



## **ОПЕРАТИВНА ПРОГРАМА**

### **"РАЗВИТИЕ НА ЧОВЕШКИТЕ РЕСУРСИ"**

**"Подкрепа за развитието на докторанти, пост-докторанти, специализанти и млади учени",**

**ДОГОВОР BG051PO001-3.3.04/58 от 2009**

# Диагностични методи за оценка на антиген-специфичния Т клетъчен имунен отговор

Молекулярна имунология и  
инфектология  
лекционен курс  
09.11 – 11.11.2010г.

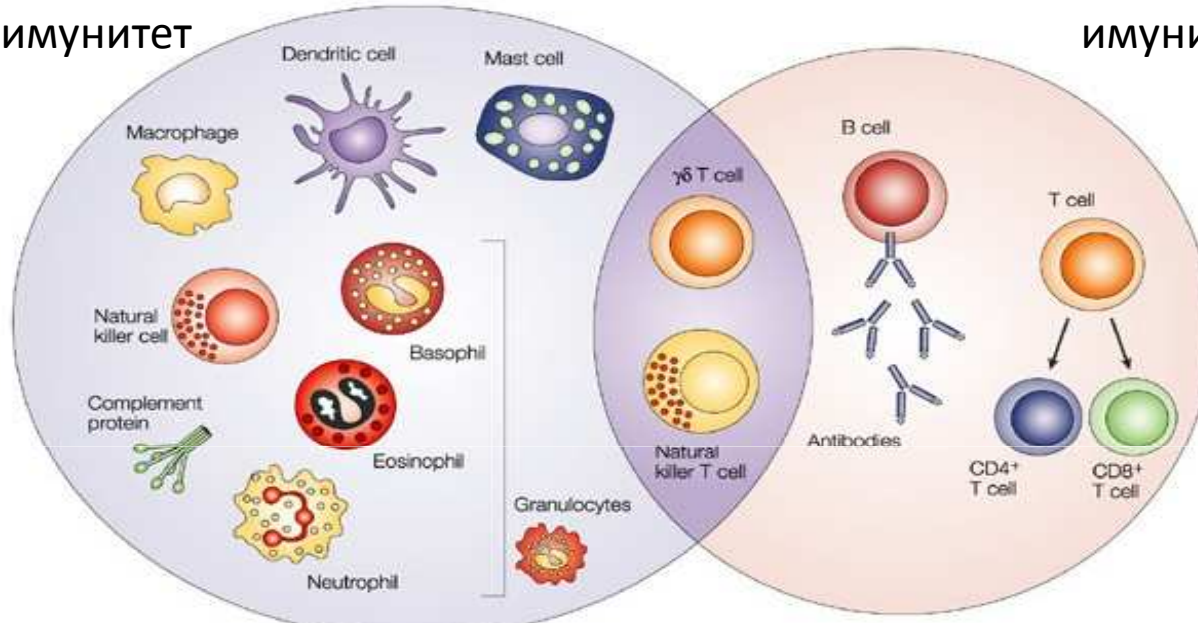
Мария Мухтарова , биолог, НРЛИ



# ИМУННИЯТ ОТГОВОР

Вроден  
имунитет

Придобит  
имунитет



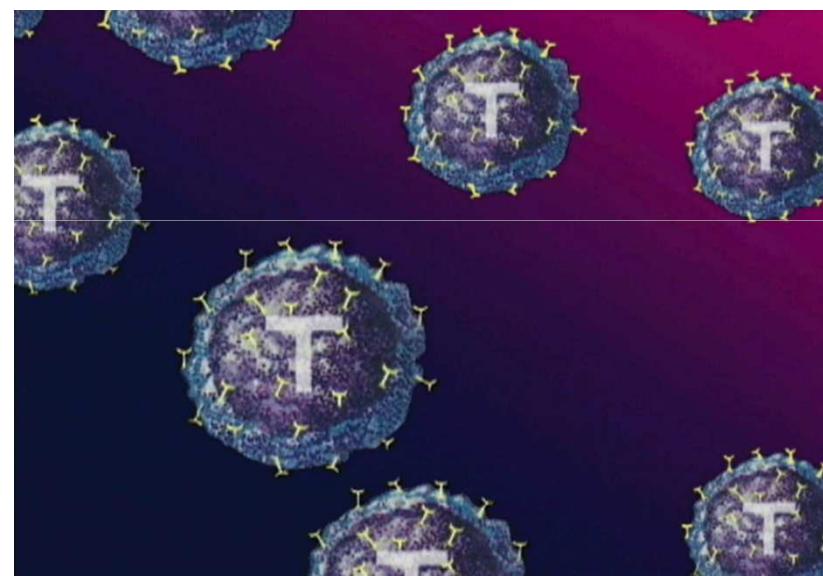
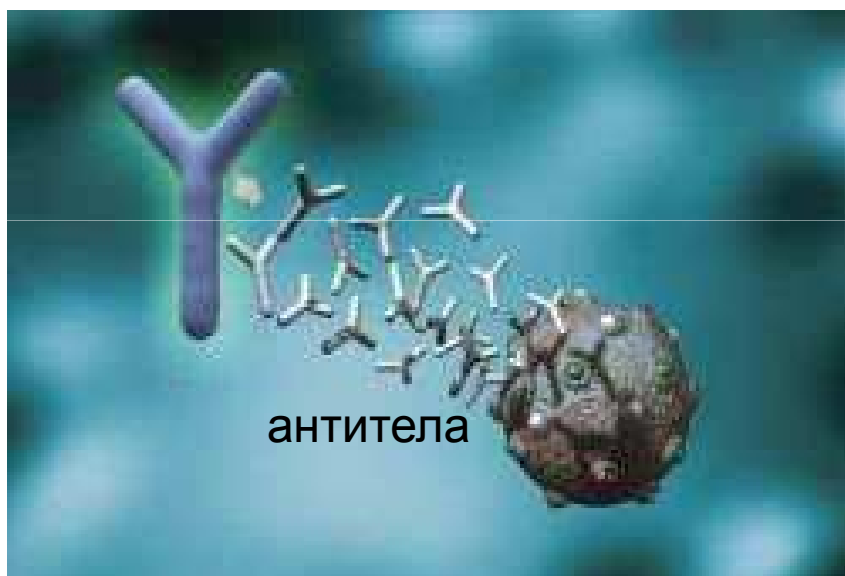
# ПРИДОБИТ ИМУНЕН ОТГОВОР

