Centrum pro výzkum toxických látek v prostředí

IMUNOTOXIKOLOGIE – metody 2

Luděk Bláha

blaha@recetox.muni.cz

Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky.

EVROPSKÁ UNIE esf

MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost 2007-13

UNIVERSITAS MASARYKIANA BRUNENSIS

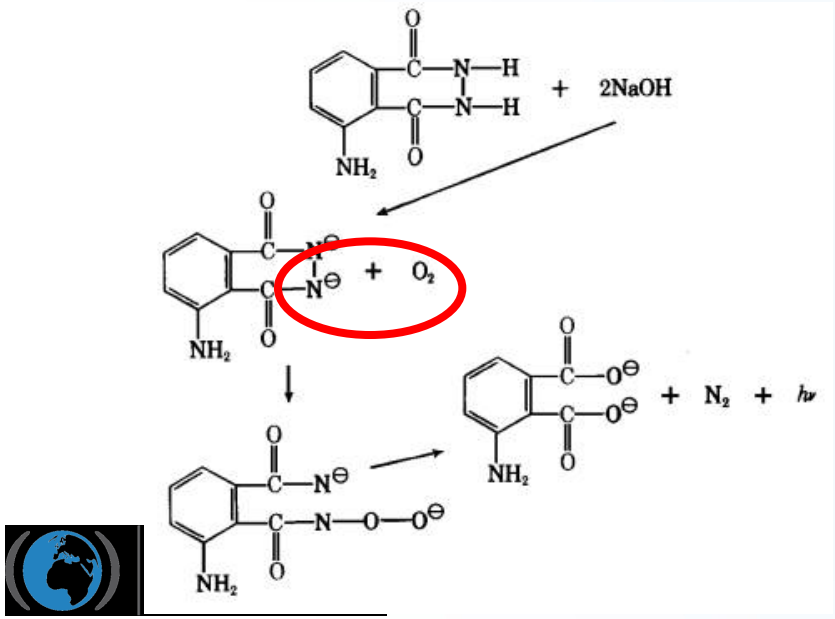
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

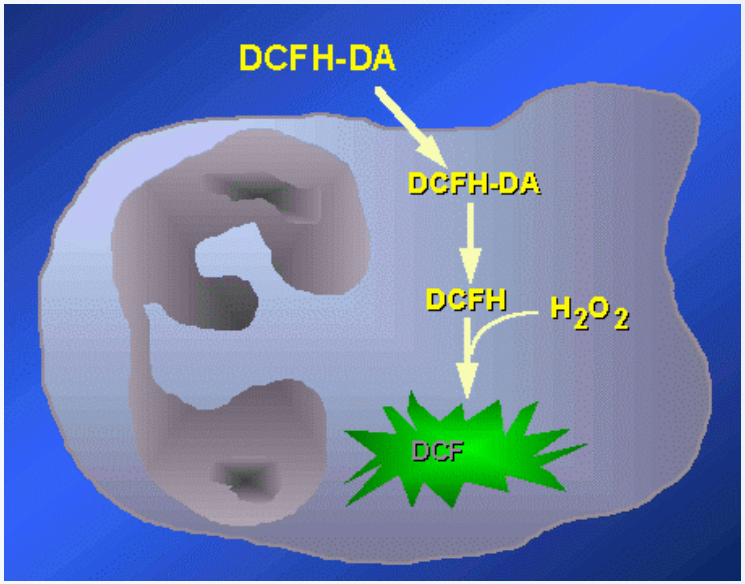
Tier 2 – RIVM – testování funkce makrofátů

1) Hodnocení „oxidativního vzplanutí" MF

- Při likvidaci patogenů - řada enzymů → oxidační reakce
- cukry - **LPS, zymosan, škrob** → nespecifická stimulace oxidativního vzplanutí

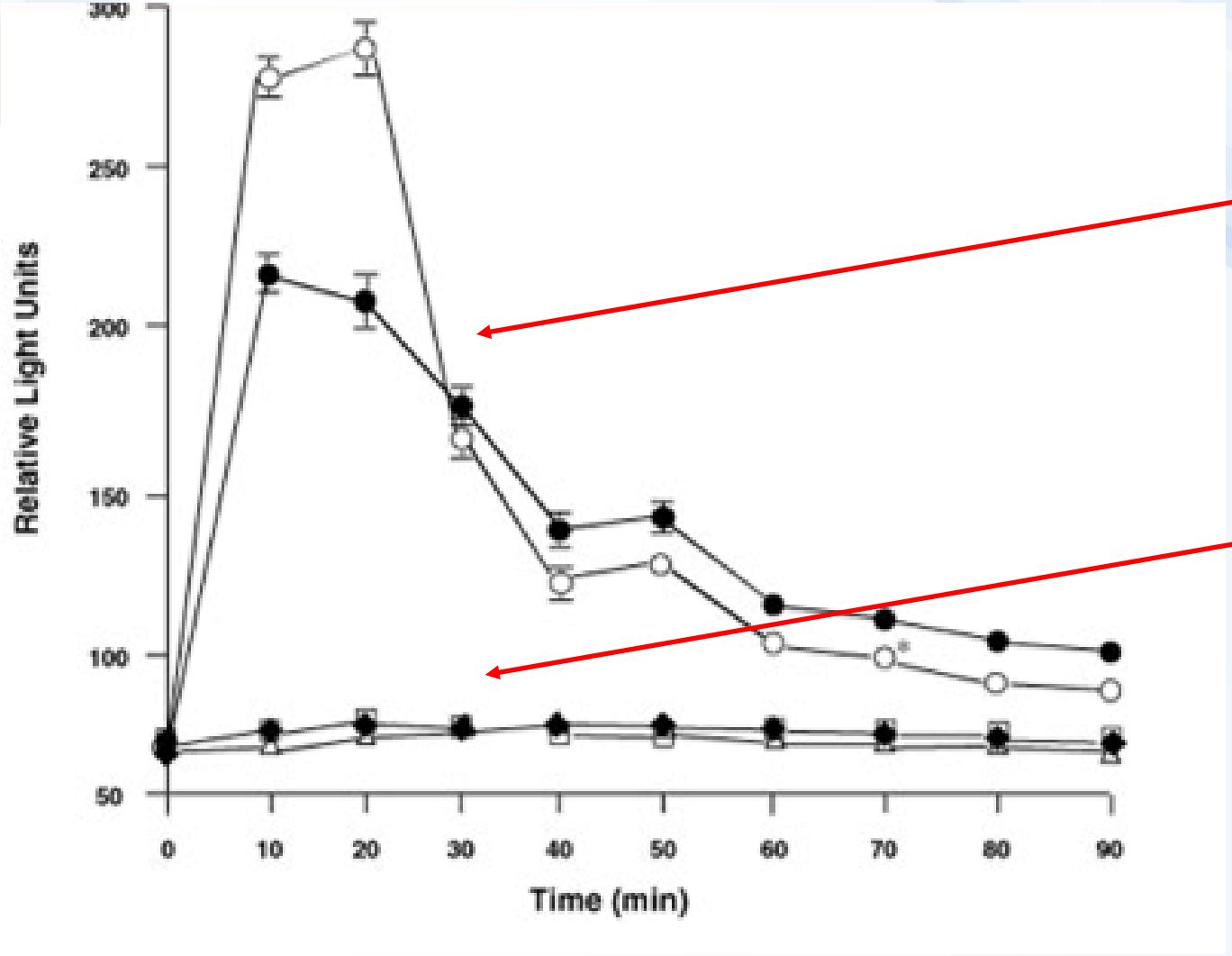
- Stanovení reaktivních radikálů (ROS) po stimulaci
  - krev (nebo bb. ze sleziny)
  - přídavek sondy citlivé na oxidaci (luminol, fluorescein …) + stimulace (LPS …)
  - měření kinetiky luminiscence (luminol) / fluorescence (fluorescein)





