

# Imunotoxikologie - metody 2

# Hodnocení imunotoxicity podle RIVM

Tier 2 - specifická imunita

*Makrofágy*

*NK buňky*

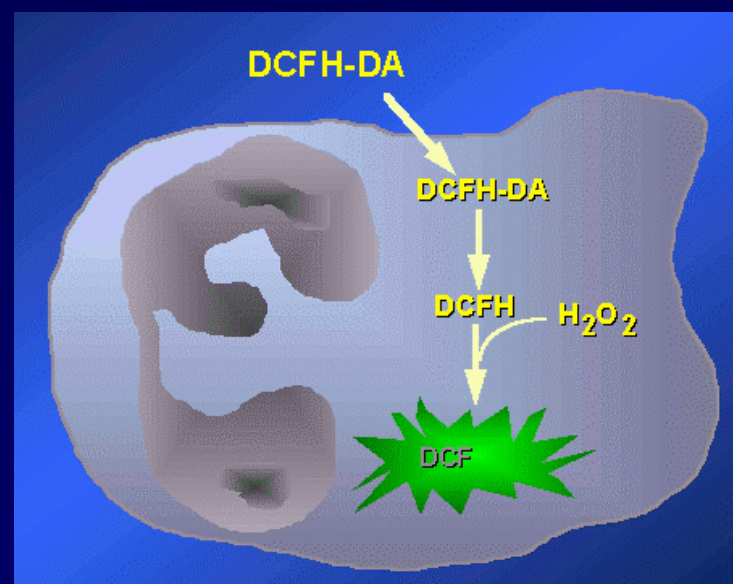
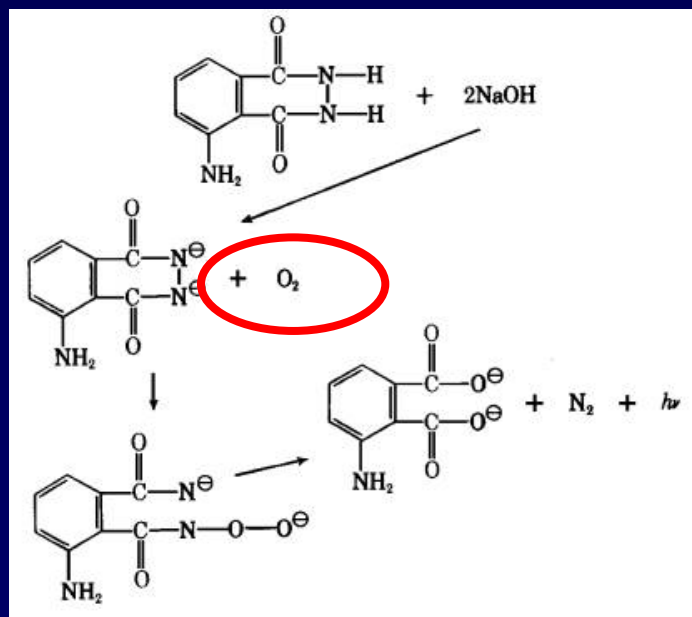
## Tier 2 - RIVM - Funkce makrofágů

### Hodnocení „oxidativního vzplanutí“ MF

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

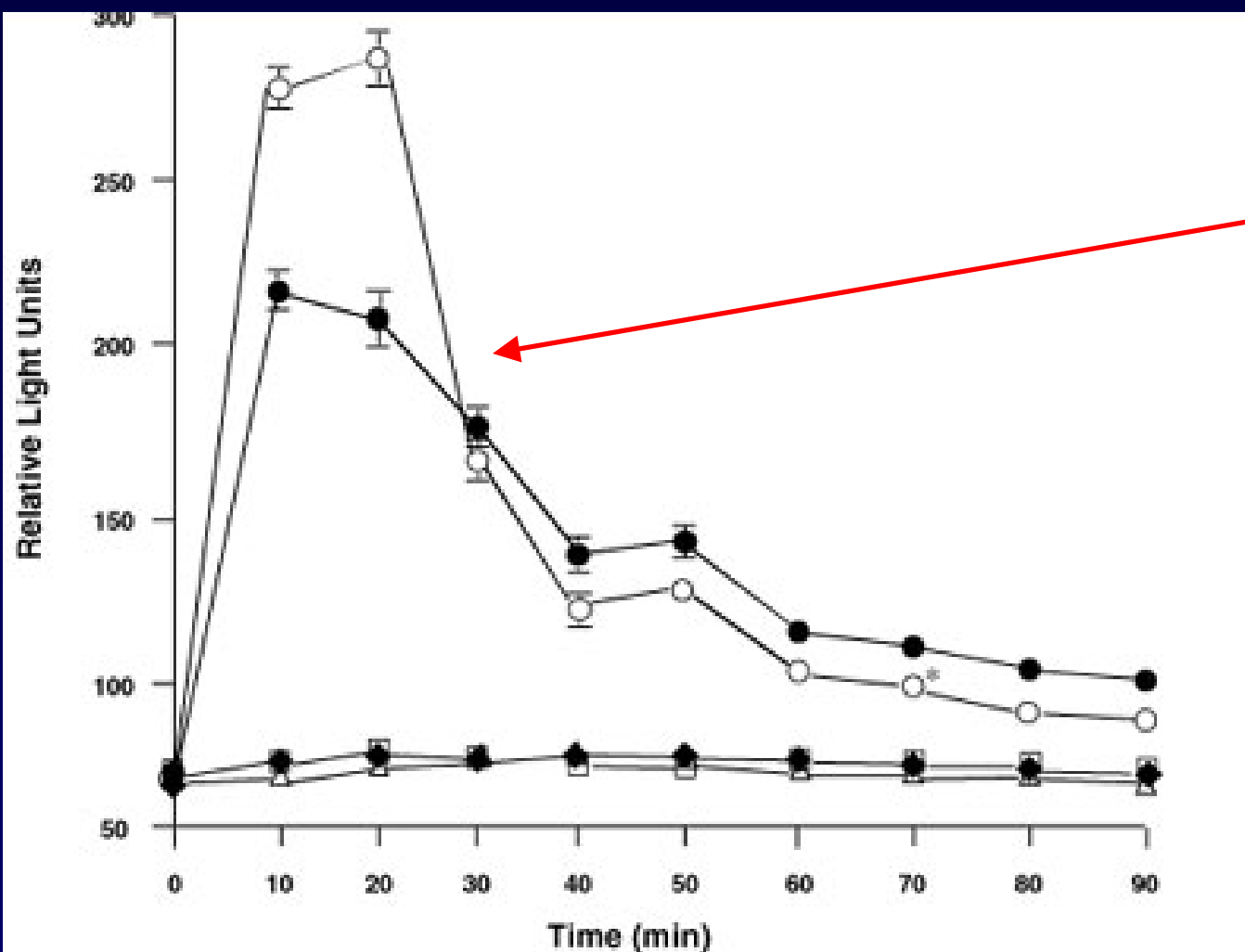
### Stanovení reaktivních radikálů (ROS) po stimulaci

- 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



Zdravé MFs

## 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

+ přídavek fagocytovaných objektů:

- fluorescenčně značené latexové kuličky NEBO
- bakterie *Listeria monocytogenes*

+ možnost přidat cytokiny (*IFN-gamma*)

- inkubace 15-30 min

- fixace (& barvení) - fluorescence:

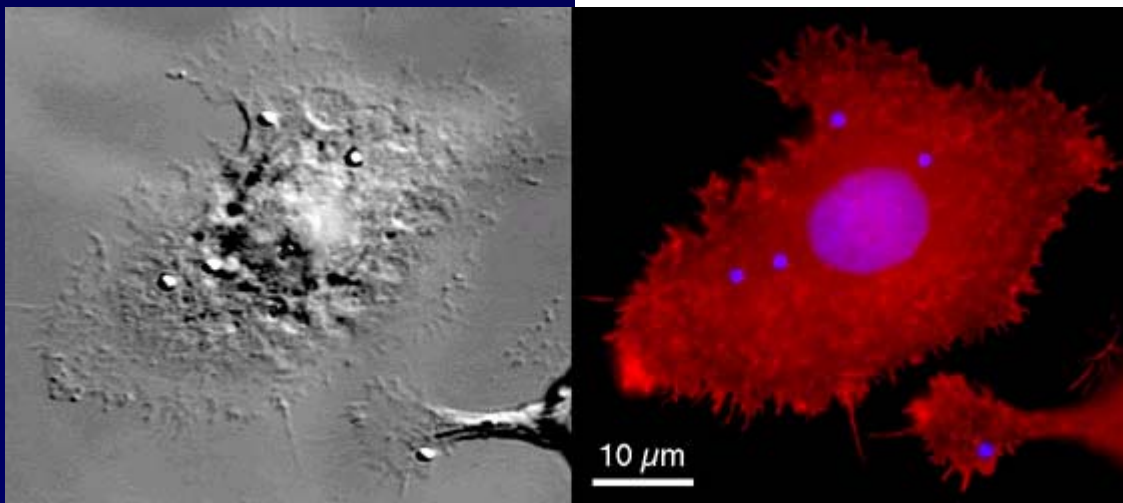
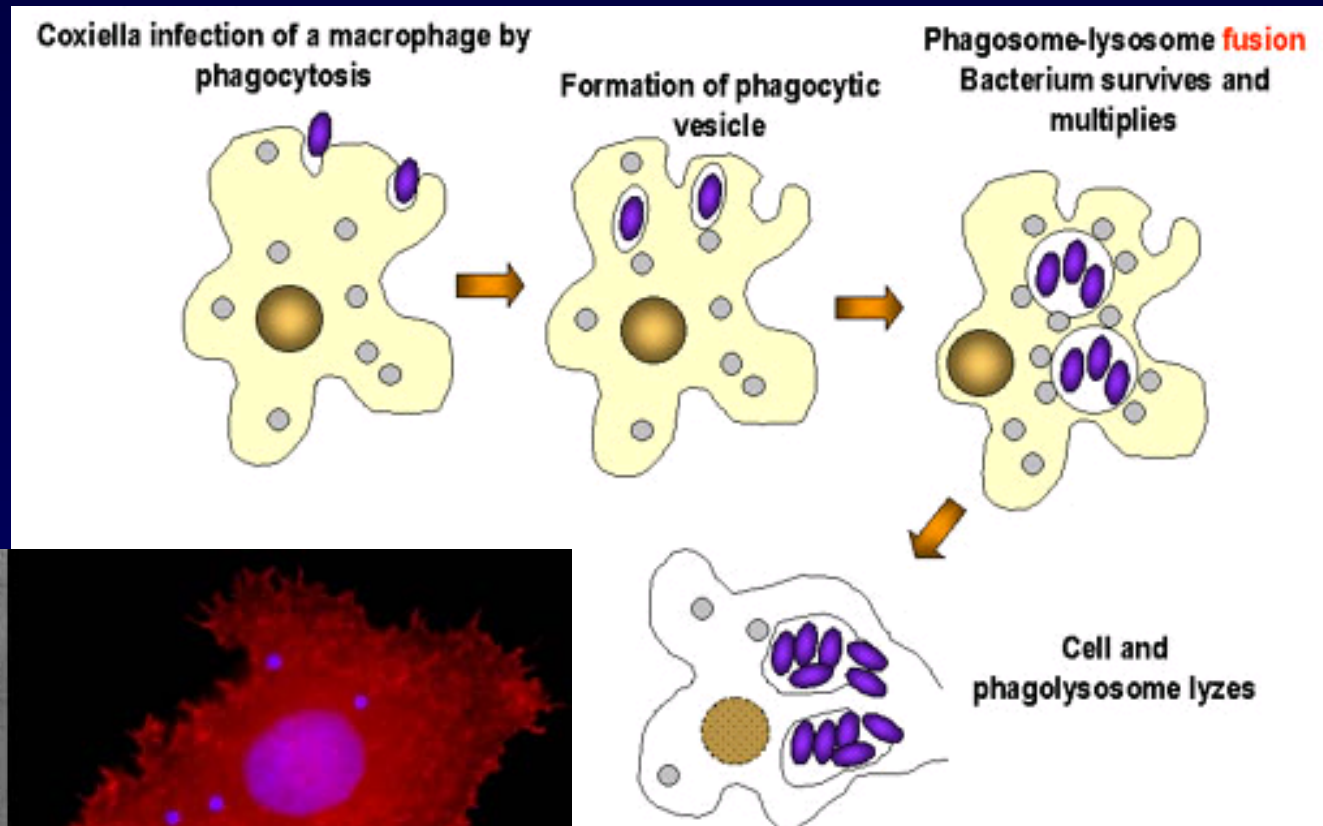
**SCHOPNOST FAGOCYTOVAT**

- nebo: kultivace živých *L. monocytogenes*

**SCHOPNOST ZABÍJET**

# Tier 2 - RIVM - Funkce makrofágů

## In vitro fagocytoza (a likvidace patogenů)



## Tier 2 - RIVM - Funkce NK-buněk

### In vitro likvidace nádoru

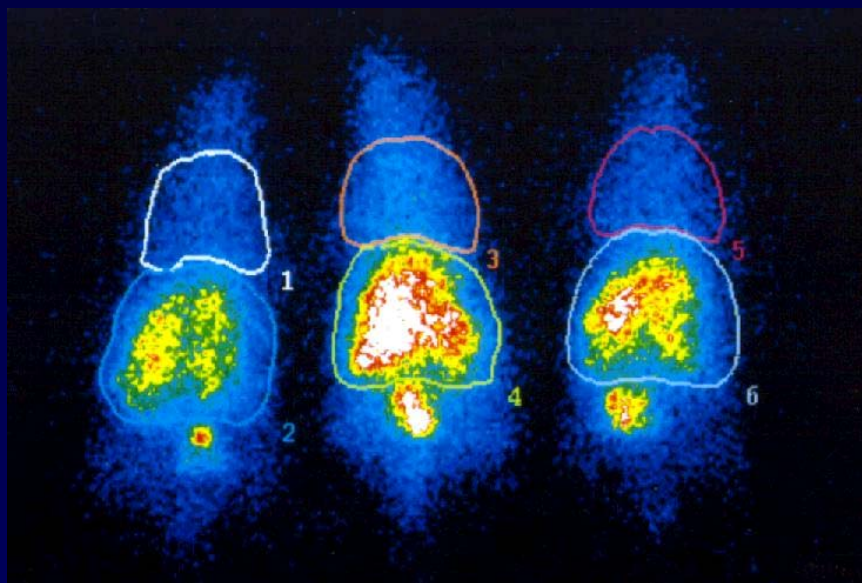
- buněčná nádorová linie YAC-1 (nebo P815, L1210...)
  - pre-inkubace s radioaktivně značeným substrátem  $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$
  - *varianta: fluorescenční značení (méně citlivé)*
  - dokonalé odmytí (aktivní jsou jen buňky - nikoliv médium)
- smýchání s buňkami ze sleziny (*specif. poměr „effector:target“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

