

Imunotoxikologie - metody 1

Imunomodulace a její důsledky

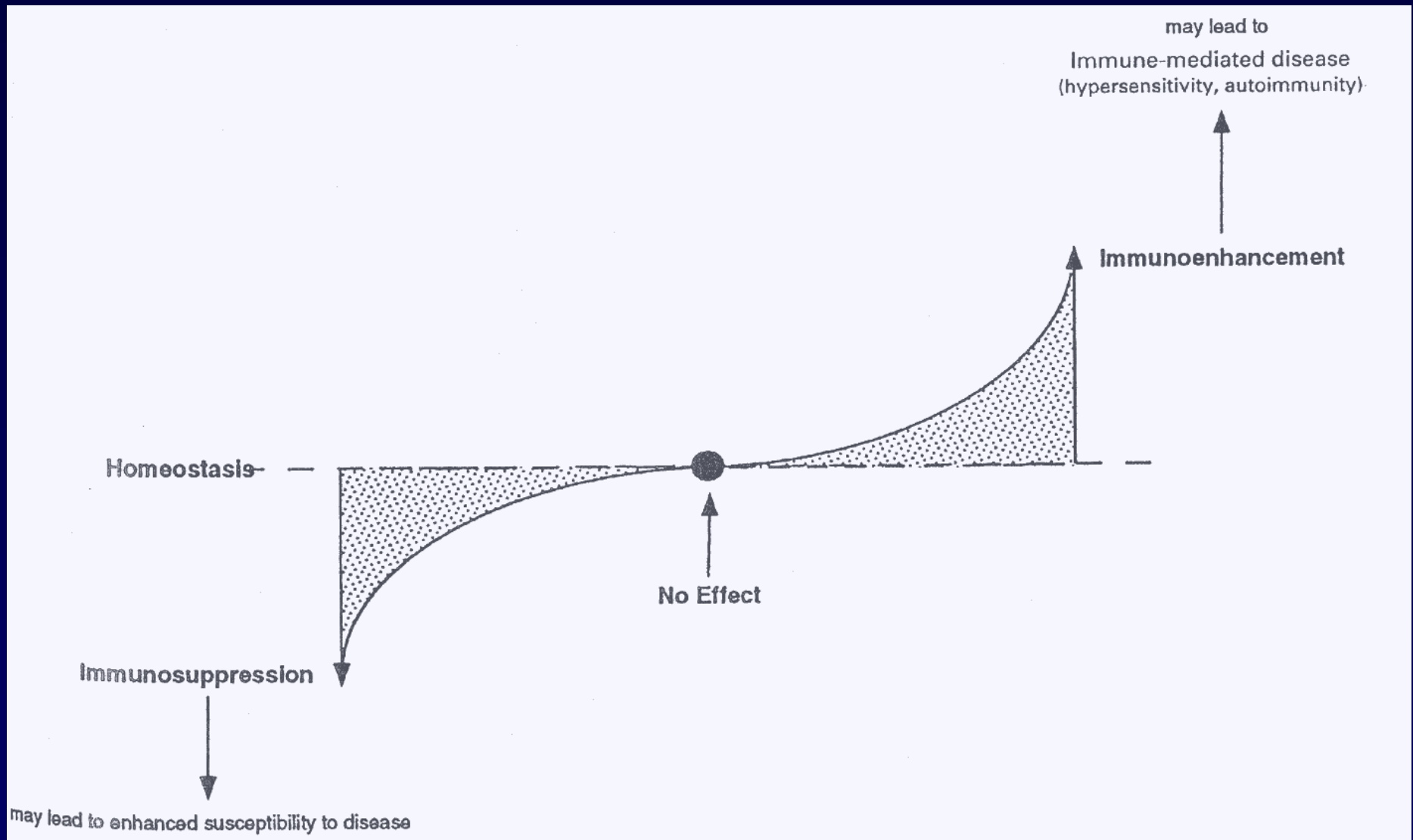


Figure 12-1. Potential consequences of immunomodulation.

Příčiny imunomodulací (*pozitivní i negativní*)



1) Genetická fixace

2) Vliv prostředí - získané během života

Důsledky imunomodulací (imunotoxicity)

- porušení proti-infekční a proti-nádorové ochrany
- neschopnost reagovat na vakcíny
- imunopatologie (autoimunita, hypersensitivity)

Působení:

- přímo na buňky I.S.
- na jiné buňky, které modulují I.S. (neuroendokrinní řízení)

ImunoDEFICIENCE

PRIMÁRNÍ - **genetická fixace**

- často vázané na X-chromozom (více ohroženi M)
- deficiency B-buněk a produkce Ab
 - neschopnost vyrovnávat se s bakteriemi
- deficiency T-buněk
 - funkční poruchy T-buněk
- SCID (Severe Combined ImmunoDeficiency)
 - řada variant: T-B-, T-B+, NK ...
 - krátká doba přežití

ImunoDEFICIENCE

SEKUNDÁRNÍ - **získané**

- řada faktorů
 - metabolismus a výživa
 - záření
 - věk
 - poranění (např. popáleniny)
 - chronické infekce
 - chemické látky
 - stres - *spojení s hormonálním řízením*

AIDS: retroviry (integrace do genomu) - HIV-1, HIV-2
infikuje CD4+ T-b a některé APC
důsledky: selhání IS

- smrt v důsledku oportunních infekcí
- neobvyklé nádory

IMUNOTOXIKOLOGIE

Část toxikologie

„Každá látka je toxická - o toxicitě rozhoduje jen dávka“

Každá látka v těle

- prodělává řadu dějů, které ovlivňují výslednou „dávku“

Toxikokinetika

- závisí na povaze látek (velké x malé, hydro- filní x fobní ...)
- příjem, distribuce, metabolismus, vylučování

Toxikodynamika

- mechanismy interakce látek s „receptory“
- jedna látka: více mechanismů ? *Který je hlavní ?*
 - rozhoduje koncentrace v místě reakce a toxikokinetika
- př.
 - reakce látky s HMC a jeho modifikace
 - aktivace receptoru AhR v brzlíku

Jak lze prokázat „Imunotoxické působení“ ?

1) Epidemiologické studie

- (+) vysoká informační hodnota - studie s populacemi lidí
- (-) - nákladné, velká přirozená variabilita
- řada kovariant (slunce, léky, stres ...)

imunotoxicita prokázána pouze pro několik málo typů látek

- dioxiny (PCDD/Fs) a polychlorované bifenyly (PCBs)
- azbest
- olovo
- některé pesticidy

Jak lze prokázat „Imunotoxické působení“ ?

2) Laboratorní studie

- (+) lepší definice, nízká variabilita experimentů
lze hodnotit velké množství parametrů I.S.
prostudována řada chemických látek

- (-) jen laboratorní zvířata
„nejednotné“ efekty v různých vědeckých studiích
(různé dávky, různé doby expozice ...)

Jak lze prokázat „Imunotoxické působení“ ?

Co je cílem imunotoxikologa ?

? poznání

- : vědecká práce imunotoxikologů
- : studie řady látek, různé experimentální přístupy
- : často základní informace o možném účinku

? posoudit skutečná RIZIKA pro lidi, zvířata

Co je riziko? (nebezpečnost \neq riziko)

- : látka zabíjí T-buňky = nebezpečnost
- : látka je přítomna v toxické koncentraci = riziko

Existující riziko - praktické dopady (zákaz výroby ...)

