НАЦИОНАЛЕН ЦЕНТЪР ПО ЗАРАЗНИ И ПАРАЗИТНИ БОЛЕСТИ

Д-р АНАСТАС ДИМИТРОВ ПАШОВ

ИДЕНТИФИКАЦИЯ И КОЛИЧЕСТВЕНА ХАРАКТЕРИСТИКА НА ЕКСПРЕСИЯТА НА ДВА ПАН-ЛЕВКОЦИТНИ АНТИГЕНА РАЗПОЗНАВАНИ ОТ МОНОКЛОНАЛНИТЕ АНТИТЕЛА 7E12 И CAF7

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд за присъждане на научната степен
"кандидат на медицинските науки"

София, 1994 г.

СПЕЦИАЛИЗИРАН НАУЧЕН СЪВЕТ ПО МИКРОБИОЛОГИЯ, ВИРУСОЛОГИЯ И ИМУНОЛОГИЯ ПРИ ВАК

Д-р АНАСТАС ДИМИТРОВ ПАШОВ

ИДЕНТИФИКАЦИЯ И КОЛИЧЕСТВЕНА ХАРАКТЕРИСТИКА НА ЕКСПРЕСИЯТА НА ДВА ПАН-ЛЕВКОЦИТНИ АНТИГЕНА РАЗПОЗНАВАНИ ОТ МОНОКЛОНАЛНИТЕ АНТИТЕЛА 7E12 И CAF7

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

на дисертационен труд за присъждане на научната степен "кандидат на медицинските науки"

Научна специалност
01.06.23 Имунология

Научен ръководител:
Доц. д-р Христо Тасков, к.м.н.

Официални рецензенти:
Ст.н.с I ст. д-р Иван Кехайов, д.б.н.
Ст.н.с.II ст. д-р Румяна Маркова, к.м.н.

СОФИЯ - 1994

Дисертационният труд е одобрен и насочен за защита от Научния колегиум по приложна имунология и производство при Националния център по заразни и паразитни болести.

Изследванията по дисертацията са извършени в Лабораторията по моноклонални антитела на НЦЗПБ - София. Дисертационният труд съдържа 153 стандартни машинописни страници. Илюстриран е с 43 фигури, и 6 таблици. В библиографията са включени 267 литературни източника, от които 1 на кирилица и 266 на латиница.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на 31.X..1994 г. от 14 ч. в Аудиторията на Националния център по заразни и паразитни болести, на заседание на Специализирания научен съвет по микробиология, вирусология и имунология при ВАК. Материалите по защитата са на разположение в библиотеката на НЦЗПБ, бул. "Янко Сакъзов" 26, София.

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

БФР	-	буфериран физиологичен разтвор
ИФ	-	имунофлуоресценция
мАт	-	моноклонално антитяло
МИФ	-	медиана на интензивността на флуоресценцията
МНК	-	мононуклеарни клетки
ПЦМ	-	проточна цитометрия
ФИТЦ	-	флуоресцеин изотиоцианат
ф.к.	-	флуоресцентен канал
ФТС	-	фетален телешки серум
ФХА	-	фитохемаглутинин
CD	-	(cluster of differentiation) кластер на диференциация
FSC	-	(forward scatter) предно разсейване на светлина
SSC	-	(side scatter) странично (ортогонално) разсейване на светлина

ВЪВЕДЕНИЕ

Вече са известни над 130 мембранни левкоцитни антигени. По начина на експресия те могат да се разделят най-общо на две групи. В първата група влизат антигени, чиято експресия е ограничена в част от левкоцитите или в отделни етапи от онтогенезата им. Например Т лимфоцитите експресират CD2, CD3, CD5, CD7, В лимфоцитите - CD19, CD20, CD21, CD22. Само зрелите тимоцити, но не и периферните Т клетки експресират CD1, а CD10 се намира при пре-В клетките, но не и върху по-зрели В лимфоидни предшественици в костния мозък. Такива антигени често са използвани като маркери на съответните субпопулации клетки. При това е достатъчно качественото определяне на даден антиген върху определена клетка за да бъде отнесена тя към една или друга субпопулация. Изследването е известно като имунофенотипизация (ИФ) и представлява практическо приложение на знанията за левкоцитните антигени.

Втората група антигени включва структури широко експресирани върху повечето (или всички) левкоцити. Панлевкоцитни антигени са CD45, CD53, CD54, CD49 и др. Поради характера на експресията им те не могат да бъдат използвани в качеството на маркери при типичната (качествена) ИФ. При количествен анализ на експресията им обаче става ясно, че нивата им варират значително във връзка с функционалното състояние на клетките или хода на диференциацията. Така количествената ИФ разширява възможностите за анализ състоянието на левкоцита, включвайки данните за експресията на значителен брой широко експресирани антигени. Нещо повече - постепенно представата за мембранните антигени като маркери се сменя с разглеждането им като структури свързани с определени функции, а динамиката на експресията им - като количествено измерима характеристика на клетката.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Сред получените в предварителните ни изследвания хибридомни клонове, секретиращи антилевкоцитни антитела, два (7E12 и CAF7) се оказаха с пан-левкоцитна специфичност. Във връзка със съществуващите тенденции пан-левкоцитните антигени да се използват пълноценно при ИФ ние се опитахме да определим информативността на антигените разпознавани от 7E12 и CAF7 при количествен анализ. Целта на настоящото изследване беше:

Да се характеризира специфичността на моноклоналните антитела CAF7 и 7E12 и да се сравни количествено експресията на съответните антигени върху левкоцити в различни функционални състояния и етапи на диференциация.

Във връзка с поставената цел бяха формулирани следните:

ЗАДАЧИ

1. Да се характеризира специфичността на моноклоналните антитела CAF7 и 7E12.
2. Да се изследват количествено и сравнят нивата на експресия на двата антигена при зрели, периферни левкоцити.
3. Да се изследват и сравнят промените в експресията на двата антигена в модел на поликлонална лимфоцитна активация.
4. Да се проучи динамиката на експресията на CAF7 и 7E12 в процеса на диференциацията на левкоцитите посредством панел от злокачествено трансформирани клетки.
5. На базата на получените резултати да се потърсят зависимости между нивата на експресия на CAF7 и 7E12 върху левкоцити в различни функционални състояния и етапи на диференциация.

При разработване на поставената цел бяха използвани следните материали:

МАТЕРИАЛИ

1. Клетки

1.1. Клетъчни линии

Използвани бяха следните клетъчни линии: миша миеломна линия - P3X63-Ag8.653 (Flow laboratories); човешки Т лимфолевкозни линии - CCRF-CEM, MOLT4, Jurkat; човешка про-В левкозна линия - REH; човешка недиференцирана левкозна линия - K562; човешка линия произлизаща от Бъркитов лимфом - Raji; човешка моноцитна линия - MONOMAC6. Човешките линии ни бяха любезно предоставени от Централната лаборатория по СПИН и Института по онкология.

1.2. Клетки от периферна кръв , костен мозък и лимфни възли

Периферна кръв беше получавана от доброволци чрез венипукция. Мононуклеарните клетки бяха изолирани посредством центрофугиране върху Ficoll-Hypaque (Pharmacia). Периферните лимфоцити бяха отделяни чрез адхезия на моноцитите върху пластмасови матраци за клетъчно култивиране (NUNC). Бласти бяха получени чрез инкубация на 2-5x10^7 мононуклеарни клетки ресуспендирани в 10 мл. хранителна среда,съдържаща 10 мкг./мл. ФХА (НЦЗПБ). Тромбоцитна суспензия беше приготвяна чрез центрофугиране на супернатантата, получена след отделяне на мононуклеарите, при 1500 x g за 10 мин., двукратно промиване на супернатантата с БФР/2% човешки АВ серум и разреждане на суспензията до 10^7 тромбоцита на мл. в същия буфер. Еритроцитна суспензия беше приготвяна чрез разреждане на 10^7 еритроцита на мл. с БФР/2% човешки АВ серум. Костен мозък, периферна кръв и материал от лимфни възли от пациенти бяха получавани от Отделението по детска онкохематология при "Царица Йоана", Кат. по патоанатомия при ВМИ, София и НЦКТХ за рутинно фенотипизиране.

2. Моноклонални антитела, антисеруми и други реагенти

Бяха използвани следните моноклонални антитела, антисеруми, ензимни конюгати и биотинови производни - CD2 (OKT11-FITC), CD3 (OKT3-FITC), CD5 (OKCLL-PE), CD7 (OKT16-FITC), CD15 (OKM15-FITC), CD21 (OKB7-PE) - (Ortho Diagnostics); CD10 (CALLA-FITC), CD13 (LeuM7-PE), CD14 (LeuM3-PE), CD19 (Leu12-PErCP), CD33 (LeuM9-PE), CD34 (HPCA2-FITC), CD38 (Leu17-PE), CD45 (HLe1), CD45RO (CD45RO-PE), CD56 (Leu19-FITC) - (Becton Dickinson); CD8 (CD8-PE) - (НЦЗПБ); D9/3 - анти-CD45 (любезно предоставено от Dr. F. Sanchez-Madrid, Service Immunologia, Hospital de la Princessa, Madrid); 135-4C5, 124-2H12, 138-3, 136-4B5, 72-5D3 - анти-CD45 (любезно предоставени от Dr. R. Vilella, Servei d'Immunologia, Hospital Clinic, Barcelona); GRT2 - анти-CD45 (любезно предоставено от Dr. F. Garrido, Servicio de Analysis Clinicos CS, Granada), 4F2 (CD98) (любезно предоставено от Dr. D. Fox, University of Michigan, Medical Center, Department of Rheumatology); кози анти-мишо IgG, конюгиран с ФИТЦ (НЦЗПБ Кат. № 4760), Avidin-FITC (Calbiochem Cat. № 189727), Avidin-Peroxidase (Calbiochem Cat. № 189754), Biotin N-Hydroxy-succinimide Ester (Biotin-NHS, Calbiochem Cat. № 203112), Biotin X-Hydrazide (Calbiochem Cat. № 203190). Като изотипна контрола беше използвано мАт 5B7 срещу картофен вирус X, любезно предоставено от Кат. по Микробиология към ВМИ, Пловдив.

