

ROR1 для детекции МОБ-ХЛЛ методом проточной цитометрии

Миролюбова Ю.В., Толстопятова Е.В., Фетисов Е.С., Тимофеева Н.С., Стадник Е.А., Зарицкий А.Ю.

Институт гематологии ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова», Санкт-Петербург

ВВЕДЕНИЕ

Определение минимальной остаточной болезни (МОБ) при хроническом лимфолейкозе (ХЛЛ) методом проточной цитометрии получило широкое распространение, благодаря стандартизации исследования для 4-цветного проточного цитометра группой ERIC (A. Rawstron с соавт). В настоящее время разрабатываются новые панели диагностики МОБ ХЛЛ в единственной пробирке, методом 6–8–10 цветной проточной цитометрии. Это позволит одновременно как повысить чувствительность, так и снизить стоимость. Для составления диагностической панели важно отобрать наиболее информативные маркеры. ROR1 - белок семейства рецепторных трансмембранных тирозинкиназ. В норме он экспрессируется на В-клеточных предшественниках и отсутствует на зрелых В-лимфоцитах. По литературным данным ROR1 является высокочувствительным и специфичным маркером злокачественных В-лимфом, что делает его потенциально применимым для детекции МОБ. В рамках проведения проспективного клинического исследования BEN-NORMA, в котором оценивались результаты применения схемы бендамустин-ритуксимаб (BR) в первой линии терапии ХЛЛ, мы включили в дополнение к стандартной панели пробирку CD160 FITC/ROR1PE/CD19/CD5 для оценки информативности этих маркеров для выявления МОБ ХЛЛ.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В течение 2015 г. было проанализировано 58 образцов костного мозга пациентов с критериально верифицированным диагнозом ХЛЛ после 3 и 6 курса иммунохимиотерапии по схеме BR. МОБ оценивалась методом 4-х цветной проточной цитометрии по Rawstron с соавт, 2007. В дополнение к стандартной панели использовались моноклональные антитела CD 160 и ROR1 в сочетании с CD19 и CD5.

Табл. 2. Панель для диагностики МОБ ХЛЛ

1	CD45 FITC	CD14 PE	CD19 PerCP- Cy5.5	CD3 APC
2	CD20 FITC	CD38 PE	CD19 PerCP- Cy5.5	CD5 APC
3	CD81 FITC	CD22 PE	CD19 PerCP- Cy5.5	CD5 APC
4	CD79b FITC	CD43 PE	CD19 PerCP- Cy5.5	CD5 APC
5	slgκ FITC	slgλ PE	CD19 PerCP- Cy5.5	CD5 APC
6	CD160 FITC	ROR1 PE	CD19 PerCP- Cy5.5	CD5 APC

Для исследования использовались реагенты (в т.ч. моноклональные антитела) производства BD Biosciences и Dako. Образцы анализировались на приборе BD FACS Calibur с помощью стандартного программного обеспечения CellQuest.

РЕЗУЛЬТАТЫ

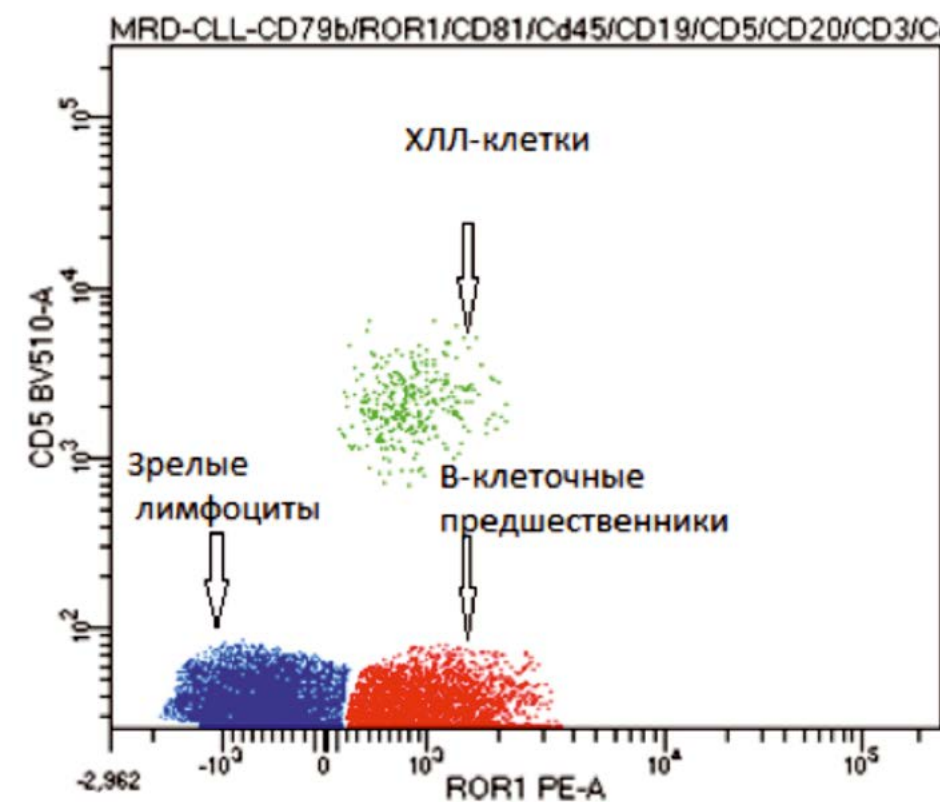
Из проанализированных 58 пациентов отмечалось 8 МОБ-негативных случаев и 50 МОБ-позитивных случаев. Получены результаты по чувствительности (Se) и специфичности (Sp) каждого их диагностических маркеров, разделяющих нормальные и опухолевые В-клетки в популяции CD19+CD5+ (табл. 2).