Záznam kinetiky oxidačního vzplanutí MF

Vyhodnocení:
Integrál (plocha pod křivkou)



Zdravé MFs

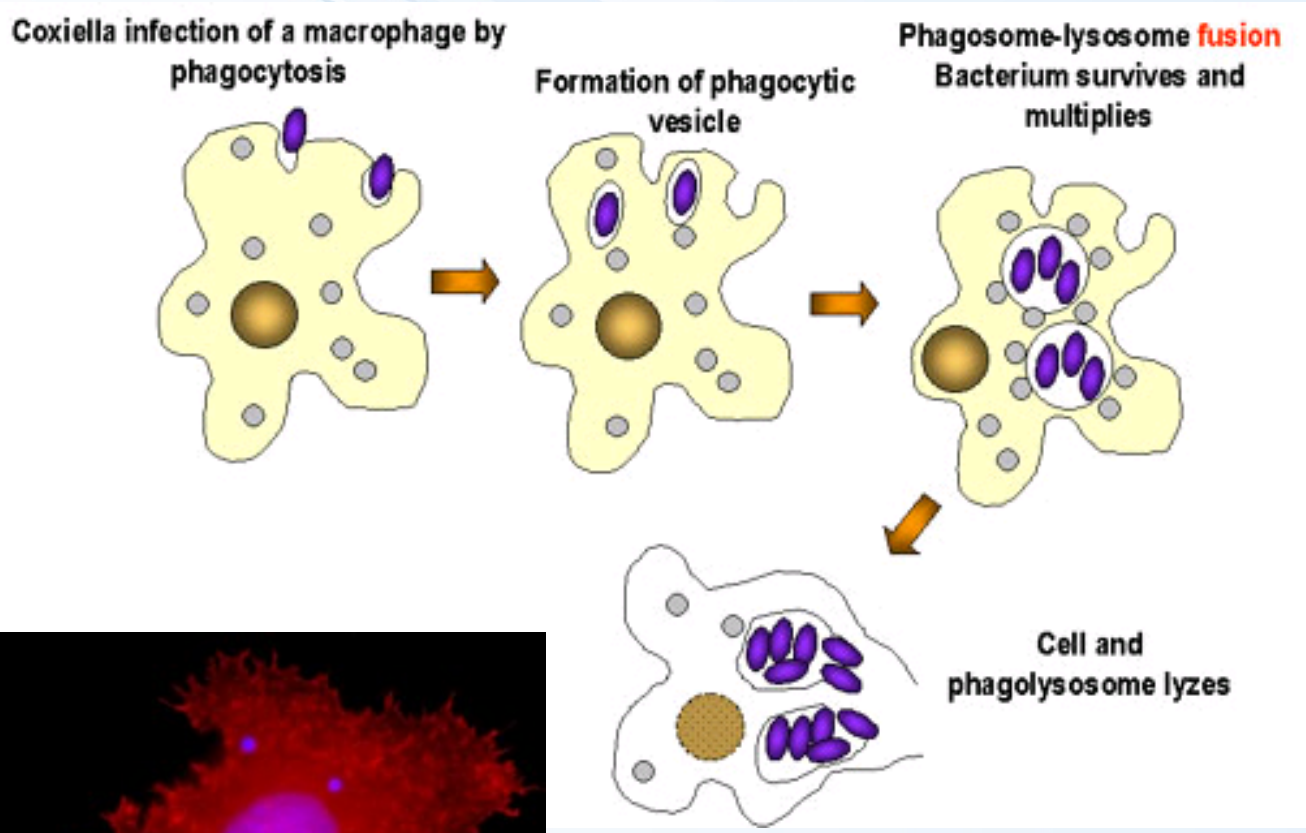
Suprese oxidativního vzplanutí

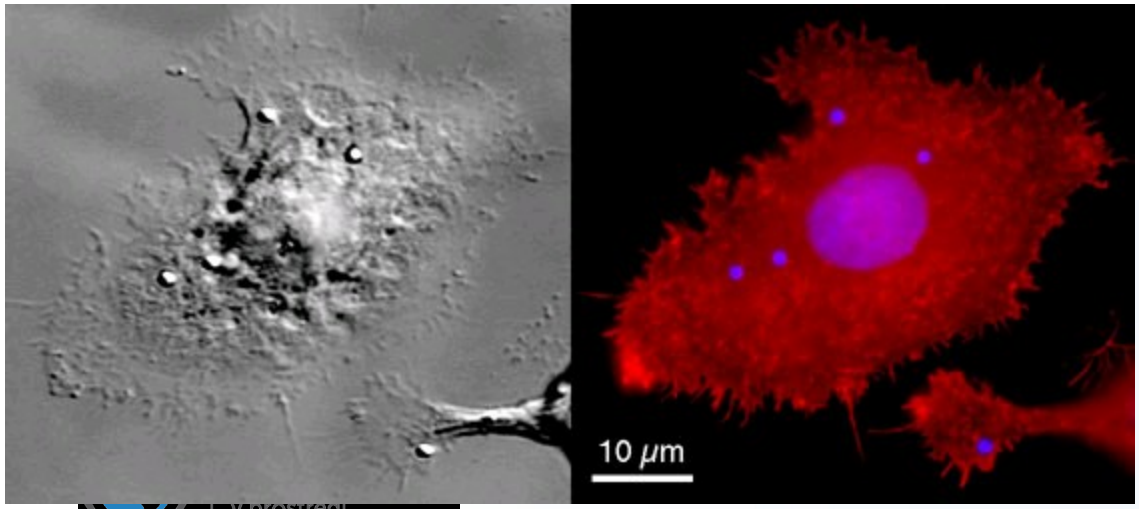
2) In vitro fagocytoza (a likvidace patogena)