3. Стандарти за калибриране на флоуцитометъра

Пилешки еритроцити - използваха се фиксирани с глутаров алдехид пилешки еритроцити, приготвени съгласно метода, препоръчан в инструкцията към програмата StarCOMP™ (Becton Dickinson). Полистиренови частици (Becton Dickinson Cat. № 95-0001) с диаметър 0.202 мкм.; частици носещи флуорохроми за качествена - CaliBRITE™ (Becton Dickinson Cat. № 95-0002), и количествена - QMS kit (Flow Cytometry Standarts) калибровка на проточен цитометър.

МЕТОДИ

1. Получаване на хибридоми

Беше използван стандартен метод за хибридизация с помощта на полиетилен гликол. Скринингът за анти-левкоцитни антитела беше проведен посредством ПЦМ.

2. Получаване на мАт

Хибридомите бяха инокулирани интраперитонеално в мишки. От получената асцитна течност се получаваха мАт посредством изсолване с $(NH_4)_2SO_4$ и гел филтрация.

3. Конюгиране на мАт с ФИТЦ

Моноклонални антитела изолирани от мишо асцити бяха конюгирани с ФИТЦ по стандартната методика.

4. Приготвяне на сорбенти с цианбромид активирана сефароза

На основа на получените антитела бяха приготвени сорбенти с цианбромид актвирана сефароза производство но Pharmacia Fine Chemicals съгласно протоколи на фирмата производител.

5. Имунофлуоресцентен анализ на клетки

Клетките бяха обработвани по станадартен метод за имунофлуоресцентно изследване с помощта на мАт конюгирани с флуорохроми.

6. Проточна цитометрия

Флуоресценцията беше отчитана посредством лазерен проточен цитометър FACStar (Becton Dickinson). Апаратът беше калибриран съгласно инструкциите на производителя. Събирането на данните и анализът на резултатите се извършваше на компютър Hewlett-Packard с помощта на програми Consort30, Simulset и Lysis. В материал съдържащ атипични клетки се анализираха само популации съдържащи повече от 70% атипични клетки.

6.1. Стандартизация на количествената ИФ

Бяха използвани ПЦМ стандарти (Flow Cyometry Standarts Corp.) натоварени с известен брой ФИТЦ остатъци. Използван беше метод предложен от фирмата производител на стандартите. Накратко проточният цитометър беше калибриран количествено с помощта на флуоресцентни стандарти. Интензитетът на флуоресценцията на ФИТЦ-конюгирани антитела беше сравняван с този на стандартни разтвори на ФИТЦ. Въз основа на така определената специфична флуоресценция на конюгатите и стандартна крива отнасяща номера на ф.к. към брой ФИТЦ остатъци беше определян броят Иг молекули свързани с изследваните клетки.

7. Определяне параметрите на свързването

Количеството свързани мАт молекули беше определяно по метода описан в т. 6.1. Клетките бяха обработени с падащи разреждания на конюгирани с ФИТЦ мАт разтвори и въз основа на данните за количеството свързано антитяло бяха определени броят антигенни епитопи експресирани от лимфоцитите и афинитетът на антителата по Скетчард.

8. Определяне молекулното тегло на мембранни антигени

То включва следните етапи:

а) Насочено биотинилиране на мембранни антигени върху живи клетки

б) Екстракция и афинитетно пречистване на биотинилирани мембранни антигени

в) Полиакриламидна гел електрофореза

г) Полу-сух блот

Използван беше нерадиоактивен метод за определяне молекулното тегло на разпознаваните антигени описан от Cole SR, Ashman LK, Ey PL:. Mol Immunology, 1987 и Hurley WL, Finkelstein E, Holst BD: J Immunol, 1985. За целите на нашето изследване ние въведохме следните модификации на този метод. Съществуващата опасност от разрушаване на епитопа, разпознаван от мАт, след биотинилиране беше избягната посредством използването на един от два алтернативни метода за биотинилиране: с биотин-сукцинимид естер и с биотин Х-хидразид. Втората модификация се състоеше в използване на специфичен сорбент за изолиране на антигена от клетъчния екстракт, а третата се отнася към подбора на високо чувствителен субстрат за визуализация на пероксидазна активност - о-дианизидин в комбинация с натриев нитропрусид.

9. Обработка на данни

9.1. Използвани статистически методи

Бяха използвани тестът на Кръскал-Уолис, методът на ранговите суми на Уилкоксън, тест за четириклетъчни таблици, регресионен анализ, тестът на Колмогоров-Смирнов, кластерен анализ по алгоритъма к-средни (k-means) и метод за определяне на връзките между количествено измерими явления, заимстван от теория на информацията. За значими се приемаха разлики при ниво на достоверност $p<0.05$. При данните за количествена експресия от стойностите на измерената флуоресценция са извадени нивата на неспецифична флуоресценция, измерена с помощта на изотипна контрола.

9.2.Стандартизация и сумиране на хистограми, построени въз основа на проточно цитометрични данни

Получените ПЦМ данни, представени като хистограма, бяха стандартизирани като броят клетки с определена интензивност на флуоресценцията (измерени във ф.к.) беше представен като част от общия брой изследвани клетки за дадената проба. При резултатите от изследването на злокачествените популации така стандартизираните хистограми бяха сумирани, като делът клетки във всеки ф.к. беше сумиран за всички изследвани популации.

Данните за средната експресия на изследваните антигени върху различни популации бяха анализирани след изваждане на неспецифичната флуоресценция за всяка отделна популация.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

1. Получаване на мАт 7E12 и CAF7

Хибридомният клон 7E12 беше получен след имунизация с човешки периферни мононуклеарни клетки, а хибридомният клон CAF7 - след имунизация с човешка Т левкозна линия CCRF-CEM. Двете хибридоми секретират мАт от клас ИгГ1. Получените мАт бяха пречистени и конюгирани с ФИТЦ.

2. Характеризиране на антигените 7E12 и CAF7

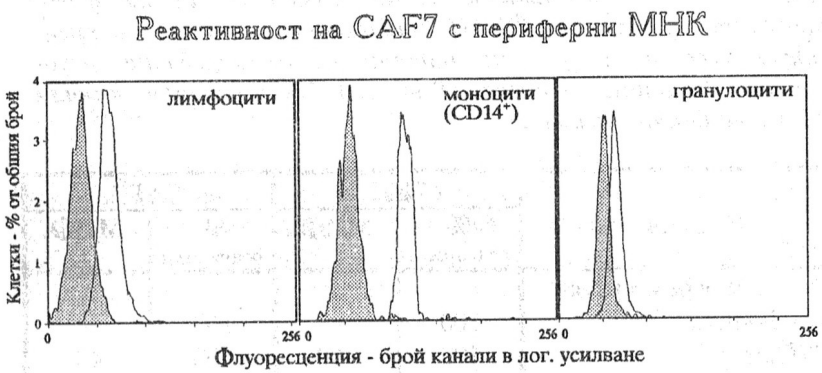
2.1. Разпространение на антигените върху клетките на кръвта

Реактивността на мАт CAF7 и 7E12 беше изследвана върху панел от клетки и клетъчни линии. Както е показано в Таблица 1, Фигури 1 и 2 и двете антитела реагират с всички левкоцити и всички клетъчни линии, върху които бяха изследвани. Еритроцитите са негативни по отношение и на двете антитела, а тромбоцитите и в двата случая се разделят на две субпопулации. Около 35% от тромбоцитите се свързват с мАт 7E12 докато останалите са негативни. Четиринадесет процента от тромбоцитите са силно положителни по отношение на CAF7, а останалите се оцветяват слабо (Фиг. 3).

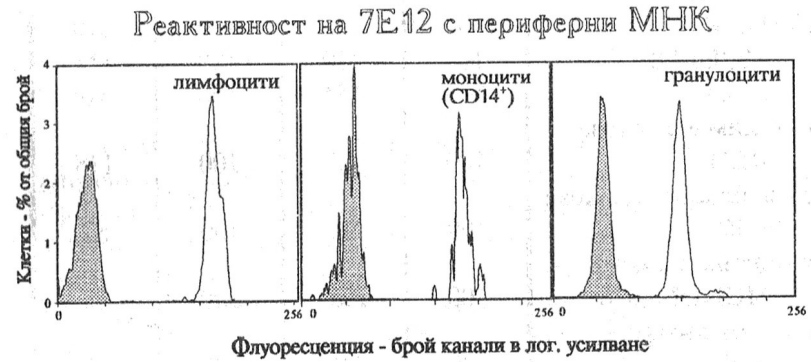
Положителната реактивност на 7E12 и CAF7 с различни популации периферни левкоцити, еритроцити и клетъчни линии определя антигените като пан-левкоцитни (nonlineage). Като се пренебрегнат количествените разлики експресията на CAF7 е много сходна с тази на 7E12. По-прецизно отнасяне на антигените 7E12 и CAF7 към известните кластери на диференциация беше възможно едва след определяне на молекулното им тегло.

ТАБЛИЦА 1. Експресия на CAF7 и 7E12 върху различни клетки и клетъчни линии. Медианата на интензивността на флуоресценцията (МИФ) на ФИТЦ конюгирани антитела е представена след изваждане на нивото на неспецифична флуоресценция. Данните са представени във флуоресцентни канали при логаритмично усилване.

