛ, первичный (n = 50)	ХЛЛ, терапия (n = 60)
Лейкоциты, $\times 10^9/\text{л}$	6,7 (4,6–9,1)	6,2 (4,08–11,9)	21,8 (8,5–153,0)	53,6 (11,8–245,6)
Лимфоциты, %	31,2 \pm 1,65	47,9 \pm 3,25	79,1 \pm 1,98	87,7 \pm 2,16
Лимфоциты, $\times 10^9/\text{л}$	1,9 (1,1–2,6)	3,0 (1,64–6,24)	16,4 (5,6–145,3)	41,9 (7,17–218,4)
Тромбоциты, $\times 10^9/\text{л}$	245 (180–299)	321 (210–450)	217,5 (129,1–321,5)	132,0 (40,0–217,5)
Эритроциты, $\times 10^{12}/\text{л}$	5,14 \pm 0,08	4,31 \pm 0,10	4,48 \pm 0,09	3,72 \pm 0,20
Гемоглобин, г/л	151,80 \pm 2,19	125,3 \pm 4,1	135,60 \pm 2,78	118,7 \pm 6,03

Данные представлены в виде медианы (P_{10} – P_{90}) или среднего значения \pm стандартное отклонение.

P_{10} — 10-й перцентиль; P_{90} — 90-й перцентиль; ХЛЛ — хронический лимфолейкоз.

инфекционного мононуклеоза и других вирусных инфекций, а также ревматоидного артрита, наблюдавшихся с января 2018 г. по май 2021 г. в дневном стационаре Московского городского гематологического центра ГБУЗ «Городская клиническая больница им. С.П. Боткина ДЗМ» (Москва). Диагноз ХЛЛ поставлен в соответствии с рекомендациями ВОЗ 2016 г. [1].

Для оценки экспрессии маркера ROR-1 проанализировано 162 образца периферической крови. Исследования проведены у 20 пациентов с реактивным лимфоцитозом (12 женщин и 8 мужчин) и 110 с ХЛЛ: 50 — с первично выявленным ХЛЛ (27 женщин и 23 мужчины) и 60 — на фоне различных ритуксимаб- и флударабин-содержащих схем терапии ХЛЛ (24 женщины и 36 мужчин). Группу сравнения составили 32 условно здоровых донора крови (11 женщин и 21 мужчина). Всем пациентам выполнялся общий анализ крови на гематологическом анализаторе BC6800 (Mindray, КНР) (табл. 1).

Для оценки МОБ проанализированы 64 образца костного мозга, стабилизированного K_2 ЭДТА, и 6 образцов периферической крови пациентов с ХЛЛ, получавших различные схемы лечения.

Оценка экспрессии маркеров CD19, ROR-1, CD20 и CD45 (Beckman Coulter, США) на В-лимфоцитах и определение МОБ проводились на проточном цитометре FACS Canto II (BD Biosciences, США). Для выявления МОБ использовался стандартизованный международный протокол, рекомендованный ERIC (European Research Initiative on CLL), с использованием панели, включавшей CD45, CD19, CD5, CD81, CD43, CD38, CD22, легкие цепи иммуноглобулинов k и l (BD Biosciences и Beckman Coulter, США) [18–21]. Параллельно проводилась оценка МОБ с использованием набора DuraClone RE CLB (Beckman Coulter, США) на проточном цитометре Navios (Beckman Coulter, США). В состав набора входили следующие лиофилизированные антитела: CD45, CD20, CD81, ROR-1, CD79b, CD19, CD5, CD43.

Статистический анализ

Обработка статистических данных выполнялась с использованием программы GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., США). Для каждого массива данных проводилась оценка характера их распределения с помощью критериев Колмогорова—Смирнова и Шапиро—Уилка. При нормальном распределении данных (экспрессия ROR-1 на В-лимфоцитах) использовались параметрические методы (среднее значение, стандартное отклонение и 95%-й доверительный интервал). В группах непрерывных данных с парными выборками при числе

сравниваемых групп 3 и более применялся статистический критерий ANOVA повторных измерений. Если распределение данных не соответствовало нормальному закону распределения (параметры общего анализа крови), то результаты исследования представлялись в виде медианы, 10-го и 90-го перцентилей, а для анализа значимости различий использовались непараметрические методы. В группах непрерывных данных с парными выборками при числе сравниваемых групп 3 и более применялся статистический анализ, основанный на тесте Краскела—Уоллиса.

Уровень статистической значимости нулевой гипотезы принимался равным 0,05.

Чувствительность и специфичность различных методов оценки МОБ при ХЛЛ определялись с помощью четырехпольной таблицы.