*Modifikace: + přídavek 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)*

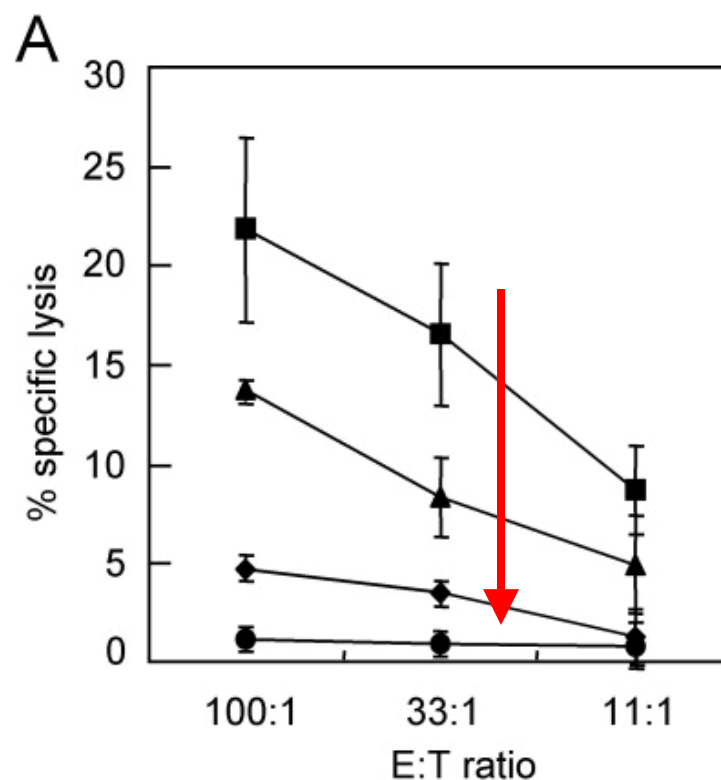
# Tier 2 - RIVM - Funkce makrofágů

## 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

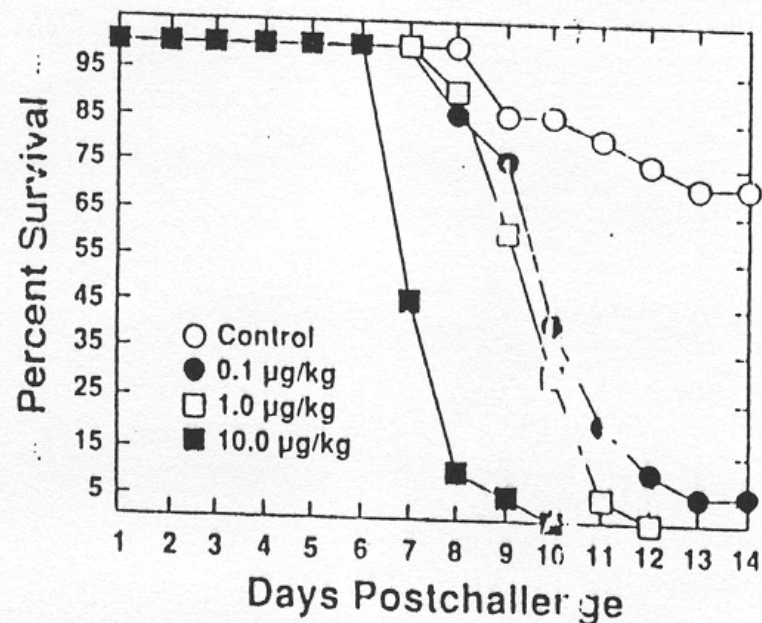
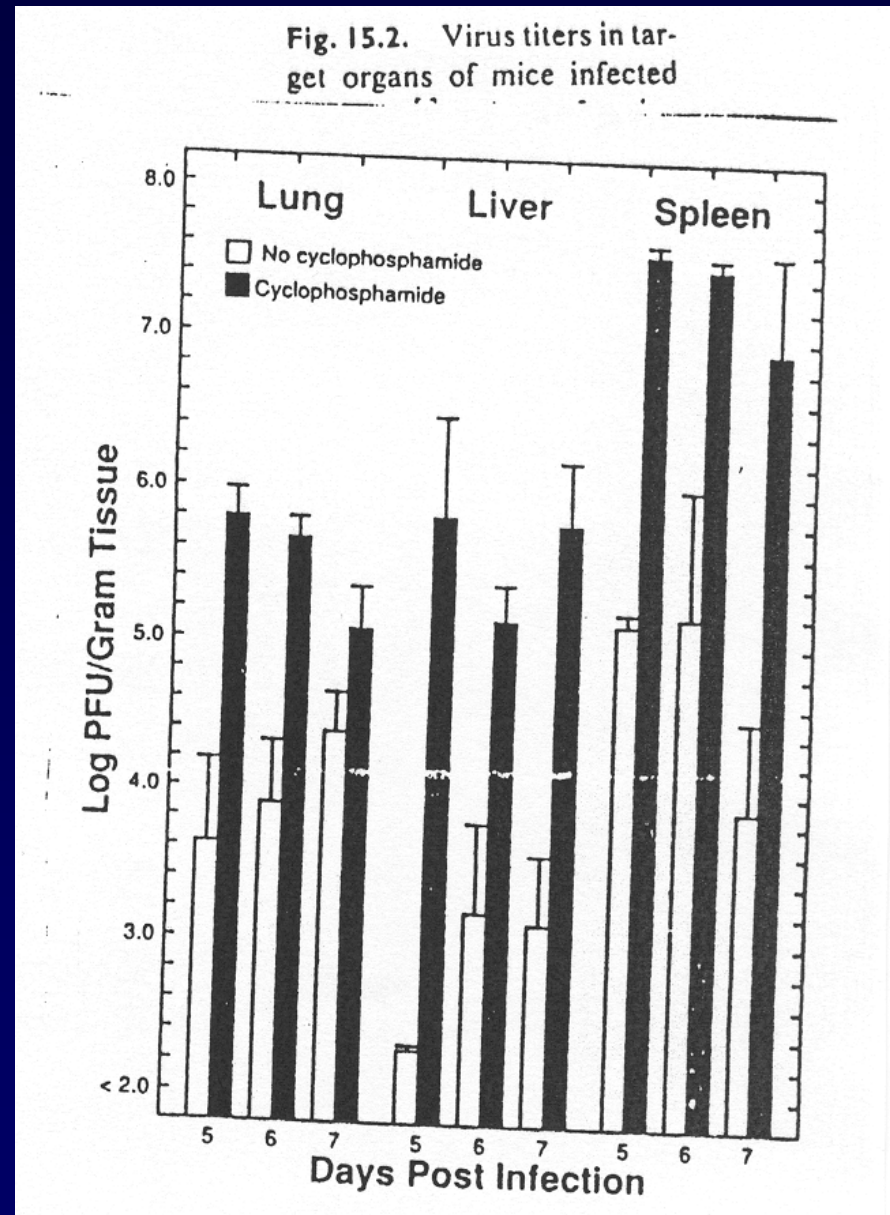


Fig. 14.2. Example of mortality used as an endpoint for mouse-adapted influenza virus A/Texasan/11/4 (H2N2). TCDD at a single intraperitoneal dose of 0.1, 1.0, or 10.0 µg/kg, challenged 7 days later with influenza virus, resulted in a significant increased mortality for each dose of TCDD. [From J Toxicol Environ Health 31, 203-215, House RV, Lauer LC, Murray MJ, Thomas PT, Ehrlich JP, Burleson GR, Dean JH, Hemisphere Publishing, Taylor and Francis, Washington, DC, Reproduced with permission. All rights reserved.]