=> **potřeba standardizovaných protokolů**

Standardizace hodnocení rizik v imunotoxikologii

Národní (mezinárodní) postupy a standardy

- NEEEXISTUJE nadnárodní doporučení/zákon (WHO, EU ...)
- NEEEXISTUJE nadnárodní standard (ISO)
- Významné národní postupy
 - Holandsko - RIVM (potkan)
 - USA - NIEHS/NTP (myš kmen B6C3F nebo BALB/C)

TABLE 1. Immunotoxicology approaches in rodents

Model	Species
Tier system developed at RIVM: (extension of OECD guideline #407 for testing repeated dose oral toxicity)	Rat
Tier system adopted by NIEHS-NTP	Mouse
Tier system of the U.S. Environmental Protection Agency (evaluation of biochemical pest control agents)	Rat or mouse
Tier system of the U.S. Food and Drug Agency (evaluation of food additives)	Rat
Multiple testing in a single animal	Rat

Postupy při testování imunotoxicity

„Tiered“ approach

Tier 1

- aplikace xenobiotika
- sledování vlivu na obecné a základní vlastnosti IS

Tier 2

- aplikace xenobiotika
- sledování funkční odpovědi na specifické antigeny (*aplikace antigenů*)

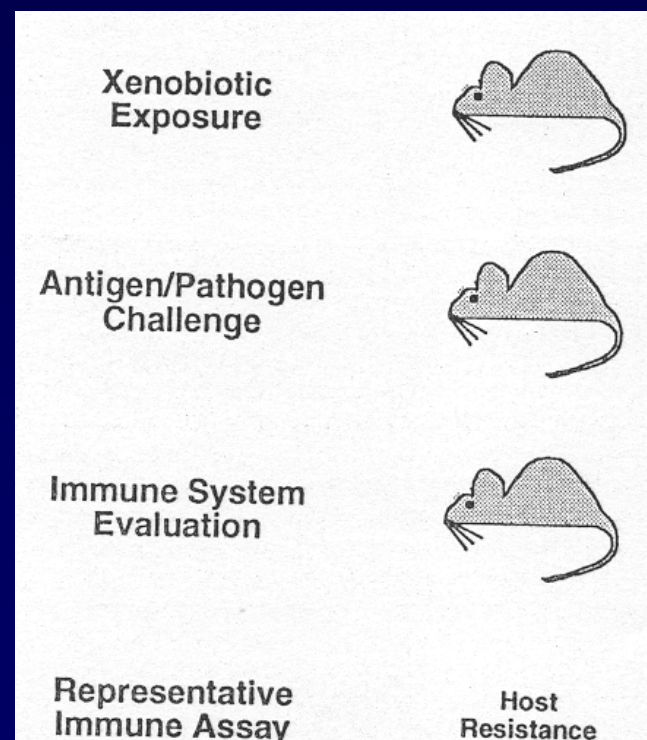


TABLE 2. *Panel of the RIVM for detecting immunotoxic alterations in the rat*

Parameters	Procedures
Tier 1	
Nonfunctional	Routine hematology, including differential cell counting Serum IgM, IgG, IgA, and IgE determination Lymphoid organ weights (spleen, thymus, local and distant lymph nodes) Histopathology of thymus, spleen, lymph nodes and mucosa-associated lymphoid tissue Bone marrow cellularity Analysis of lymphocyte subpopulations in spleen by flow cytometry
Tier 2	
Cell-mediated immunity	Sensitization to T-cell-dependent antigens (e.g., ovalbumin, tuberculin, and <i>Listeria</i>) and skin test challenge Lymphoproliferative responses to specific antigens (<i>Listeria</i>) and mitogen responses (Con-A, PHA)
Humoral immunity	Serum titration of IgM, IgG, IgA, IgE responses to T-cell-dependent antigens (ovalbumin, tetanus toxoid, <i>Trichinella spiralis</i> , SRBCs) with ELISA Serum titration of T-cell-independent IgM response to LPS with ELISA
Macrophage function	Mitogen response to LPS <i>In vitro</i> phagocytosis and killing of <i>Listeria monocytogenes</i> by adherent spleen and peritoneal cells Cytolysis of YAC-1 lymphoma cells by adherent spleen and peritoneal cells
NK cell function	Cytolysis of YAC-1 lymphoma cells by nonadherent spleen and peritoneal cells
Host resistance	<i>Trichinella spiralis</i> challenge (muscle larvae counts and worm expulsion) <i>Listeria monocytogenes</i> challenge (spleen and lung clearance) Rat cytomegalovirus challenge (clearance from salivary gland) Endotoxin hypersensitivity Autoimmune models (adjuvant arthritis, experimental allergic encephalomyelitis)

TABLE 3. Panel of the NIEHS-NTP for detecting immune alterations following chemical or drug exposure in rodents*

Parameter	Procedures
Screen (tier I) Immunopathology	Hematology—complete blood count and differential Weights—body, spleen, thymus, kidney, liver Cellularity—spleen, bone marrow Histology—spleen, thymus, lymph nodes IgM antibody PFCs to T-cell-dependent antigen (SRBCs) LPS mitogen response Lymphocyte blastogenesis (Con A) and MLR against allogeneic leukocytes NK cell activity
Humoral immunity	
Cell-mediated immunity	
Nonspecific immunity	
Comprehensive (tier II) FACS analysis Humoral immunity Cell-mediated immunity Host resistance challenge models (and points) ^b	Quantitation of splenic B and T cell numbers IgG antibody response to SRBCs (PFCs) CTL cytotoxicity or DTH response Syngeneic tumor cells—PYB6 sarcoma (tumor incidence), B16F ₁ melanoma (lung burden) Bacterial models— <i>Listeria monocytogenes</i> (mortality), <i>Streptococcus</i> species (mortality) Viral models—influenza (mortality) Parasite models— <i>Plasmodium yoelli</i> (parasitemia)

*The testing panel was developed using B6C₃F₁ female mice.

^bFor any particular chemical tested only two or three host resistance models are selected for examination.

PRAKTICKÝ EXPERIMENTÁLNÍ DESIGN



1) Nejdříve - zjištění obecné akutní a chronické toxicity
(*existují standardy ISO, OECD ...*)

Akutní toxicita (24-48 hodin, i.p. aplikace)

Kontrolní skupina	10 zvířat	přežívá: 10
Expozice - koncentrace 1	5 zvířat	přežívá: 5
- koncentrace 4	5 zvířat	přežívá: 4
- koncentrace 20	5 zvířat	přežívá: 2
- koncentrace 100	5 zvířat	přežívá: 1
- koncentrace 500	5 zvířat	přežívá: 0