ХУМОРАЛЕН

КЛЕТЪЧЕН

Антитела, В клетки

Т клетки



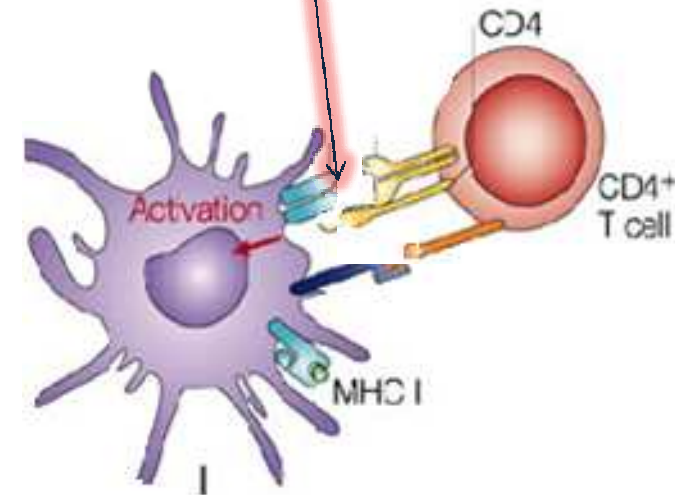
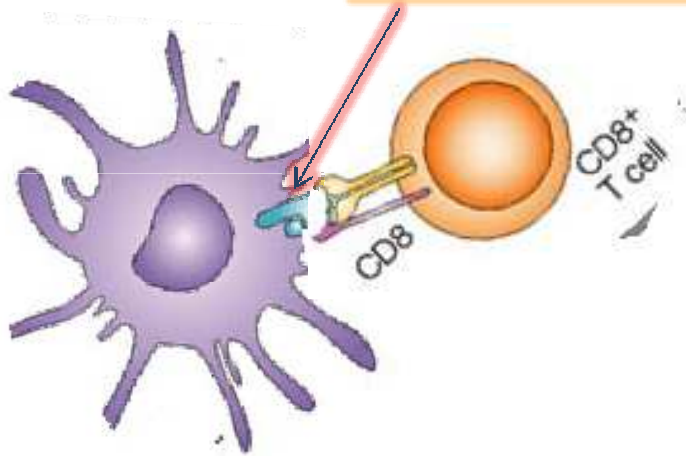
# КЛЕТЪЧЕН ИМУНЕН ОТГОВОР

## КЛЕТЪЧЕН

### CD8 Т лимфоцити

### CD4 Т лимфоцити

ГКТС – главен комплекс за тъканна съвместимост  
MHC - Major histocompatibility complex

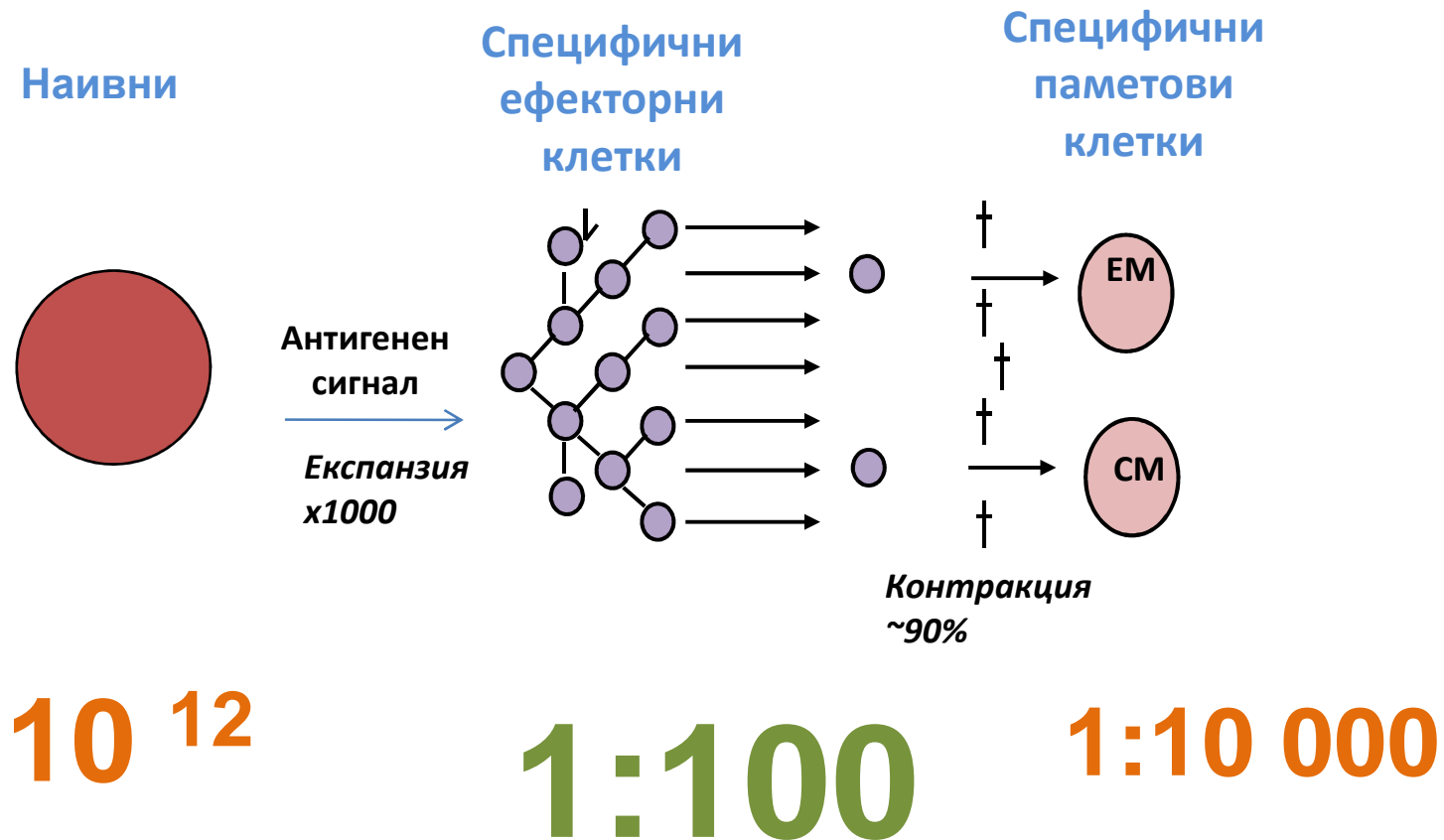


- лизират инфектираните клетки
- продуцират имунореактивни субстанции – антивирусни цитокини (INF $\gamma$ , TNF $\alpha$ ,)

- произвеждат цитокини, чрез които активират и контролират хуморалния и клетъчно-медиация имуен отговор

# КЛЕТЪЧЕН ИМУНЕН ОТГОВОР

генериране и хомеостаза на наивни, ефекторни и паметови Т клетки



# Диагностични методи за оценка на антиген-специфичния Т клетъчен имунен отговор

## Изследвани характеристики на на Т лимфоцитите:

- Честота – брой клетки на определен обем кръв
- Фенотип - съвкупността от различни функционални молекули, експресирани от Т клетките на даден етап от диференциацията им
- Функционални характеристики - цитокинов профил, цитолитична активност, пролиферативен отговор