Клетки	7E12		CAF7	
	% реагирали	МИФ	% реагирали	МИФ
1. От периферна кръв:				
• лимфоцити	100	-	100	-
• Т ($CD3^+$)	100	160	100	40
• В ($CD19^+$)	100	160	100	28
• моноцити ($CD14^+$)	100	172	100	65
• гранулоцити	100	130	87	8
• еритроцити	0	-	0	-
• тромбоцити	35	110	100	94
2. Тонзиларни лимф.	100	155	100	35
3. Лимфен възел	100	156	100	37
4. ФХА бласти	100	158	100	112
5. Клетъчни линии:				
• Т лимфолевкози				
– CEM	100	80	100	120
– MOLT4/8	100	120	100	115
– Jurkat	100	154	100	40
• про-В лимфолевкоза				
– REH	100	65	100	118
• недиф. бластна левкоза				
– K562	100	90	100	57
• моноцитна левкоза				
– MONOMAC6	100	н.о.	100	72
• Бъркитов лимфом				
– Raji	100	112	100	75



ФИГУРА 1. *Проточно-цитометрични данни от свързване на CAF7-ФИТЦ с левкоцити от периферна кръв. Лимфоцитите и гранулоцитите са отделени при анализа въз основа на оптичните им параметри, а моноцитите са анализирани посредством двойна имунофлуоресценция с CD14-PE. Защрихованата хистограма показва нивото на неспецифичната флуоресценция.*



ФИГУРА 2. *Проточно-цитометрични данни от свързване на 7E12-ФИТЦ с различни популации левкоцити от периферна кръв. Анализът и означенията - както при Фигура 1.*

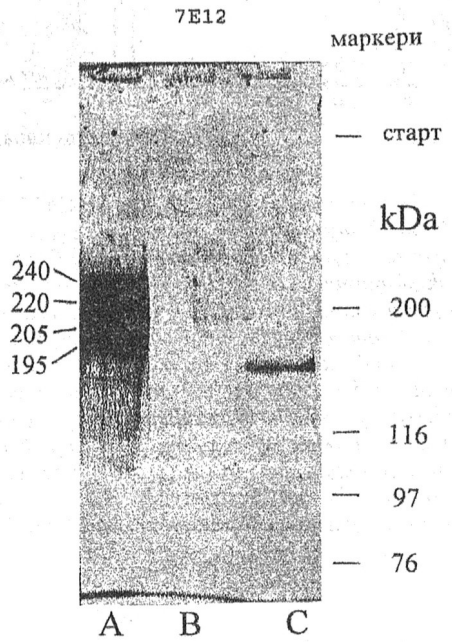
ФИГУРА 3. *Реактивност на 7E12 (А) и CAF7 (Б) с тромбоцити от периферна кръв. Защрихованата хистограма показва нивото на неспецифичната флуоресценция. Експресията е силно вариращa и при 7E12, за разлика от левкоцитите, голяма част от популацията остава немаркирана. За да се представи по-ясно разпределението на реагиращите тромбоцити е показана разликата между негативната и позитивната хистограма. Както при останалите експерименти, данните са представени в хистограми не на абсолютния брой клетки, а като разпределение на процента от изследваните клетки, съответен на даден флуоресцентен канал. Така площта на всяка хистограма е равна на 100%. Това дава право да се представи и разликата между двата експеримента като разлика между хистограмите по канали. За разлика от 7E12, CAF7 реагира с всички тромбоцити, но част от тях експресират значително по-високи нива на този антиген.*

2.2. Определяне на молекулното тегло на антигените 7E12 и CAF7

2.2.1. Антиген 7E12

За изолиране на антигена 7E12 бяха използвани периферни мононуклеарни клетки. След биотинилиране с биотин Х-хидразид, екстракция на мембранните протеини, адсорбция на антигена върху специфичен сорбент и елюиране, се проведе полиакриламидна гел електрофореза в присъствието на натриев додецилсулфат. Белтъците бяха прехвърлени от гела върху нитроцелулозна хартия с помощта на полу-сух блот и антигенът беше визуализиран с помощта на авидин-пероксидаза. Антитялото

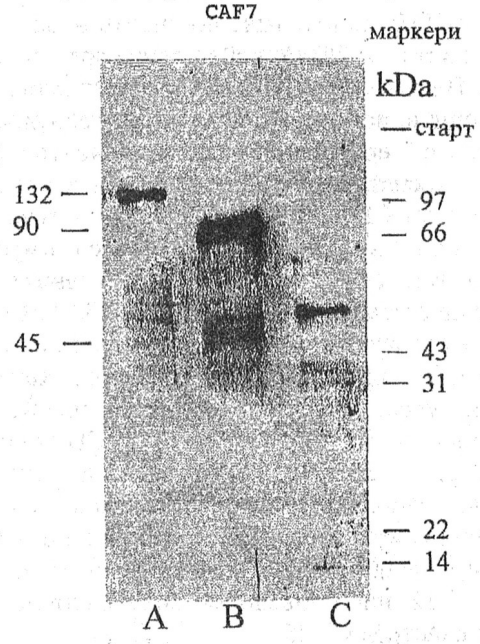
7E12 преципитираше от лизат на мононуклеарни клетки 4 вериги с молекулни тегла около 190/200/215/240 kDa (Фиг. 4). Интензивността на отделните ивици на антигена 7E12 беше висока, но относително най-интензивна беше ивицата съответстваща на около 200 kDa.



ФИГУРА 4. *Блотинг след разделяне чрез електрофореза в 5% полиакриламиден гел в присъствие на натриев додецилсулфат на биотинилиран антиген от периферни мононуклеарни клетки, преципитиран с мАт 7E12. Пътека А - нередуциращи условия, пътека В - преципитация от същите клетки с помощта на изотипно съвпадащо мАт, което не реагира с човешки левкоцити, пътека С - проба от биотинилирано анти-CD8 мАт (клас ИгГ1) при нередуциращи условия. Указано е положението на маркерите за молекулно тегло. Визуализация на авидин-пероксидазна активност посредством хромофор - о-дианизидин хидрохлорид/ натриев нитропрусид.*

2.2.2. Антиген CAF7

С аналогична постановка беше анализиран и антигенът разпознаван от мАт CAF7, като се използваха биотинилирани с биотин-сукцинимид клетки от клетъчна линия CEM. При нередуциращи условия се намираше единствена ивица, отговаряща на 120-140 kDa (Фиг. 5А). При редуциращи условия вместо нея се откриваха две ивици с тегла 40-43 and 90-100 kDa (Фиг. 5В).



ФИГУРА 5. *Блотинг след разделяне чрез електрофореза в 12% полиакриламиден гел в присъствие на натриев додецилсулфат на биотинилиран антиген от клетки CEM, преципитиран с мАт CAF7. Пътека А - нередуциращи условия, пътека В - редуциращи условия, пътека С - преципитация от същите клетки на друг антиген с помощта на изотипно съвпадащо мАт 5G7. Отстрани е указано положението на маркерите за молекулно тегло. Обработката на блота е както при Фигура 4.*

2.3. Специфичност на мАт 7E12 и CAF7

2.3.1. 7E12

От съпоставянето профила на експресия описан в т. 2.1., отговарящ на пан-левкоцитен антиген, и данните за молекулното тегло на 7E12 посочени в т. 2.2.1., които показват наличие на епитопа 7E12 върху поне 4 различни структури с молекулни тегла между 180 и 240 kDa, можем да направим следните изводи. Антигенът 7E12 има експресия подобна на тази на мембранните антигени CD18, CD29, CD43, CD44, CD45, CD46, CD47, CD50, CD52, CD53, CD54, CD59. Експресията на 7E12 върху лимфоцити е хомогенна. С това тя се различава от експресията на CD18, CD29, CD44, CD54, които имат по-високи нива върху активирани и паметови клетки и CD43, който се експресира само от част от В клетките. Пан-левкоцитната експресия, хомогенната експресия върху лимфоцити, по-ниските нива върху гранулоцити, липсата на реактивност с еритроцити и частичната реактивност с тромбоцити стесняват кръга на известните антигени с подобно разпределение до CD45, CD50, CD53. Единствено CD45 показва картина подобна на тази при 7E12 след имунопреципитация. Молекулните тегла, броят ивици и съотношенията между тях при 7E12 са сходни с намерените при CD45 - 180/190/205/220 kDa, но с известно изместване към по-високи стойности. Разликите от веригите на CD45 са от 5-20 kDa и са в рамките на очакваното артефициално увеличение дължащо се на присъединените палмитоил-биотинови остатъци. Тъй като в CD класификацията не съществува друг антиген, който да има така близка характеристика до разпознавания от 7E12, единствената алтернатива на идентифицирането му с CD45 е той да не е познат до сега. За да потвърдим тази хипотеза и да определим епитопната специфичност на 7E12, ние проведохме инхибиционни тестове с други антитела от кластера CD45.

2.3.1.1. Инхибиционни тестове с CD45 антитела

Мононуклеарни клетки от периферна кръв бяха обработени с антитела от кластера CD45 насочени към различни епитопи: - HLe1, D9/3, 135-4C5, 124-2H12, 138-3, 136-4B5, 72-5D3 и GRT2. При положителната контрола на теста като първо антитяло беше използвано неконюгирано мАт 7E12 с концентрация 20 мкг./мл. За разлика от положителната контрола не бе наблюдавана

инхибиция между 7E12 и останалите антитела от кластера CD45. От изброените антитела само три са с известна епитопна специфичност - GRT2, 72.5D3 (епитоп T) и Anti-HLe-1 (епитоп P). Въпреки невъзможността да идентифицираме разпознавания от 7E12 епитоп с някой от известните при CD45 (P,Q,R,S,T), ние приехме, че вероятността 7E12 да е специфичен за CD45 е достатъчно голяма, за да можем да използваме това антитяло по-нататък като реагент, с който да изследваме експресията на CD45. Като допълнителен довод в полза на това е фактът, че CD45 е имунодоминантен антиген и вероятността да бъде получен хибридомен клон с анти-CD45 специфичност е много голяма.