## Tier 2 - RIVM: Hostitelská rezistence

### Likvidace patogenů

Vliv cyklofosfamidu  
(cytostatikum, karcinogen)  
na titry virů



## Tier 2 - RIVM: Hostitelská rezistence

### Likvidace parazitů

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

### Likvidace nádorů

B16F10 melanoma

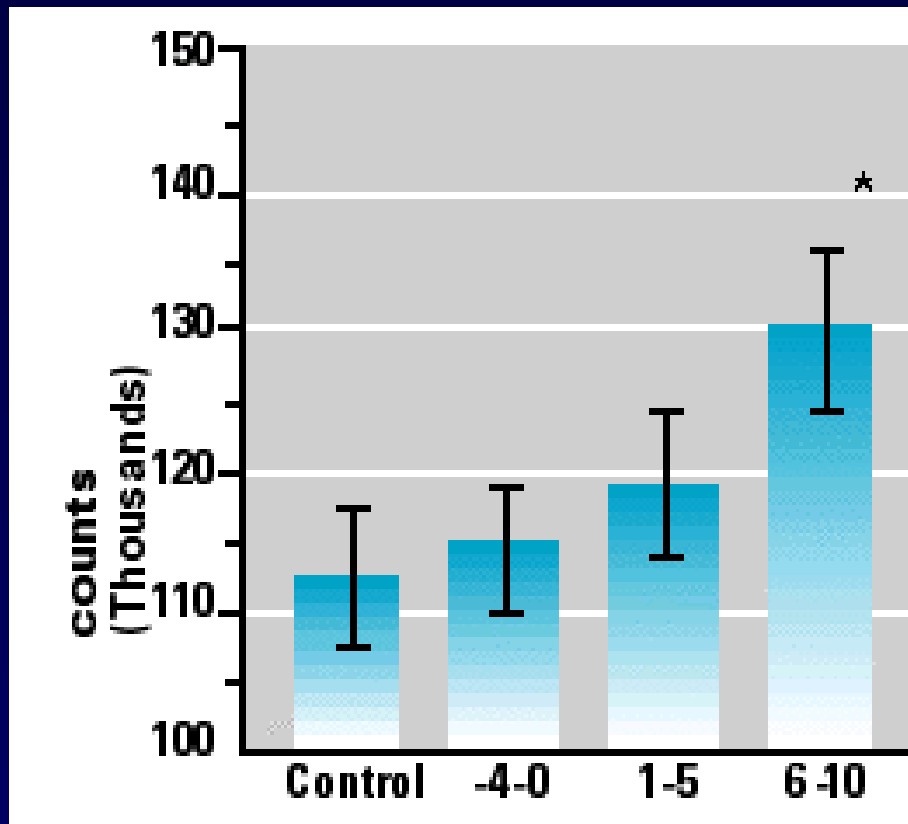
- i.p. injekce - 21 dnů - diseminace na plicích
- likvidace: NK a MF

PYB6 sarcoma

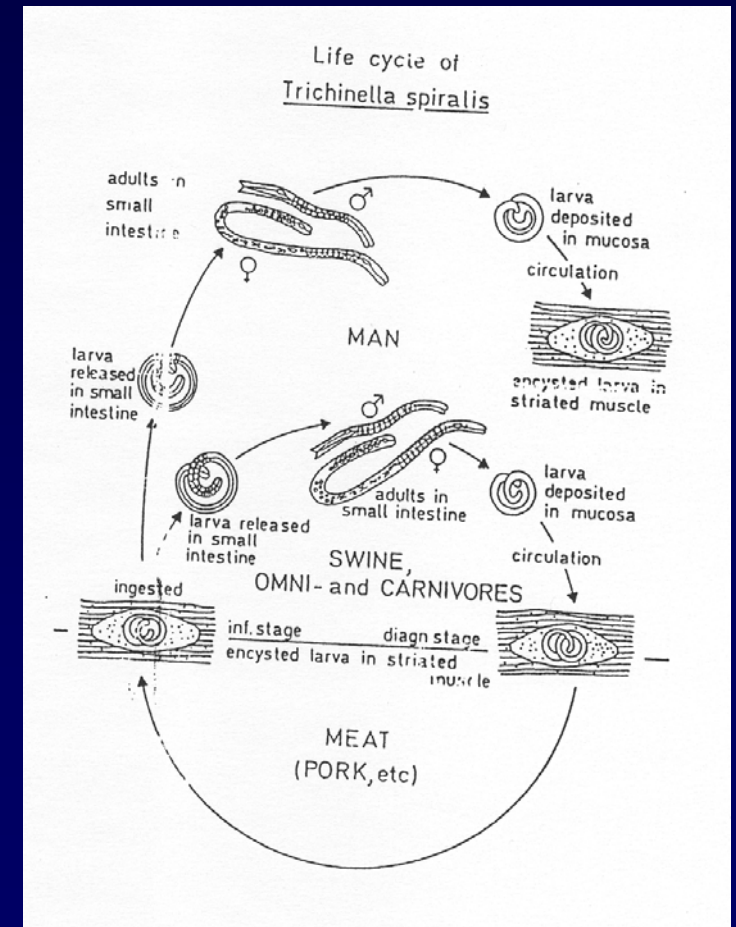
- i.m. injekce - zde vývoj nádoru

# Tier 2 - RIVM: Hostitelská rezistence

## Likvidace parazitů



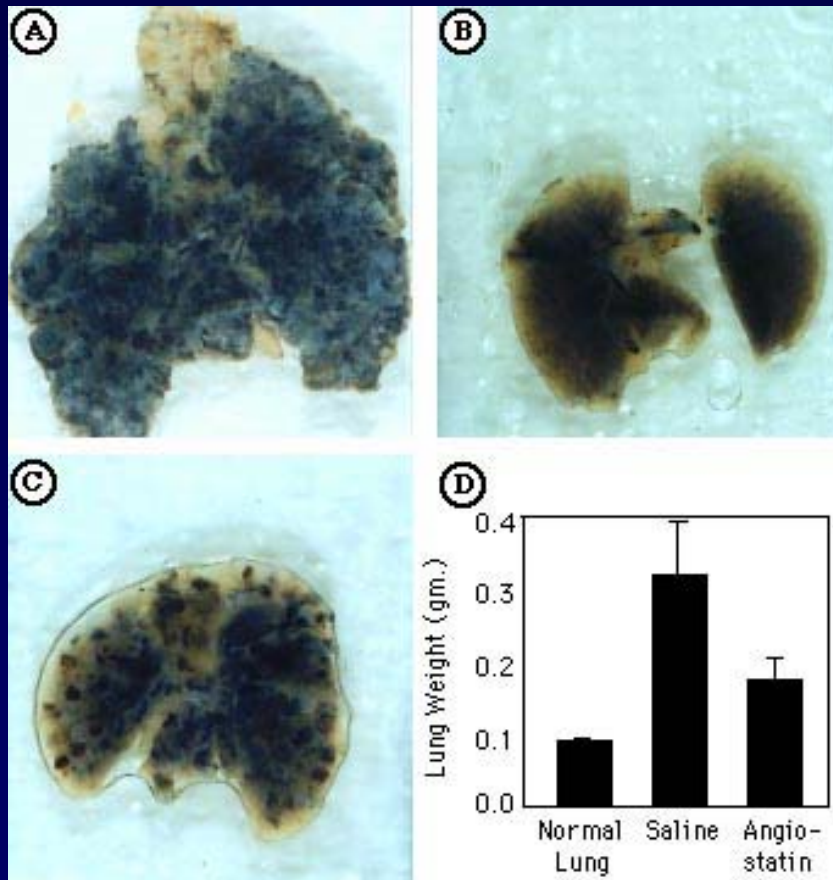
Dny ozařování UV-B vs počty *T. spiralis* kultivovaných z infikovaných potkanů



