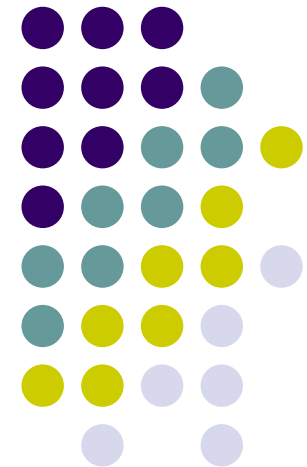
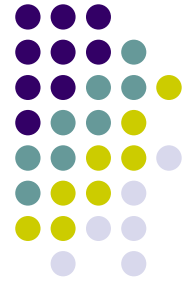


# Vyšetření produkce perforinu po aktivaci HIV antigeny gp120 a gag specifickými CD8+ Tymfocyty

J. Hanzlíková  
UIA FN Plzeň



# Úvod:



- **Cytotoxické T lymfocyt (CTL) hrají velmi důležitou roli při kontrole virové replikace během HIV infekce.**
- **Testovali jsme hypotézu, že HIV-specifické CTLs (HIV-CTLs) jsou více aktivovány po inkubaci s HIV antigeny + Histaminem nebo IL-2 než při inkubaci samotnými HIV peptidy.**

# Metoda:



- Změřili jsme in vitro produkci perforinu HIV-CTLs po stimulaci HIV-peptidy gp 120 a gag.
- Využili jsme diagnostický set Cytodetect kit f. IQ Products
- Měření jsme provedli průtokovým cytometrem FACSCAN s využitím protilátek f. IQ Products a Immunotech a analýzu jsme provedli v softwaru Cellquest.
- Konfirmaci jsme provedli Elispotem analýzou počtu HIV specifických CD8+ T lymfocytů (spotů) opět po stimulaci samotnými HIV peptidy gat a gp120, po stimulaci peptidy a Histaminem a po stimulaci peptidy a IL2.

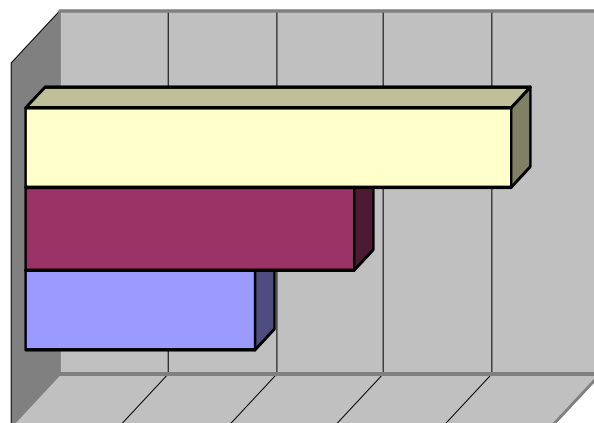
# Sledované skupiny



- **17 HIV-negativních kontrol – zaměstnanců a dárců krve**
- **24 HIV-positivních subjektů z HIV centra západočeského regionu**
- **Obě skupiny byly vyšetřeny po podpisu informovaného souhlasu**