РЕЗУЛЬТАТЫ

При проведении исследований выявлено, что у пациентов с реактивным лимфоцитозом и доноров количество В-лимфоцитов с экспрессией CD19+ROR-1+ и CD20+ROR-1+ не различалось. Однако использование таргетной анти-CD20-терапии у больных ХЛЛ приводило к снижению экспрессии CD20 на опухолевых клетках, а следовательно, и процента лимфоцитов CD20+ROR-1+ по сравнению с CD19+ROR-1+ в этих же пробах (рис. 1). В связи с этим в дальнейшем исследовании анализировались значения только CD19/ROR-1-позитивных В-лимфоцитов.

Анализ экспрессии ROR-1 на В-лимфоцитах показал, что количество В-лимфоцитов, экспрессирующих ROR-1, в группах доноров и пациентов с реактивным лимфоцитозом было крайне низким и составляло десятые и сотые доли процента (от 0,0 до 0,01 %). В то же время у пациентов с ХЛЛ отмечалась высокая экспрессия этого маркера на большинстве В-лимфоцитов как в дебюте заболевания (80,1 \pm 15,8 %), так и на фоне проводимой терапии (88,4 \pm 9,9 %) (табл. 2, рис. 2).

При сравнении количества опухолевых В-клеток CD19+CD5+ у пациентов с ХЛЛ, как первичных, так и получающих лечение, и количества В-лимфоцитов, экспрессирующих ROR-1, выявлена высокая их корреляция ($r = 0,9174$), что свидетельствует о стабильности маркера ROR-1 на опухолевых клетках в ходе терапии (рис. 3).

Таким образом, учитывая 100%-ю экспрессию ROR-1 на опухолевых клетках ХЛЛ как в начале забо-

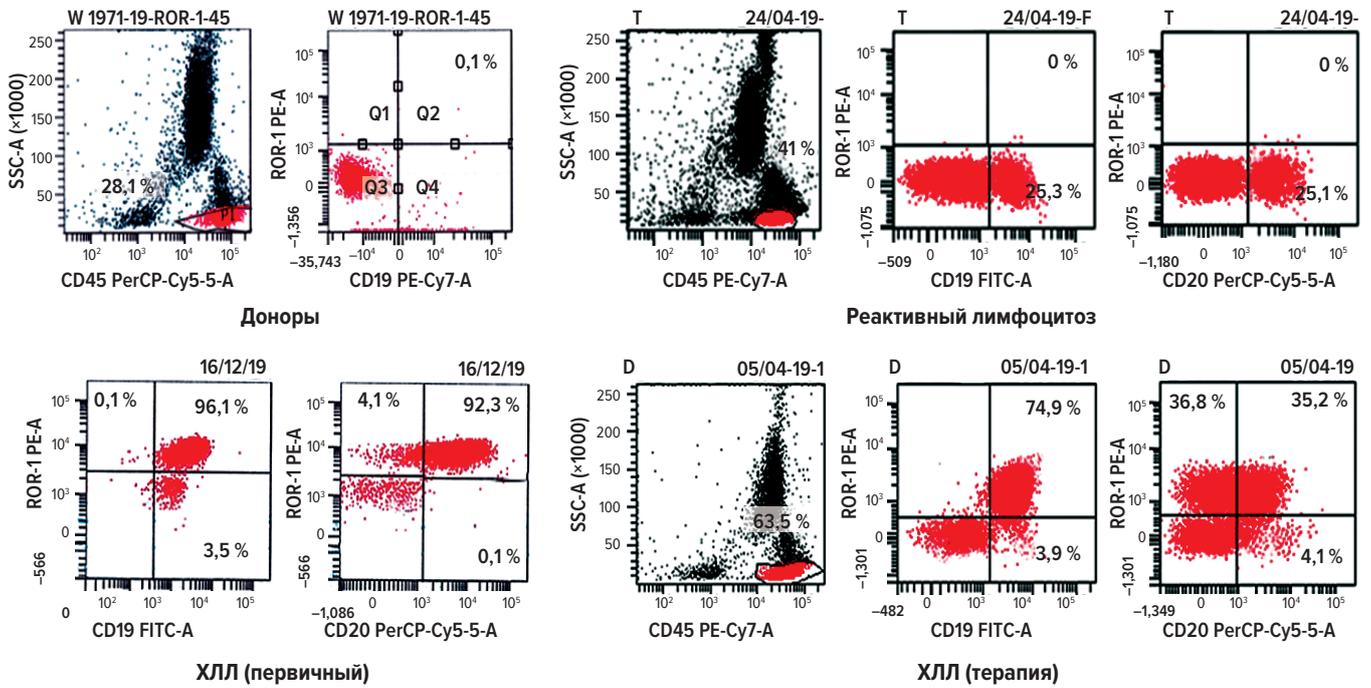


Рис. 1. Примеры экспрессии ROR-1 на В-лимфоцитах доноров, пациентов с реактивным лимфоцитозом и хроническим лимфолейкозом (ХЛЛ)

Fig. 1. Examples of the ROR-1 expression in B-lymphocytes of donors, patients with reactive lymphocytosis, and chronic lymphocytic leukemia (ХЛЛ)

Таблица 2. Экспрессия ROR-1 на В-лимфоцитах в исследованных группах

Показатель	ХЛЛ, первичный (n = 50), %	ХЛЛ, терапия (n = 60), %	Реактивный лимфоцитоз (n = 20), %	Доноры (n = 32), %
CD19+ROR-1+	80,1 ± 15,8	88,4 ± 9,9	0,05 ± 0,07	0,13 ± 0,12

Данные представлены в виде среднего значения ± стандартное отклонение.

