

Imunotoxikologie - metody 2



Hodnocení imunotoxicity podle RIVM



Tier 2 - specifická imunita
Makrofágy
NK buňky

Tier 2 - RIVM - Funkce makrofágů

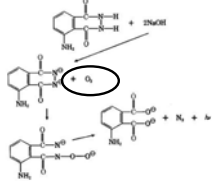


Hodnocení „oxidativního vzplanutí“ MF

- likvidace patogenů MF - řada enzymů / oxidace
- nespecifické stimulační (cukry) - LPS, zymosan, škrob

Stanovení reaktivních radikálů (ROS) po stimulaci

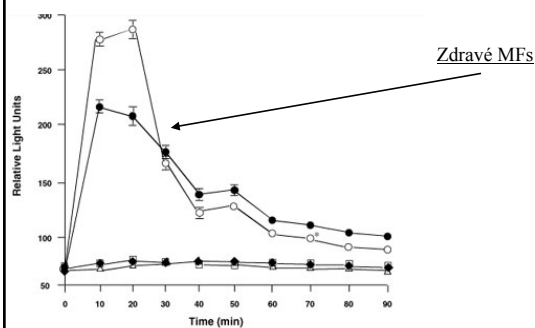
- krev (nebo bb. ze sleziny)
- přidavek sondy citlivé na oxidaci (luminol, fluorescein ...) + stimulace (LPS ...)
- měření kinetiky - luminiscence (luminol) / fluorescence (fluorescein)



Tier 2 - RIVM - Funkce makrofágů



Hodnocení „oxidativního vzplanutí“ MF



Tier 2 - RIVM - Funkce makrofágů



In vitro fagocytoza (a likvidace patogena)

- buňky ze sleziny nebo výplach břicha i.p. (*adherence na povrch*)
- aplikace na sklíčko / misku

- + přidavek fagocytovaných objektů:
 - fluorescenčně značené latexové kuličky NEBO
 - bakterie *Listeria monocytogenes*

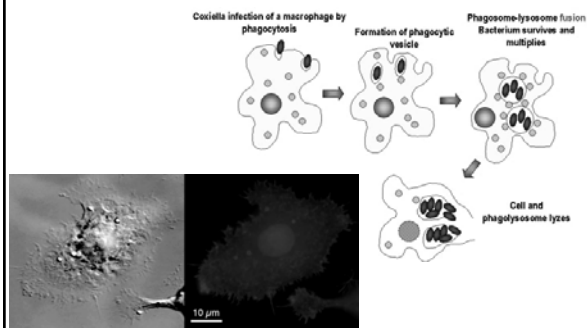
+ možnost přidat cytokiny (*IFN-gamma*)

- inkubace 15-30 min
- fixace (& barvení) - fluorescence: SCHOPNOST FAGOCYTOVAT
- nebo: kultivace živých *L. monocytogenes* SCHOPNOST ZABÍJET

Tier 2 - RIVM - Funkce makrofágů



In vitro fagocytoza (a likvidace patogena)



Tier 2 - RIVM - Funkce NK-buněk



In vitro likvidace nádoru

- buněčná nádorová linie YAC-1 (nebo P815, L1210...)
- pre-inkubace s radioaktivně značeným substrátem $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$
- varianta: fluorescenční značení (méně citlivé)
- dokonale odmytí (aktivní jsou jen buňky - nikoliv médium)
- smýchání s buňkami ze sleziny (specif. poměr „effector:target“ ratio)

Modifikace: + přidavek IFN-gamma a LPS = zabíjení nádoru MAKROFÁGY (odlišení od funkce NK bb. - NK bb. nepotřebují stimulaci!)