# Tier 2 - RIVM: Hostitelská rezistence

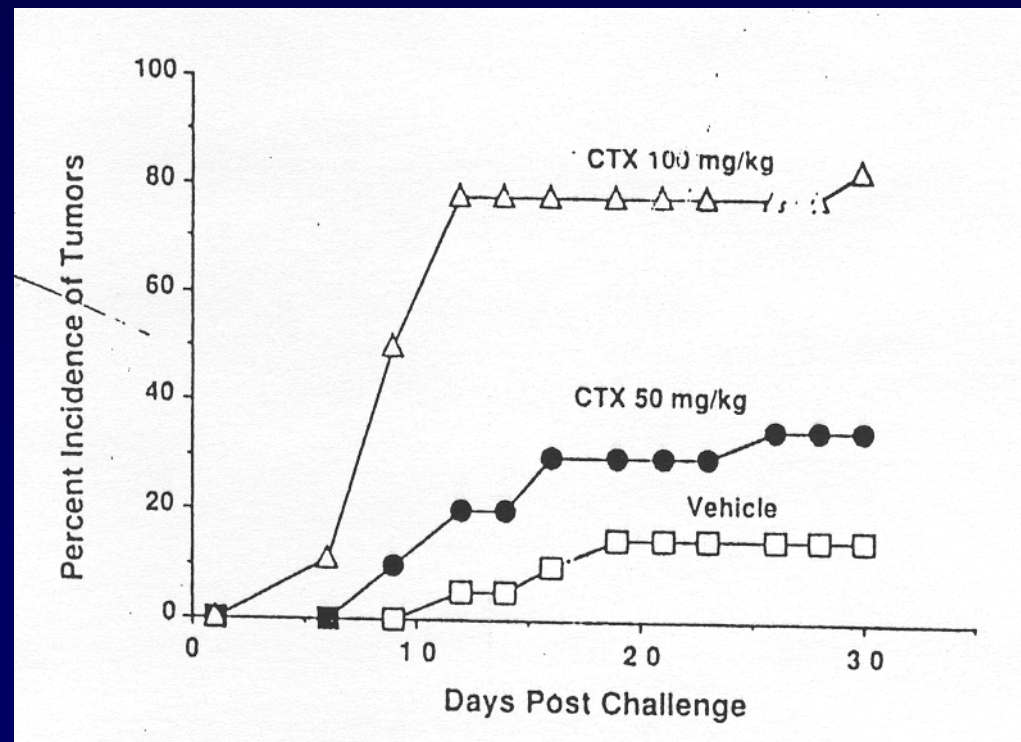
## Likvidace nádorů

Metastázy B16F10 na plicích myši



Efekt cyklofosfamidu

-> Výskyt nádorů po aplikaci PYB6



# Hodnocení imunotoxicity

Specifické testy

*Autoimunita*

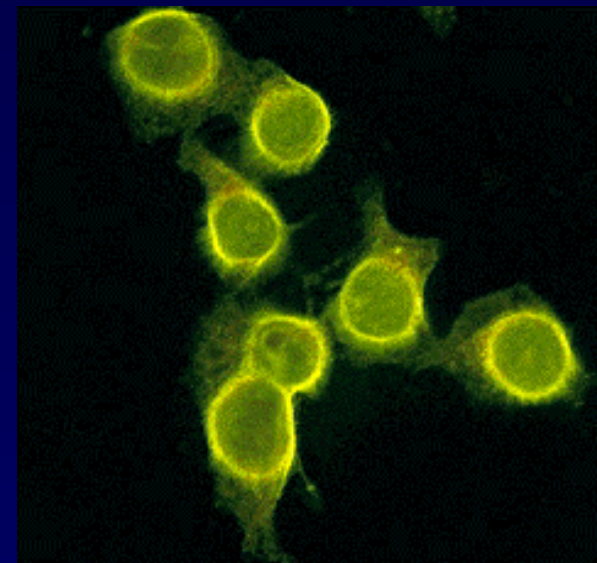
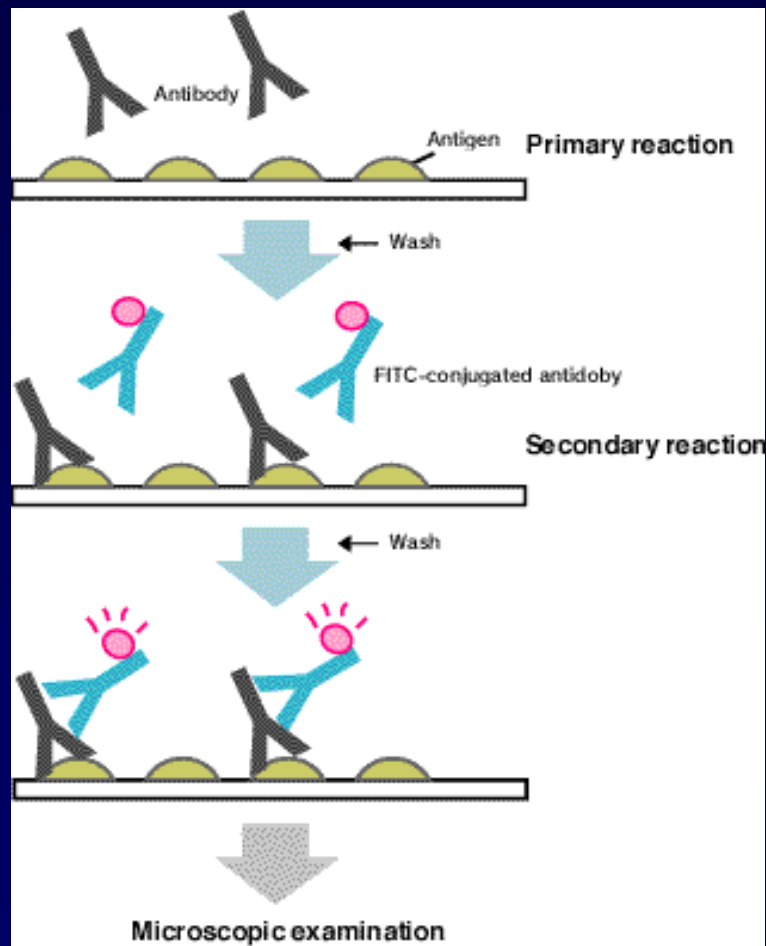
*Hypersensitivita*



# Autoimunita

## Průkaz proti-jaderných protilátek (ANA)

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



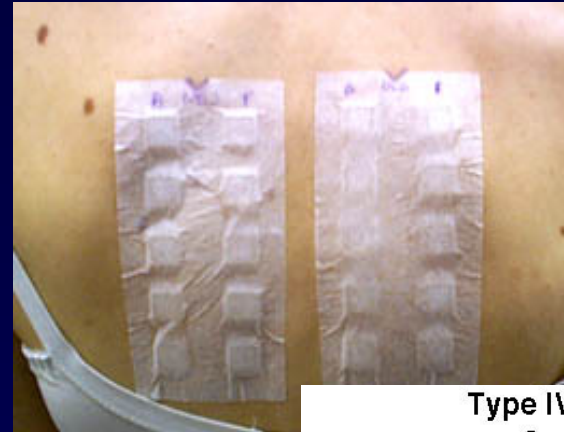
**Antinuclear fluorescent antibody stain**

# Hypersensitivita

## Kontaktní hypersensitivita

### Kontaktní hypersensitivita

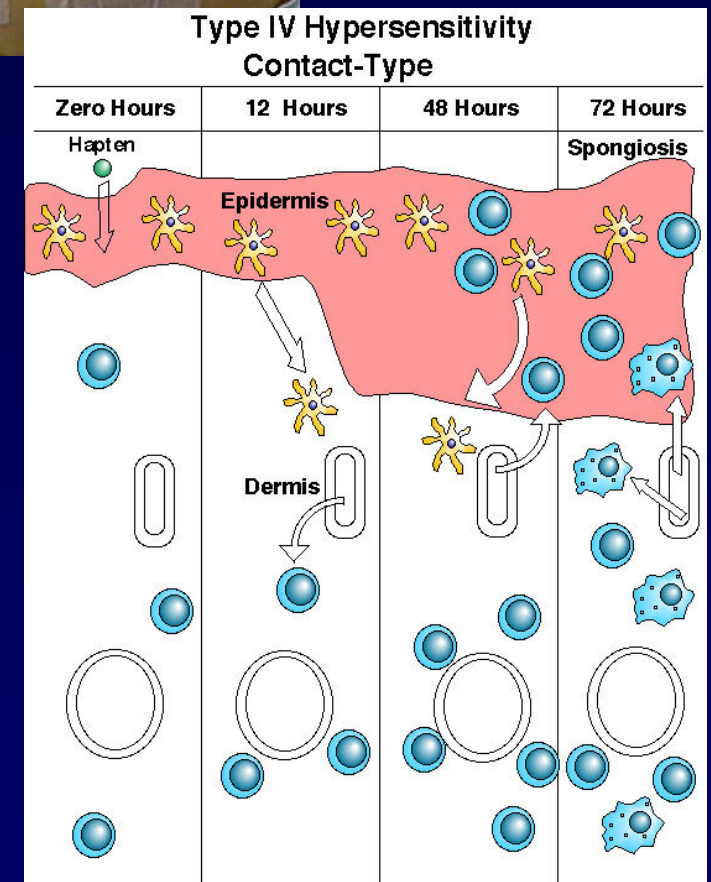
- průkaz DTH reakce
  - > aplikace Ag na kůži
  - > po delší době zarudnutí