# Диагностични методи за оценка на антиген-специфичния Т клетъчен имунен отговор

## Съвременни методи

Изследване на Т клетъчни  
функции

Определят се специфични клетки  
по секретирани от тях цитокини  
след стимулация със специфичен  
антиген

- **ELISPOT**
- **ICS ASSAY**

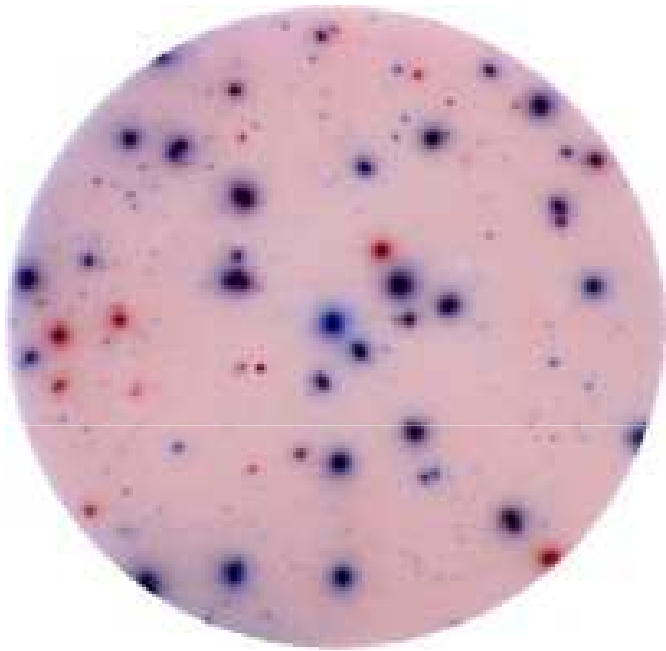
Изследване на Т клетъчни  
структури

Определят се специфични клетки  
по структурни черти на TCR

- **MHC – PEPTIDE  
BINDING ASSAY**
- **IMMUNOSCOPE**

# Диагностични методи за оценка на антиген-специфичния Т клетъчен имунен отговор

Изследване на Т клетъчни функции



**Enzyme-linked immunosorbent  
spot assay**

**ензимо-свързан имуносорбентен  
точков анализ**

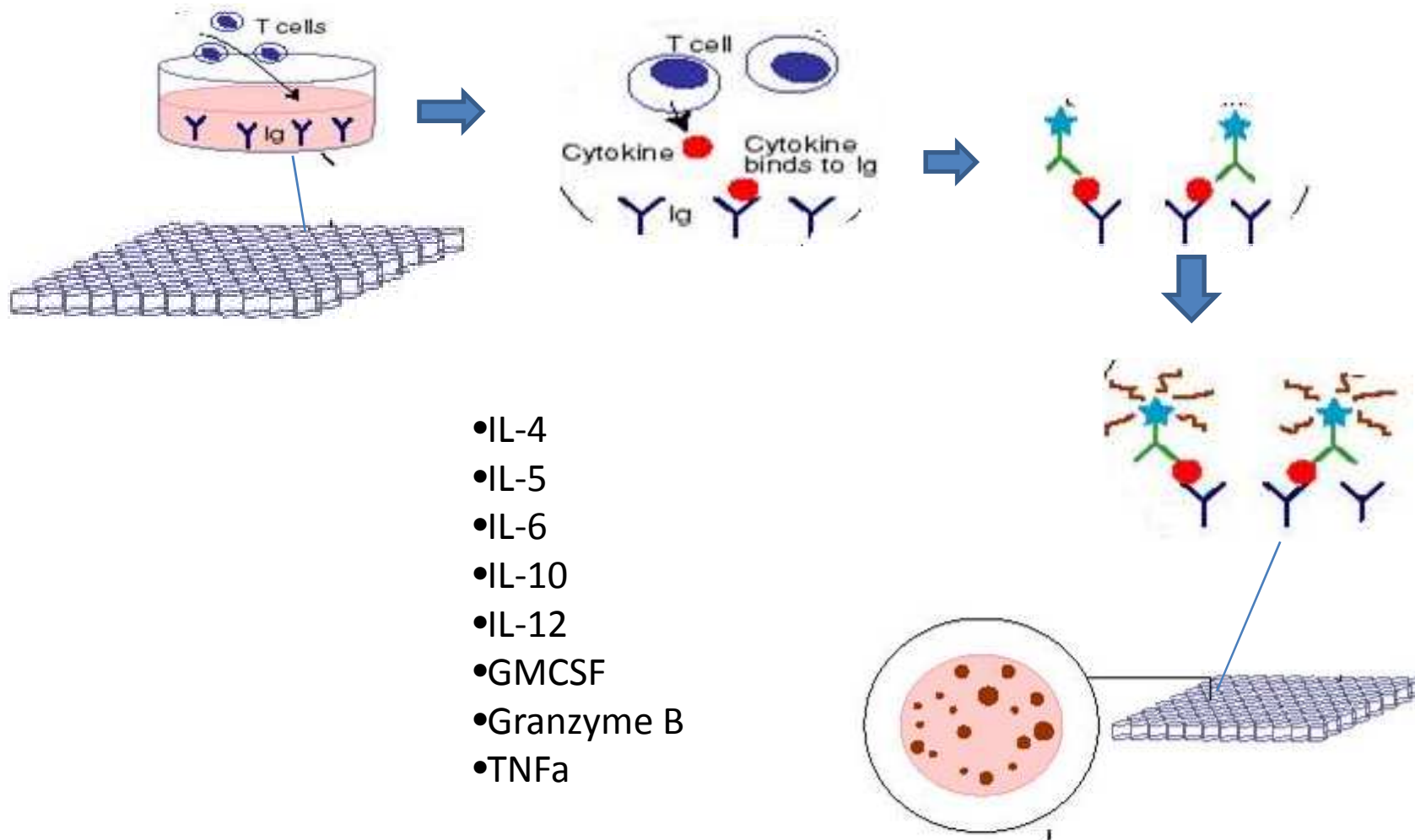
## ELISPOT

- Разработен от Cecil Czerkinsky in 1983
- Модифицирана версия на ELISA
- Първоначално прилаган за откриване на В клетки синтезиращи Ag специфични антитела
- Изследването позволява откриване на индивидуални специфични Т клетки чрез отчитане на синтезирани от тях цитокини