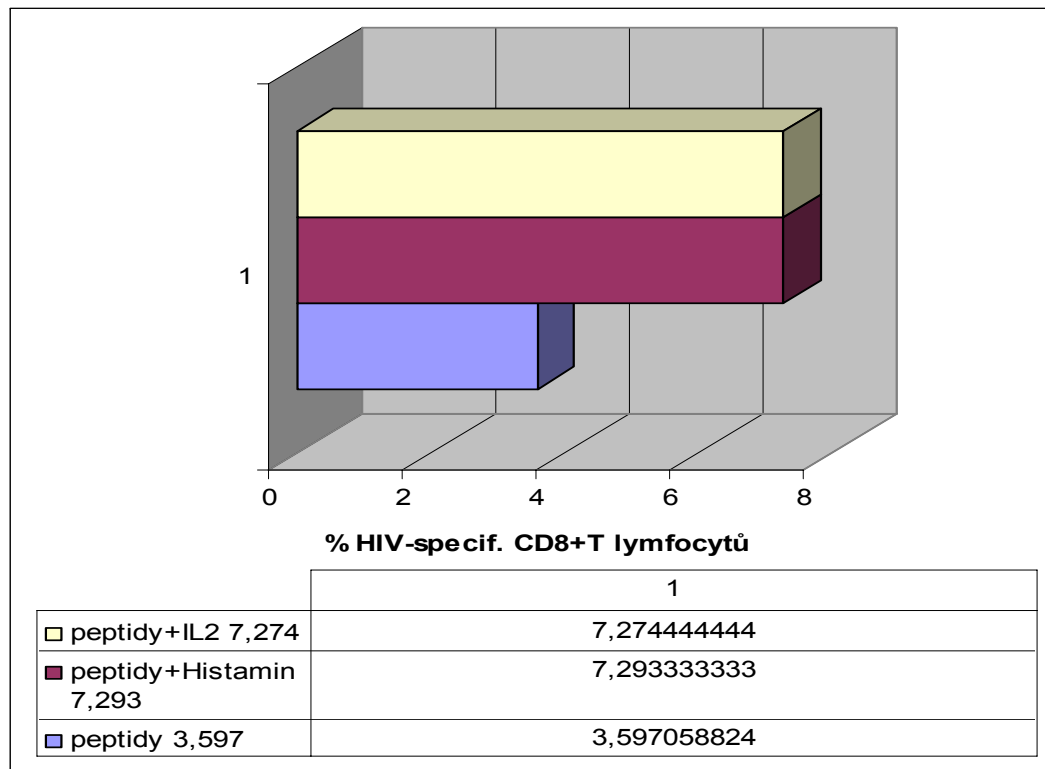
# Produkce perforinu HIV specif. CD8+ T lymfocyty u HIV+ po stimulaci jen peptidy, peptidy + Histaminem a peptidy + IL2:



	1
peptidy+IL2	13,25
peptidy+Histamin	12,52
peptidy	12,06

p=0,2(2)    p=0,3 (2)    p=0,5 (2)  
p/p+h    p/IL    p+h/p+IL

# Produkce perforinu CD8+ T lymfocyty u kontrolního souboru po stimulaci jen peptidy, peptidy + Histaminem a peptidy + IL2:



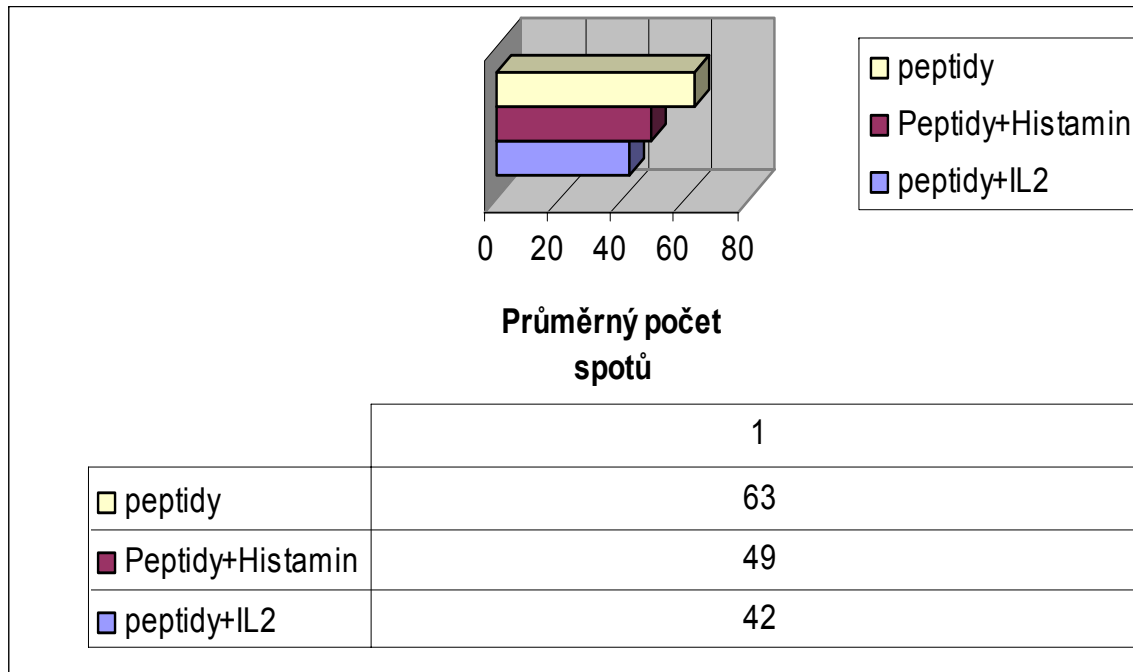
p=0,4(2)

p=0,5 (2)

p/p+h

p/p+IL2

# Produkce IFN-gamma jednotlivými CD8+ T lymfocyty (spoty) u HIV+ po stimulaci jen peptidy, peptidy + Histaminem a peptidy + IL2:



$p=0,09$  (2)       $p=0,008$ (2)       $p=0,05$ (2)  
 $p/p+h$        $p/p+IL$        $p+h/p+IL$

# Tvorba perforinů HIV specif. T lymfocyty u pacientů a kontrol- statistika:



- Peptidy  $p = 0,03$
- p+h  $p = 0,03$
- p+IL  $p = 0,04$

# Produkce perforinu CD8+ Tlymfocyty u HIV- po stimulaci samotnými peptidy s izotypovou kontrolou:



Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	Y Mean
UL	14	0.31	0.06	29.29	113.37
UR	7	0.16	0.03	96.23	66.61
LL	4471	99.49	20.14	18.45	12.54
LR	2	0.04	0.01	89.39	52.63

File: HIV FIC2/1ML P.002 Tube: PERFORIN/HIV

Acquisition Date: 10-Oct-6

Gate: G1

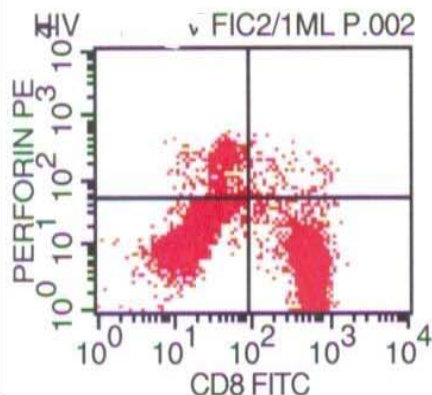
Gated Events: 7611

Total Events: 27520

X Parameter: FL1-H CD8 FITC (Log)

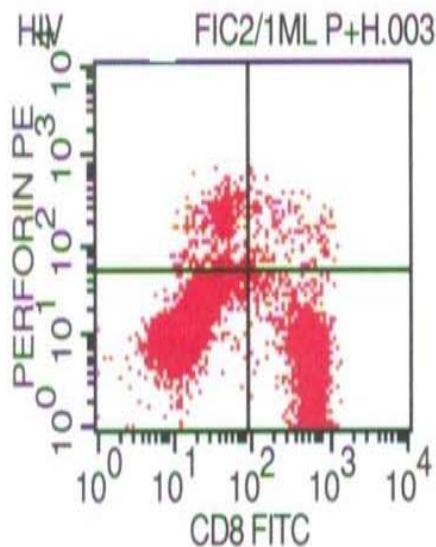
Y Parameter: FL2-H PERFORIN PE (Log)

Quad Location: 84, 56



Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	Y Mean
UL	460	6.04	1.67	41.59	192.69
UR	107	1.41	0.39	338.11	143.51
LL	4683	61.53	17.02	20.51	17.42
LR	2361	31.02	8.58	563.43	7.29

# Produkce perforinu CD8+ Tlymfocyty u HIV- po stimulaci peptidy a Histaminem:



File: HIV FIC2/1ML P+H.003

Tube: PERFORIN/HIV/H

Acquisition Date: 10-Oct-6

Gate: G1

Gated Events: 8207

Total Events: 22760

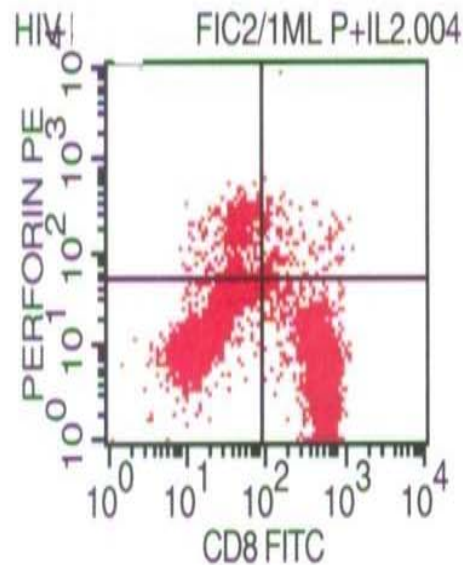
X Parameter: FL1-H CD8 FITC (Log)

Y Parameter: FL2-H PERFORIN PE (Log)

Quad Location: 84, 56

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	Y Mean
UL	463	5.64	2.03	41.16	199.72
UR	160	1.95	0.70	331.98	179.61
LL	5173	63.03	22.73	19.65	17.00
LR	2411	29.38	10.59	577.72	7.22