### „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)

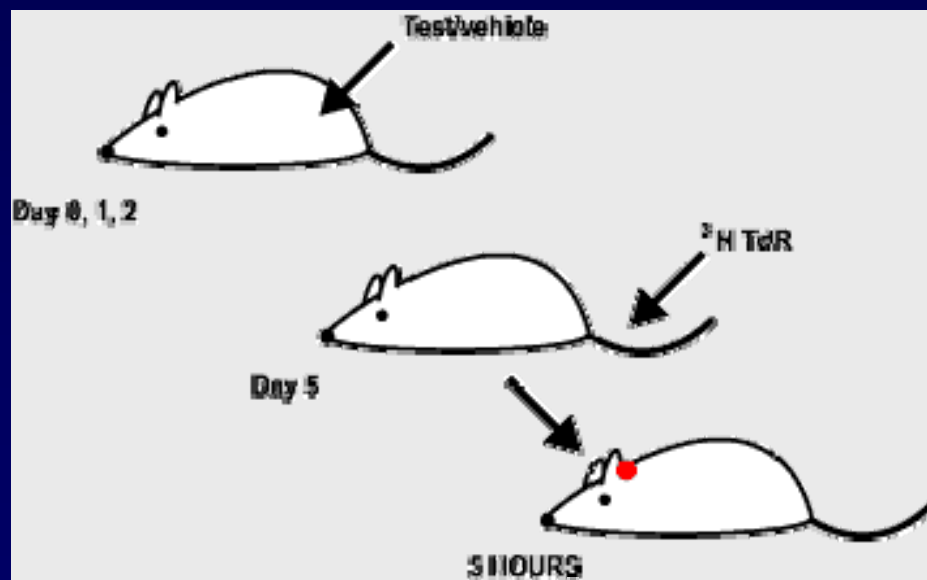
### Local Lymph Node (LLN) Assay

<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  
 usmrcení  
 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

př. SRBC

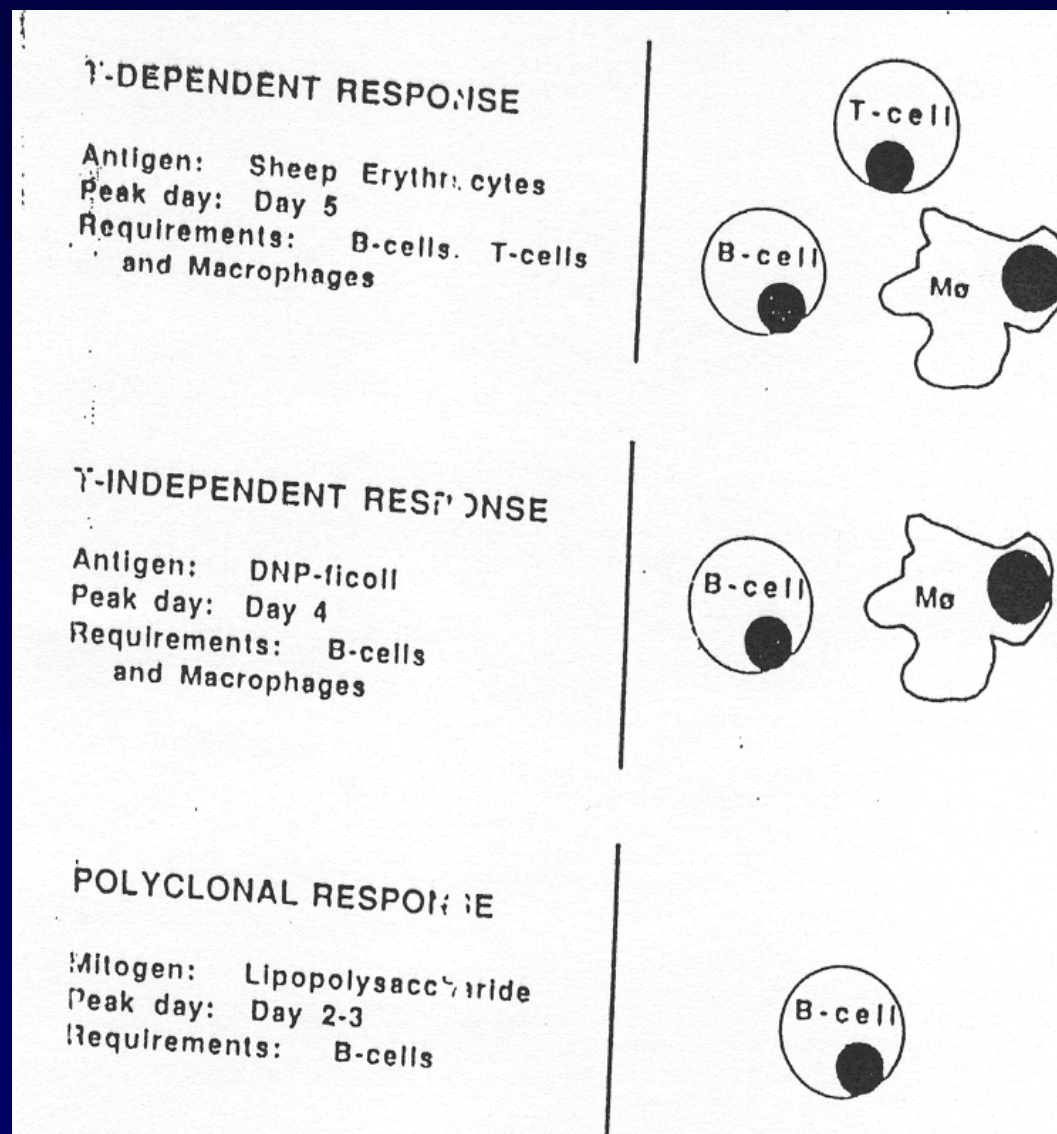
T-nezávislé

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



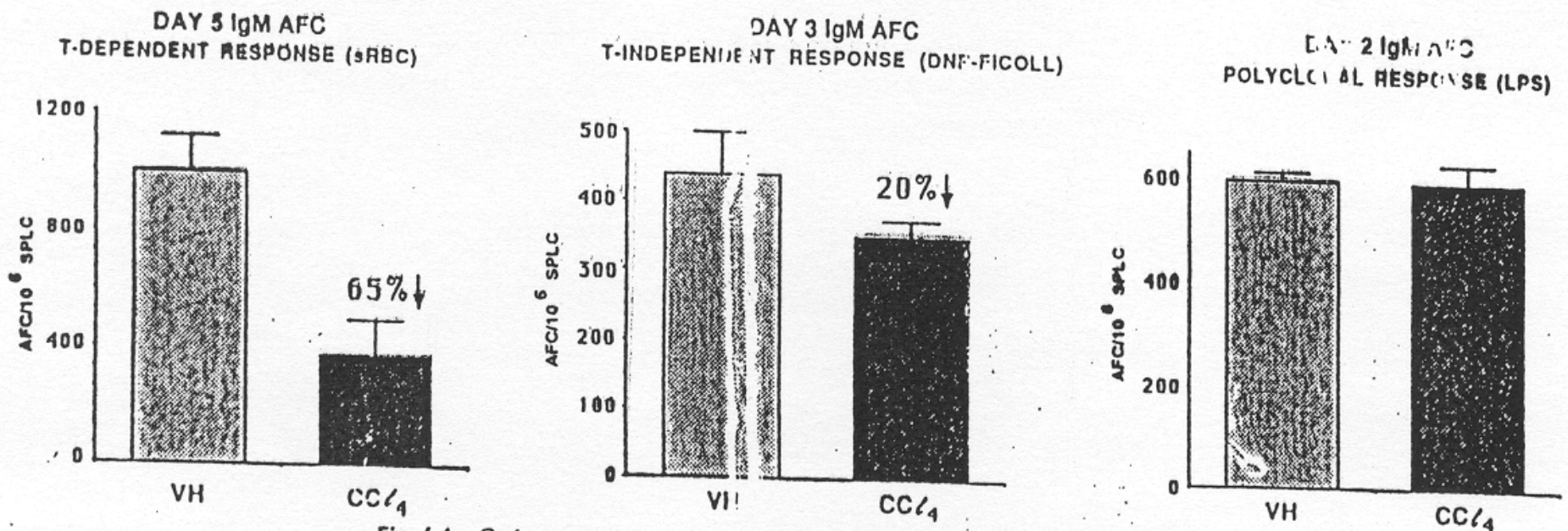
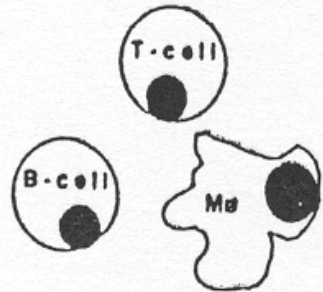


Fig. 6.4. Carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>) *In vitro* IgM antibody-forming cell responses.