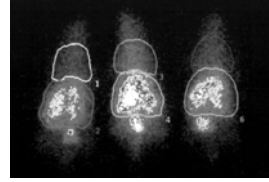
- inkubace 20h, centrifugace všech buněk

- stanovení radioaktivity v médiu (aktivita pochází z rozbitých nádorových buněk)
- varianta: měření fluorescence (méně citlivé)

Tier 2 - RIVM - Funkce makrofágů

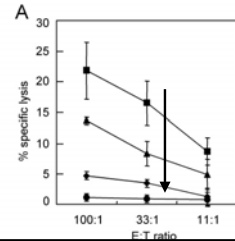


In vitro likvidace nádoru



Radioaktivita v myších po aplikaci YAC-1 (rozvoj nádorů)

Inhibice lýzy YAC-1 po přidání modelové látky



Hodnocení imunotoxicity podle RIVM

Tier 2 - specifická imunita Testy hostitelské rezistence

? Projeví se in vivo imunotoxicita pro určitou funkční část I.S.?

Tier 2 - RIVM: Hostitelská rezistence



Likvidace patogenů

Problémy: In vivo práce s patogeny ...

Bakterie - modely

- Listeria monocytogenes*
intracelulární patogen, likvidace T-závislá (vyžaduje stimulaci MF)
- Streptococcus*
extracelulární G+ bakterie
likvidace - funkce Ab + MF

Viry - modely

- Virus chřipky* - neutralizační Ab, správná funkce IFN-a,b
- Cytomegaloviry (herpes)* - Tc, makrofágy, NK-bb.

Tier 2 - RIVM: Hostitelská rezistence



Likvidace patogenů

Vliv TCDD na přežití po infekci chřipkou

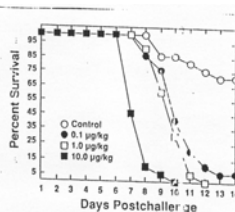


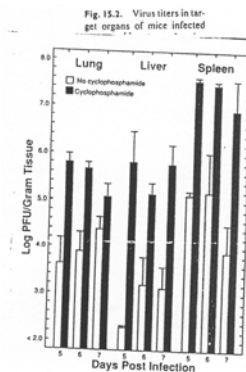
Fig. 15.3. Efficacy of mortality used as an endpoint for mouse-adapted influenza virus A/Egypt/41/4 (H2N2). TCDD at a single intraperitoneal dose of 0.1, 1.0, or 10.0 µg/kg, coadministered 7 days later with influenza virus, resulted in a significant increase in mortality for each dose of TCDD. [From J Toxicol Environ Health 31, 203-215, House RV, Lane LP, Murray J, Thomas PT, Ehrlich JP, Hurlson GR, Dixon JH, Hemisphere Publishing, Taylor & Francis, Washington, DC. Reproduced with permission. All rights reserved.]

Tier 2 - RIVM: Hostitelská rezistence



Likvidace patogenů

Vliv cyklofosfamidů (cytostatikum, karcinogen) na titry virů



Tier 2 - RIVM: Hostitelská rezistence

Likvidace parazitů

- *Trichinella spiralis*
 - helmint - infekce přes GIT
 - T-buňková imunita + eosinofily
- *Plasmodium yoelli* - prvok
 - malarie (infikuje ERY)
 - likvidace: B-b / T-b / MF

Likvidace nádorů

B16F10 melanoma

- i.p. injekce - 21 dnů - diseminace na plicích
- likvidace: NK a MF

PYB6 sarcoma

- i.m. injekce - zde vývoj nádoru

Tier 2 - RIVM: Hostitelská rezistence

Likvidace parazitů

Dny ozařování UV-B vs počty *T. spiralis* kultivovaných z infikovaných potkanů

Tier 2 - RIVM: Hostitelská rezistence

Likvidace nádorů

Metastázy B16F10 na plicích myši

Efekt cyklofosfamidů
-> Výskyt nádorů po aplikaci PYB6

Hodnocení imunotoxicity

Specifické testy

Autoimunita

Hypersensitivita

Autoimunita

Průkaz proti-jaderných protilátek (ANA)

- lidské buňky fixované na mikroskopickém skle
- přidání séra (pokud obsahuje ANA, naváží se ...)