2.3.2. CAF7

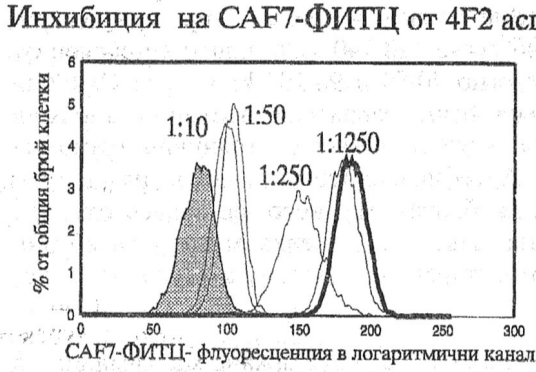
Изследването на молекулното тегло на CAF7, проведено по разгледаната по-горе схема показа, че става въпрос за хетеродимер с общо молекулно тегло 110-140 kDa, който се състои от две вериги с тегло съответно 40-50 и 90-100 kDa. При CAF7 за визуализация на антигена беше използван биотин-сукцинимид естер, който се свързва чрез лизиновите странични групи на полипептидната верига. Артефициалното увеличение на теглото на антигена вследствие на биотинилирането ще зависи от броя потенциални места за свързване, но по оценка от други мембрани гликопротеини с известна първична структура вероятно е по-малко от 10 kDa.

Единственият антиген, който се приближава максимално до характеристиката на CAF7 е т.нар. 4F2. Той е открит от Haynes et al. (1980). Характеризиран е като активационен антиген. Антигенът 4F2 е съставен от две вериги с молекулно тегло 90 и 40 kDa, които съставят хетеродимер от около 120 kDa. На последната, V. работна среща 4F2 беше кластерифициран под номер CD98 в Т клетъчната секция. Антигенът CD98 е експресиран от лимфоцити и моноцити. Експресията му нараства рано след активация на Т лимфоцити, но също и на В лимфоцити и NK клетки, а и от пролифериращи клетки от много други тъкани. Всъщност 4F2 е разглеждан като един от най-ранните активационни антигени, като неговата експресия започва да нараства преди тази на CD71 (трансферинов рецептор), CD25 (IL2Rβ), CD38 (T10), CD100 (BB18) (Patterson et al.,1984; Parmacek et al., 1989).

2.3.2.1. Инхибиционни тестове с CD98 антитела

С оглед доказването на хипотезата, че CAF7 разпознава епитоп от CD98 (4F2) ние проведохме инхбиционен тест с антитяло срещу този антиген. Като положителна контрола беше използван CAF7 асцит, а като отрицателна - 7E12 асцит. Постигнатата пълна инхибиция на свързването на CAF7 с клетъчна линия CCRF-CEM с помощта на антитяло 4F2 (Фиг. 6) потвърди изказаната хипотеза и определи епитопната специфичност на мАт CAF7 - епитоп 4F2-1.

При тези резултати CAF7 може да бъде характеризирано окончателно като анти-CD98 мАт[1].



***ФИГУРА** 6. Инхибиция на свързването на CAF7-ФИТЦ с клетъчна линия CEM в следствие претретиране на клетъчната суспензия с асцит 4F2. Над хистограмите са посочени разреждания-та на асцита. Нивото на неспецифичната флуоресценция е представено със защрихована хистограма. С плътна линия е представено нивото на флуоресценция на клетки, претретипрани с асцит с несъответстваща специфичност в разреждане 1:10.*

[1]Тези резултати бяха потвърдени и от експерименти проведени в лабораторията на д-р Фокс (Отдела по ревматология на Катедрата по вътрешни болести към Мичиганския университет). От направените изследвания става ясно, че CAF7 реагира с L клетки трансфектирани с тежката верига на 4F2. Чрез инхибиция с мАт в кластера CD98 - UM7F8, 4F2, UM2G12, 2F3, JS-13 и JS-5, авторите показват, че свързването на CAF7 с периферни лимфоцити се инхибира от мАт UM7F8, UM2G12 и 4F2, които разпознават епитоп 4F2-1, но не и от 2F3, JS-13 и JS-5, които разпознават епитоп 4F2-2. Реактивността с лимфоцити в покой и посочените данни показват, че CAF7 разпознава епитоп 4F2-1 върху тежката верига на CD98 (4F2) по означението въведено от L. Diaz et al. на V. международна работна среща. Със същия протокол в тази лаборатория са идентифицирани останалите антитела в клас-тера CD98 за целите на V. международна работна среща. От приложените протоколи на инхибиционните тестове става ясно, че инхибицията с 4F2 (епитоп 4F2-1) и 2F3 (епитоп 4F2-2) е пълна за част от изследваната популация. В случая с 4F2 това е интерпретирано като инхибиция, а при 2F3 като липса на инхибиция, но хетерогенността не е интерпретирана. Тези резулта-ти според нас са основание за търсене на специфика на CAF7 епитопа по отношение на дефинираните досега епитопи в контекста на популационната хетерогенност на периферните лимфоцити.

3. Количествена характеристика на експресията на 7E12 и CAF7

Посочените по-горе резултати за нивата на експресия на 7E12 и CAF7, както относително при сравнение между двата антигена при различни левкоцитни популации, така и като абсолютни стойности, са в съгласие с литературни данни за CD45 и CD98.

Известно е, че експресията на някои пан-левкоцитни антигени варира в зависимост от функционалното състояние на клетката и в процеса на диференциация. Във връзка с това ние изследвахме количествено 7E12 и CAF7 в хода на тези два процеса.

3.1. Експресия върху левкоцити в покой

Както се вижда от Таблица 1 и Фиг. 1 и 2 изследваните левкоцитни популации експресират и двата антигена, но нивата варират значително. Експресията е различна както за различните популации при всеки от антигените така и за всяка популация при двата антигена. Като цяло при клетъчните линии се наблюдаваха по-ниски нива на 7E12 отколкото при клетките от периферната кръв, а при CAF7 - обратно - нивата му бяха по-високи върху клетъчните линии. И при двата антигена моноцитите експресират най-високи нива. В периферната кръв лимфоцитите експресират във високи нива 7E12, докато CAF7 се експресира слабо. Част от тромбоцитите експресират ниски нива на 7E12, а CAF7 ги разделя на две субпопулации: едната експресира нива съизмерими с тези при 7E12, а другата е със значително по-висока експресия (Фиг. 3).

С помощта на стандартизирана количествена проточна цитометрия бяха определени броят антигени на клетка за главните левкоцитни популации и афинитета на мАт. Резултатите за CAF7 са: около 9 000 епитопа за лимфоцитите, 40 000 епитопа за моноцитите и k_{aff} - $5x10^{-9}$ М. При 7E12 стойностите са съответно около 120 000 епитопа при лимфоцитите и моноцитите и около 25 000 епитопа при гранулоцитите и k_{aff} - $3x10^{-10}$ М.

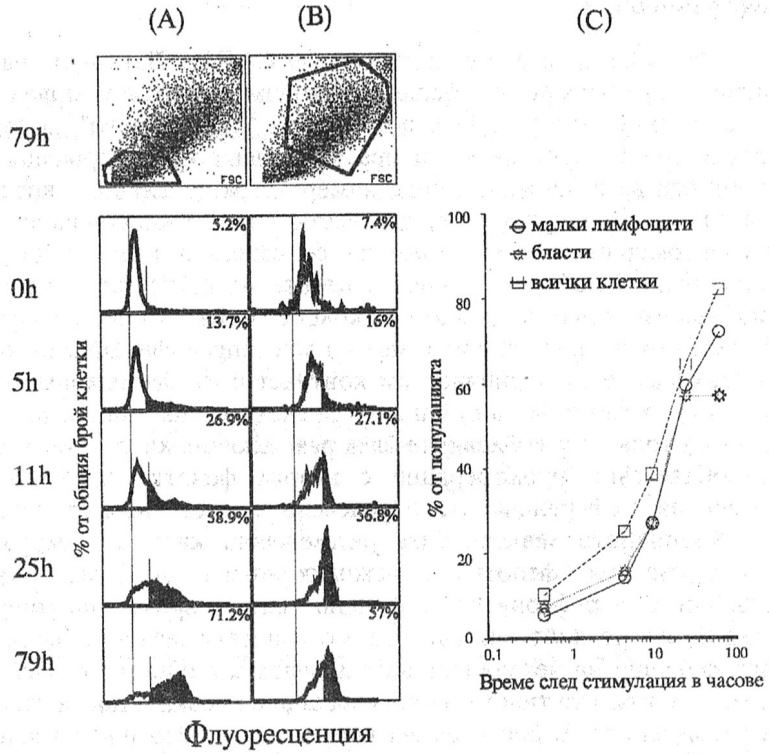
3.2. Нива на 7E12 и CAF7 при in vitro активирани лимфоцити

3.2.1. 7E12

Мононуклеарни клетки, изолирани от периферна кръв чрез центрофугиране върху Ficoll-Hypaque, бяха култивирани в среда съдържаща ФХА. Проби от културата бяха изследвани с мАт 7E12 на 0-ия и 72-ия час. Паралелно беше изследвана нестимулирана култура (в средата липсваше ФХА). Не бе намерена съществена разлика в експресията на 7E12 след поликлонална активация in vitro с ФХА между стимулираната и нестимулираната култура и в сравнение с клетки от периферна кръв.