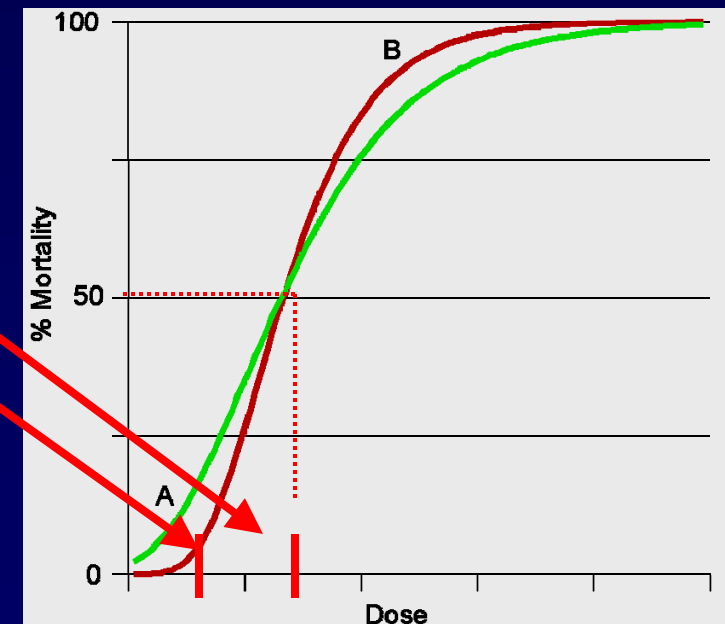
Vyhodnocení

LD50
LOEC

Chronická toxicita

zpr. 21 dní, dávky dle akutní toxicity

- 1/2 akutní LD50
- LOEC
- 1/10 LOEC



PRAKTICKÝ EXPERIMENTÁLNÍ DESIGN

2) Hodnocení imunotoxicity

viz dále

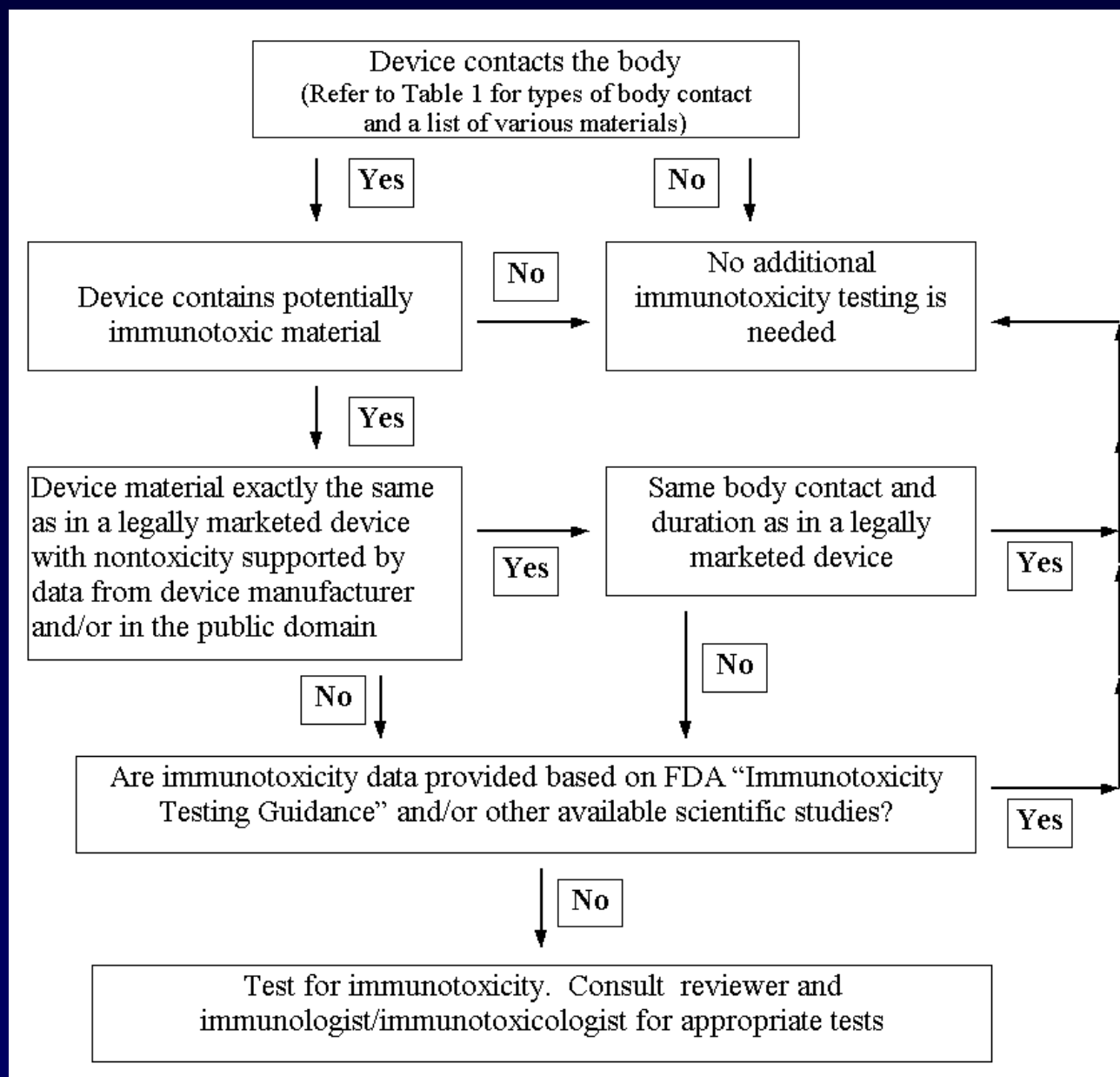
Praktické aspekty:

in vivo experimenty - potřeba velkého množství zvířat
: realizace jen v oprávněných případech

existují rozhodovací schémata - kdy a jak testovat?

? Lze in vivo nahradit **in vitro** ?

- v některých případech ANO - viz dále

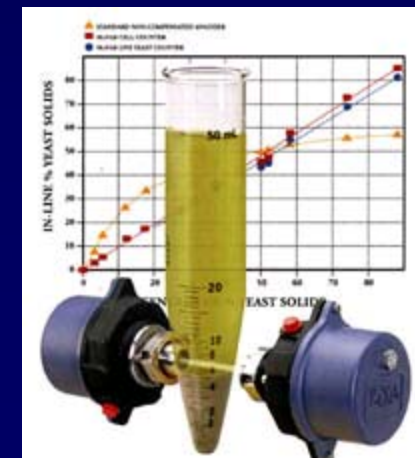
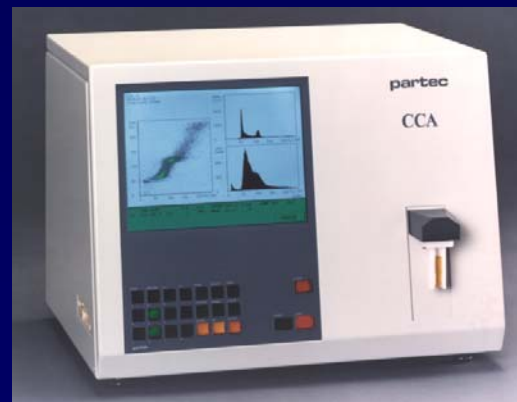
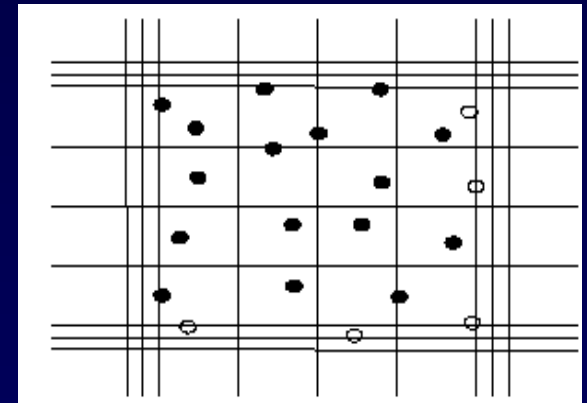
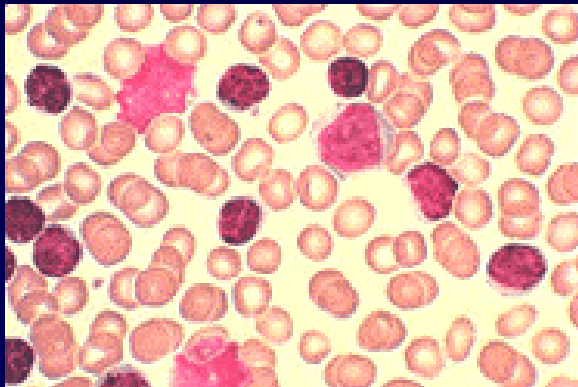


Hodnocení imunotoxicity podle RIVM

Tier 1 - obecná imunita

Tier 1 - RIVM - Hematologie a buněčnost

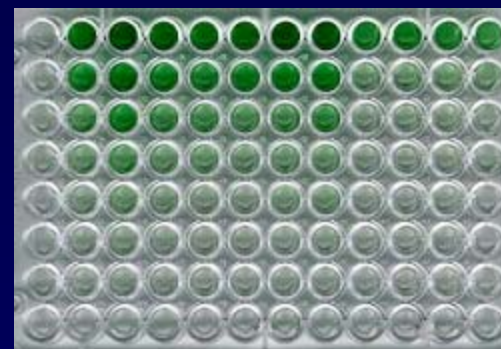
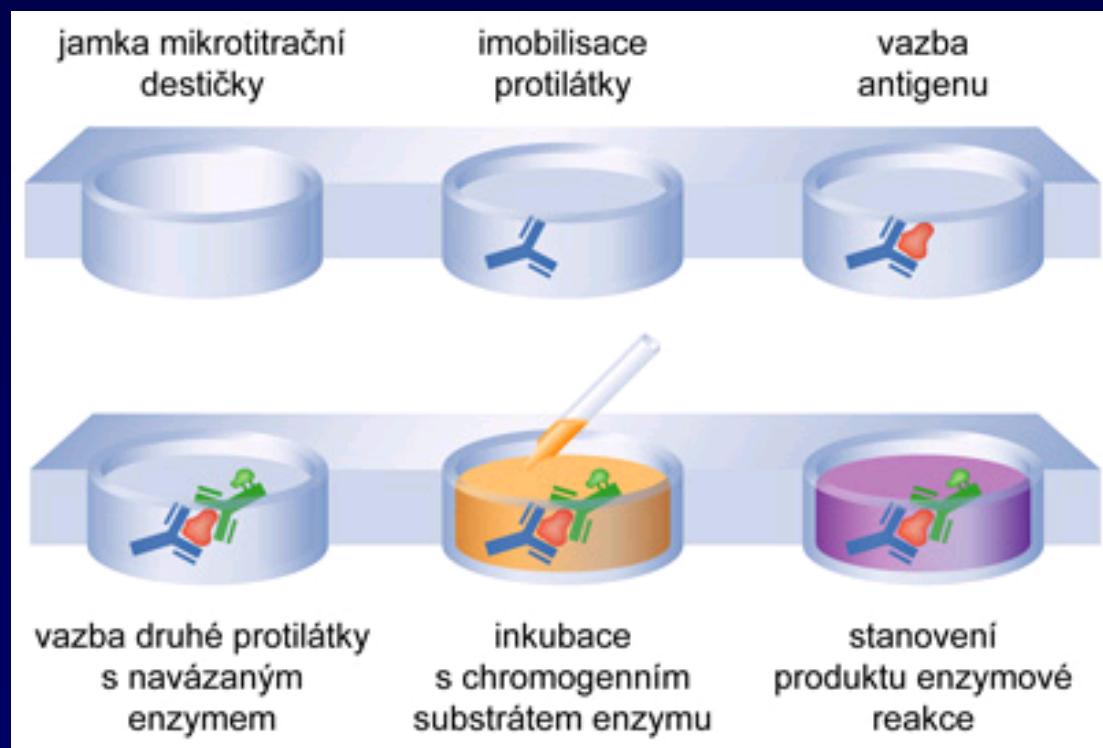
- Počty krevních buněk/mL
- Počty leukocytů, lymfocytů
 - : stanovení
 - mikroskopie: počítací komůrka
 - jednoduché počítač - „cell counter“