ХЛЛ — хронический лимфолейкоз.

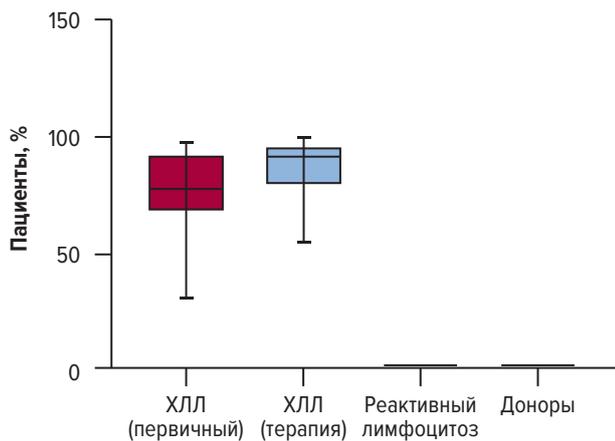


Рис. 2. Экспрессия ROR-1 на В-лимфоцитах доноров, пациентов с реактивным лимфоцитозом и хроническим лимфолейкозом (ХЛЛ)

Fig. 2. The ROR-1 expression in B-lymphocytes of donors, patients with reactive lymphocytosis, and chronic lymphocytic leukemia (ХЛЛ)

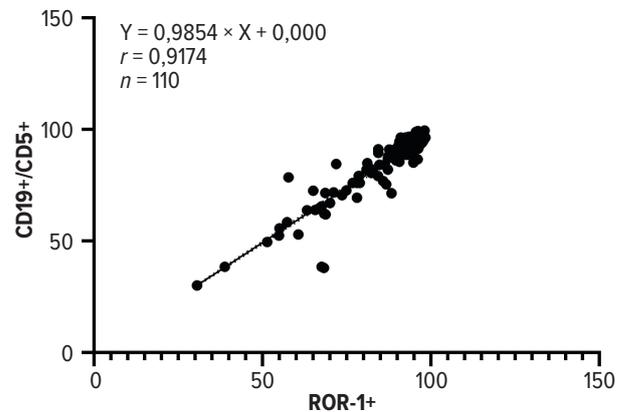


Рис. 3. График корреляции экспрессии ROR-1 и клеток CD19+CD5+ при ХЛЛ. В левом верхнем углу графиков даны компоненты математического анализа регрессии: уравнение линейной регрессии (y = x), коэффициент корреляции Спирмена (r), объем выборки (n)

Fig. 3. Correlation plot of ROR-1 and CD19+CD5+ cell expression in CLL. In the upper left corner of the plot, the components of mathematical regression analysis are specified: linear regression equation (y = x), Spearman's rank correlation coefficient (r), and sample size (n)

Таблица 3. Панель моноклональных антител, применяемая для оценки МОБ при ХЛЛ с использованием методики ERIC

Проба	Флюорохром						
	FITC	PE	PerCP	PY-Cy7	APC	APC-Cy7	PB
1	κ	λ	CD19	CD3	CD22	CD45	CD5
2	CD43	CD81	CD38	CD19	CD3	CD45	CD5

ERIC — European Research Initiative on CLL; МОБ — минимальная остаточная болезнь; ХЛЛ — хронический лимфолейкоз.