3.2.2. CAF7

Резултатите от изследването експресията на CAF7 след поликлонална активация на периферни лимфоцити от здрав донор in vitro, са представени на Фиг. 7. Постановката на експеримента беше аналогична на тази описана в т. 3.2.1. като проби от културата са вземани на 0-ия, 5-ия, 11-ия, 25-ия и 79-ия час. Както се вижда експресията на CAF7 значително се повишаваше в хода на активацията. Промяната в експресията настъпваше постепенно, като част от клетките започваха да експресират нарастващи количества CAF7 още след 5-ия час от началото на културата. В продължение на 1-ия и 2-ия ден от културата с ФХА нивото на CAF7 върху около 40% от клетките беше повишено като вариране от нормалното до 12 пъти по-високо ниво. Тези клетки запазваха оптичните параметри на малки лимфоцити (Фиг. 7, колона А). Същевременно в културата се наблюдаваха и около 30% оптично хетерогенни клетки с голям размер, отговарящи на бласти. Нивата на CAF7 върху тези клетки, които бяха по-високи от тези върху малките лимфоцити, нарастваха също. На третия ден от културата около 80% от клетките показваха флоуцитометрично оптични характеристики на бласти (Фиг. 7, колона Б). Те имаха значително по-хомогенна експресия на CAF7 от тази върху малките лимфоцити на този етап, която достигаше 25 пъти по-високи нива от експресията в покой. Наблюдаваните нива при оптично плътните малки клетки обхващаха целия интервал от експресия в покой до експресия върху тридневни бласти. Многократното и ранно повишение на нивото на CAF7 е в съгласие с литературни данни за CD98 като ранен активационен антиген.



ФИГУРА 7. *Експресия на CAF7 върху in vitro активирани с ФХА лимфоцити. Горе е показано двумерно представяне на данните за оптичните параметри на изследваните клетки от 3-дневна култура. По ординатата - ортогонално разсейване (SSC- корелира с оптична хетерогенност); по абсцисата - предно разсейване (FSC - корелира с размер). (А) - данни за малки плътни клетки - първият маркер в хистограмите отговаря на границата на изотипната контрола, а вторият - на CAF7 ниво, двукратно надвишаващо това при клетки в покой. Обозначен е делът от популацията, на който отговаря запълнената част от хистограмата. (В) - данни за бласти - първият маркер е на нивото на втория от (А), а вторият - на 8 пъти по-високо ниво. Останалите означения - както в (А). (С) - графично представяне на процентите от (А) и (В) сравнени със стойностите за сумарната популация при маркери както при (А). Флуоресценцията, както при всички други тестове, е изследвана с логаритмично усилване.*

3.3. Нива на експресия на 7E12 и CAF7 в хода на левкоцитната диференциация

За да се проследи експресията на CAF7 и 7E12 при левкоцитните прекурсори ни беше необходим подходящ модел на левкопоезата. Въпреки че хипотезата за "фиксирането" на съответния прекурсорен фенотип при малигнена трансформация на левкоцити не е напълно точна, намерени са достатъчно корелации за да бъде прието, че, с известно приближение, набор от трансформирани клетки може да се използва като модел на левкоцитната диференциация. За целите на настоящото изследване ние използвахме данните от количествена ИФ на 105 случая (Табл. 2) на злокачествени лимфо- и миелопролиферации като се абстрахирахме от клиничния им контекст и ги разглеждахме изцяло като хомогенни популации с определено ниво на зрялост. С оглед на това острите левкози бяха разглеждани като лимфо- или миелобластозни пролиферации с незрял фенотип и различна степен на диференциация, определена посредством фенотипа им. Хроничните левкози бяха разглеждани като циркулиращи клетки със зрял фенотип, а неходжкиновите лимфоми - като уседнали в периферните лимфоидни органи зрели лимфоцити. Един белег, по който има по-голямо единство между отделните класификации на неходжкиновите лимфоми, е общото разделяне на хистологичните типове на корелиращи с висока и ниска степен на малигненост. В биологичния контекст, в който ние ползваме този модел, горното разделяне в голяма степен е еквивалентно на разделяне по пролиферативна активност.

3.3.1. CAF7

Нивата на CAF7 намерени при изследваните популации варираха от негативни до 21 пъти по-високи спрямо нивото намерено върху нормални, неактивирани периферни лимфоцити. Резултатите са представени на Фиг. 8. В девет случая CAF7 се експресираше хетерогенно (Фиг. 11c). При тях бластните популации се разделяха на две по количеството експресиран CAF7. В тази група бяха отделени случаи, при които по-малката субпопулация не беше по-малка от 30%. Тъй като нашата цел бе да изследваме експресията на CD98 и CD45 във връзка с

биологичните особености на клетките ние разглеждаме по отделно популациите с хомогенна експресия.

ТАБЛИЦА 2. Изследвани левкоцитни популации

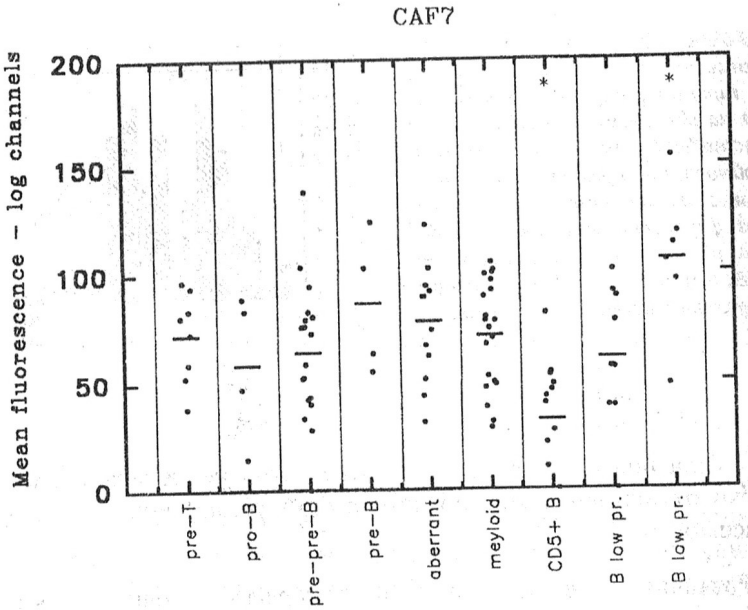
Тип клетки	CD45	CD98	CD45/ CD98
1. Прекурсори	**63**	**60**	**46**
В лимфоцитни-$CD19^+CD10^-CD20^-$	3	4	2
- $CD19^+CD10^+CD20^-$	14	15	12
- $CD19^+CD10^{+/-}CD20^+$	4	4	3
Т лимфоцитни- $CD7^+CD2^+/CD3^+$	6	8	5
миелоидни - $CD13^+CD14^+/CD33^+$	22	19	16
аберантни - $CD13^+/CD34^+/CD33^+CD7^+/CD2^+/CD19^+$	14	10	8
2. Зрели	**27**	**23**	**22**
В лимфоцитни - $CD5^+$	9	10	9
В лимфоцитни - $CD5^-$ - с висока пролиферативна активност	10	3	7
В лимфоцитни - $CD5^-$ - с ниска пролиферативна активност	3	7	3
Т лимфоцитни	5	3	3

Тестът на Крускал-Уолис показа статистически значими различия в експресията на CAF7 в общата група популации ($p<0.05$). При сравнението по единично на отделни популации с всички останали беше използван теста на ранговите суми на Уилкоксън. Така по-висока експресия на CAF7 при зрели уседнали В клетки с висока пролиферация беше потвърдена при ниво на значимост $p<0.01$. Открита бе значимо по-ниска ($p<0.001$) експресия на антигена върху зрели $CD5^+$ В лимфоидни клетки. Миелобластите с аберантна експресия на Т клетъчния маркер CD7 имаха по-високо ниво CAF7 сравнени с цялата група злокачествени новообразувания ($p<0.05$). Намерените от нас високи нива на CAF7 при тези клетки вероятно са следствие на висока пролиферативна активност характерна за целия кратък етап, в който прекурсорите на миелоидната редица носят CD7.

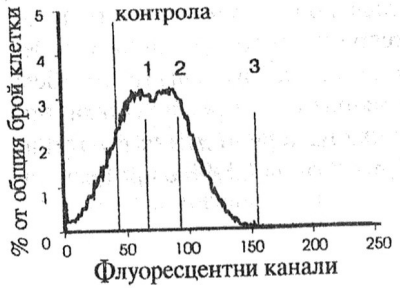
С цел да се разграничат типични нива на експресия на CAF7 върху изследваните популации данните от проточната цитоме-

трия за този антиген бяха стандартизирани и сумирани. Сумарната хистограма беше бимодална (Фиг. 9). Хистограмата построена въз основа на медианите на интензитета на флуоресценция също показа бимодален характер (Фиг. 10). Емпиричното разпределение беше сравнено с нормалното с помощта на теста на Колмогоров-Смирнов и хипотезата за нормално разпределение не беше отхвърлена (p=0.23). Въпреки това коефициента на вариация беше 47%, което значително надхвърля нивото от 33% прието за допустимо при хомогенни разпределения. Така бимодалността на разпределението не може да се отхвърли въпреки недостатъчното ниво на достоверност получено при теста на Колмогоров-Смирнов. С оглед на тези находки беше издигната хипотезата за наличие на две дискретни нива на експресия на CAF7: с висока и с ниска експресия. Не всички случаи, обаче, можеше да бъдат отнесени към един от двата вида експресия. Предварителния анализ показа, че в 7 популации CD98 имаше хетерогенна (бимодална) експресия. Тези случаи бяха групирани отделно. Така разглежданите популации бяха групирани в три типа експресия на CAF7: висока хомогенна, ниска хомогенна и хетерогенна (Фиг. 11). Резултатите от това групиране, свързани с фенотипа на съответните клетки са показани на Табл. 3. Не беше намерена връзка между фенотипното групиране и експресията на CAF7 (χ^2, p>0.05). Групата на субпопулациите на случаите с хетерогенна експресия показа по-високи нива на CAF7 в сравнение с хомогенните случаи (p<0.05).