Hypersensitivita

Kontaktní hypersensitivita

Kontaktní hypersensitivita

- průkaz DTH reakce
- > aplikace Ag na kůži
- > po delší době zarudnutí

„DTH“ test (delayed type hypersensitivity)

viz **MEST - Mouse Ear Swelling Test**

- Vyholení břicha, aplikace Ag /alergenu/
- po 10 dnech: Ag do jednoho ucha (solvent do druhého & srovnání)

Hypersensitivita



Stimulace v lokálních uzlinách (myši)

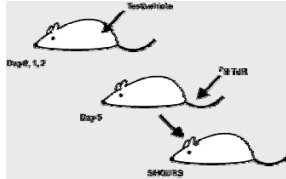
Local Lymph Node (LLN) Assay

<http://school.powow-consulting.com/sourisSchool.swf>

opakovaná i.d. injekce látky (za uši) 5 dní
i.v. injekce $^3\text{H-Thy}$
5 h
usmrčení
izolace lokálních (krčních) uzlin

vyhodnocení hmotnost uzliny
+ proliferace buněk z uzliny in vitro

stanovení radioaktivity v uzlině
(proliferace T-buněk)



Hodnocení imunotoxicity



EXPERIMENTÁLNÍ DESIGN

Která část IS je zasažena?

Různé typy Ag

T-závislé

T-nezávislé

př. SRBC

DNP-Ficol (=dinitrofenyl-ficoll)

LPS

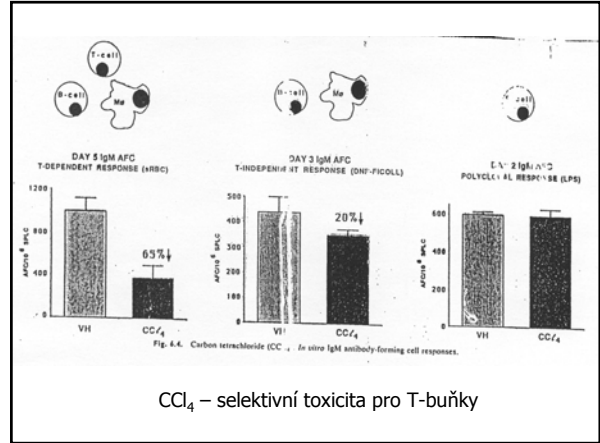
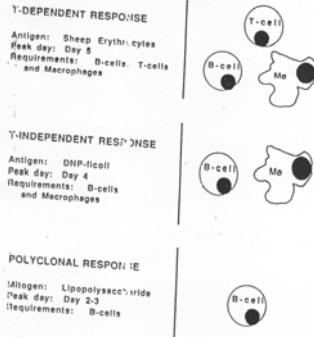


Exp. design:

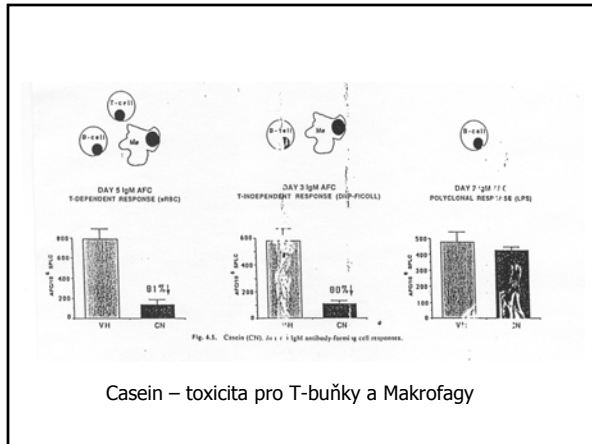
- působení toxické látky

- kombinace různých Ag
-> reakce různých složek IS
-> poznání, které složky IS
jsou ovlivněny xenobiotikem