# Диагностични методи за оценка на антиген-специфичния Т клетъчен имуен отговор

Изследване на Т клетъчни функции

## •ELISPOT - ПРИНЦИП

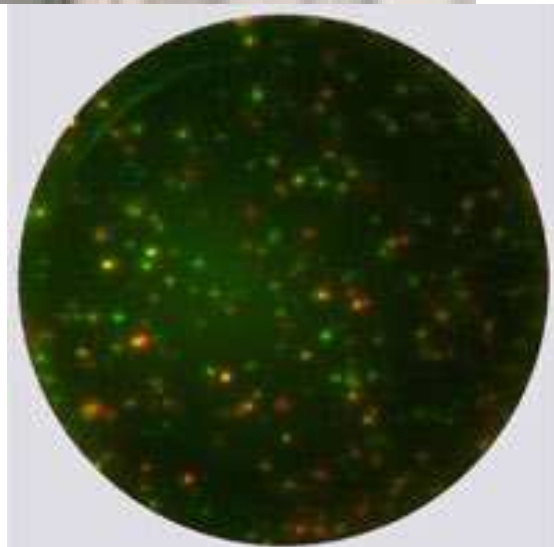


- IL-4
- IL-5
- IL-6
- IL-10
- IL-12
- GMCSF
- Granzyme B
- TNFa

# Диагностични методи за оценка на антиген-специфичния Т клетъчен имунен отговор

Изследване на Т клетъчни функции

## •ELISPOT - ПРИНЦИП



# Диагностични методи за оценка на антиген-специфичния Т клетъчен имунен отговор

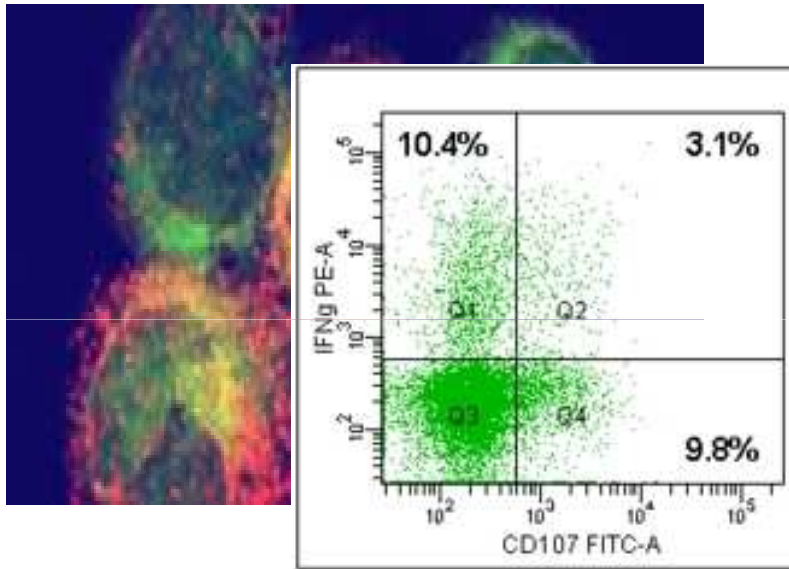
## Изследване на Т клетъчни функции

### •ELISPOT - ХАРАКТЕРИСТИКИ

- Позволява да се определи честотата на редки клетъчни популации (Ag – специфични клетки)
- Откриват се предимно ефекторни клетки – способни за секретират цитокини
- Не открива Ag специфични клетки, които са нефункционални
- Не дава възможност за определяне на фенотипа на ефекторните клетки
- Възможно е да се направи оценка за количеството на секретирания цитокин по плътността и ширината на точките
- Изисква минимален обем на проба за анализ
- Високо чувствителен метод - 1/300 000 клетки
- Възможност за стандартизиране на работния протокол

# Диагностични методи за оценка на антиген-специфичния Т клетъчен имунен отговор

Изследване на Т клетъчни функции



Intracellular cytokine staining assay

Метод за определяне на вътреклетъчни  
цитокени

## ICS ASSAY

- Разработен от Jung & Picker 1993
- Изследването позволява определянето на специфичните клетки по вътреклетъчни цитокини продуцирани от клетките след стимулация с конкретен разпознаван от тях антиген.

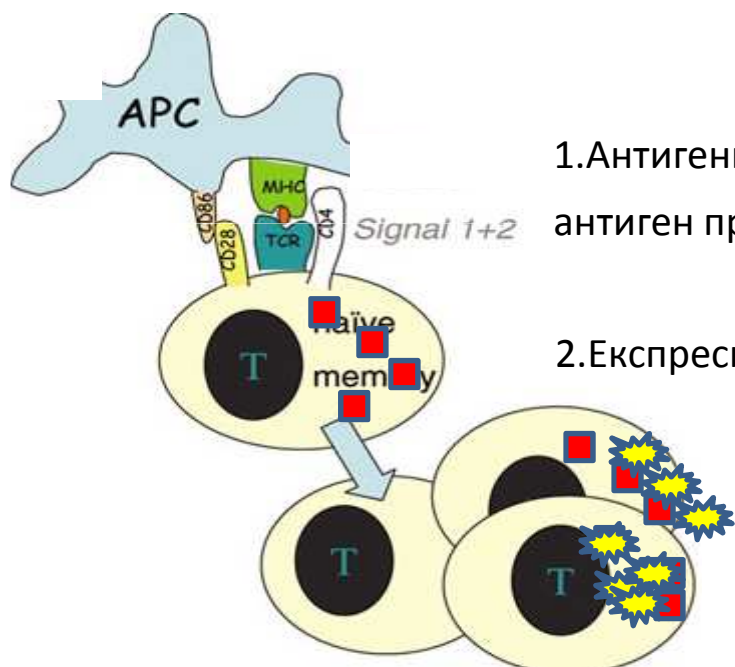
# Диагностични методи за оценка на антиген-специфичния Т клетъчен имунен отговор