С помощта на точен тест за четириклетъчни таблици беше проверена значимостта на разликите в честотите при разделяне на хомогенна CAF7^{hi}/CAF7^{low}, и хомогенна/хетерогенна експресия поотделно за всяка група новообразувания. Всичките 9 случая с CD5+ зрели B клетки бяха с хомогенна ниска експресия и това беше значимо различие по отношение на високата хомогенна експресия (p<0.001). Също така значително повече случаи (18/26) бяха с висока хомогенна отколкото с ниска хомогенна експресия при бластите с миелоиден фенотип (включително тези с аберантна експрсия на лимфоидни маркери) (p=0.025).

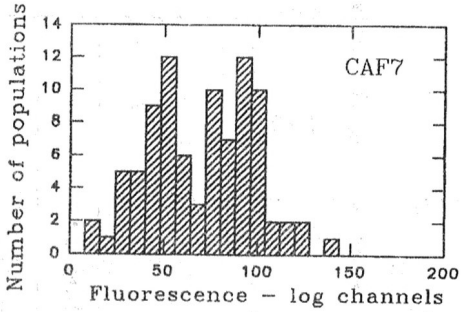


ФИГУРА 8. *Нива (МИФ) на CAF7 (CD98) върху клетки от различни линии на хемопоезата и стадии на диференциация. Хоризонталните отсечки обозначават средните стойности. Pre-T - фенотип на тимоцити; pro-B, pre-pre-B и pre-B - последователни етапи от диференциацията на B лимфоцитите, aberrant - ранни миелоидни прекурсори с експресия на лимфоцитни маркери, CD5+ B - зрели B лимфоцити експресиращи CD5, B low pr. - зрели B лимфоцити от лимфни възли с ниска пролиферативна активност, ly high pr. - зрели лимфоцити с висока активност. С * са отбелязани групите със значимо различни от общата група стойности (p<0.05).*



ФИГУРА 9. *Сборна хистограма на флуоресценцията на клетки от изследваните трансформирани популации маркирани с CAF7-ФИТЦ. Контрола -максимални нива на неспецифична флуоресценция на изотипната контрола. Маркер1 - средно ниво на CAF7 експресия върху лимфоцити в покой, маркер 2 - средно ниво на CAF7 експресия върху моноцити, маркер 3 - средно ниво на CAF7 експресия при ФХЛ бласти на трети ден от култивирането.*

ФИГУРА 10. *Данни за разпределението на изследваната група от трансформирани клетки по нива на експресия на CAF7 (CD98) представени чрез хистограма. Стойностите представляват разликата от медианата на намерената флуоресценция при изследваната популация и медианата на неспецифичната флуоресценция определена с изотипна контрола.*



Така при изследванията с CAF7 върху нетретирани клетки ex vivo от лимфо- и миелобластози бяха установени две главни зависимости.

а) Различават се две нива на експресия - едно ниско и съизмеримо с това при лимфоцити в покой и друго високо, съизмеримо с това върху нормални моноцити, но по-ниско от нивото върху ФХА активирани лимфоцити. Второто ниво е сравнимо още с нивото намерено върху ФХА активирани лимфоцити през първите два дни от култивирането. В тази група са намерени бласти както от миелоиден така и от лимфоиден произход (Т и В). Повечето от тези с миелоиден произход не носеха фенотип на моноцитоидни прекурсори, а нормалните нива върху гранулоцитите са пренебрежимо ниски. Следователно високата ниво на експресия не корелираше нито с линия на диференциация нито с нормалното ниво върху in vitro активирани лимфоцити.

б) Бяха намерени три типа експресия при изследваните популации: хомогенни с ниска и висока експресия, и хетерогенна експресия, при която популациите се разделяха на две близки по обем части. Субпопулациите при хетерогенната експресия имаха почесто високи нива на антигена. Не бяха намерени данни в литературата за подобна хетерогенност. Връзката на CD98 с процеса на

ФИГУРА 11. *Примерни популации трансформирани клетки с типична експресия на CAF7: (A) - висока хомогенна, (B) - ниска хомогенна и (C) - хетерогенна.*

пролиферация предполага отношение към клетъчния цикъл. Съществуват обаче няколко значителни пречки за тълкуването на хетерогенността в контекста на клетъчния цикъл. Фракцията клетки в S фаза обикновено е по-малка от намерените при хетерогенната експресия на CD98 субпопулации. Освен това се наблюдава ранно повишение на CD98 при лимфоцитната активация - още при прехода от Go в G1, и постоянни, високи нива в хода пролиферацията. Така етапът с висока експресия на CD98 из-цяло обхваща G1\S\G2\M фазите. Двете нива на CD98 по-скоро отразяват наличието на различни субпопулации съществуващи едновременно с различна пролиферативна активност.

3.3.2. 7E12

Резултатите са представени на Фиг. 12. Нивата на CD45 варираха от негативни до 2-3 пъти по-високи от нормалните спрямо нивото, намерено върху нормални периферни лимфоцити. Хипотезата за нормално разпределение на стойностите на експресията на CD45 при изследваната група не бе отхвърлена (тест Колмогоров - Смирнов, p=0.21), но коефициентът на вариация (66%) беше двойно по-висок от стойността, допустима при хомогенно разпределени данни (Фиг. 13). За да проверим доколко експресията на CD45 варира изобщо във връзка с

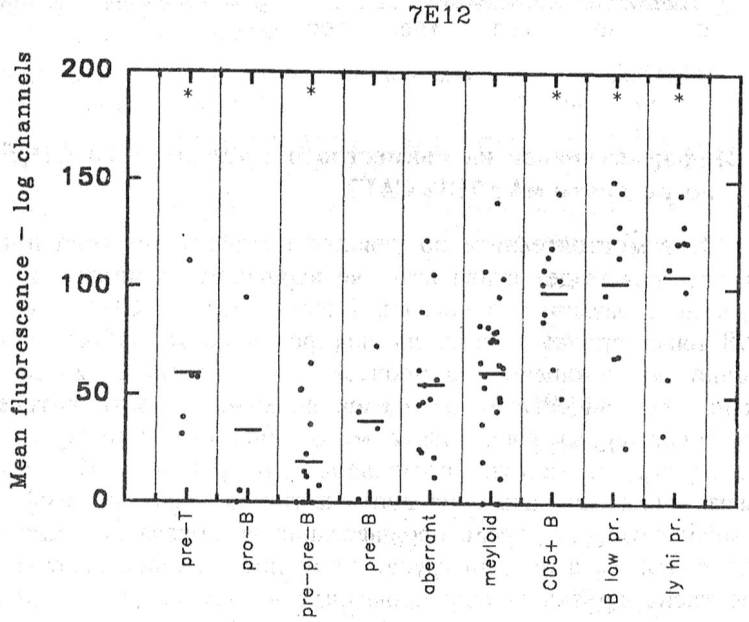
***ТАБЛИЦА 3.** Разпределение на изследваните популации по тип експресия на CAF7. Показан е броят популации от всеки вид със съответен тип CAF7 експресия.*

Тип клетки	Тип експресия на CAF7		
	висока хомогенна	ниска хомогенна	хетерогенна
пре-Т	5	3	0
про-В	2	2	0
пре-пре-В	5	7	3
пре-В	3	1	0
"аберантни"	5	2	3
миелобласти	13	6	1
$CD5^+$ зрели В	0	9	0
$CD5^-$ зрели В ниска пролиф.	3	4	1
зрели лимфоцити висока пролиф.	5	1	0

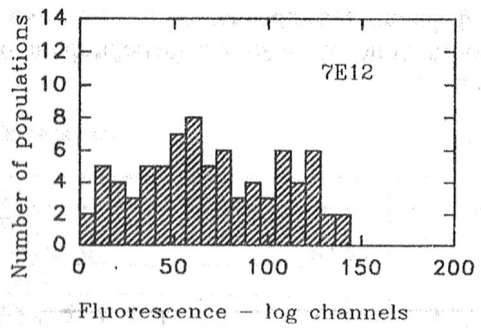
типа на клетките използвахме теста на Крускал-Уолис. Бяха открити статистически значими различия в експресията на CD45 между фенотипните групи ($p<0.001$). За да установим кои фенотипни групи имат отличаващи се нива, ние сравнихме всяка една от тях с останалите, както и по двойки, с помощта на теста на ранговите суми на Уилкоксън. Така в изследваната група по-висока експресия на CD45 бе намерена при клетките със зрял фенотип ($p<0.01$ за $CD5^+$ В, уеднакви $CD5^-$ В с ниска пролиферация и Т и $p<0.05$ за уеднакви $CD5^-$ В с висока пролиферация). По-ниска, отколкото при останалите случаи, беше експресията на CD45 върху най-незрелите клетки от В клетъчен произход ($CD19^+CD10^-CD20^-CD34^{+/-}$ - $p<0.05$, и $CD19^+CD10^+$ $CD20^-$ - $p<0.001$).

Тези резултати са в съгласие с публикуваните от Caldwell et al. (1986, 1987, 1988, 1991) и Shah et al. (1987) за постепенното нарастване нивата на CD45 върху В-клетъчни предшественици. В тези работи се правят и паралели с нивата на CD45 намерени върху злокачествено трансформирани клетки и В прекурсорите, от които произхождат.