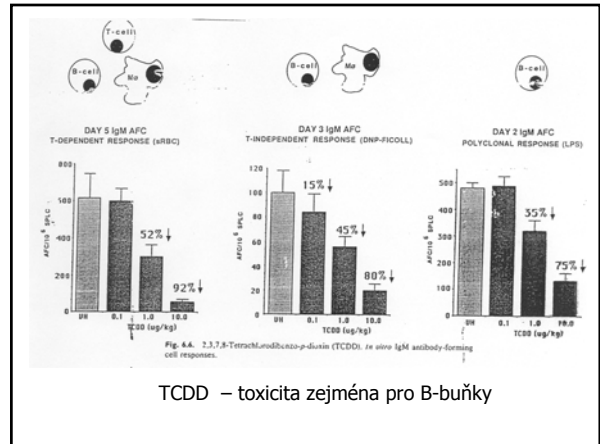
- vyhodnocení
-> reakce různých složek IS



CC₄ – selektivní toxicita pro T-buňky



Casein – toxicita pro T-buňky a Makrofagy



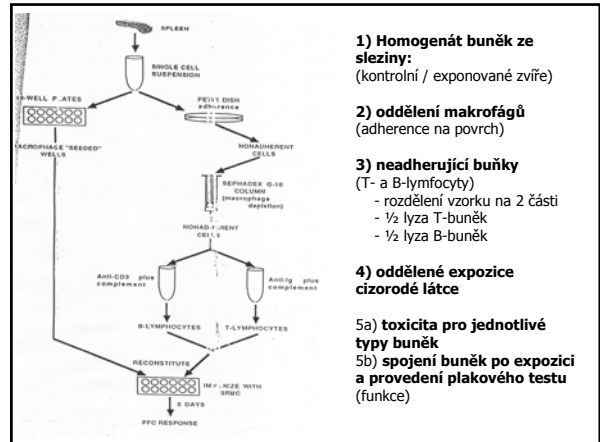
TCDD – toxicita zejména pro B-buňky

In vitro varianty pro studium vlivu xenobiotik na buňky

- separace jednotlivých typů buněk ze sleziny
- oddělené expozice buněk
 - rekonstituce různých buněk & spojení dohromady
 - odpověď na podávaný Ag

Výsledky

- srovnání různých xenobiotik
- posouzení vlivu na jednotlivé typy buněk



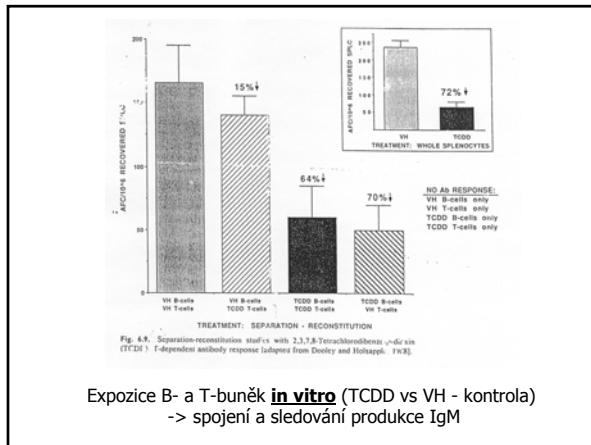
1) Homogenát buněk ze sleziny:
(kontrolní / exponované zvíře)

2) oddělení makrofágů
(adherence na povrch)

3) neadherující buňky
(T- a B-lymfocyty)
- rozdělení vzorku na 2 části
- 1/2 lyza T-buněk
- 1/2 lyza B-buněk

4) oddělené expozice cizorodé látce

5a) toxicita pro jednotlivé typy buněk
5b) spojení buněk po expozici a provedení plakového testu (funkce)



Expozice B- a T-buněk **in vitro** (TCDD vs VH - kontrola)
-> spojení a sledování produkce IgM