- 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

Sledování fagocytozy in vitro



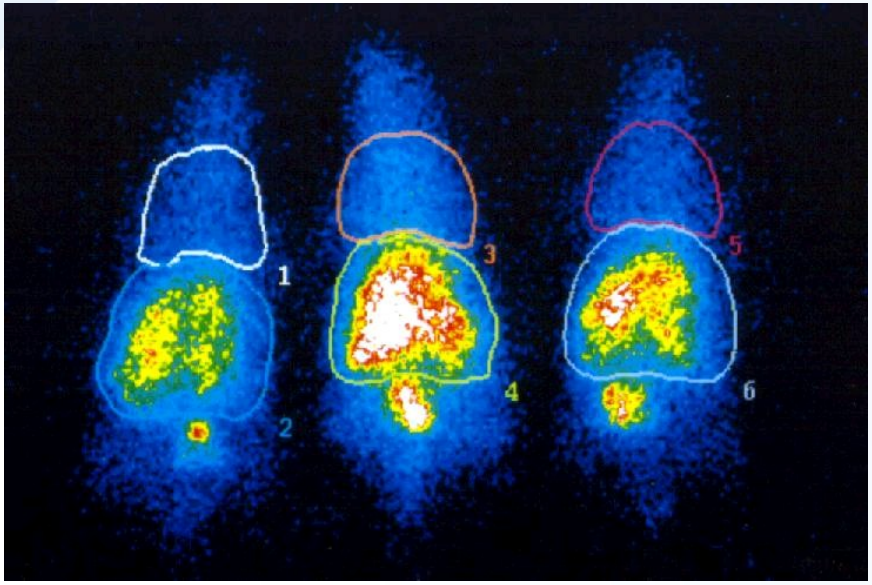


Tier 2 - Sledování funkce NK buněk

1) <u>In vitro likvidace nádoru</u>

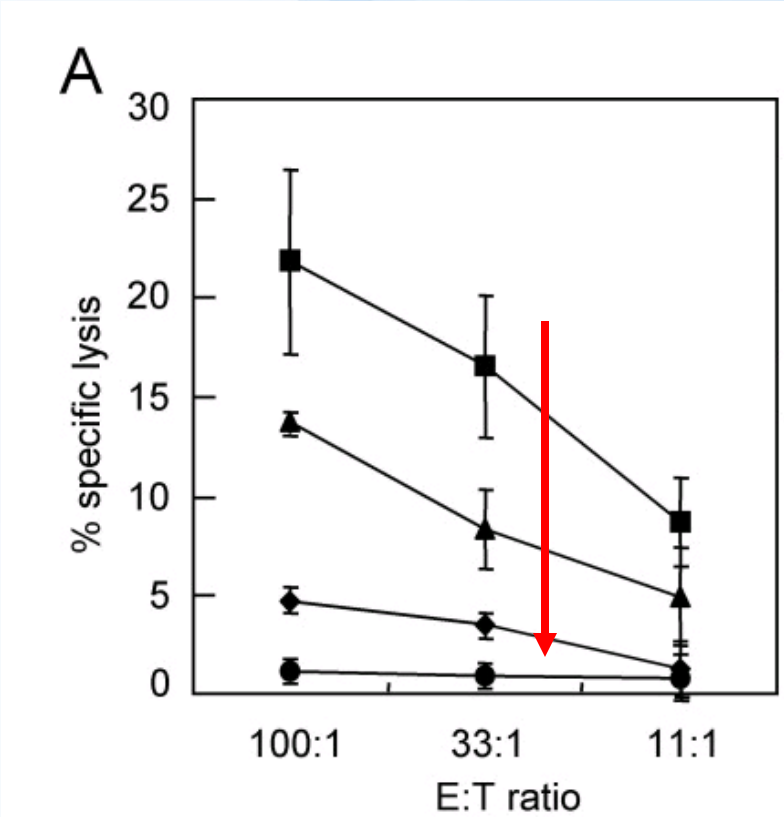
- buněčná nádorová linie YAC-1 (nebo P815, L1210…)
- pre-inkubace nádoru s radioaktivně značeným substrátem $Na_2{}^{51}CrO_4$
  (varianta: fluorescenční značení - méně nebezpečné pro personál, méně citlivé)
- dokonalé odmytí média (radioaktivní jsou jen buňky - nikoliv médium)
- smýchání nádoru s buňkami 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)

Sledování likvidace nádorových buněk



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

Inhibice lýzy YAC-1 po přidání modelové látky



Centrum pro výzkum toxických látek v prostředí

Testy specifické imunity

Hostitelská rezistence

? Projeví se in vivo imunotoxicita pro určitou část IS ?

Modelové patogeny v testech **INFEKČNÍ** rezistence

- Experimentální uspořádání:
  - Expozice látkou (in vivo)
  - Aplikace patogena (! Potenciální nebezpečí pro personál)
  - Sledování odolnosti vůči patogenům

- 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.

Příklad – vliv TCDD na přežití myší po infekci chřipkou

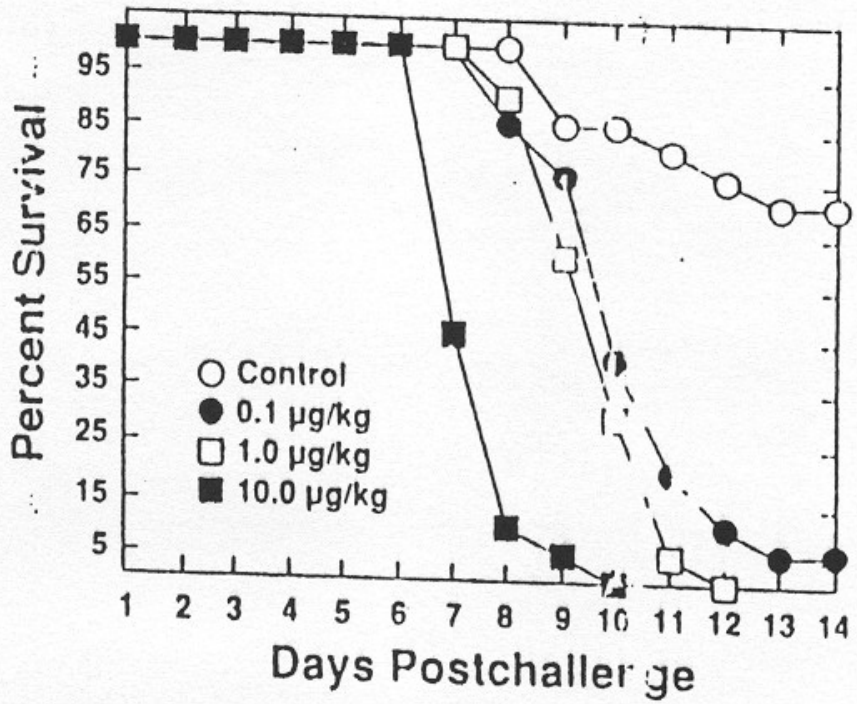
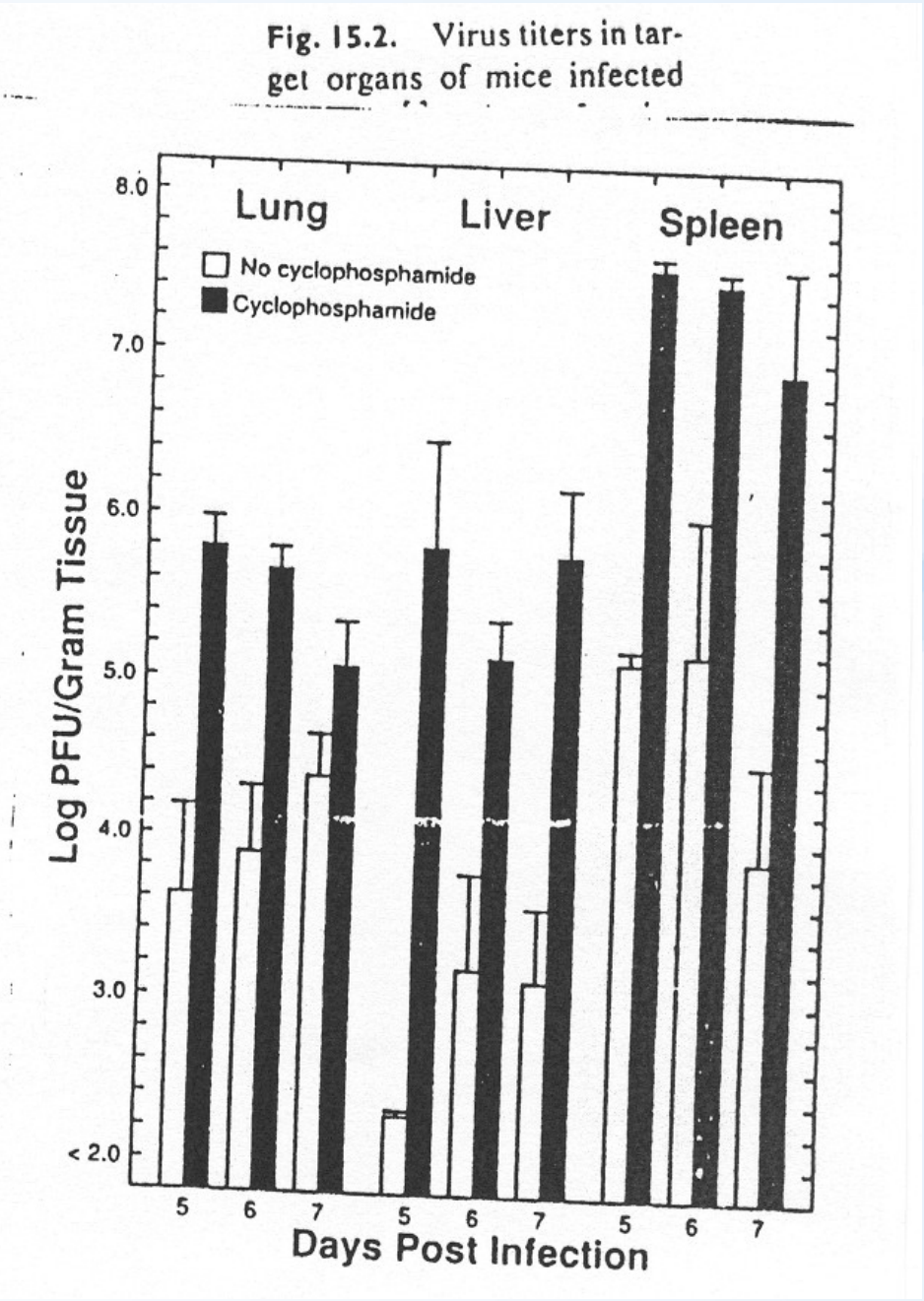