## Изследване на Т клетъчни функции

### • ICS ASSAY- ПРИНЦИП



Кръв/ лимфоцити  
антиген



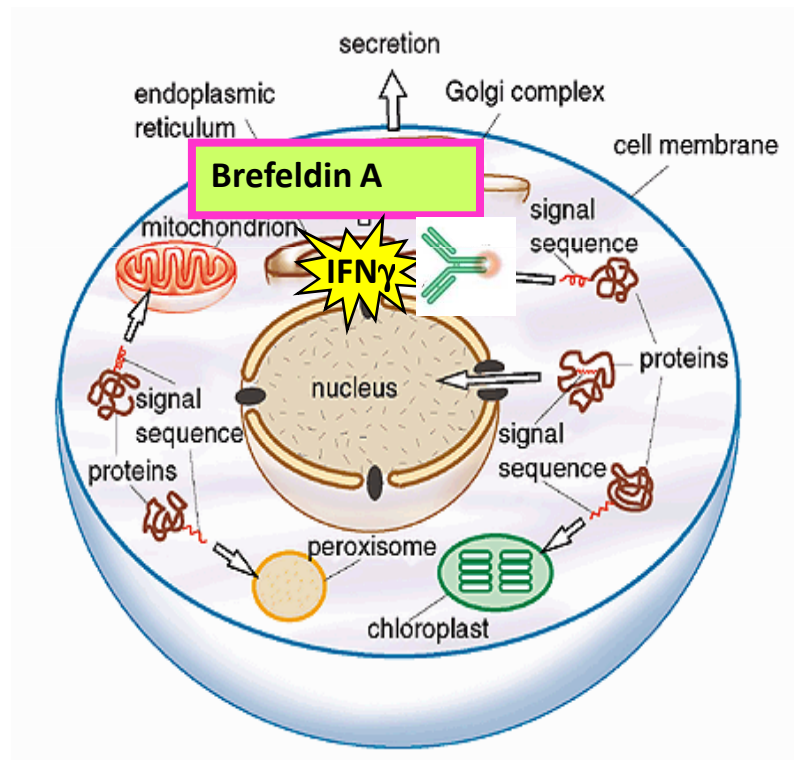
1. Антигените се поглъщат и представят от антиген представящи клетки на специфични за тях Т клетки.
2. Експресия на интрацелуларни цитокини INF $\gamma$ , IL2, IL4, TNF $\alpha$ , и др.
3. Маркиране на цитокините чрез флуорохром свързани моноклонални антитела
4. Флоуцитометричен анализ



# Диагностични методи за оценка на антиген-специфичния Т клетъчен имунен отговор

## Изследване на Т клетъчни функции

### • ICS ASSAY- ПРИНЦИП

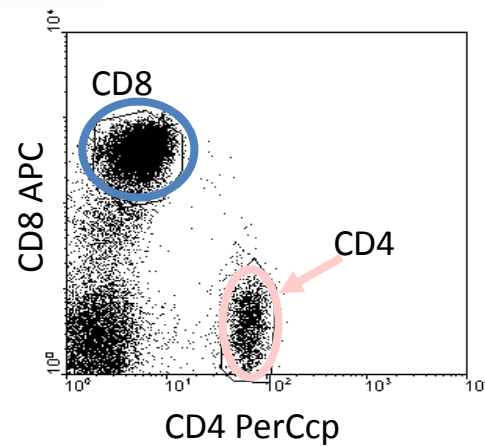
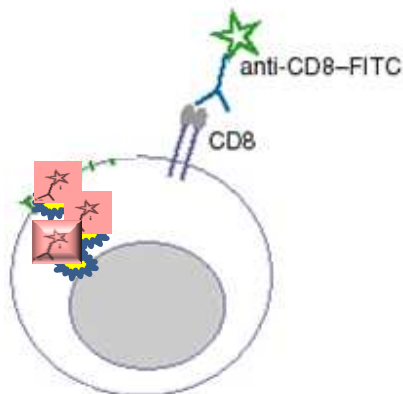


- Вид на антикоагуланта: Heparin (Ca<sup>++</sup> !)
- Време на стимулация
- Време на инкубация с Brefeldin A

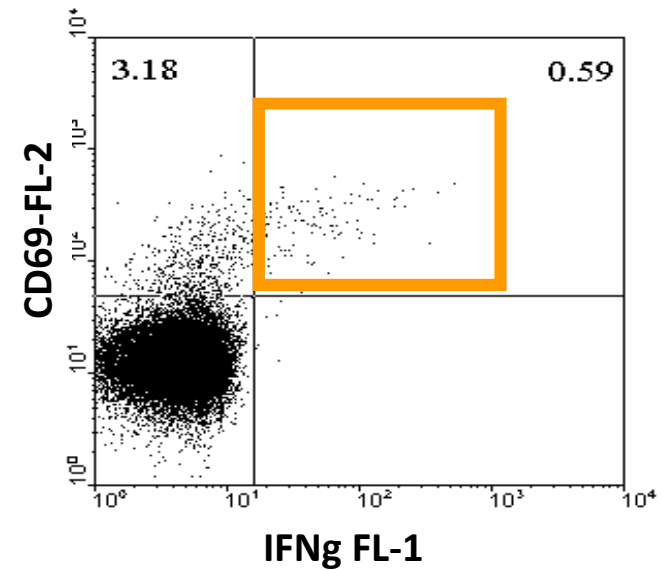
# Диагностични методи за оценка на антиген-специфичния Т клетъчен имунен отговор

## Изследване на Т клетъчни функции

### • ICS ASSAY- ПРИНЦИП



Лимфоцити стимулирани със  
специфичен пептид



# Диагностични методи за оценка на антиген-специфичния Т клетъчен имунен отговор

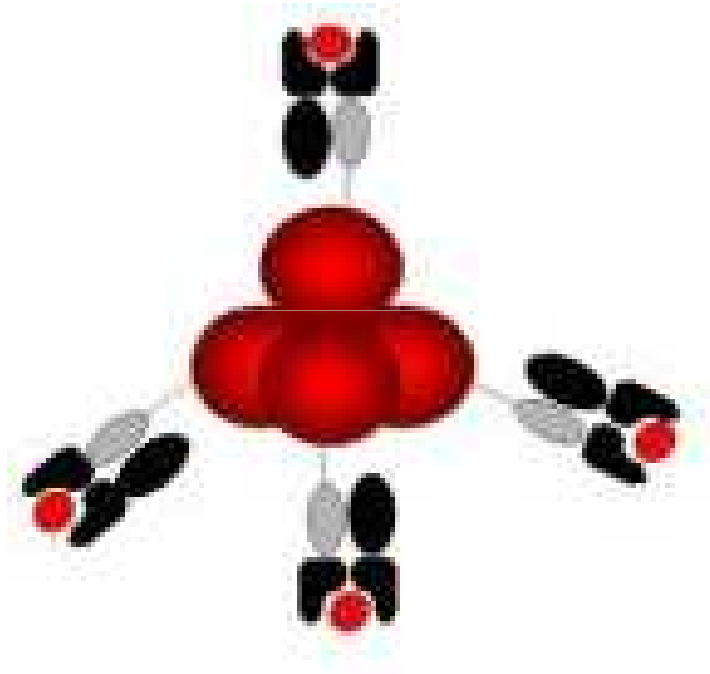
## Изследване на Т клетъчни функции

### •ICS ASSAY- ХАРАКТЕРИСТИКИ

- Идентифицират се и се определя процента на функционалните, специфични Т клетки, но не дава информация за анергичните Т клетки
- Типа/ фенотипа на специфичната клетка
- Позволява едновременното определяне на два и повече цитокина от специфичните клетки
- Определя типа на продуцирания цитокин
- Висока чувствителност 1/10 000
- Възможност за стандартизиране на работния протокол
- Сравнително бърз, лесен за изпълнение метод - получаване на резултат в рамките на 8 – 12 часа