Tier 1 - RIVM - Množství Ab & třídy Ig

- ELISA proti Fc fragmentům IgG, IgM, IgE
- Stanovení „titru“ (čím vyšší ředění - tím více protilátek)

Vždy srovnání Kontrola vs. Exponované

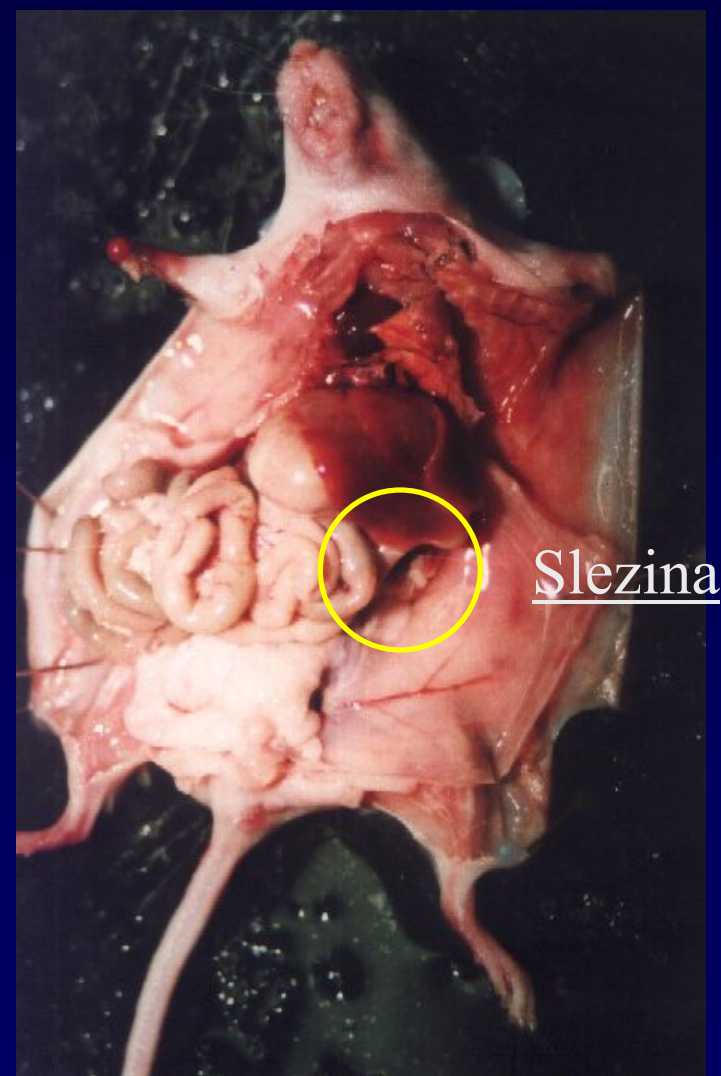
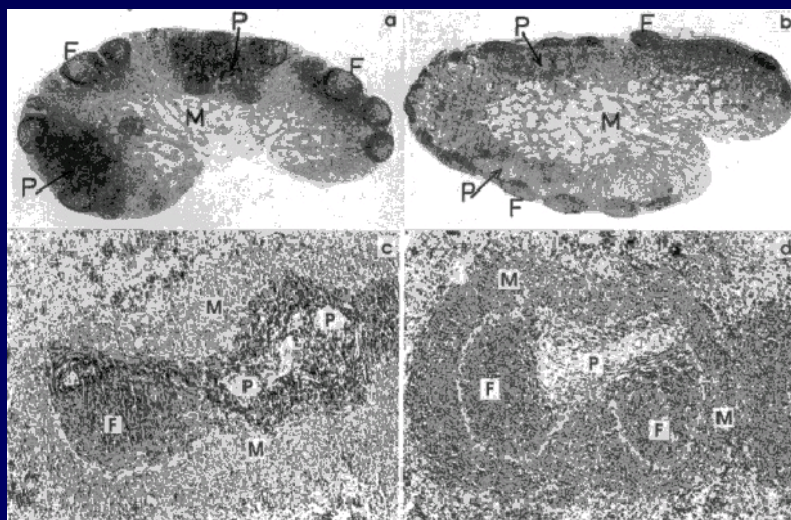


Tier 1 - RIVM - HISTOLOGIE

- Hmotnost (a poměr k hmotnosti těla) orgánů IS a dalších
 - zejména: **slezina**, thymus, uzliny
- Histopatologie
 - fixace orgánu v parafinu
 - tenké řezy cca 5 μm (mikrotom)
 - barvení & mikroskopie