Fig. 14.3. Example of mortality used as an endpoint for mouse-adapted influenza virus A/Taiwan/1/(4 H2N2). TCDD at a single intraperitoneal dose of 0.1, 1.0, or 10.0 µg/kg, challenged 7 days later with influenza virus, resulted in a significant increased mortality for each dose of TCDD. [From J Toxicol Environ Health 31, 263–215. House RV, Lauer LD, Murray MJ, Thomas PT, Ehrlich JP, Burleson GR, Dean JH, Hemisphere Publishing, Taylor and Francis, Washington, DC, Reproduced with permission. All rights reserved.]

Vliv cyklofosfamidu (cytostatikum, karcinogen) na přežívání virů



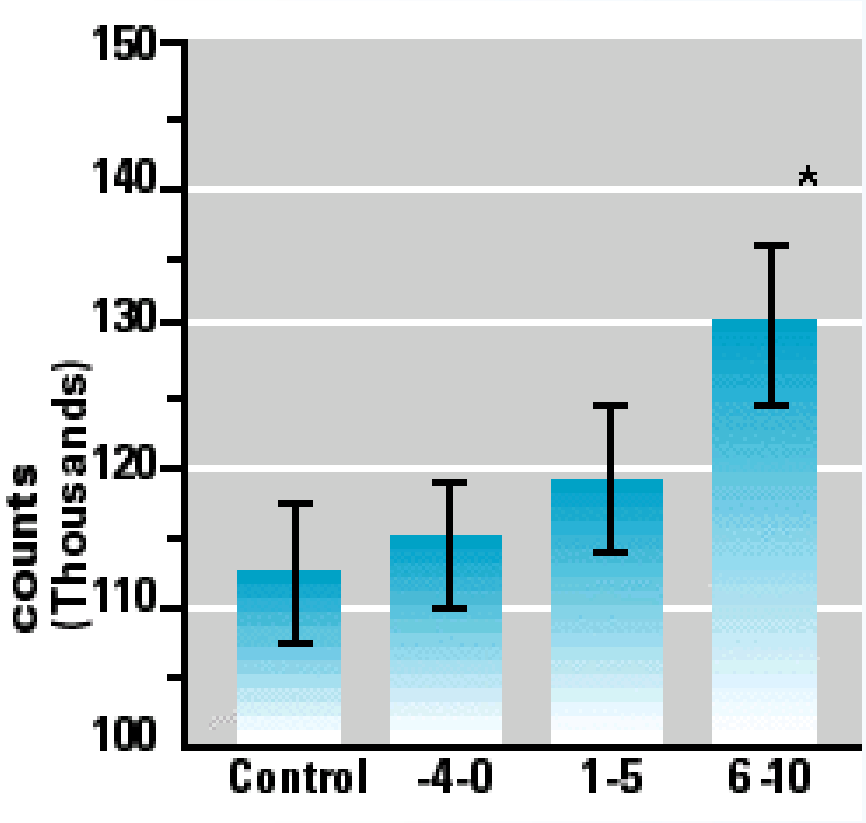
Testování protiparazitární a protinádorové imunity

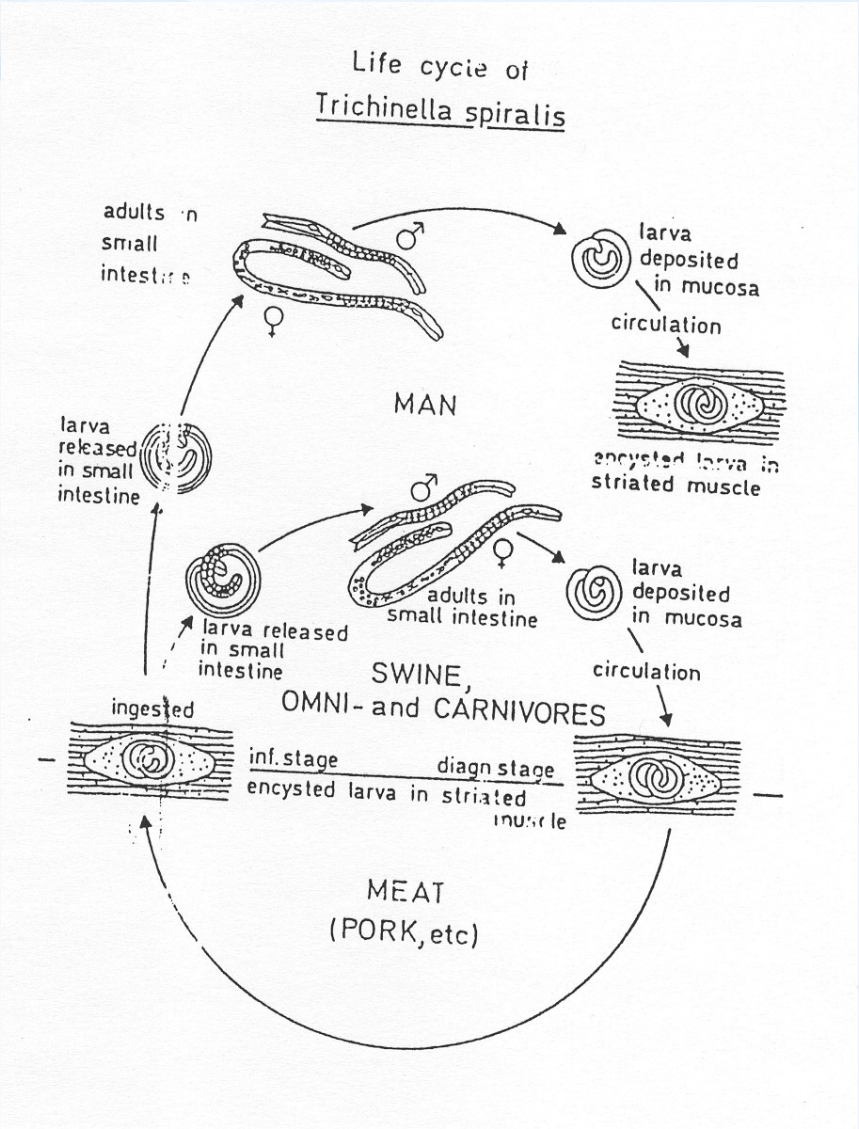
- Likvidace parazitů
  - *Trichinella spiralis*
    - helmint - infekce přes GIT
    - T-buňěčná imunita + eosinofily
  - *Plasmodium yoelli – prvok*
    - malarie (infikuje ERY)
    - likvidace: B-b / T-b / MF