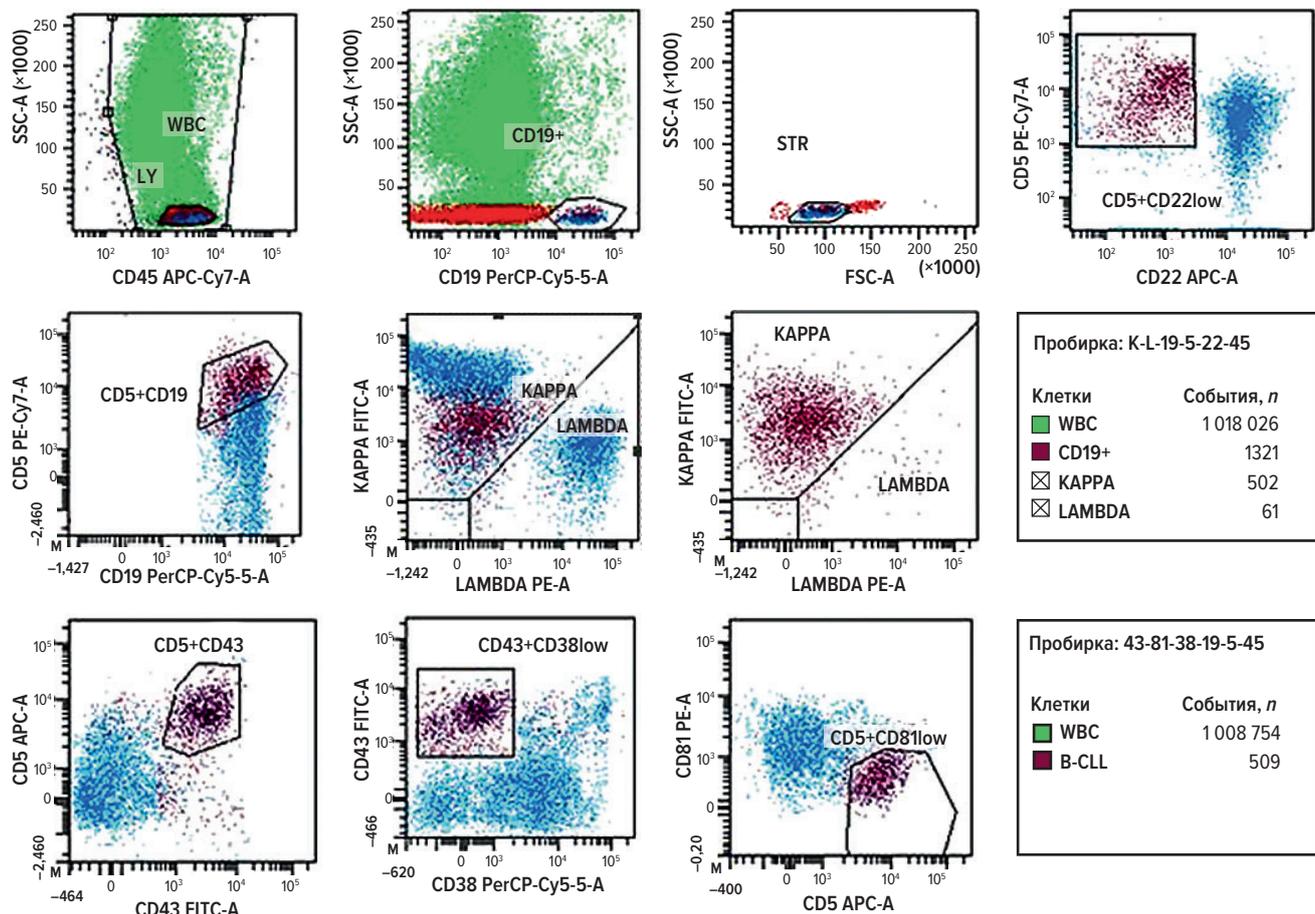


Рис. 4. Принцип гейтирования при определении МОБ у больных ХЛЛ с использованием протокола ERIC. Опухолевая популяция выделена бордовым цветом, популяция нормальных В-лимфоцитов — синим

Fig. 4. Gating for detecting MRD in CLL patients using the ERIC protocol. The tumor population is highlighted in deep red, and the population of normal B-lymphocytes is highlighted in blue

Таблица 4. Панель моноклональных антител набора DuraClone RE CLB

PB	KrO	FITC	PE	PC5.5	PC7	APC	APC-AF750
CD20	CD45	CD81	ROR-1	CD79b	CD19	CD5	CD43

ления, так и на фоне проводимой терапии, данный маркер может использоваться для оценки МОБ.

Оценка МОБ у пациентов с ХЛЛ осуществлялась двумя способами. Первым методом был стандартизованный международный протокол (2007 г.), модифицированный для 8-цветного анализа [19–22]. Используемая панель моноклональных антител представлена в табл. 3.

В 1-й пробирке последовательно выделялась популяция $CD5+CD22^{dim}+CD19+$, в пределах которой определялась клональность В-лимфоцитов. Во 2-й пробирке путем последовательного гейтирования выделялась популяция клеток $CD19+CD5+CD43+CD38^{dim}+CD81^{dim}$. Процент остаточного опухолевого клона рассчитывался как среднее арифметическое значений, полученных в двух пробирках (рис. 4).

Параллельно сравнительная оценка МОБ осуществлялась с использованием набора DuraClone RE CLB, включавшего в себя стандартизованный набор 8 лиофилизированных моноклональных антител (табл. 4) [23].