Интересна находка бяха значително по-ниските нива на CD45 при уеднаквите, сравнени с циркулиращите зрели $CD5^+$ В пролиферации ($p<0.01$) (Фиг. 16). В литературата дребноклетъчният лимфоцитен лимфом и хроничната лимфолевкоза се разглеждат като две форми на едно и също заболяване с фенотипно неотличими В-пролиферации. Намерената от нас разлика в експресията на CD45 би могла да послужи за отдиференциране на тези две форми и фенотипно.



***ФИГУРА 12.** Данни за нивата на експресия на 7E12 (CD45) върху трансформирани клетки от различни линии на хемопоезата и различни стадии на диференциация. Стойностите представляват разликата от намерената флуоресценция и нивото на неспецифичното свързване определено с изотипни контрола. Хоризонталните отсечки обозначават средните стойности. Обозначенията на вида клетки са както при Фиг. 8. Правят впечатление ниските стойности при прекурсорите и високите - при зрелите клетки.*



ФИГУРА 13. *Данните за разпределението на изследваната група от трансформирани клетки по нива на експресия на 7E12 (CD45) представени чрез хистограма. Стойностите представляват разликата от медианите на специфичната и неспецифичната флуоресценция.*

3.4. Информативност на съвместното изследване на CD45 и CD98 посредством мАт 7E12 CAF7

От самостоятелните проучвания на двата антигена върху разглеждания модел става ясно, че вариациите в нивата им са свързани с различни феномени. Експресията на CD45 има, а CD98 няма връзка с хода на диференциацията. Обратното е валидно по отношение на процеса на активацията. За да се изясни дали съществува паралелна промяна в двата антигена беше анализирана корелацията между нивата им върху популациите където те бяха изследвани едновременно. Корелационният анализ на нивата на двата антигена върху 46 лимфо- и миелобластози и 23 зрели пролиферации не показа корелация в експресията им в общата група, което потвърждава липсата на съществена връзка между промените в експресията на двата антигена в този модел.

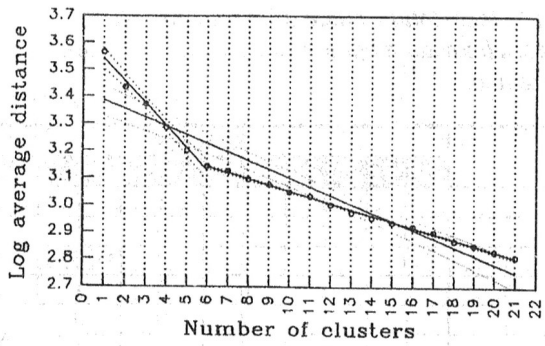
Имайки пред вид дефинираните по-рано три нива на експресия на CD45 в костния мозък (Caldwell et al. 1986, 1987, 1988, 1991, Shah et al. 1988), силно разпръснатите данни от изследванията със 7E12 и намерените две нива на експресия на CD98, беше приложен кластерен анализ за обективизиране на вероятното групиране на данните както по CD45 така и при едновременното изследване на двата антигена. Използвана бе програма KM.86 от статистически пакет BMDP. Програмата използва дивизионна стратегия "к-средни". Беше приложено последователно разделяне на 1 до 21 кластера. В разглеждания случай бе открита рязка промяна в зависимостта между

компактността на кластерите и броя им след разделянето на 6 кластера (Фиг. 14). Това може да се интерпретира като бързо повишение на компактността на структурата до разделяне на 6 кластера, и значително по-бавно - при по-нататъшното кластерифициране. Така бе обективизирано групиране на изследваните популации в 6 групи (Табл. 4 и Фиг. 15). Получените кластери се радзделяха на две групи по нивото на CD98 и на три групи по нивото на CD45 (съответно: такива с ниска експресия на CD98 и ниска, средна и висока - по CD45 и с висока по CD98 и отново - ниска, средна и висока по CD45). Намерената структура с шест кластера е в потвърждение на:

⇒ разделянето на степените на експресия на CD98 в две дискретни нива,

⇒ литературните данни за три дискретни нива на експресия на CD45 в хода на левкопоезата,

⇒ липсата на корелация между степента на експресия на двата антигена - при всяко ниво на CD45 се наблюдаваха ниско и високо ниво на CD98.



ФИГУРА 14. *Резултати от проследяването на ефективността на кластерифицирането на данните за количествена експресия на CAF7 и 7E12 върху трансформирани клетки. Логаритмите на средното отстояние на точка от данните до центъра на кластера, в който е класифицирана, са представени като функция от броя кластери. Гладката зависимост при разделяне от 1 до 6 кластера и от 6 до 21 кластера е признак, че в тези интервали данните се разделят артефициално. Рязката промяната в зависимостта при шест кластера е индикатор за наличие на структура в данните, които са групирани именно в получените шест кластера. Показана е линейна регресия през всички точки с 95% доверителни интервали и по отделно за участъците при по-малко и повече от 6 кластера, където доверителните интервали са значително по-тесни.*

Отнасянето на популациите с различен фенотип към това разделяне е показано на Табл. 5. Прилагайки подход заимстван от теория на информацията фенотипните групи бяха подредени по силата на асоциацията им с отделни кластери (Табл. 6). Като цяло зрелите форми показаха по-силна връзка при това с класте-

Таблица 4. *Резултати от кластерния анализ на нивата на експресия на CD98 и CD45.*

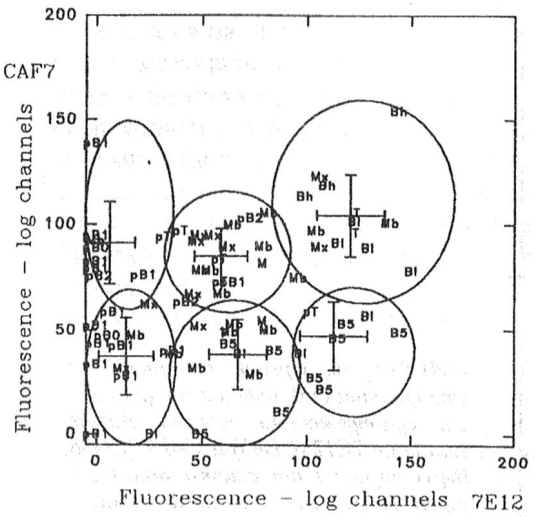
Параметри		Кластер					
		1	2	3	4	5	6
CD45 -	$\bar{x}$	121	59	14	113	6	67
МИФ	SD	16.2	12.6	13	16	12.1	13.7
CD98 -	$\bar{x}$	104	85	38	47	91	38
МИФ	SD	19.5	12.9	18.6	16.5	19.2	16.9

Кластер 1 - $7E12^{+++}$, $CAF7^{++}$; кластер 2 - $7E12^{++}$, $CAF7^{++}$; кластер 3 - $7E12^{+}$,$CAF7^{+}$; кластер 4 - $7E12^{+++}$, $CAF7^{+}$; кластер 5 - $7E12^{+}$,$CAF7^{++}$; кластер 6 - $7E12^{++}$, $CAF7^{+}$.

Таблица 5. *Резултати от кластерния анализ на нивата на експресия на CD98 и CD45. Показан е броят популации от всеки вид попадащи в даден кластер.*

Тип клетки	Кластер					
	1	2	3	4	5	6
пре-Т	0	3	0	1	1	0
про-В	0	0	1	0	1	0
пре-пре-В	0	1	8	0	5	0
пре-В	0	2	0	0	1	0
"аберантни"	2	5	2	0	0	1
миелобласти	2	6	2	1	1	5
$CD5^{+}$ зрели В	0	0	0	5	0	4
$CD5^{-}$ зрели В ниска пролиф.	4	0	1	2	0	1
зрели лимфоцити висока пролиф.	5	0	0	0	0	1

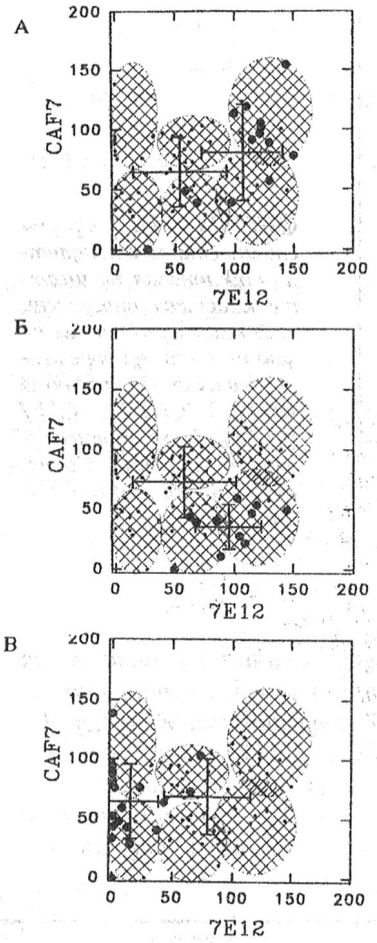
Означенията на кластерите - както в Табл. 4. Стойностите в защрихованите клетки се отличават значимо от случайното разпределение (χ^2, $p<0.05$).