- Likvidace nádorů
  - B16F10 melanoma
    - i.p. injekce nádorů do myší - 21 dnů
    - diseminace na plicích – vyhodnocení makroskopicky
    - likvidace: NK a MF
  - PYB6 sarcoma
    - intramuskulární injekce - zde vývoj nádoru (hodnocení)

Protiparazitární infekce

Počty *T.spiralis*
kultivovaných z infikovaných potkanů
v závislosti na ozařování UV (dny)

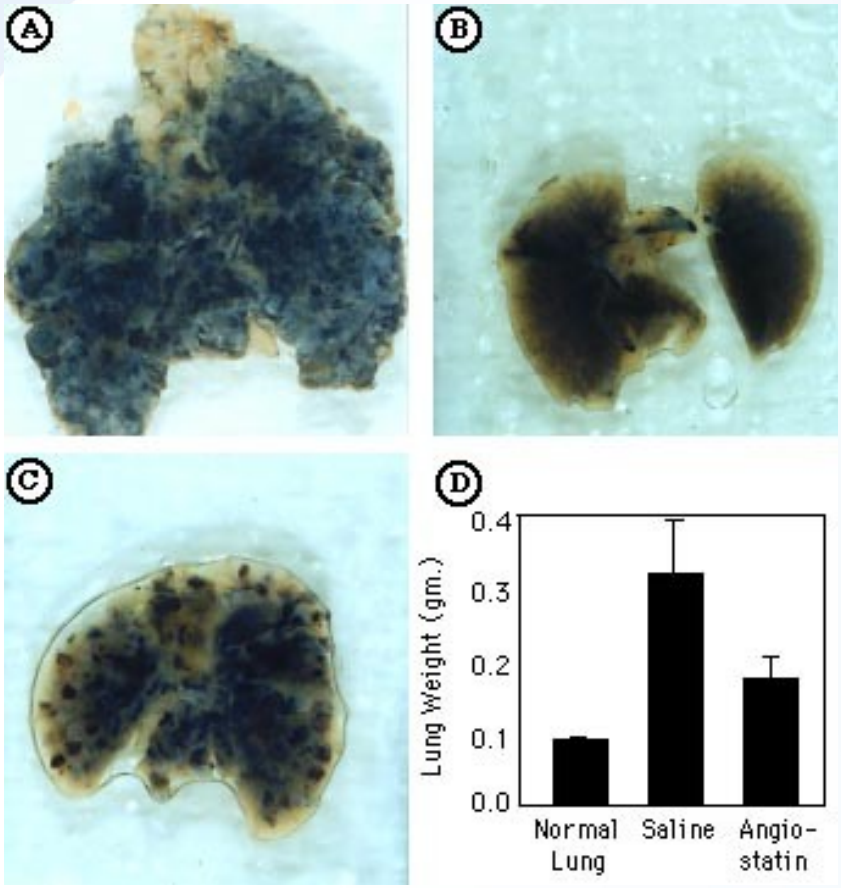




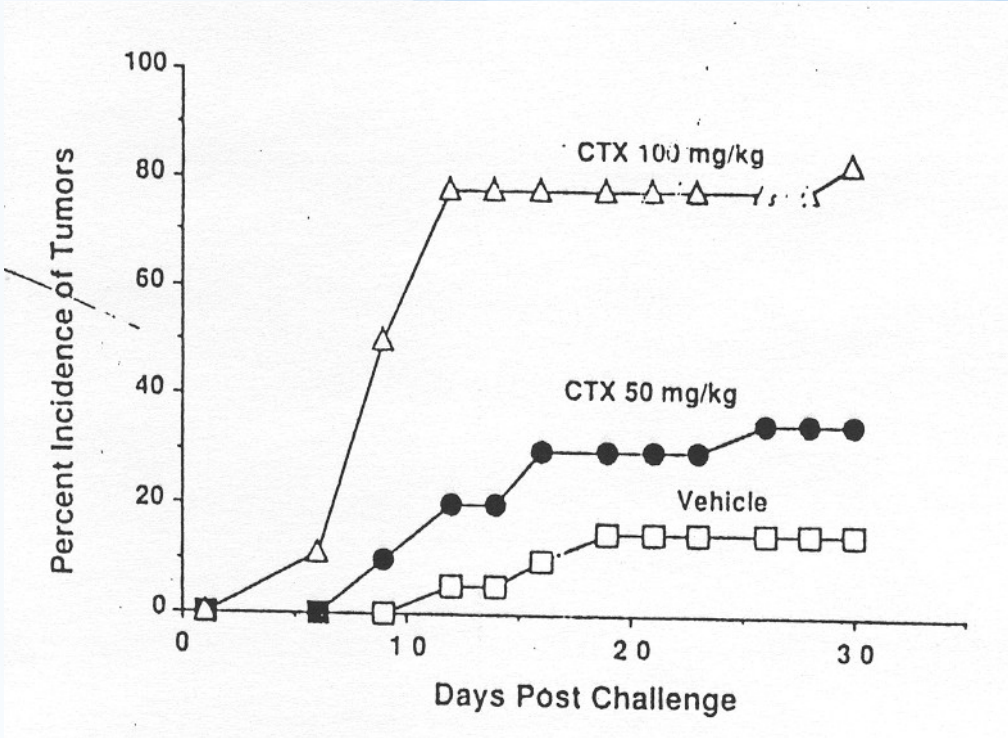
Centrum pro výzkum toxických látek v prostředí

Hodnocení protinádorové imunity

Metastázy B16F10 na plicích myši
Makroskopické hodnocení



Efekt cyklofosfamidu
→ Výskyt nádorů po aplikaci PYB6



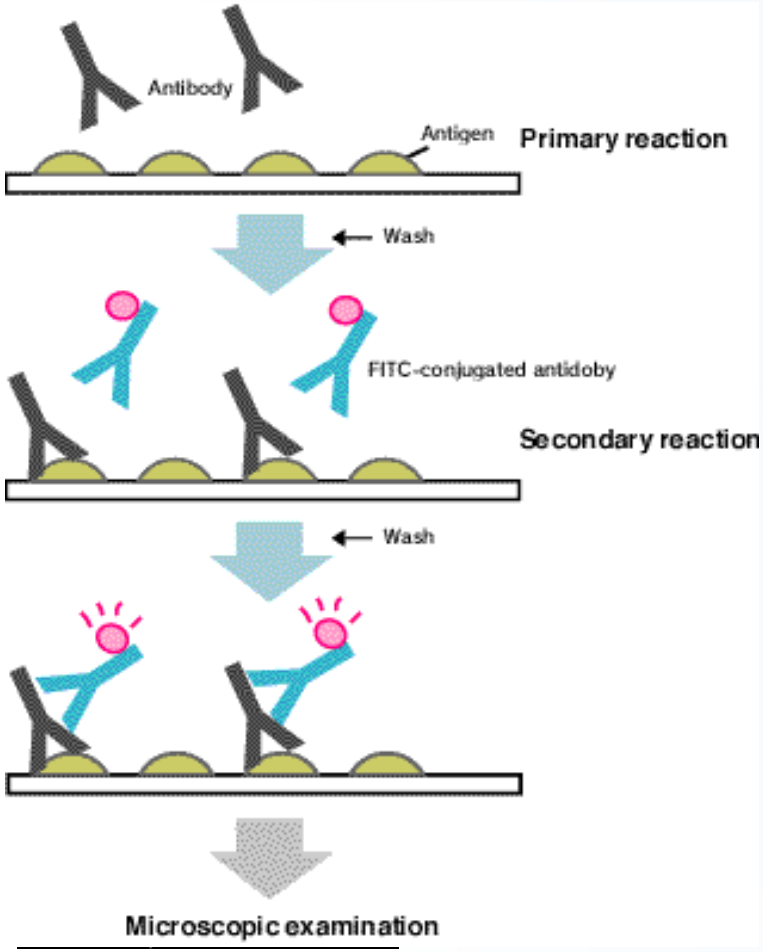
Centrum pro výzkum toxických látek v prostředí