# Produkce perforinu CD8+ Tlymfocyty u HIV- po stimulaci peptidy a IL2:



File: HIV : FIC2/1ML P+IL2.004

Tube: PERFORIN/HIV/IL2

Acquisition Date: 10-Oct-6

Gate: G1

Gated Events: 7341

Total Events: 22580

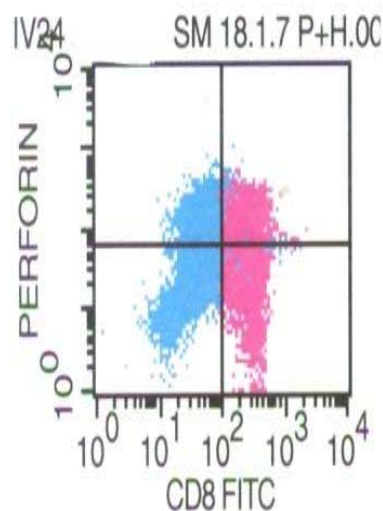
X Parameter: FL1-H CD8 FITC (Log)

Y Parameter: FL2-H PERFORIN PE (Log)

Quad Location: 84, 56

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	Y Mean
UL	451	6.14	2.00	47.26	190.05
UR	183	2.49	0.81	254.02	203.90
LL	4602	62.69	20.38	24.62	20.37
LR	2105	28.67	9.32	496.78	9.16

# Produkcje perforinu CD8+ Tlymfocyty u HIV+ po stimulaci peptidy a Histaminem



File: HIV24 SM 18.1.7 P+H.003

Acquisition Date: 18-Jan-07

Gated Events: 14549

X Parameter: FL1-H CD8 FITC (Log)

Quad Location: 101, 64

Tube: PEPTIDY+HIST=H

Gate: G4

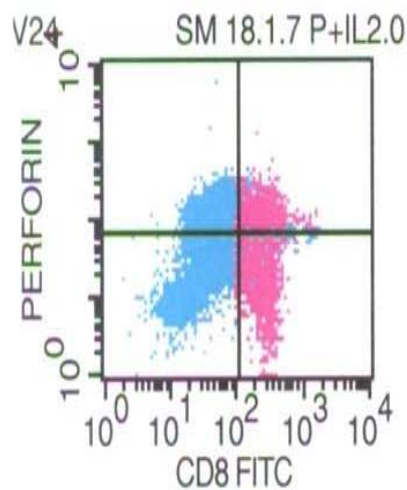
Total Events: 17087

Y Parameter: FL2-H PERFORIN (Log)

HIV

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	Y Mean
UL	1745	11.99	10.21	55.63	158.85
UR	2301	15.82	13.47	232.95	150.99
LL	5378	36.96	31.47	44.83	24.68
LR	5125	35.23	29.99	220.38	30.86

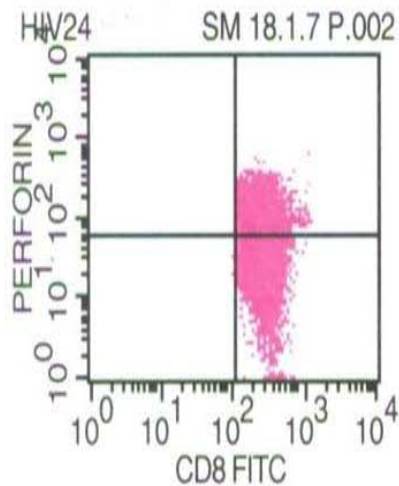
# Produkce perforinu CD8+ Tlymfocyty u HIV+ po stimulaci peptidy a IL2:



File: HIV24 SM 18.1.7 P+IL2.004 Tube: PEPTIDY +IL2  
 Acquisition Date: 18-Jan-07 Gate: G4  
 Gated Events: 15114 Total Events: 17706  
 X Parameter: FL1-H CD8 FITC (Log) Y Parameter: FL2-H PERFORIN (Log)  
 Quad Location: 101, 64

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	Y Mean
UL	1816	12.02	10.26	55.04	133.45
UR	1827	12.09	10.32	229.83	120.76
LL	6287	41.60	35.51	44.24	26.91
LR	5184	34.30	29.28	195.21	31.50