В ходе исследования путем последовательного гейтирования (рис. 5) выделялась популяция клеток

$CD45+CD19+ROR-1+CD5+CD43+CD81^{dim}+CD20^{dim}+CD79b^{dim}$. По результатам исследования оценивали долю опухолевых клеток и суммарный процент В-лимфоцитов.

Оценка МОБ при ХЛЛ двумя способами показала высокую корреляцию полученных результатов ($r = 0,9936$) (рис. 6).

Определение чувствительности и специфичности двух методов оценки остаточного опухолевого клона ХЛЛ приведено в табл. 5. Чувствительность метода определения остаточного опухолевого клона ХЛЛ с помощью набора DuraClone RE CLB составляет 97,4 %, специфичность — 87,1 %, что позволяет рекомендовать его для мониторинга опухолевой популяции В-лимфоцитов в динамике терапии.

Использование в панели маркера ROR-1 позволяет упростить иммунофенотипическое исследование, а также заменить оценку клональности В-лимфоцитов по рестрикции легких цепей.

ОБСУЖДЕНИЕ

Определение МОБ является ключевым показателем оценки глубины ответа на терапию при ХЛЛ [24]. Появление препаратов, позволяющих получить хороший ответ на лечение даже у пациентов с неблагопри-

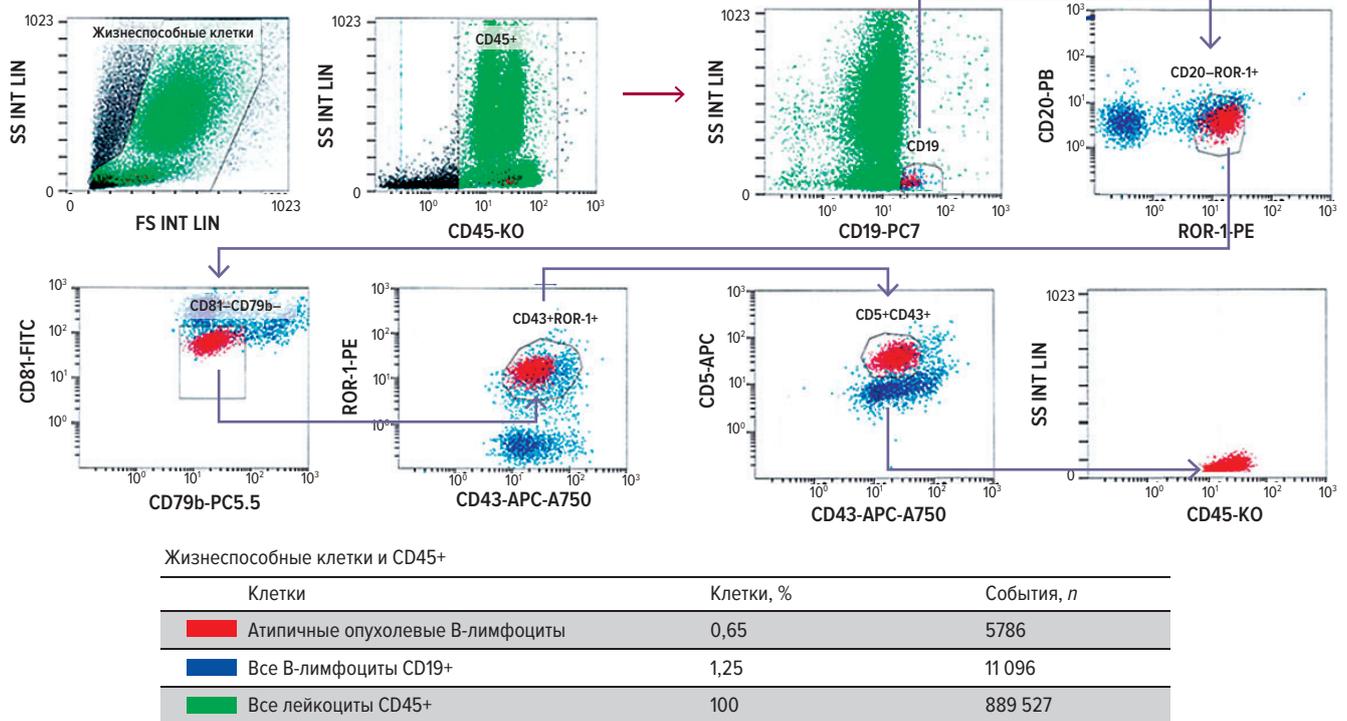


Рис. 5. Принцип гейтирования при определении МОБ у больных ХЛЛ с использованием набора DuraClone RE CLB. Опухолевая популяция выделена красным цветом

Fig. 5. Gating for detecting MRD in CLL patients using DuraClone RE CLB Tube. The tumor population is highlighted in red

Таблица 5. Четырехпольная таблица для оценки чувствительности и специфичности метода определения остаточного опухолевого клона ХЛЛ с помощью набора DuraClone RE CLB

	DuraClone RE CLB			Общее количество исследований
	МОБ+	МОБ-		
ERIC	МОБ+	ИП 38	ЛО 1	39
	МОБ-	ЛП 4	ИО 27	31
Общее количество исследований		42	28	70

ERIC — European Research Initiative on CLL; ИО — истинно отрицательный; ИП — истинно положительный; ЛО — ложноотрицательный; ЛП — ложноположительный; МОБ — минимальная остаточная болезнь.