Profesně náročné hodnocení

- expertíza



Tier 1 - RIVM - Stanovení buněčnosti

- Buněčnost v kostní dřeni

- preparace femuru
- odstříhnutí hlavic
- výplach kostní dřeni

- Buněčnost ve slezině

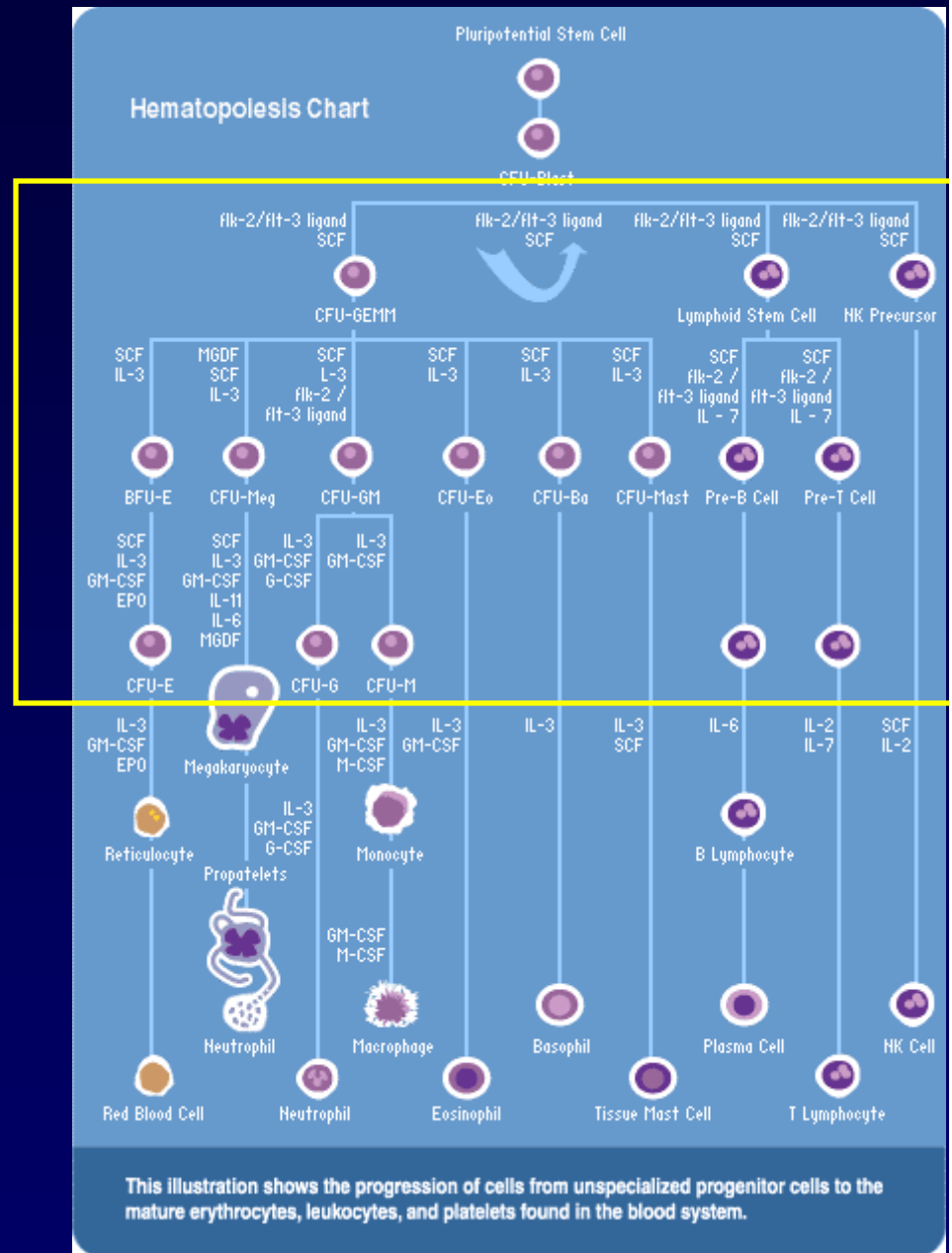
- slezina / homogenizace

Myš: 10^8 buněk

- 4-8% adhezuje MF
- 60% B-b
- 40% T-b.

- stanovení počtů bb.
(cell counter)

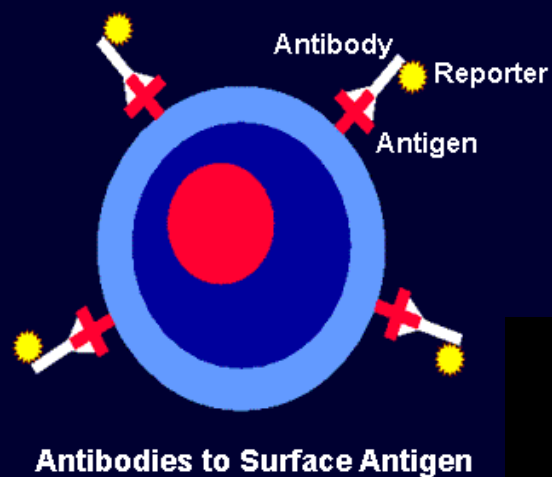
- stanovení typů bb.
(flow cytometer)



Průtoková cytometrie

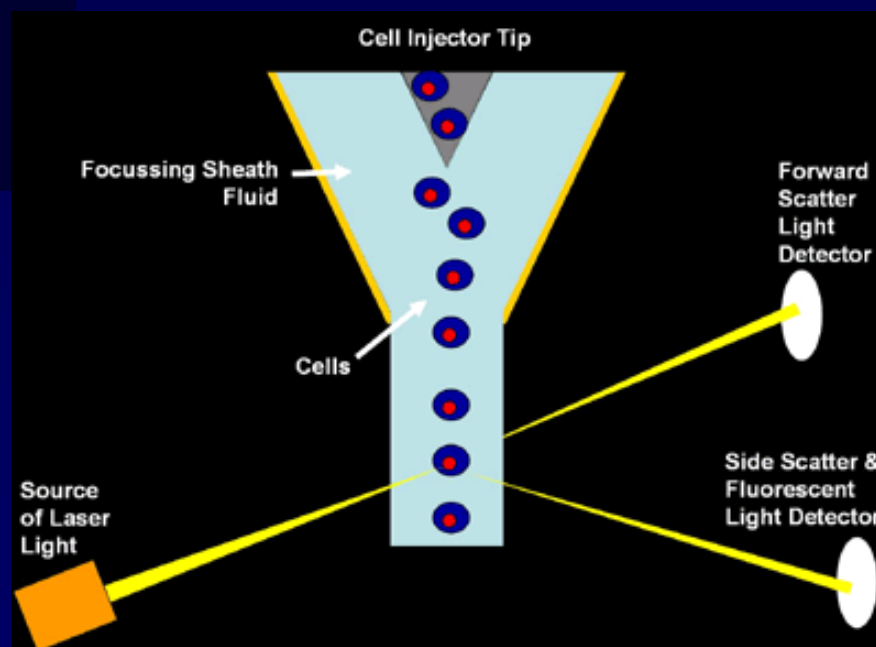
- subpopulace lymfocytů

Fluorescenčně značené protilátky proti povrchovým antigenům
(CD3, CD4 ...)



Zástin
„buňka a její velikost“

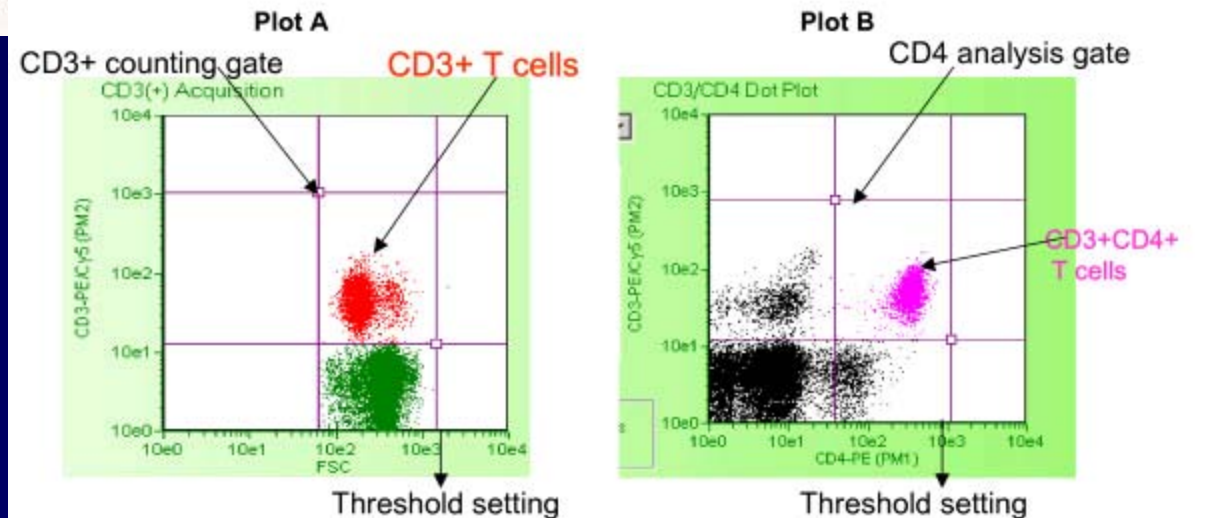
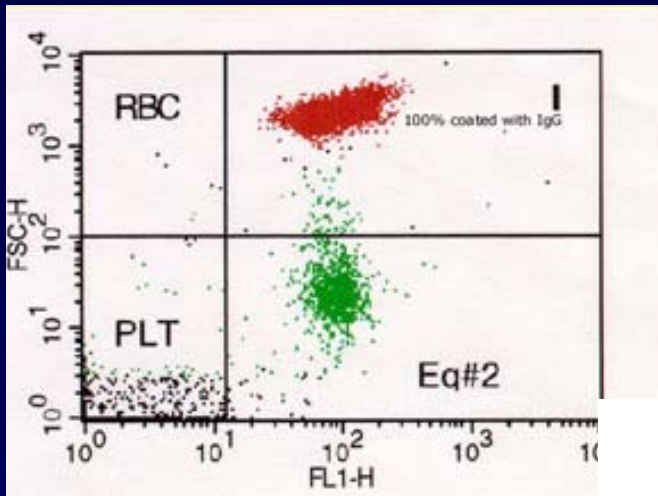
Fluorescence
Typ buňky



Průtoková cytometrie

- subpopulace

Fluorescenčně značené protilátky proti povrchovým antigenům
(CD3+/CD4+, CD3+/CD8+)



Hodnocení imunotoxicity podle RIVM

Tier 2 - specifická imunita

B-buňky

T-buňky

Tier 2 - RIVM - Protilátková odpověď

ELISA proti IgM na T-nezávislý Ag (LPS)