# Produkce perforinu CD8+ Tlymfocyty u HIV+ po stimulaci samotnými peptidy:



File: HIV24 SM 18.1.7 P.002

Tube: PEPTIDY=P

Acquisition Date: 18-Jan-07

Gate: G3

Gated Events: 7469

Total Events: 16144

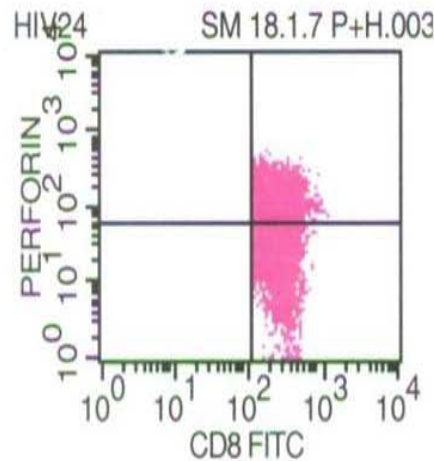
X Parameter: FL1-H CD8 FITC (Log)

Y Parameter: FL2-H PERFORIN (Log)

Quad Location: 101, 64

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	Y Mean
UL	1	0.01	0.01	100.90	138.24
UR	2234	29.91	13.84	257.09	136.17
LL	10	0.13	0.06	100.36	34.67
LR	5224	69.94	32.36	233.22	30.56

# Produkce perforinu CD8+ Tlymfocyty u HIV+ po stimulaci peptidy a Histaminem:



File: HIV24 SM 18.1.7 P+H.003

Tube: PEPTIDY+HIST=H

Acquisition Date: 18-Jan-07

Gate: G3

Gated Events: 7322

Total Events: 17087

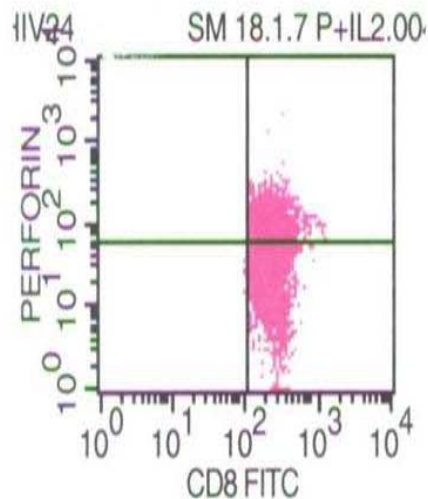
X Parameter: FL1-H CD8 FITC (Log)

Y Parameter: FL2-H PERFORIN (Log)

Quad Location: 101, 64

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	Y Mean
UL	0	0.00	0.00	***	***
UR	2303	31.45	13.48	242.97	142.56
LL	7	0.10	0.04	100.77	32.42
LR	5012	68.45	29.33	221.55	29.87