ятными прогностическими факторами, такими как del(17p), немутантный вариант IGHV-генов и мутация в гене TP53, обуславливает необходимость поиска новых маркеров как для диагностики заболевания, так и получения статистически значимых и воспроизводимых результатов оценки МОБ.

Тот факт, что некоторые В-клеточные лимфо-пролиферативные заболевания имеют сходные морфологические и фенотипические характеристики, обуславливает необходимость постоянного поиска новых маркеров, среди которых наибольший интерес представляют сохраняющиеся в процессе терапии. Экспрессия таких маркеров может использоваться для выявления остаточной опухолевой популяции на фоне проводимой терапии [17, 25]. Одним из таких маркеров является ROR-1. Согласно литературным данным, ROR-1 ограниченно экспрессируется в нормальных тканях (например, жировой ткани, верхних отделах ЖКТ и др.) и практически не экспрессируется

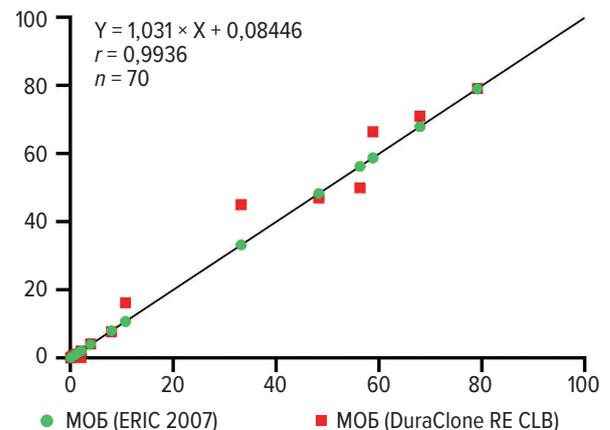


Рис. 6. Сравнительное иммунофенотипическое исследование двух методов оценки минимальной остаточной болезни (МОБ). В левом верхнем углу графиков даны компоненты математического анализа регрессии: уравнение линейной регрессии ($y = x$), коэффициент корреляции Спирмена (r), объем выборки (n)

Fig. 6. Comparative immunophenotypic analysis of two methods for assessing minimal residual disease (MRD). In the upper left corner of the plot, the components of mathematical regression analysis are specified: linear regression equation ($y = x$), Spearman's rank correlation coefficient (r), and sample size (n)

на нормальных В-лимфоцитах [26, 27], что было подтверждено и в нашем исследовании. ROR-1 aberrantly expressed on cells of various tumor diseases, including CLL/lymphocytic lymphoma, lymphoma from mantle cells, lymphoma from marginal zone, diffuse large B-cell lymphoma and follicular lymphoma [10]. Expression of the protein

ROR-1 на опухолевых В-лимфоцитах при ХЛЛ была подтверждена другими исследованиями [12, 28–30]. Несмотря на то что экспрессия ROR-1 не является специфическим маркером клеток ХЛЛ и обнаруживается при других В-клеточных лимфомах, интерес к данному маркеру сохраняется, т. к. ROR-1 экспрессируется только на опухолевых В-лимфоцитах и может служить мишенью для таргетной терапии.

В нашем исследовании показано, что экспрессия данного маркера на клетках ХЛЛ как выявляется в начале заболевания, так и сохраняется на протяжении терапии независимо от выбранных схем лечения. Отсутствие экспрессии ROR-1 у доноров и пациентов с реактивным лимфоцитозом позволяет использовать его для дифференциальной диагностики с В-клеточными лимфопрлиферативными заболеваниями, включая ХЛЛ, а стабильность его экспрессии на опухолевых клетках в ходе терапии — для оценки МОБ.

В настоящее время разработаны различные панели для оценки МОБ при ХЛЛ. Одним из важнейших критериев принадлежности В-лимфоцитов к опухолевому является определение их клональности, что нашло свое отражение в стандартизованной панели, предложенной ERIC (2007 г.). Определение рестрикции легких цепей иммуноглобулинов — довольно трудоемкий процесс и требует определенных навыков выполнения. Благодаря появлению ROR-1 с его избирательной экспрессией на опухолевых клетках этот маркер можно использовать как альтернативу определения клональности В-лимфоцитов, а применение стандартизованного набора DuraClone RE CLB позволяет избежать преаналитических ошибок и сократить время исследования.