Antigenně specifické ELISA

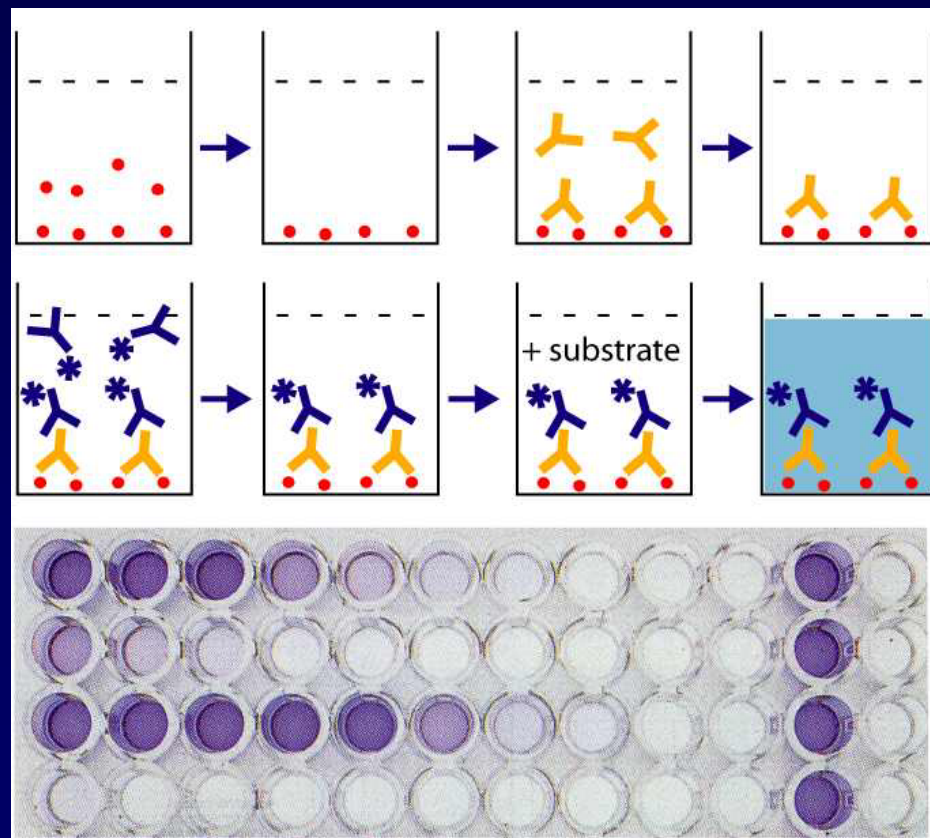
- ELISA proti T-závislým Ag
 - : tetanový toxin (anaT)
 - : beranní erythrocyty (SRBC)

Viz dále:

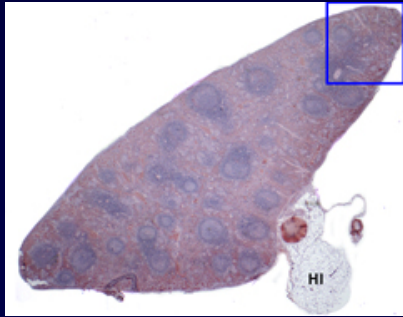
Proliferační odpověď

bb. ze sleziny na LPS

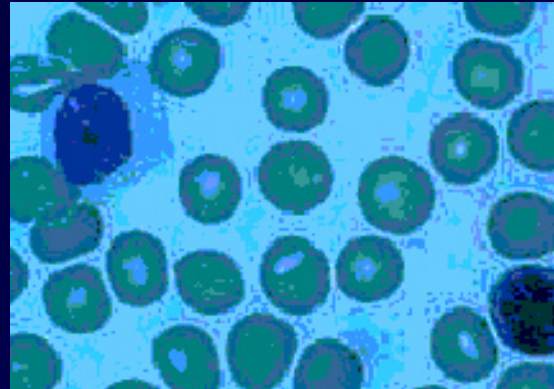
Počty buněk produkujících Ab
proti SRBC: Plaková metoda



Proliferační odpověď B-bb. ze sleziny proti LPS



Homogenizace
a izolace buněk
-lyza erytrocytů



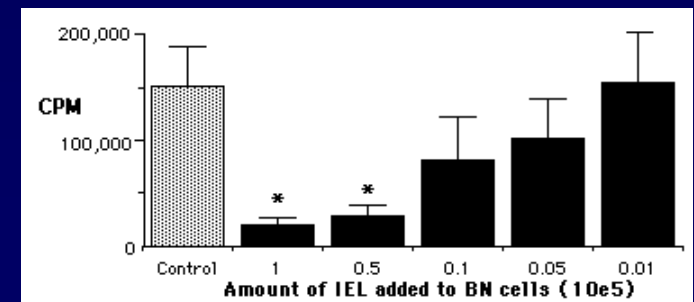
aplikace LPS
-> stimulace B-lymfocytů
kultivace in vitro (48 h)



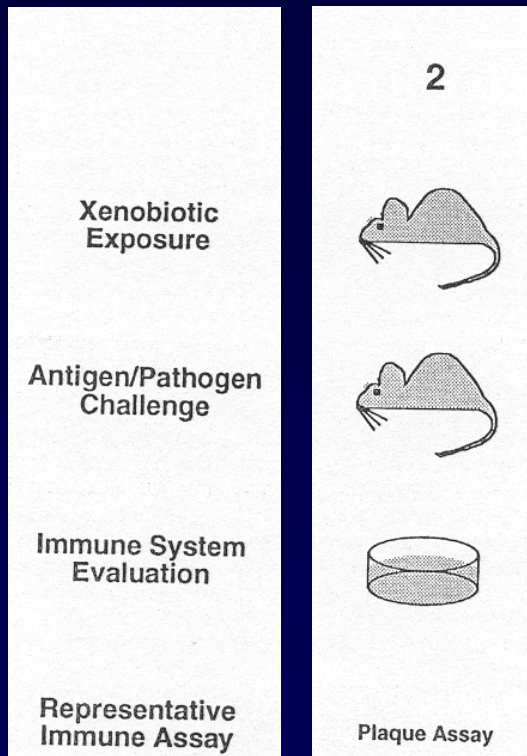
Přidání ^3H -Thy
Inkorporace do DNA
dělicích se buněk
(24 h)



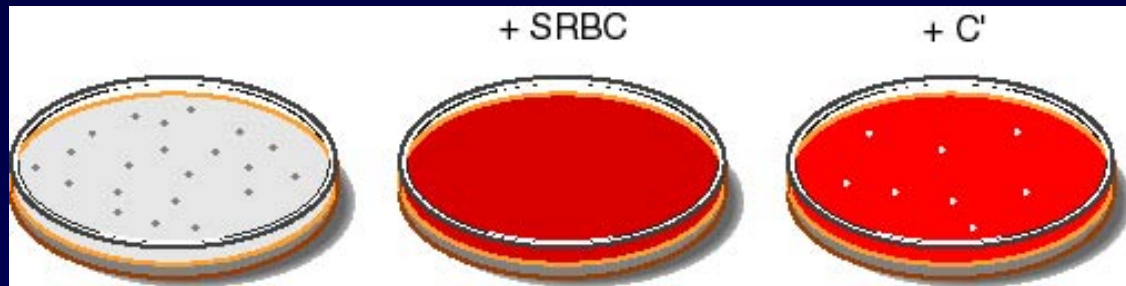
Oplach radioaktivního media
Stanovení radioaktivity (CPM) v buňkách



Plaková metoda - stanovení počtů B-bb.