# Диагностични методи за оценка на антиген-специфичния Т клетъчен имунен отговор

Изследване на Т клетъчни структури



## MHC – PEPTIDE BINDING ASSAY

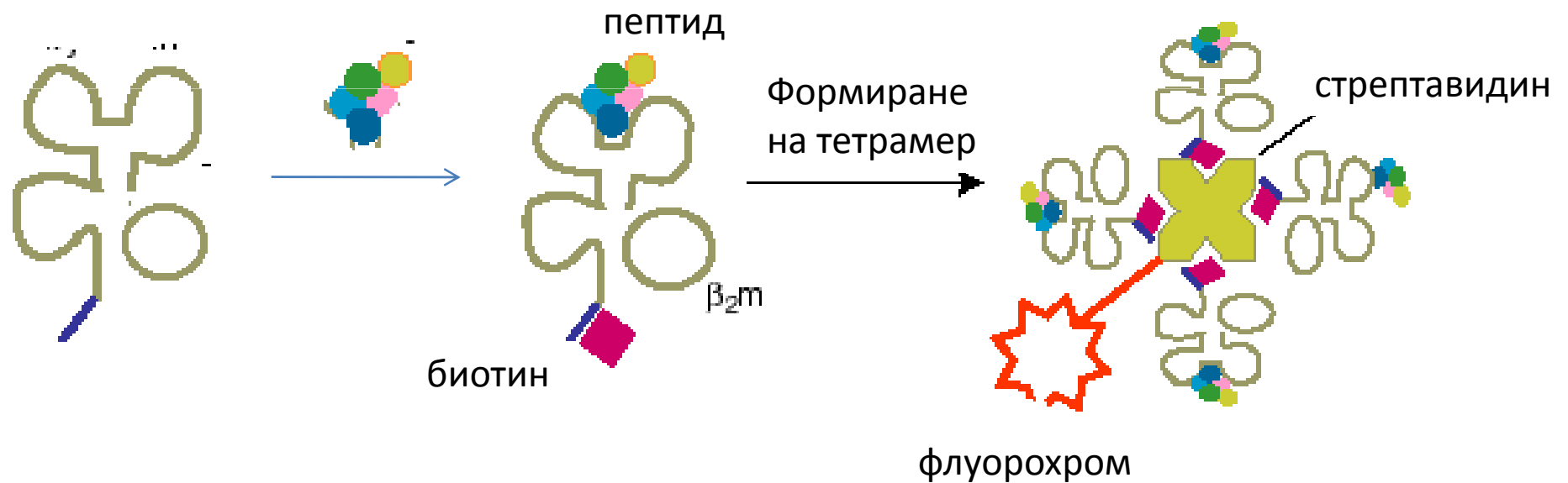
Основава се на използването на мултимерни МНС молекули, натоварени с пептид, които директно разпознават и определят специфичните Т клетки.

Комплекси МНС – Пептид за анализ

# Диагностични методи за оценка на антиген-специфичния Т клетъчен имунен отговор

## Изследване на Т клетъчни структури

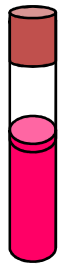
### • МНС – PEPTIDE BINDING ASSAY – ПРИНЦИП



# Диагностични методи за оценка на антиген-специфичния Т клетъчен имуен отговор

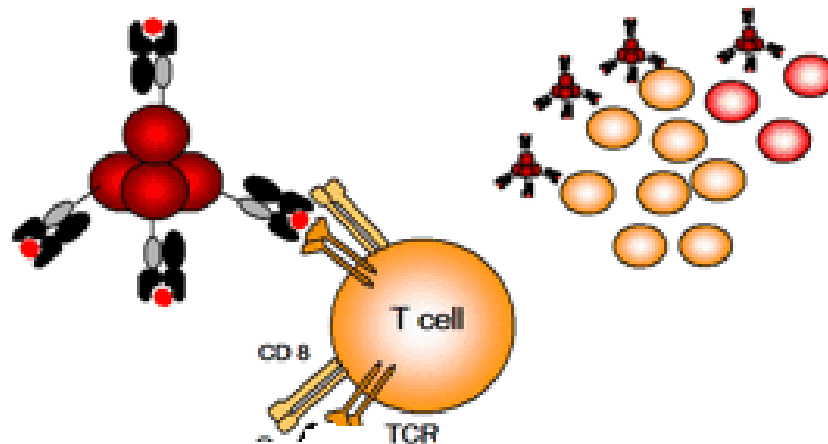
## Изследване на Т клетъчни структури

### • МНС – PEPTIDE BINDING ASSAY – ПРИНЦИП



Кръв+  
МНС-пептид комплекс

1. МНС-пептид комплексите се разпознават и свързват от специфичните за антигена Т клетки.



2. Флоуцитометричен анализ



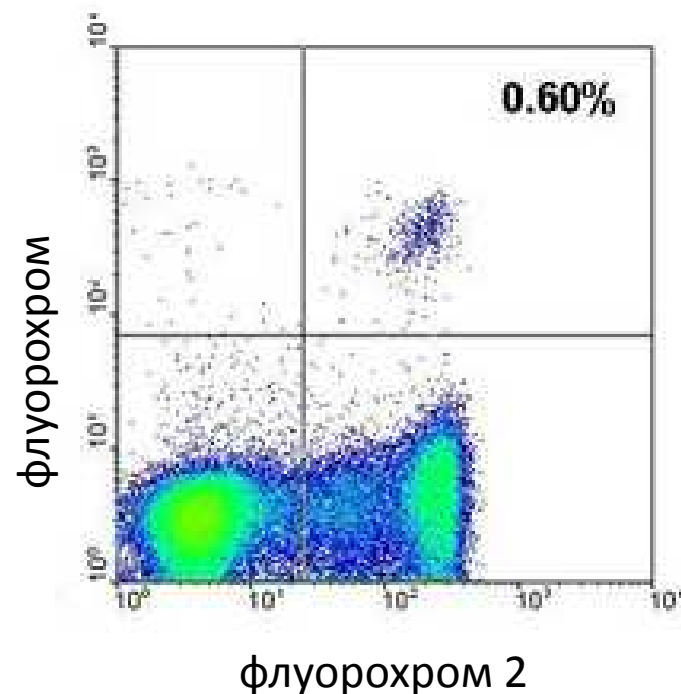
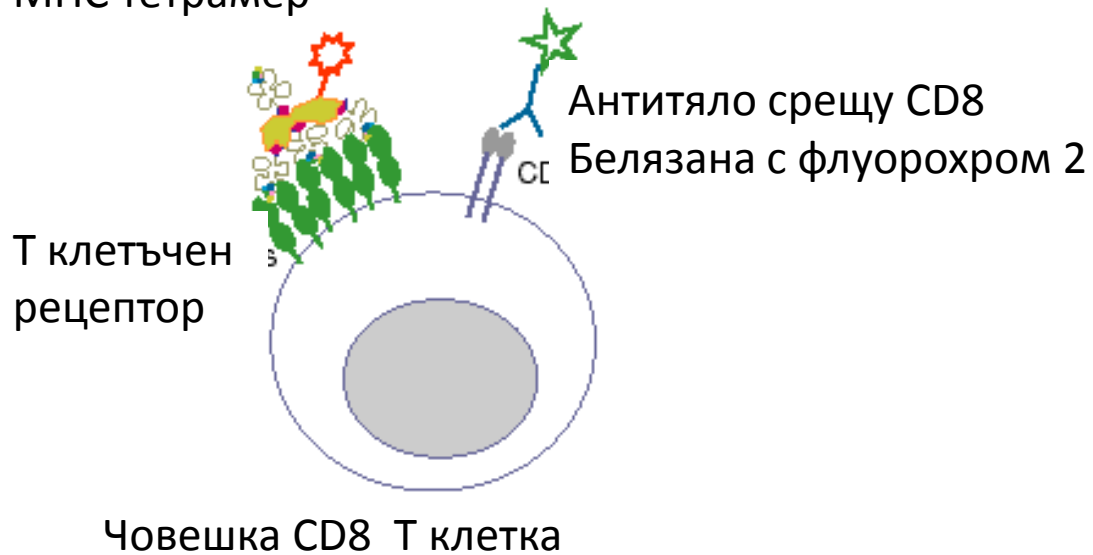
# Диагностични методи за оценка на антиген-специфичния Т клетъчен имунен отговор