Сравнительное определение остаточного опухолевого клона ХЛЛ стандартизованным методом и с помощью набора DuraClone RE CLB показало высокую корреляцию полученных результатов ($r = 0,9936$).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, оценка ROR-1 может использоваться в диагностической панели ХЛЛ. Экспрессия ROR-1 на опухолевых В-лимфоцитах остается стабильной на фоне проводимой терапии, что позволяет применять данный маркер в оценке МОБ при ХЛЛ. Благодаря наличию в панели маркера ROR-1 можно сократить время проведения иммунофенотипического исследования, количество моноклональных антител (с 14 до 8), а также заменить оценку клональности В-лимфоцитов по рестрикции легких цепей.

КОНФЛИКТЫ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование не имело спонсорской поддержки.

ВКЛАД АВТОРОВ

Концепция и дизайн: Е.В. Почтарь, С.А. Луговская.

Сбор и обработка данных: Е.В. Почтарь, Е.А. Дмитриева.

Представление материалов исследования: Е.В. Почтарь, С.А. Луговская, Е.В. Наумова.

Анализ и интерпретация данных: Е.В. Почтарь, С.А. Луговская, Е.В. Наумова, Е.А. Дмитриева.

Подготовка рукописи: Е.В. Почтарь, С.А. Луговская.

Окончательное одобрение рукописи: все авторы.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

- Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. (eds) WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Revised 4th edition. Lyon: IARC Press; 2016.
- Daneshmanesh AH, Mikaelsson E, Jeddi-Tehrani M, et al. Ror1, a cell surface receptor tyrosine kinase is expressed in chronic lymphocytic leukemia and may serve as a putative target for therapy. *Int J Cancer*. 2008;123(5):1190–5. doi: 10.1002/ijc.23587.
- Bing C, Ghia EM, Liguang C, et al. High-level ROR1 associates with accelerated disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2016;128(25):2931–40. doi: 10.1182/blood-2016-04-712562.
- Hasan MK, Yu J, Widhopf GF, et al. Wnt5a induces ROR1 to recruit DOCK2 to activate Rac1/2 in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2018;132(2):170–8. doi: 10.1182/blood-2017-12-819383.
- Hasan MK, Rassenti L, Widhopf GF, et al. Wnt5a causes ROR1 to complex and activate cactactin to enhance migration of chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia*. 2019;33(3):653–61. doi: 10.1038/s41375-018-0306-7.
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646–74. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- Yu J, Chen L, Cui B, et al. Wnt5a induces ROR1/ROR2 heterooligomerization to enhance leukemia chemotaxis and proliferation. *J Clin Invest*. 2016;126(2):585–98. doi: 10.1172/JCI83535.
- Janovska P, Poppova L, Plevova K, et al. Autocrine signaling by Wnt-5a deregulates chemotaxis of leukemic cells and predicts clinical outcome in chronic lymphocytic leukemia. *Clin Cancer Res*. 2016;22(2):459–69. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-0154.
- Kauk M, Plevova K, Pavlov S, et al. The planar cell polarity pathway drives pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia by the regulation of B-lymphocyte migration. *Cancer Res*. 2013;73(5):1491–501. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-1752.
- Barna G, Mihalik R, Timar B, et al. ROR1 expression is not a unique marker of CLL. *Hematol Oncol*. 2011;29(1):17–21. doi: 10.1002/hon.948.
- Hojjat-Farsangi M, Moshfegh A, Daneshmanesh AH, et al. The receptor tyrosine kinase ROR1 an oncofetal antigen for targeted cancer therapy. *Semin Cancer Biol*. 2014;29:21–31. doi: 10.1016/j.semcancer.2014.07.005.
- Shabani M, Asgarian-Omran H, Jeddi-Tehrani M, et al. Overexpression of orphan receptor tyrosine kinase Ror1 as a putative tumor-associated antigen in Iranian patients with acute lymphoblastic leukemia. *Tumour Biol*. 2007;28(6):318–26. doi: 10.1159/000121405.
- Baskar S, Kwong KY, Hofer T, et al. Unique cell surface expression of receptor tyrosine kinase ROR1 in human B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Clin Cancer Res*. 2008;14(2):396–404. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-1823.
- Fukuda T, Chen L, Endo T, et al. Antisera induced by infusions of autologous Ad-CD154-leukemia B cells identify ROR1 as an oncofetal antigen and receptor for Wnt5a. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105(8):3047–52. doi: 10.1073/pnas.0712148105.
- Borcherding N, Kusner D, Liu GH, et al. ROR1, an embryonic protein with an emerging role in cancer biology. *Protein Cell*. 2014;5(7):496–502. doi: 10.1007/s13238-014-0059-7.
- Chen Y, Chen L, Yu J, et al. Cirmtuzumab blocks Wnt5a/ROR1 stimulation of NF- κ B to repress autocrine STAT3 activation in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2019;134(13):1087–94. doi: 10.1182/blood.2019001366.
- Миролюбова Ю.В., Тимофеева Н.С., Барт В.А. и др. Орфаный рецептор ROR1 для детекции минимальной остаточной болезни при хроническом лимфолейкозе. *Медицинский алфавит*. 2020;5:19–24. doi: 10.33667/2078-5631-2020-5-19-24. [Mirolyubova YuV, Timofeeva NS, Bart VA, et al. Orphan receptor ROR1 for detection of minimal residual disease in chronic lymphocytic leukemia. *Medical alphabet*. 2020;5:19–24. doi: 10.33667/2078-5631-2020-5-19-24. (In Russ)]
- Хронический лимфолейкоз. Современная диагностика и лечение. Руководство для клиницистов. Под ред. Е.А. Никитина. М.: Буки-Веди, 2021. 436 с. [Nikitin EA, ed. *Khronicheskii limfoleikoz. Sovremennaya diagnostika i lechenie. Rukovodstvo dlya klinitsistov*. (Chronic Lymphocytic Leukemia. Current methods of diagnosis and treatment. A Clinician's Manual.) Moscow: Buki-Vedi Publ.; 2021. 436 p. (In Russ)]