CCl<sub>4</sub> – selektivní toxicita pro T-buňky

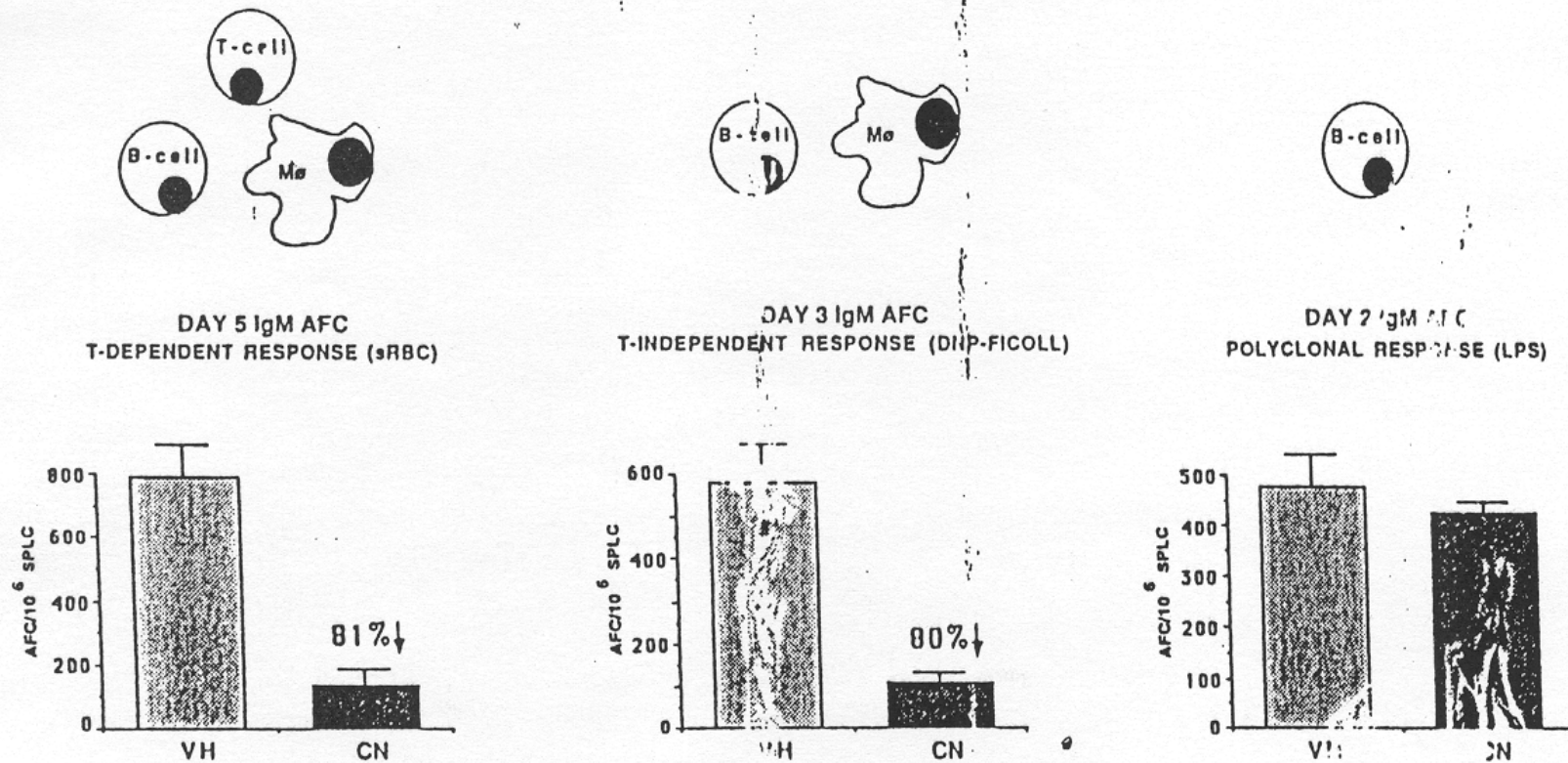
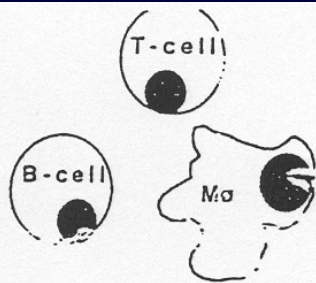
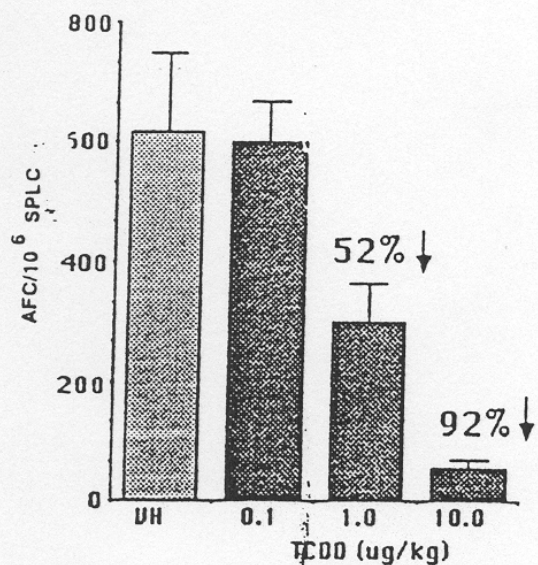


Fig. 6.5. Casein (CN). *In vivo* IgM antibody-forming cell responses.

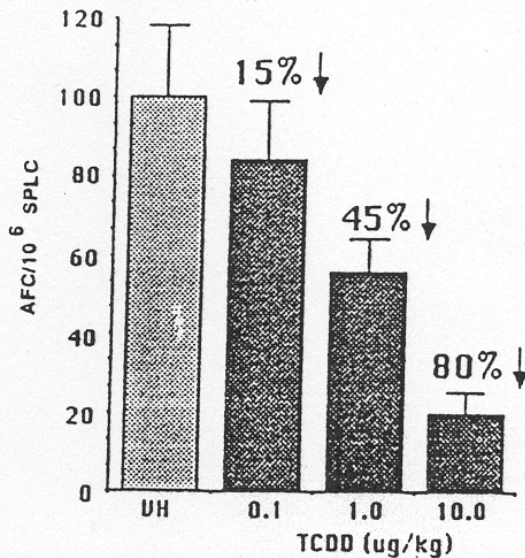
Casein – toxicita pro T-buňky a Makrofagy



DAY 5 IgM AFC  
T-DEPENDENT RESPONSE (sRBC)



DAY 3 IgM AFC  
T-INDEPENDENT RESPONSE (DNP-FICOLL)



DAY 2 IgM AFC  
POLYCLONAL RESPONSE (LPS)

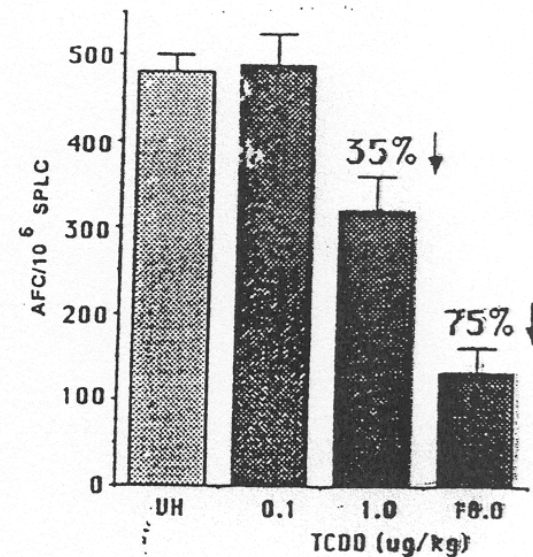


Fig. 6.6. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD). *In vitro* IgM antibody-forming cell responses.