# Produkce perforinu CD8+ Tlymfocyty u HIV+ po stimulaci peptidy a IL2



File: HIV24 SM 18.1.7 P+IL2.004

Tube: PEPTIDY +IL2

Acquisition Date: 18-Jan-07

Gate: G3

Gated Events: 6989

Total Events: 17706

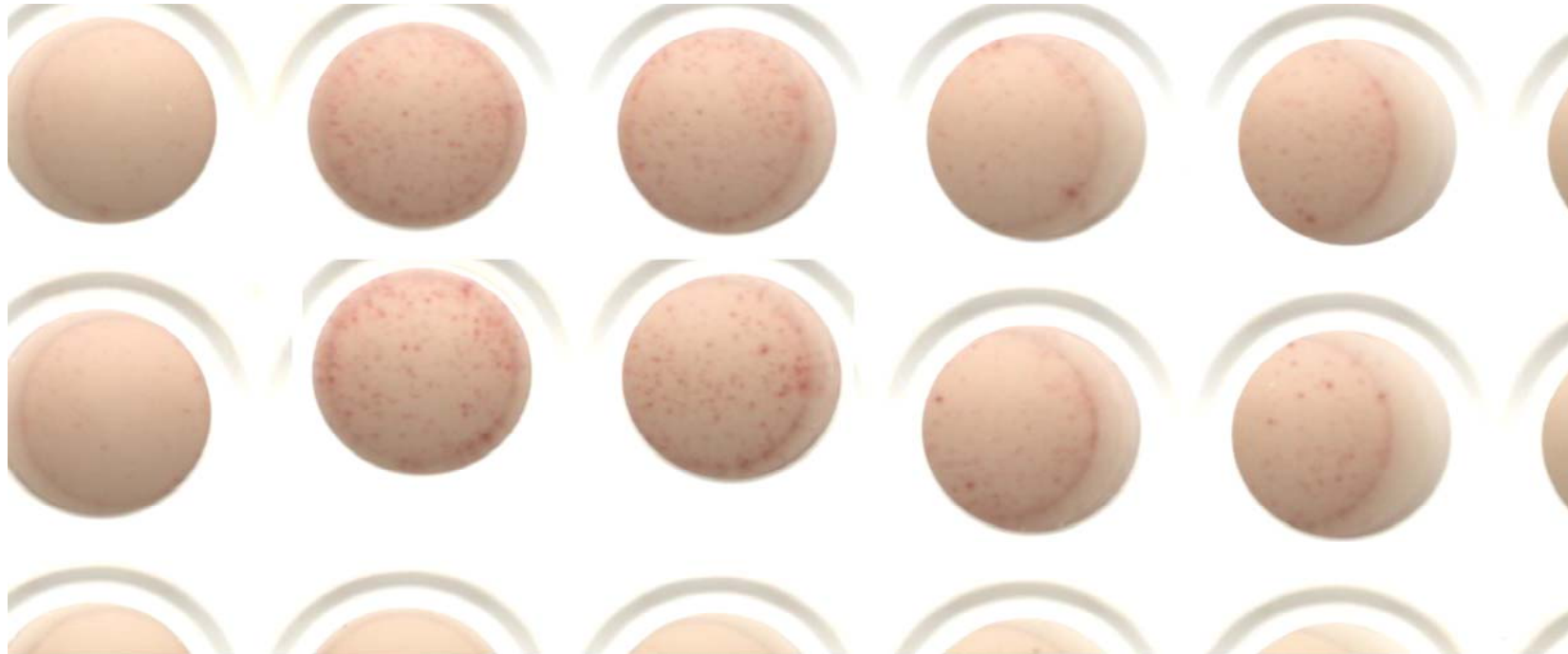
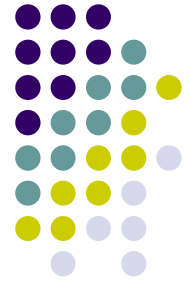
X Parameter: FL1-H CD8 FITC (Log)

Y Parameter: FL2-H PERFORIN (Log)

Quad Location: 101, 64

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	Y Mean
UL	0	0.00	0.00	***	***
UR	1800	25.75	10.17	221.67	119.40
LL	25	0.36	0.14	100.29	26.33
LR	5164	73.89	29.17	194.42	30.68

**Konfirmace změny funkce HIV  
specifických CD8+ T lymfocytů  
(po aktivaci HIV peptidy,  
Histaminem a IL2) ELISPOTEM,  
vyjádřená produkcí IFN-gamma:**



# Výsledky I:



- **Porovnání HIV+ a HIV- subjektů:**
- **Produkce perforinu u HIV+ subjektů v porovnání s HIV- po stimulaci HIV peptidy samotnými byla vyšší (12,06%, 3,60 % HIV specif. CTLs),  $p=0,03$ )**
- **Podobný výsledek jsme zaznamenali zaznamenali po stimulaci HIV peptidy a Histaminem (12,52 %, respect. 7,29 % HIV specif. CTLs),  $p=0,03$**
- **A po stimulaci HIV peptidy a IL2 (13,30 %, respect. 7,27 % HIV specif. CTLs),  $p=0,04$ .**



## Výsledky II:

- **Rozdíl v produkci perforinu u HIV+ subjektů**
- **Produkce perforinu u HIV+ subjektů po stimulaci HIV peptidy a Histaminem nebo IL2 byla vyšší než po stimulaci samotnými HIV peptidy, rozdíl ale nebyl statisticky významný.**
- **Při konfirmaci změny funkce HIV specif. CTLs ELISPOTEM jsme po stimulaci peptidy a Histaminem nebo IL2 oproti peptidy samotnými zjistili podobný nárůst aktivity, ale zvýšení produkce IFN gamma bylo v tomto případě statisticky významné**
- **Produkce IFN-gamma u HIV- subjektů byla téměř nulová po stimulaci všemi kombinacemi.**



## Závěr:

**Produkce perforinu a IFN-gamma HIV-specifickými CTLs po stimulaci HIV-peptidy samotnými ve srovnání se stimulací HIV peptidy a Histaminem nebo IL-2 je vyšší u HIV pozitivních subjektů. Rozdíl je větší v produkci IFN-gamma, kde je statisticky významný.**

**Rozdíl v produkci perforinu i IFN-gamma mezi HIV+ a HIV- je po stimulaci kombinace HIV peptidů a Histaminu nebo IL2 statisticky významně vyšší.**

- Práce je podpořena grantem MZ č.