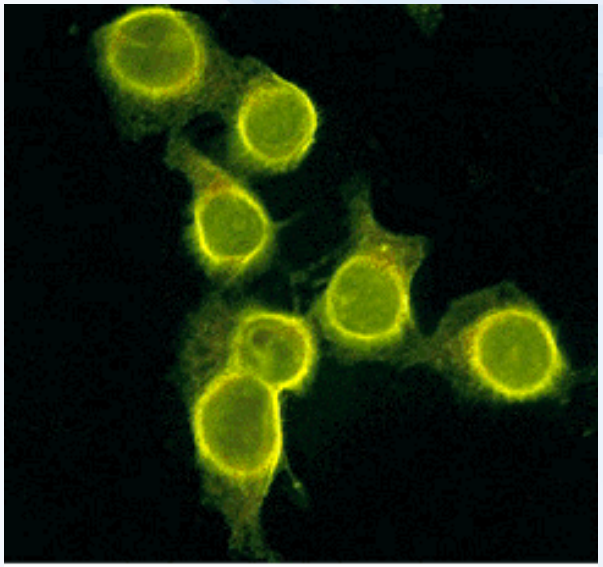
Testy hypersensitivity a autoimunity

Průkaz autoimunity – ANA protilátky

Průkaz proti-jaderných protilátek (ANA)

- lidské buňky fixované na mikroskopickém skle
- přidání séra (pokud obsahuje ANA, naváží se …)
- následná vizualizace (fluoresceinem-značené protilátky)



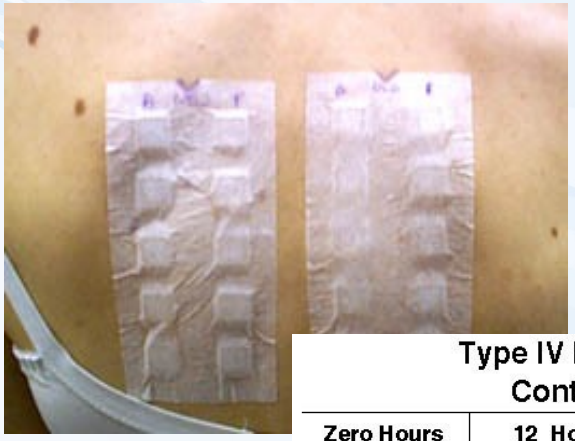


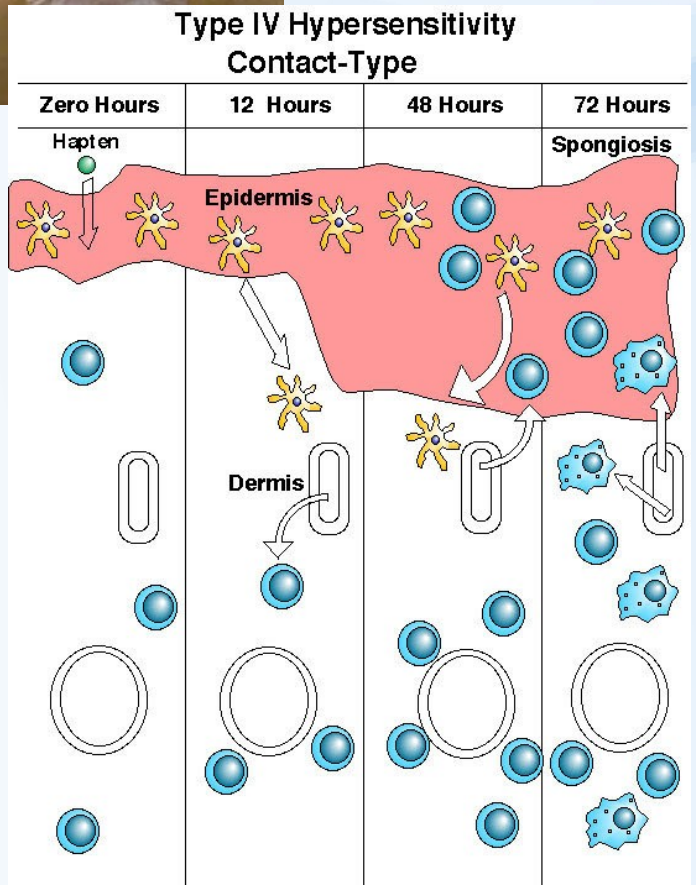
Antinuclear fluorescent antibody stain

Kontaktní dermatitida

Kontaktní hypersensitivita

Průkaz DTH reakce
→ aplikace Ag na kůži
→ po delší době zarudnutí





„DTH" test (delayed type hypersensitivity)