- xenobiotikum
- antigen (=SRBC)
- izolace buněk ze sleziny -> agar



- opakované přidání antigenu (SRBC) a přidání komplementu (morče) do agaru



- kolem buněk produkujících Ab proti SRBC -> lyza SRBC: plaky (PFC = plaque forming cells)

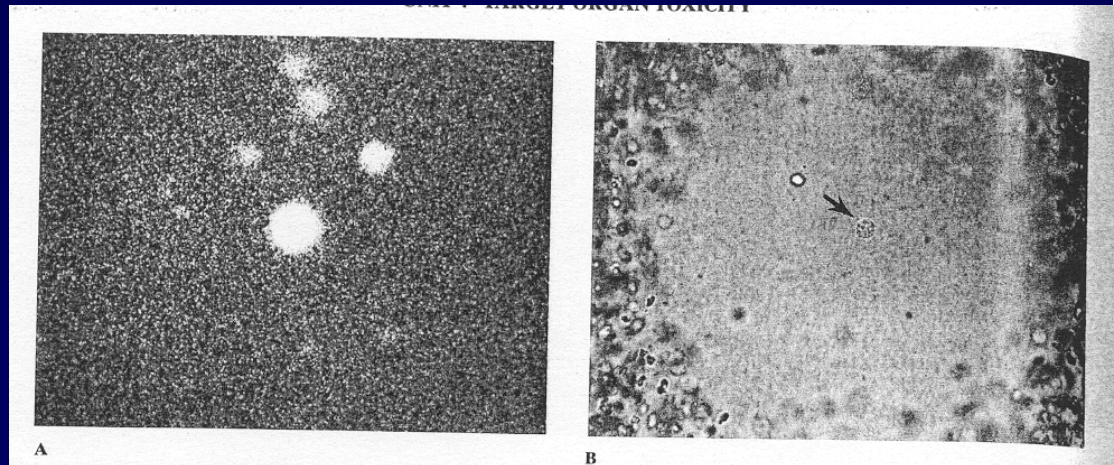


Figure 12-11. The plaque-forming cell (PFC) assay.

A. Demonstration of plaques (areas of hemolysis) which have formed within the lawn of sheep red blood cells $\times 10$ magnification. B. $\times 100$ magnification of a plaque from panel A showing the B cell evident in the center of the plaque. [From photos by Dr. Tracey L. Spriggs (with permission)].

Plaková metoda - varianty

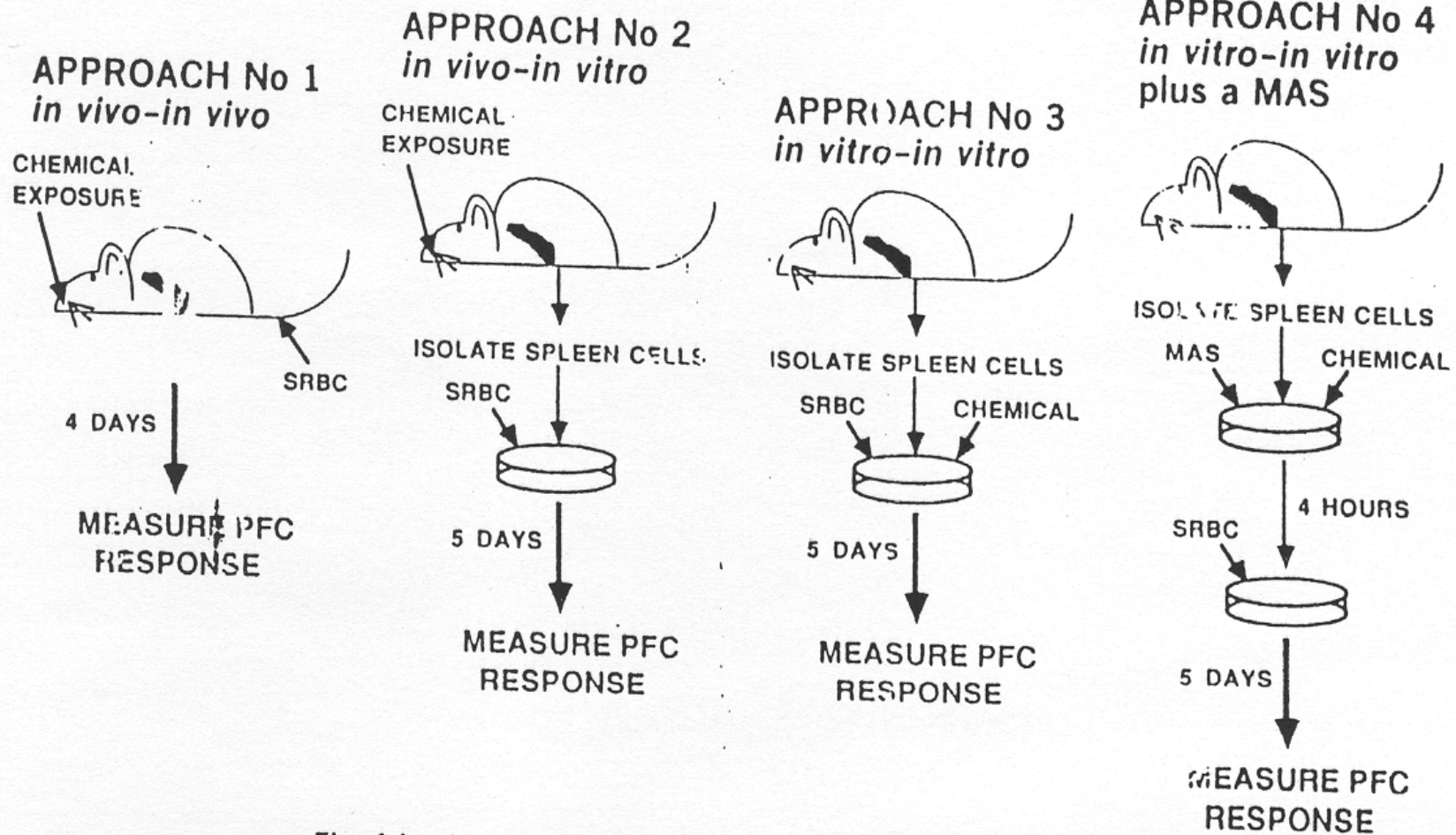
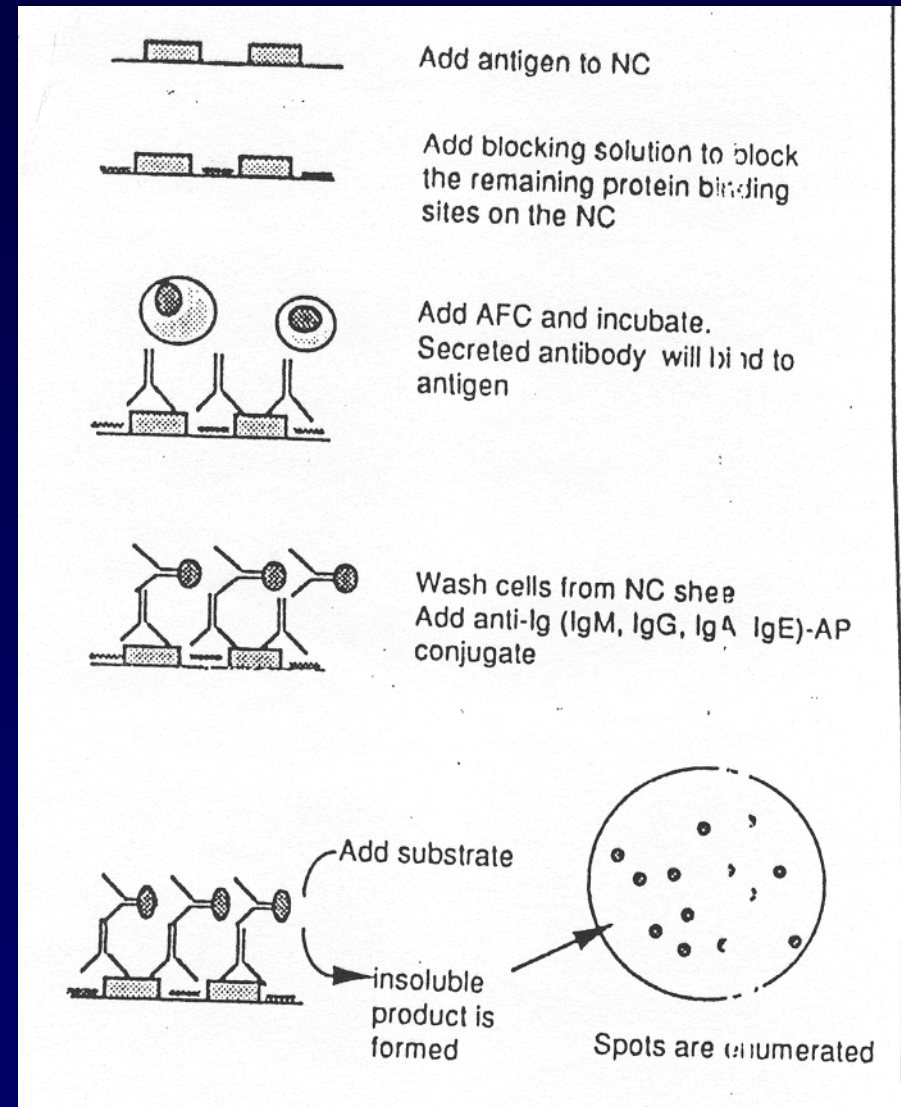


Fig. 6.1. Mechanistic approaches to study drug-chemical-induced modulation of the PFC response to SRBC.