Табл. 2. Чувствительность и специфичность маркеров для выявления МОБ ХЛЛ

Маркер	Истинно (-)	Ложно(+)	Сумма ИО и ЛП	Ложно (-)	Истинно (+)	Сумма ЛО и ИП	Чувствительность	Специфичность	p
CD5	4	4	8	3	47	50	0,94	0,5	< 0,001
CD20	5	3	8	25	25	50	0,5	0,625	0,512
CD38	4	4	8	8	42	50	0,84	0,5	0,512
CD22	5	3	8	34	16	50	0,32	0,625	0,759
CD81	5	3	8	10	40	59	0,68	0,625	0,011
CD79B	6	2	8	8	42	50	0,84	0,75	< 0,001
CD43	7	1	8	8	39	50	0,84	0,875	< 0,001
ROR1	7	1	8	0	50	50	1.0	0,875	< 0,001
Cd160	4	4	8	26	24	50	0,48	0,5	0,917

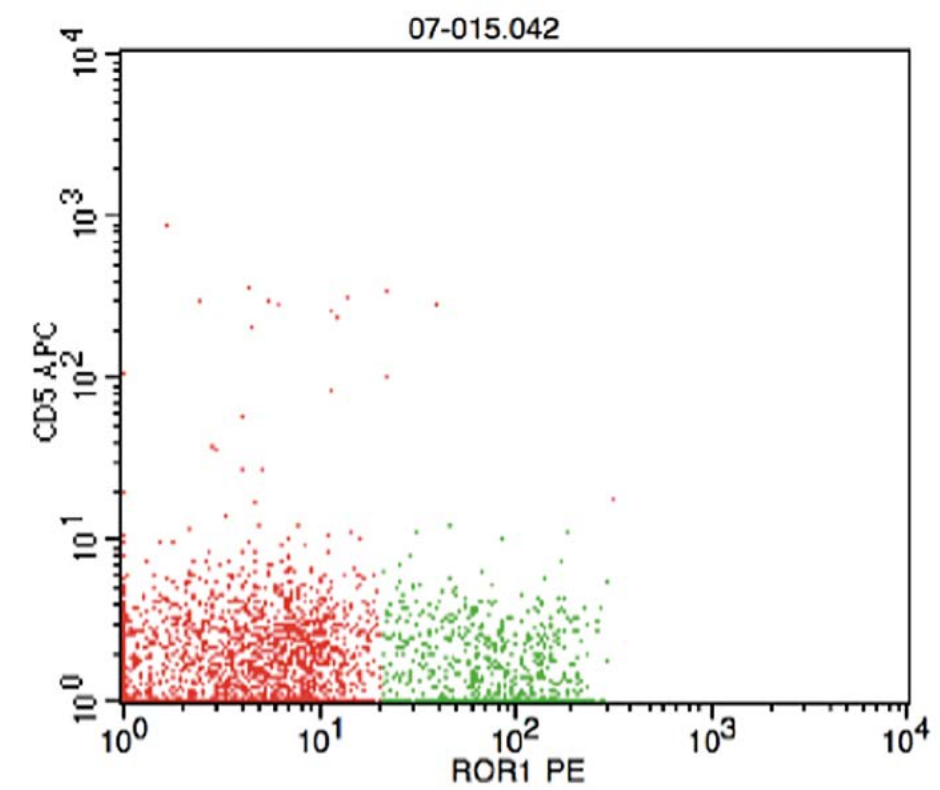
Оптимальное сочетание чувствительности и специфичности отмечалось у CD79b (Se – 84%, Sp – 75%, p = < 0,001), CD43 (Se – 84%, Sp – 87,5%, p = < 0,001) и ROR1 (Se – 100%, Sp – 87,5%, p = < 0,001). Это согласуется с литературными данными о значимости этих маркеров для диагностики ХЛЛ. Однако следует заметить, что CD 43 в норме положительно экспрессирован на Т-лимфоцитах, что может привести к неправильной интерпретации в случае контаминации гейта В-клеток Т-лимфоцитами. В случае ROR1 такой возможности нет, так как этот белок не экспрессируется на Т-лимфоцитах.

Рис. 1. ROR1 и CD5, гейт CD19+ лимфоцитов (МОБ-позитивный случай)



В нашем исследовании не наблюдалось ложноположительной экспрессии ROR1 в случае МОБ-негативности. Однако следует учесть факт положительной экспрессии ROR1 на В-клеточных предшественниках, что приводит к необходимости иметь в диагностической панели дополнительный маркер, разделяющий В-клеточные предшественники от потенциальных ХЛЛ-событий. В данном случае, таким маркером был CD5 (рис. 2).

Рис. 2. МОБ-негативный случай (гейт CD19+ лимфоцитов)



ВЫВОДЫ

По данным проведенного исследования маркер ROR1 в сочетании с CD5 показал оптимальную чувствительность и специфичность при анализе МОБ ХЛЛ у пациентов после иммунохимиотерапии в четырехцветной панели. Это открывает перспективы для использования этого маркера в 6–8-ми цветной панели для диагностики МОБ ХЛЛ. Варианты оптимального сочетания с другими маркерами требуют дальнейшего изучения.