viz také
MEST - Mouse Ear Swelling Test

Centrum pro výzkum toxických látek v prostředí

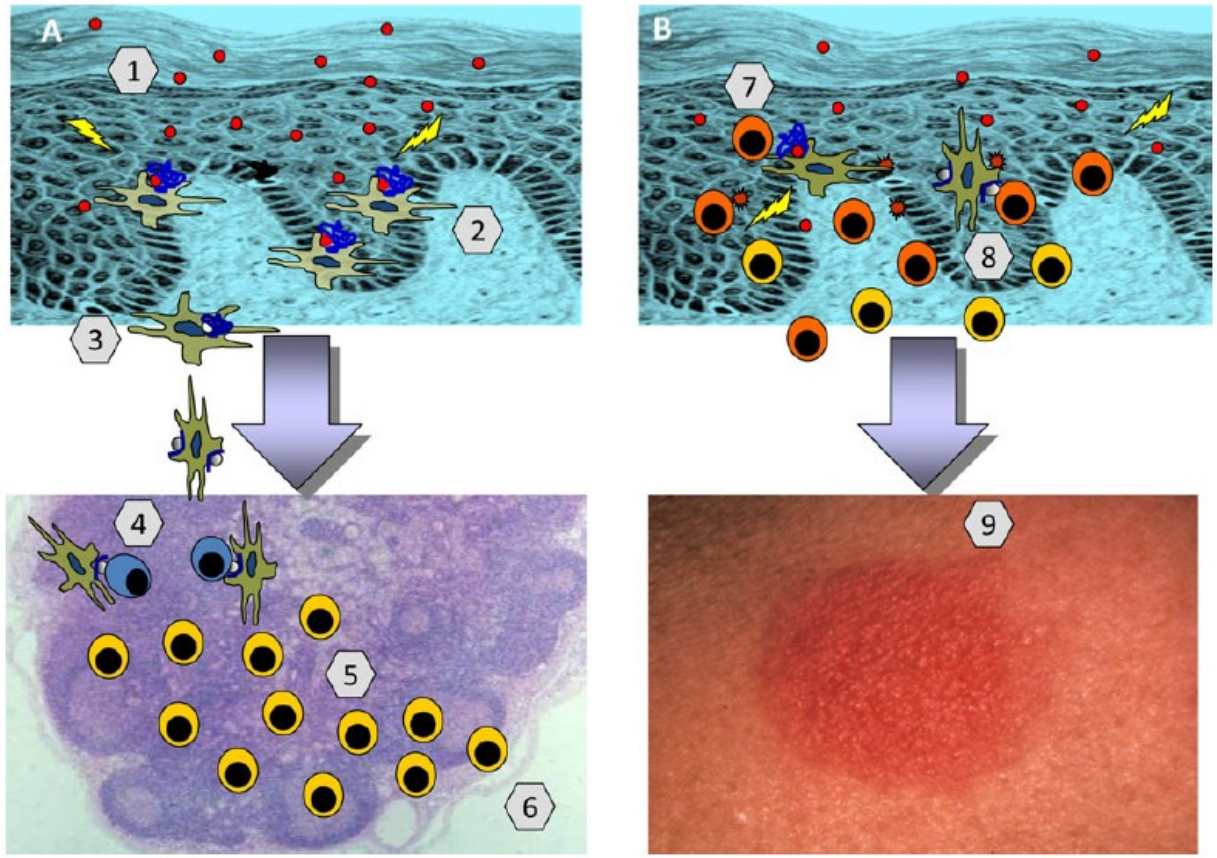


FIG. 2. The induction phase of skin sensitization (A). Chemical allergens gain access to the viable epidermis and associate in stable fashion with protein (1). There is the local release of various proinflammatory cytokines and other ''danger signals'' that are required to support immune activation and the engagement of DC (2). LC (and other cutaneous DC) are activated and recognize, internalize, and process haptenated protein. These cells transport antigen from the skin to draining lymph nodes, via the afferent lymphatics, during which time they become activated and differentiate into mature, antigen-presenting cells (3). Haptenated peptides are presented to naive, antigen-responsive T lymphocytes (4). The antigen-driven activation of responsive cells is associated with rapid turnover and selective clonal expansion of antigen-specific T lymphocytes (5). The expanded population of primed antigen-specific T lymphocytes (effector and memory T lymphocytes) disseminates into the peripheral circulation (6). At this point, sensitization has been acquired. The elicitation of ACD (B). Elicitation is triggered by exposure of the now-sensitized subject, at the same or a different skin site, to the same chemical allergen (7). Allergen-specific T lymphocytes accumulate at the site of encounter with the chemical (8). T lymphocytes become activated and are stimulated to release cytokines, chemokines, and other inflammatory mediators that act in concert to draw in other leukocytes and drive the cutaneous inflammatory reaction that is characterized by erythema, edema, and visiculation and that is recognized clinically as ACD (9).

MEST test

- 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)
- Interpretace
  - Test funkčnosti Tc buněk – T-závislé Ag (ovalbumin, tuberculin, Listeria)
  - Test „DTH" – aplikace potenciálního sensitizéru

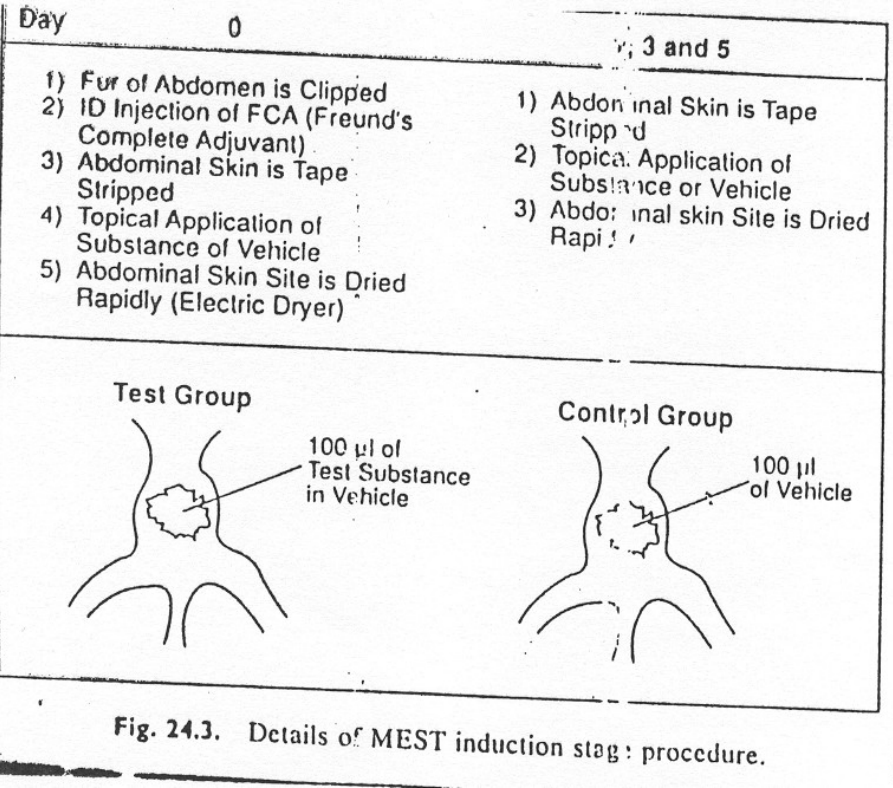


Fig. 24.3. Details of MEST induction stage procedure.

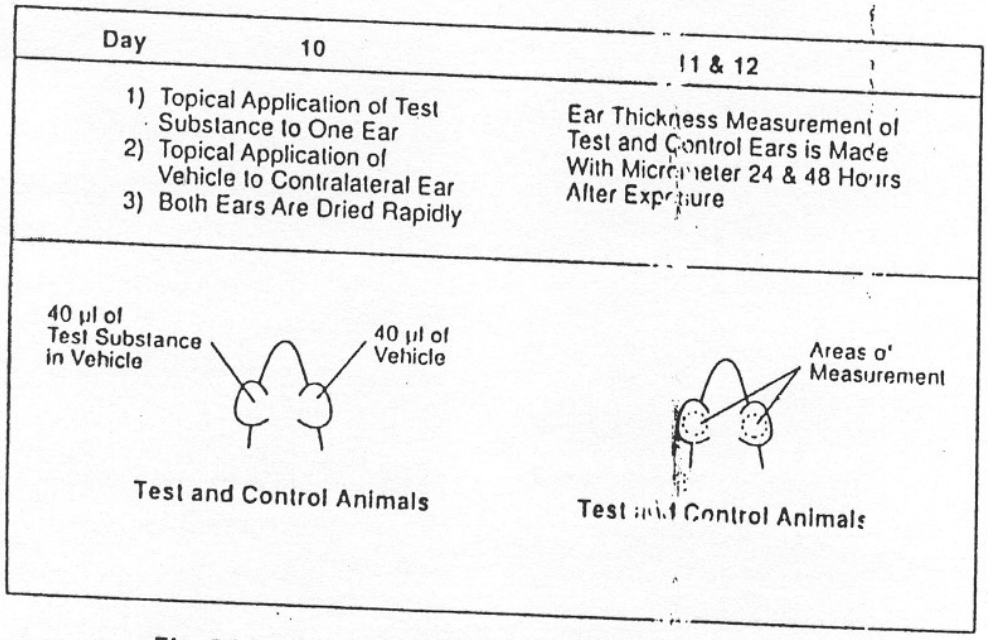


Fig. 24.1. Details of MEST challenge stage procedure.