Изследване на Т клетъчни структури

## • МНС – PEPTIDE BINDING ASSAY – ПРИНЦИП



Белязан с флуорохром  
МНС тетрамер



# Диагностични методи за оценка на антиген-специфичния Т клетъчен имунен отговор

## Изследване на Т клетъчни структури

### • МНС – PEPTIDE BINDING ASSAY – ХАРАКТЕРИСТИКИ

- Позволява визуализация и определяне на процента на всички Т клетки с определена специфичност - прекурсори, ефектори, паметови, функционални и анергични
- Т клетки белязани с тетрамери могат в последствие да бъдат изследвани за техните функционални възможности чрез ELISPOT и ICS
- Възможност разпознатите клетки да бъдат използвани за следващи проучавания

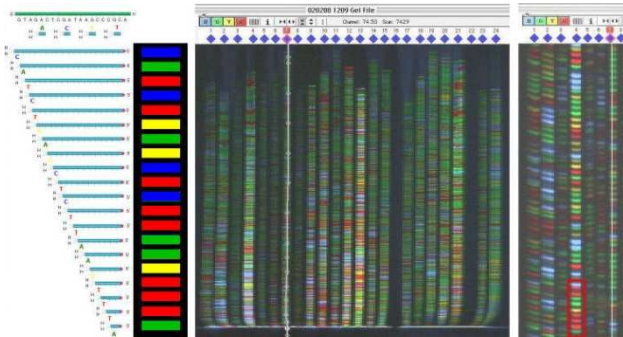
#### *In vitro*

- Висока чувствителност – 1/ 10 000
- Бързина на изпълнение на теста
- Възможност за стандартизация

# Диагностични методи за оценка на антиген-специфичния Т клетъчен имунен отговор

Изследване на Т клетъчни структури

## IMMUNOSCOPE



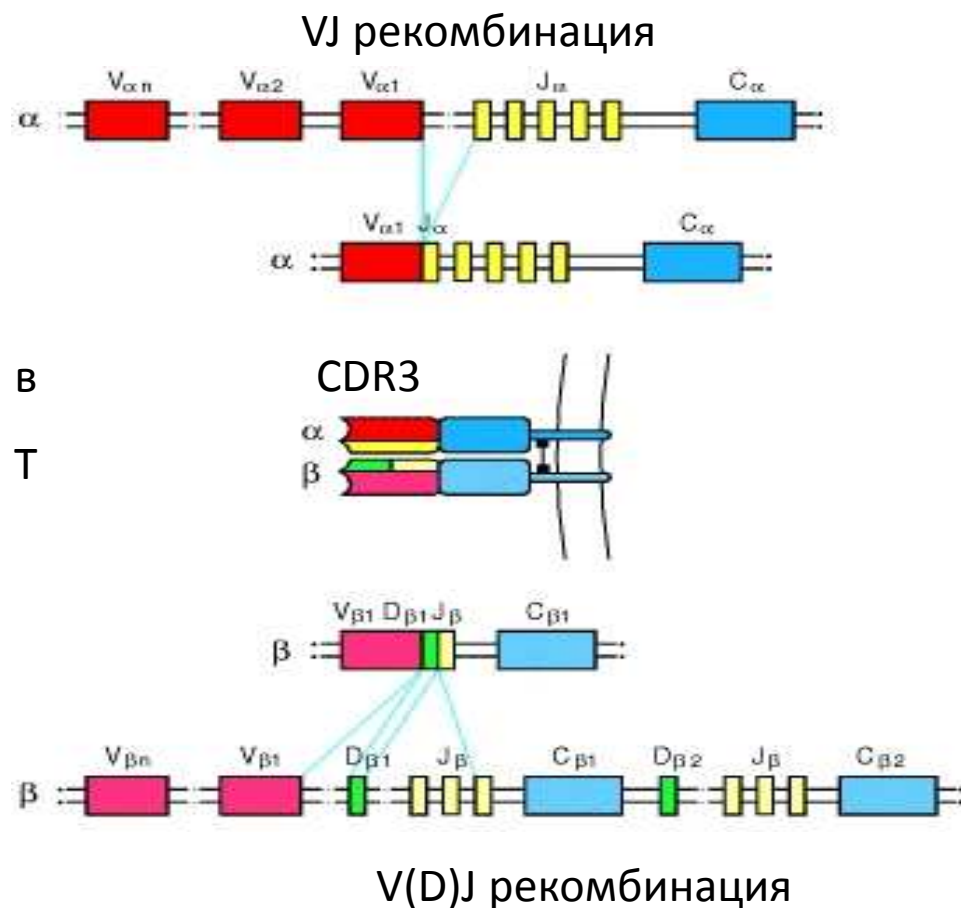
Дава информация за многообразието на Т  
клетъчния репертоар селектиран по време  
на имунния отговор.

# Диагностични методи за оценка на антиген-специфичния Т клетъчен имуен отговор

## Изследване на Т клетъчни структури

### •IMMUNOSCOPE - ПРИНЦИП

За определяне на специфичните Т клетки се използва вариациите в структурната организация на Т клетъчния рецептор.