ELISPOT - Stanovení počtů buněk produkujících Ab

- destička krytá antigenem (anaT)
- přidání buněk (*v různých ředěních*)
- produkce Ab proti anaT v jamce
- sekundární Ab-HRP
- HRP - NEROZPUSTNÝ produkt
- počítání „spotů“

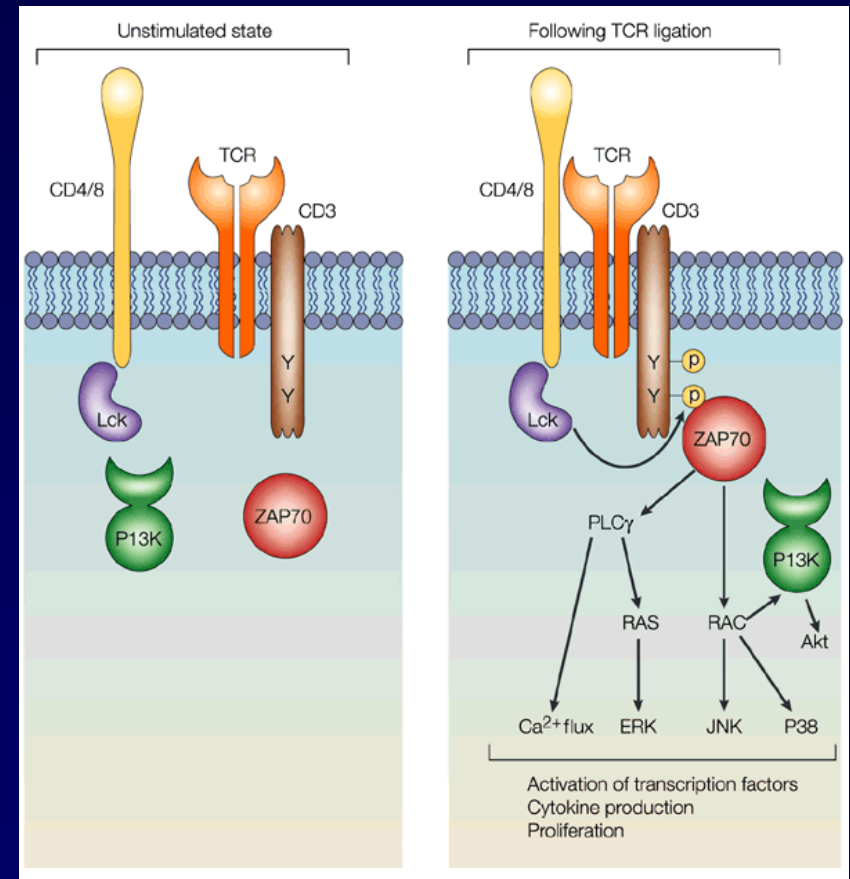


Tier 2 - RIVM - Buněčná odpověď' (T-bb.)

Proliferační odpověď' T-bb. ze sleziny

- nespecifické
 - mitogeny (lectiny/sacharidy - ConA, PHA)
 - jiné lymfocyty (smíšená lymfocytová reakce - MLR)
- specifické antigeny (SRBC, anaT)

Design stejný jako u B-bb.



Tier 2 - RIVM - Buněčná odpověď (T-bb.)

Test na T-závislé Ag (ovalbumin, tuberculin, Listeria)
 „DTH“ test (delayed type hypersensitivity)

MEST - Mouse Ear Swelling Test

- Vyholení břicha, opakovaná aplikace Ag v pásce (3-5 den)
- po 10 dnech: Ag do jednoho ucha (solvent do druhého)

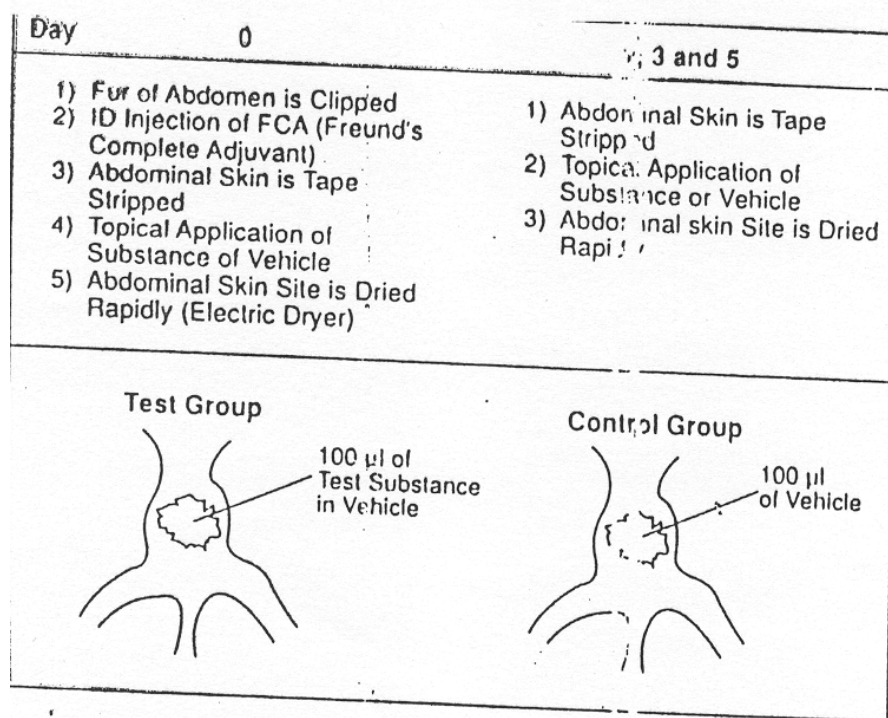


Fig. 24.3. Details of MEST induction stage procedure.

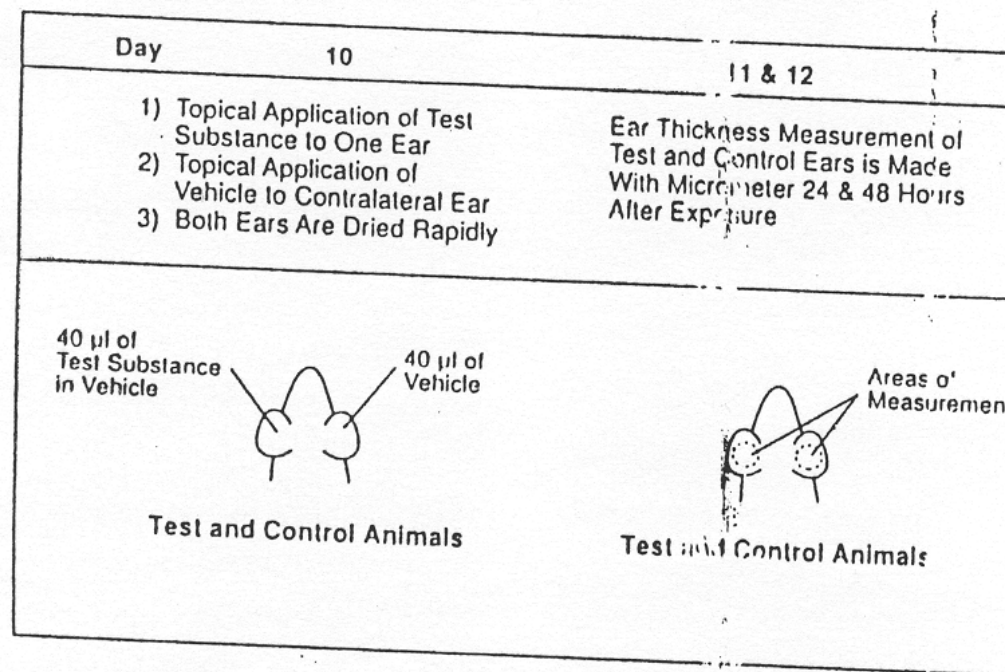


Fig. 24.1. Details of MEST challenge stage procedure.