TCDD – toxicita zejména pro B-buňky

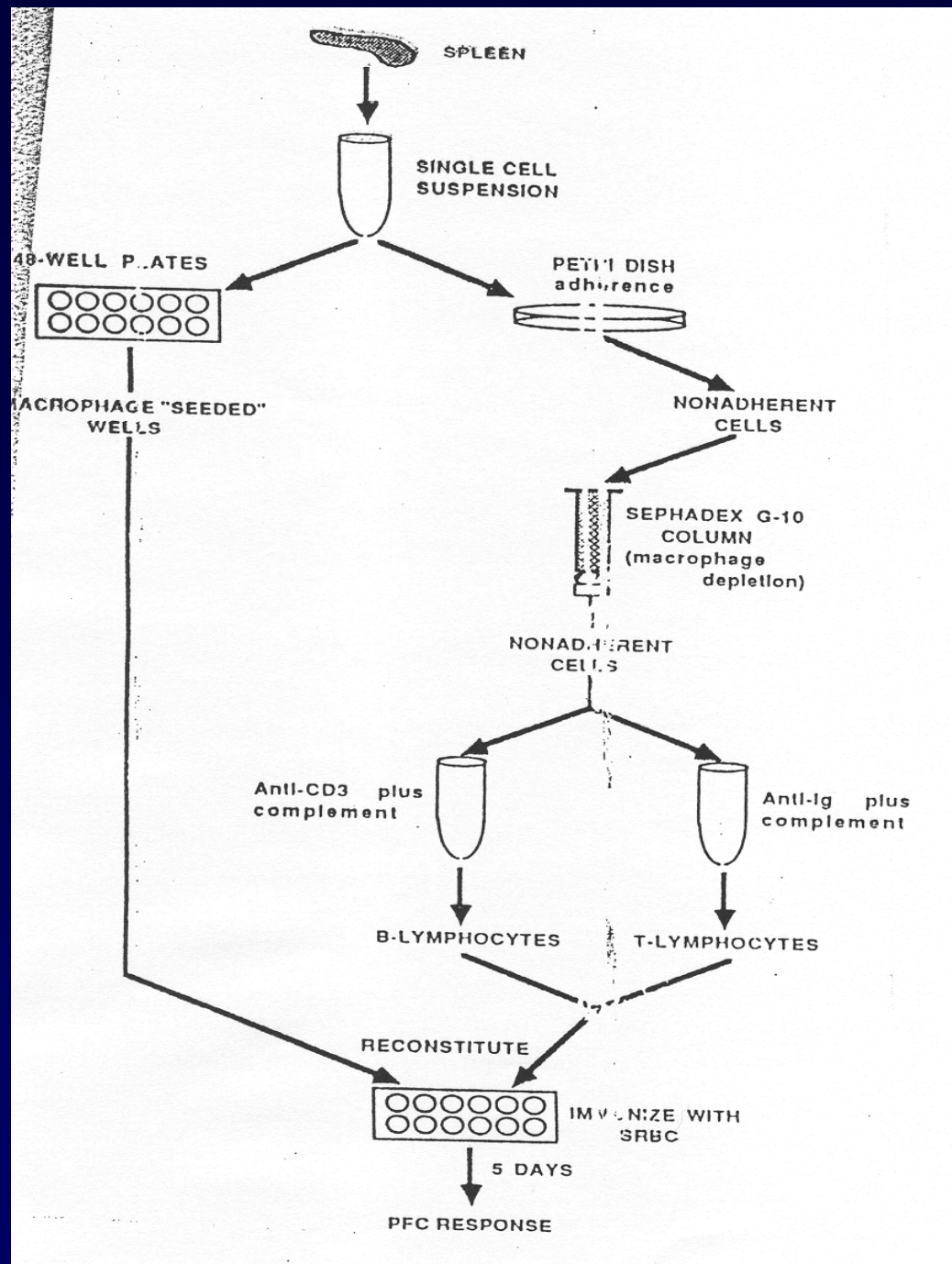


## In vitro varianty pro studium vlivu xenobiotik na buňky

- 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)

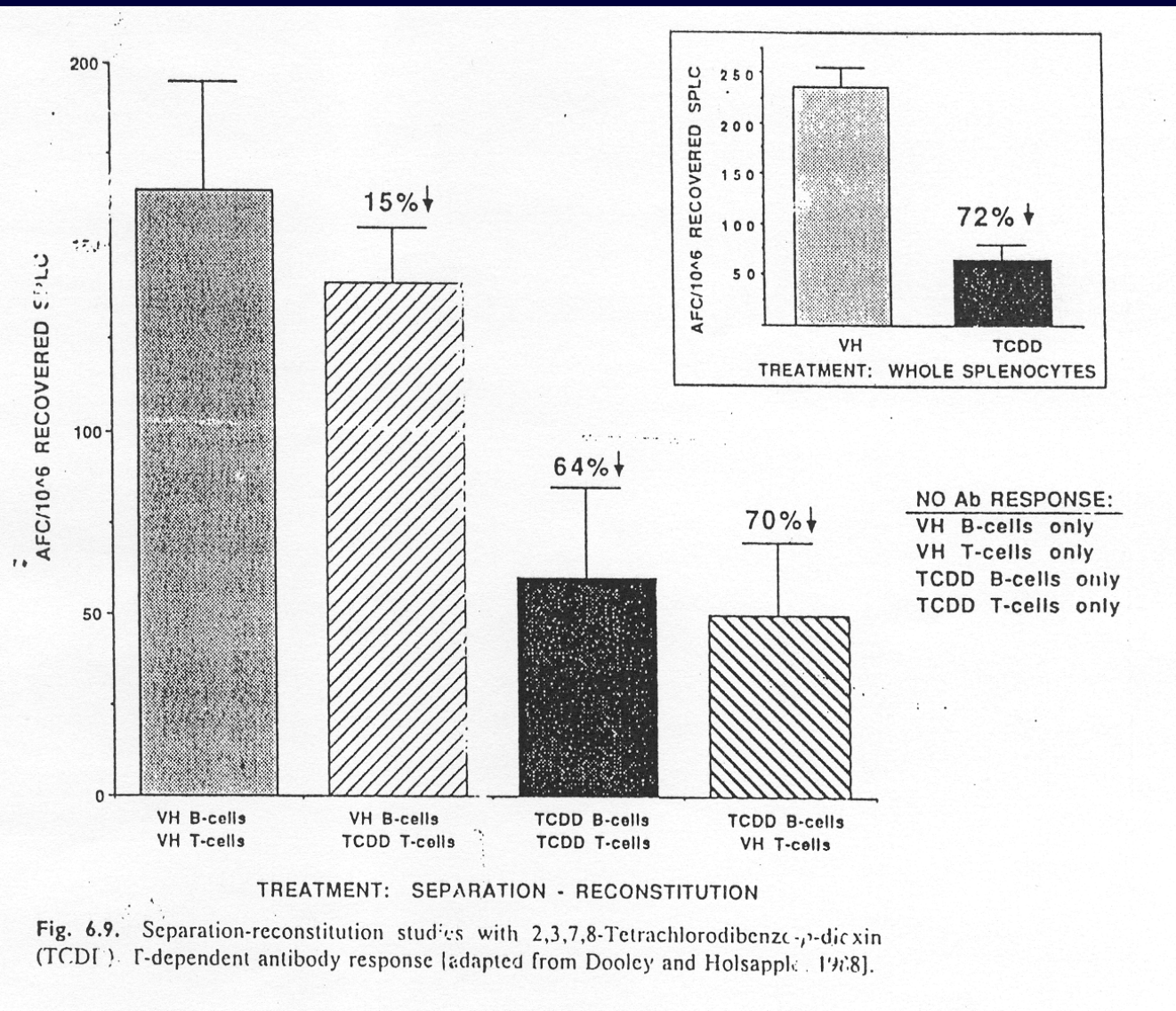
**2) oddělení makrofágů**  
(adherence na povrch)

**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