19. Rawstron AC, Villamor N, Ritgen M, et al. International standardized approach for flow cytometric residual disease monitoring in chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia*. 2007;21(5):956–64. doi: 10.1038/sj.leu.2404584.
20. Rawstron AC, Fazi C, Agathangelidis A, et al. 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. *Leukemia*. 2016;30(4):929–36. doi: 10.1038/leu.2015.313.
21. Rawstron AC, Kreuzer KA, Soosapilla A, et al. Reproducible diagnosis of chronic lymphocytic leukemia by flow cytometry: an European Research Initiative on CLL (ERIC) & European Society for Clinical Cell Analysis (ESCCA) Harmonization project. *Cytometry B Clin Cytom*. 2018;94(1):121–8. doi: 10.1002/cyto.b.21595.
22. Zalcberg I, D'Andrea MG, Monteiro L, et al. Multidisciplinary diagnostics of chronic lymphocytic leukemia: European Research Initiative on CLL – ERIC recommendations. *Hematol Transfus Cell Ther*. 2020;42(3):269–74. doi: 10.1016/j.htct.2019.07.006.
23. Bento L, Correia R, de Sousa F, et al. Performance of eight-color dry antibody reagent in the detection of minimal residual disease in chronic lymphocytic leukemia samples. *Cytometry B Clin Cytom*. 2020;98(6):529–35. doi: 10.1002/cyto.b.21875.
24. Roche Announces Data at EHA2021 Reinforcing Efficacy of Venclexta/Venclyxto Combinations in Chronic Lymphocytic Leukaemia And Acute Myeloid Leukaemia. 2021. Available from: <https://www.roche.com/media/releases/medcor-2021-06-11b.htm> (accessed 24.01.2022).
25. Миролубова Ю.В., Стадник Е.А. Клиническая значимость достижения МОБ-негативности у больных хроническим лимфолейкозом. Современная онкология. 2018;20(1):17–22. doi: 10.26442/1815-1434_20.17-22. [Mirolyubova YuV, Stadnik EA. Clinical significance of the achievement of MRD-negativity in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Journal of Modern Oncology*. 2018;20(1):17–22. doi: 10.26442/1815-1434_20.17-22. (In Russ)]
26. Al-Shawi R, Ashton SV, Underwood C, et al. Expression of the Ror1 and Ror2 receptor tyrosine kinase genes during mouse development. *Dev Genes Evol*. 2001;211(4):161–71. doi: 10.1007/s004270100140.
27. Zhang S, Chen L, Wang-Rodriguez J, et al. The onco-embryonic antigen ROR1 is expressed by a variety of human cancers. *Am J Pathol*. 2012;181(6):1903–10. doi: 10.1016/j.ajpath.2012.08.024.
28. Klein U, Tu Y, Stolovitzky GA, et al. Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia reveals a homogeneous phenotype related to memory B cells. *J Exp Med*. 2001;194(11):1625–38. doi: 10.1084/jem.194.11.1625.
29. Rosenwald A, Alizadeh AA, Widhopf G, et al. Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med*. 2001;194(11):1639–47. doi: 10.1084/jem.194.11.1639.
30. Mahadevan D, Choi J, Cooke L, et al. Gene Expression and Serum Cytokine Profiling of Low Stage CLL Identify WNT/PCP, Flt-3L/Flt-3 and CXCL9/CXCR3 as Regulators of Cell Proliferation, Survival and Migration. *Hum Genomics Proteomics*. 2009;2009:453634. doi: 10.4061/2009/453634.