DNA – реаранжировка при формиране на Т клетъчен рецептор

# Диагностични методи за оценка на антиген-специфичния Т клетъчен имунен отговор

## Изследване на Т клетъчни структури

### •IMMUNOSCOPE - ПРИНЦИП



Т лимфоцити



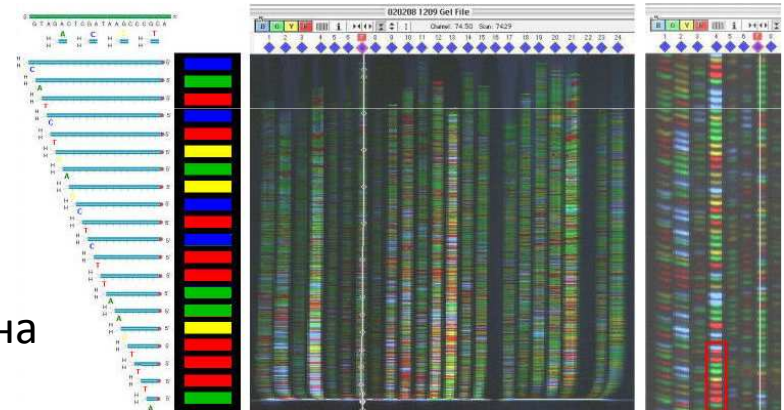
флуорохром  
белязани  
праймери  
Специфични  
за CDR3  
региона

PCR



Полимеразно –верижна  
реакция

2000



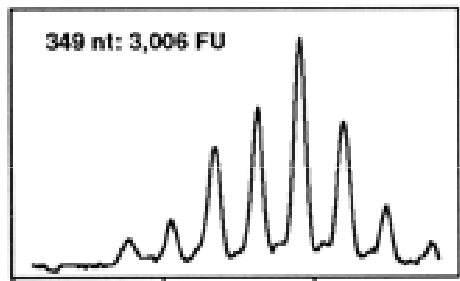
# Диагностични методи за оценка на антиген-специфичния Т клетъчен имунен отговор

## Изследване на Т клетъчни структури

### •IMMUNOSCOPE - ПРИНЦИП

Интензитет на флуоресценция

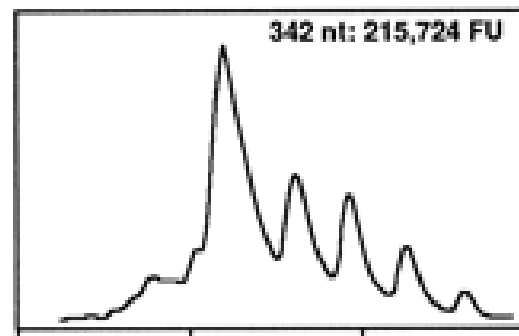
Гаусово разпределение  
При обща популация от Т клетки



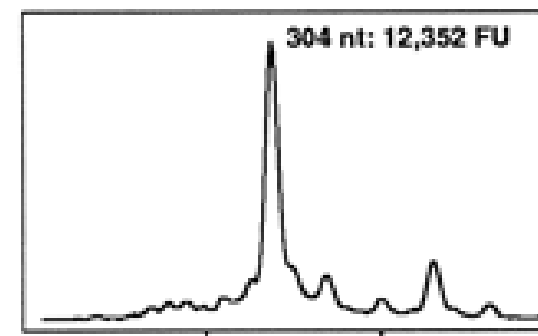
Дължина на фрагментите

Наличие на преекспонирани пикове при  
стимулирана с антиген, популация от Т клетки

Интензитет на флуоресценция



Дължина на фрагментите



# Диагностични методи за оценка на антиген-специфичния Т клетъчен имунен отговор

## Изследване на Т клетъчни структури

### •IMMUNOSCOPE - ХАРАКТЕРИСТИКИ

- Дава информация за състава на Т клетъчния репертоар, селектиран при имунен отговор
- Изисква минимално количество проба за анализ – 10 000 Т клетки
- При комбиниране с МНС тетрамери дава възможност да се оцени разнообразието на епитоп специфичните Т клетки след антигенна стимулация
- Високо чувствителен метод - може да се открие 1 специфична клетка /200 000 клетки

# Диагностични методи за оценка на антиген-специфичния Т клетъчен имунен отговор

## Приложение

### 1. При клинични проучвания

•върху лимфоцитна активация и функция в хода на имунния отговор при наличие на патологии (ICS, ELISPOT, Комплекси МНС – Пептид )

при вирусни и бактериални инфекции – HIV, Tuberculosis

при алергии - Доказват се алерген специфични IL-4 продуциращи Th2-cells (при пациенти с атопия)

при автоимунни болести - Мултипленна склероза, диабет I, ревматоиден артрит, лупус

•при мониториране на имунния отговор при разработване и тестване на ваксини (ICS, ELISPOT, Комплекси МНС – Пептид )

•при изследвания на модулацията на имунния отговор под действие на различни имунорегулиращи агенти (ICS, ELISPOT)

•при изследване на имунитета при тумори - идентифициране и селектиране на специфични клетки с висок авидитет от хетерогенна популация с Т клетки – за приложение в адоптивна терапия (Комплекси МНС – Пептид , Immunoscope)

# Диагностични методи за оценка на антиген-специфичния Т клетъчен имунен отговор

## Приложение

### 2. В клиничната практика за диагностика



#### **T-SPOT.TB**

- тип ELISPOT тест използван за диагностика на туберкулоза;
- позволява да се открива както остра форма на туберкулозата така и клинично неприявената латентна форма;
- определя се честотата на ефекторните Т клетки продуциращи IFN в кръвна проба, при стимулация с антигени от M. Tuberculosis;

Предимствата на тази техника са свързани с

- изисква единично посещение на пациента в диагностичния кабинет;
- бързината на получаване на резултата – за 24 часа от вземане на кръвната проба;
- акуратността на теста;

# Диагностични методи за оценка на антиген-специфичния Т клетъчен имунен отговор

## Приложение

### 2. В клиничната практика за диагностика

#### CMV-Tetramer TEST

- отчита честотата на CMV CD8 специфичните клетки при пациенти с костно мозъчна трансплантации.
- CMV е сред причините да смъртността при имунокомпрометирани индивиди
- CD8 клетките играят ключова роля за супресия на CMV реактивацията, и когато CD8 отговорът е подтиснат се развива инфекция



- Директен анализ на цяла кръв
- Бързина за получаване на резултата до 2ч. след взимане на кръвната проба
- Комбинация от добре характеризирани имунодоминантни CMV пептиди и HLA-types (A1, A2, B7)

**БЛАГОДАРЯ ЗА  
ВНИМАНИЕТО**