ФИГУРА 15. *Средни стойности и стандартни отклонения на шестте кластера определени чрез кластерен анализ на данните от едновременния анализ експресията на 7E12 (CD45) и CAF7 (CD98) върху трансформирани клетки. Съкращенията са както при Фиг. 27.*

Таблица 6. *Резултати от кластерния анализ на нивата на експресия на CD98 и CD45. Коефициенти на информативност на кластерите по отношение типа на популациите. Кластер 1 - $7E12^{+++}$, $CAF7^{++}$; кластер 2 - $7E12^{++}$, $CAF7^{++}$; кластер 3 - $7E12^{+}$,$CAF7^{+}$; кластер 4 - $7E12^{+++}$, $CAF7^{+}$; кластер 5 - $7E12^{+}$,$CAF7^{++}$;кластер 6 - $7E12^{++}$, $CAF7^{+}$. Стойностите в защрихованите клетки сочат връзки между типа популация и съответния кластер.*

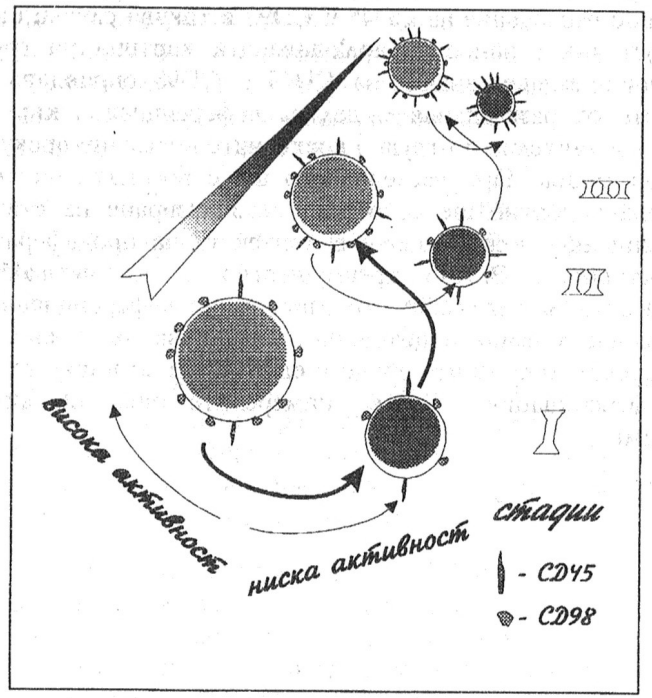
Тип клетки	Кластер					
	1	2	3	4	5	6
пре-Т	0	2.53	0	1.69	1.69	0
про-В	0	0	2.71	0	4.23	0
пре-пре-В	0	0.30	3.10	0	3.01	0
пре-В	0	2.81	0	0	2.81	0
"аберантни"	1.17	2.11	1.09	0	0	0.58
миелобласти	0.69	1.49	0.64	0.50	0.50	1.72
CD5+ зрели В	0	0	0	4.69	0	2.60
CD5- зрели В ниска пролиф.	2.92	0	0.68	2.11	0	0.73
зрели В лимфоцити висока пролиф.	5.00	0	0	0	0	0
зрели Т лимфоцити висока пролиф.	3.90	0	0	0	0	1.95



ФИГУРА 16. *Средни стойности и стандартни отклонения на данните от едновременния анализ експресията на 7E12 (CD45) и CAF7 (CD98) върху групата от всички популации трансформирани клетки (малки точки) и на:*
А) - зрелите лимфоцитни популации без CD5⁺ В клетките;
Б) - зрелите лимфоцитни CD5⁺ В клетъчни популации;
В) - ранните В прекурсори;
- представени с големи точки. За сравнение са показани и определените 6 кластера.

рите с висока експресия на CD45, като CD5⁻ В-клетъчните и Т-клетъчните бяха свързани с висока експресия на CD98, а CD5⁺ В-клетъчните - с ниска (Фиг. 16 А,Б). От пролиферациите с незрял фенотип най-силна връзка имаше между В лимфобластните пролиферации и кластерите с ниски нива на CD45 (Фиг. 16В). При бластозите най-общо връзките с отделни кластери бяха по-слаби отколкото при зрелите форми. Най-характерно е разцепването на групите с едни и същи фенотипни и морфологични характеристики и ниво на диференциация определено с помощта на CD45, на подгрупи с ниски и високи нива на CD98. Тази картина ни дава основание да предложим следната хипотеза. Наблюдаваните промени показват, че експресията на CD45

следва хода на диференциацията на левкоцитите като до етапа на зрели левкоцити в периферията нараства, преминавайки през три нива. Съпоставена с нея експресията на CD98 показва вариации не в хода на диференциацията, а в рамките на наблюдаваните отделни етапи. Това отговаря на представата за преминаването през цикъл на активация и пролиферация на всеки етап на диференциация преди прогресия към следващия (Фиг. 19). Интересно би било да се потърси потвърждение на предположението, че пролиферациите с хетерогенна експресия на CD98 представляват еквиваленти на преходен етап между двете състояния.



ФИГУРА 17. *Схема илюстрираща предложения хипотетичен модел на динамиката на процесите на диференциация въз основа на експериментите с CD45 и CD98. Данните предполагат стъпалообразно развитие на процеса, при което се редуват периоди с различна пролиферативна активност.*

Намереното групиране на данните при анализа експресията на CD98 и CD45 е доказателство за високата информативност на количествената ПЦМ при широко експресирани антигени. Съчетанието на количествения анализ на двата антигена при левкоцитни пролиферации с различни биологични характеристики показа нарастването на информативността в сравнение с анализа поотделно поради липсата на корелация помежду им, универсалната им експресия и вариабилността на нивата им. С помощта на CD45/CD98 анализ е възможно да се намерят допълнителни разграничения в рамките на дадена фенотипно и морфологично обособена група малигнени пролиферации. Вероятно разграничаването на дискретни нива на експресия при едновременно изследване на CD45 и CD98 в такива случай ще има и диагностична стойност. Наблюдаваната картина на групиране при едновременен анализ на CD45 и CD98 оправдава преминаването от разгледания модел на диференциация към изследване на значително по-трудно достъпните нормални прекурсори в костния мозък. При изследването им с помощта на тези два антигена вероятно ще се отдаде детайлизиране на етапите на диференциация и изследване в контекста на пролиферативната им активност. Важно преимущество е независимостта на експресията на антигените от линията на диференциация (лимфоидна или миеломоноцитоидна). Това дава възможност да се проследяват въпросните процеси едновременно върху тези линии на диференциация и прави намерените нива на активация сравними.

ИЗВОДИ

1. Получени са две нови моноклонални антитела - 7E12 и CAF7, специфични за левкоцитни антигени. Въз основа на характера на експресия и молекулно тегло на разпознаваните антигени и проведените инхибиционни тестове беше установена специфичността им: CAF7 принадлежи към кластера CD98, а 7E12 - към CD45.

2. Антигените разпознавани от 7E12(CD45) и CAF7(CD98) са представени върху повечето клетки от кръвен произход, но нивата им на експресия варират в широки граници в зависимост от процесите на диференциация и клетъчно активиране. Промените в нивата при CD45 са свързани предимно със степента на диференциация, а при CD98 - с функционалното състояние на клетките.

3. Експресията на CD98 в изследваната група злокачествено трансформирани клетки има бимодално разпределение - с две дискретни нива. При отделните популации са намерени три типа експресия на CD98: висока хомогенна, ниска хомогенна и хетерогенна.

4. Едновременното изследване експресията на CD45 и CD98 показа, че се различават три нива на експресия на CD45, свързани с хода на диференциацията, в рамките на всеки от които се наблюдават по две нива на CD98, свързани с функционалното състояние на клетките.

5. Тъй като нивата на експресията на CD45 и CD98 носят различна информация за левкоцитите, съчетаното количествено изследване на тези два антигена може да се използва като модел за определяне отношенията между процесите на активация и диференциация.

СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИЯТА

1. Pashov A., M. Nikolova, H. Taskov; Two New Monoclonal Antibodies with Pan-leucocyte Specificity. **Probl. Infect. Parasit. Dis.**, 1993, XX, 43-45.

2. Taskov H., A. Pashov, E. Dimitrova; Expression of the Activation Antigen Identified by CAF7 - a Novel Monoclonal Antibody, in Acute Leukaemia. **C. R. Acad. Acad. Bulg. Sci.**, 1994, (под печат).

3. Pashov A., H. Taskov; Preparation and Characterization of a New Monoclonal Antibody CAF7 Specific for a Leucocyte Activation Antigen. **Hybridoma**, 1994, 13, (3), 229-236.

4. Pashov A., H. Taskov, E. Dimitrova; AA10.5 A New mAb, CAF7, Specific for an Activation Antigen. in: **Leucocyte Typing V: White Cell Differentiation Antigens.** Edited by S. Schlossman, L. Boumsell, W. Gilks, J. Harlan, T. Kishimoto, C. Morimoto, J. Ritz, S. Shaw, R. Silverstein, T. Springer, T. Tedder and R. Todd. Oxford University Press. 1994 (под печат).

УЧАСТИЯ В КОНГРЕСИ И КОНФЕРЕНЦИИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИЯТА

1. Николова М., А. Пашов; Получаване на моноклонални антитела срещу човешки лимфоцити и възможности за диагностичното им приложение в онкологията. **Трети национален интердисциплинарен младежки симпозиум.** Хасково, 11-12 октомври 1991г.

2. Pashov A., M. Nikolova; Two New Monoclonal Antibodies specific for membrane antigens recognizing non-lineage leucocyte antigens. **8th Interanational Congress of Immunology**, Budapest, 23-28 August, 1992.

3. Пашов А., М. Николова, Хр. Тасков; Три нови моноклонални антитела специфични за пан-левкоцитни антигени. **VII конгрес по заразни и паразитни болести**, Велинград, 1992.

4. Pashov A., M. Nikolova, H. Taskov; Three New Monoclonal Antibodies Specific for Membrane Antigens of Human Leucocytes. **VIII congress of the microbiologists Bulgaria**, Varna, 21-23 October, 1993.

5. Pashov A., H. Taskov; A new monoconal antibody - CAF7, specific for an activation antigen. **5th International Conference on Human Leucocyte Differentiation Antigens**, Boston, 1-7 November, 1993.