Test stimulace v lokálních uzlinách – LLNA

- Stimulace v lokálních uzlinách (myši)
- Local Lymph Node (LLN) Assay

- Opakovaná i.d. injekce látky (za uši) 5 dní
- Následně i.v. injekce ^{3}H-Thy - 5 h expozice
- Usmrcení
- Izolace lokálních (krčních) uzlin

- Vyhodnocení hmotnost uzliny
  - proliferace buněk z uzliny in vitro = stanovení radioaktivity v uzlině (proliferace T-buněk)

The mouse local lymph node assay (LLNA)

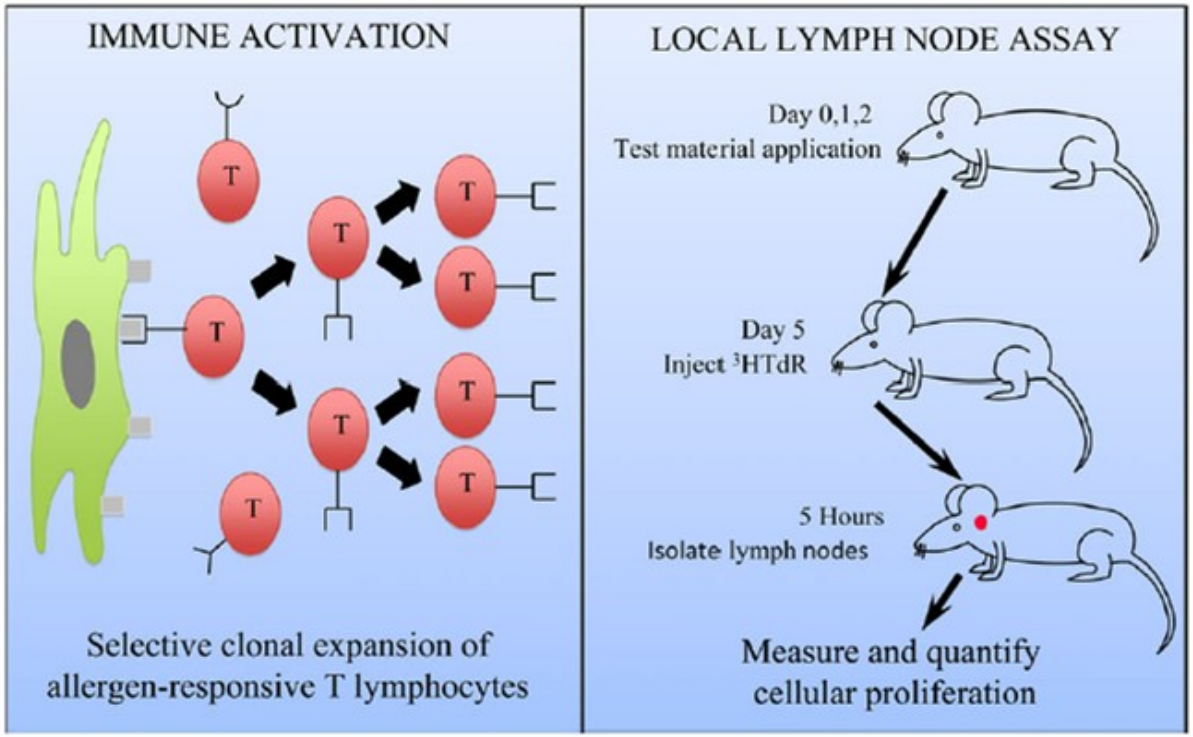


FIG. 6. The murine LLNA. Left box. The immune activation and clonal expansion of allergen-reactive T lymphocytes in skin-draining lymph nodes; the immunological event upon which the LLNA is based. Right box. The basic LLNA protocol. Groups of CBA strain mice receive a topical application on the dorsum of both ears of various concentrations of the test chemical or an equal volume of the vehicle alone. Treatment is repeated daily for 3 consecutive days. Five days following the initiation of exposure, mice are injected (iv) with a source of ^{3}H-TdR. Mice are sacrificed 5 h later and the draining auricular lymph nodes excised and processed for β scintillation counting.

Vyhodnocení imunotoxikologických experimentů

Hledání ovlivněné části IS

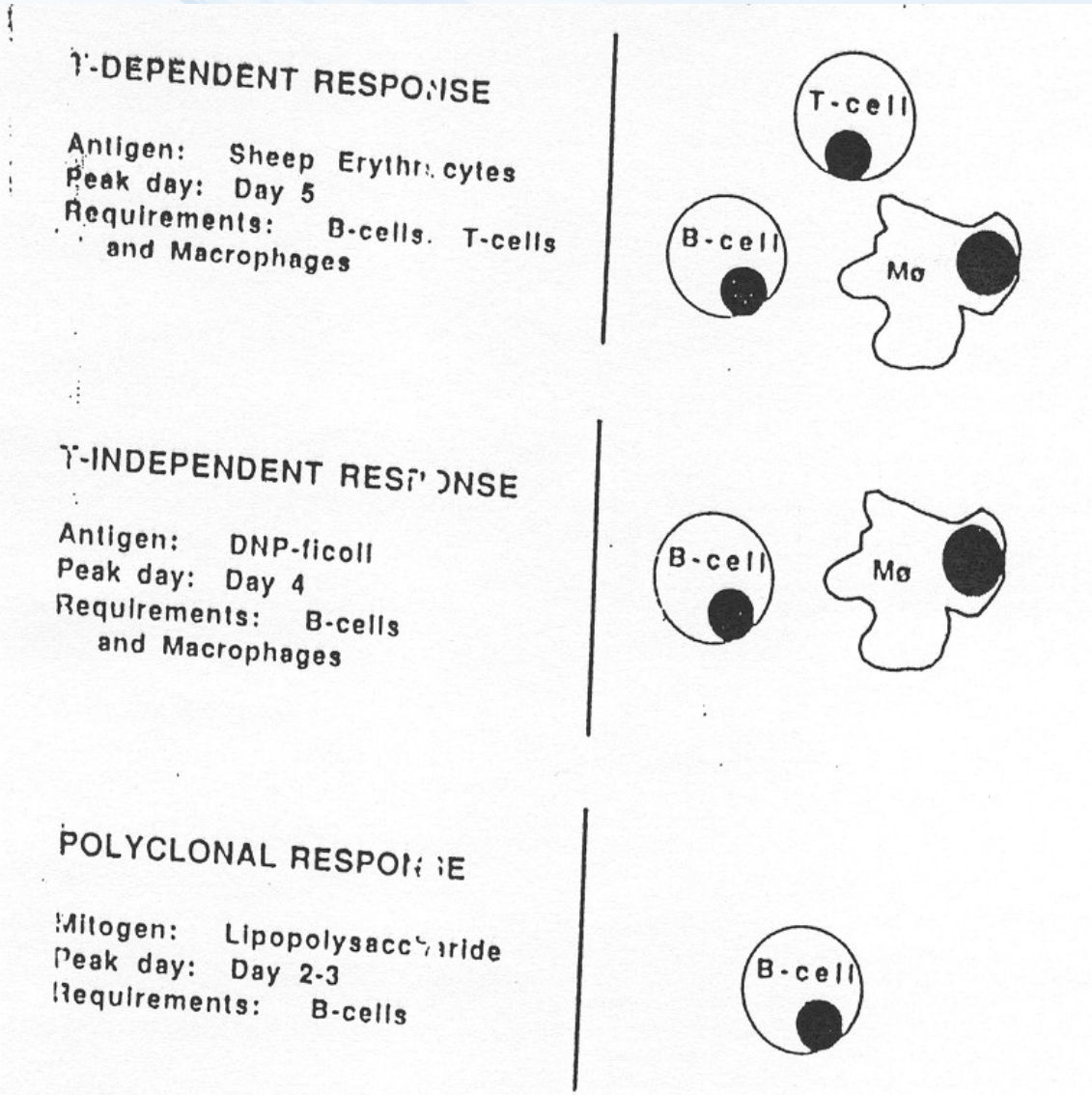
Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

Různé typy antigenů – zapojení různých složek IS

- T-závislé
  - př. SRBC
- T-nezávislé
  - DNP-Ficol (=dinitrofenyl-ficoll)
  - LPS

- Exper. design:
  - 1) působení toxické látky
  - 2) podání modelových Ag

- Kombinace různých Ag
  →reakce různých složek IS



Centrum pro výzkum toxických látek v prostředí

Příklad – tetrachlormetan → „selektivní toxicita“ pro T-bb.

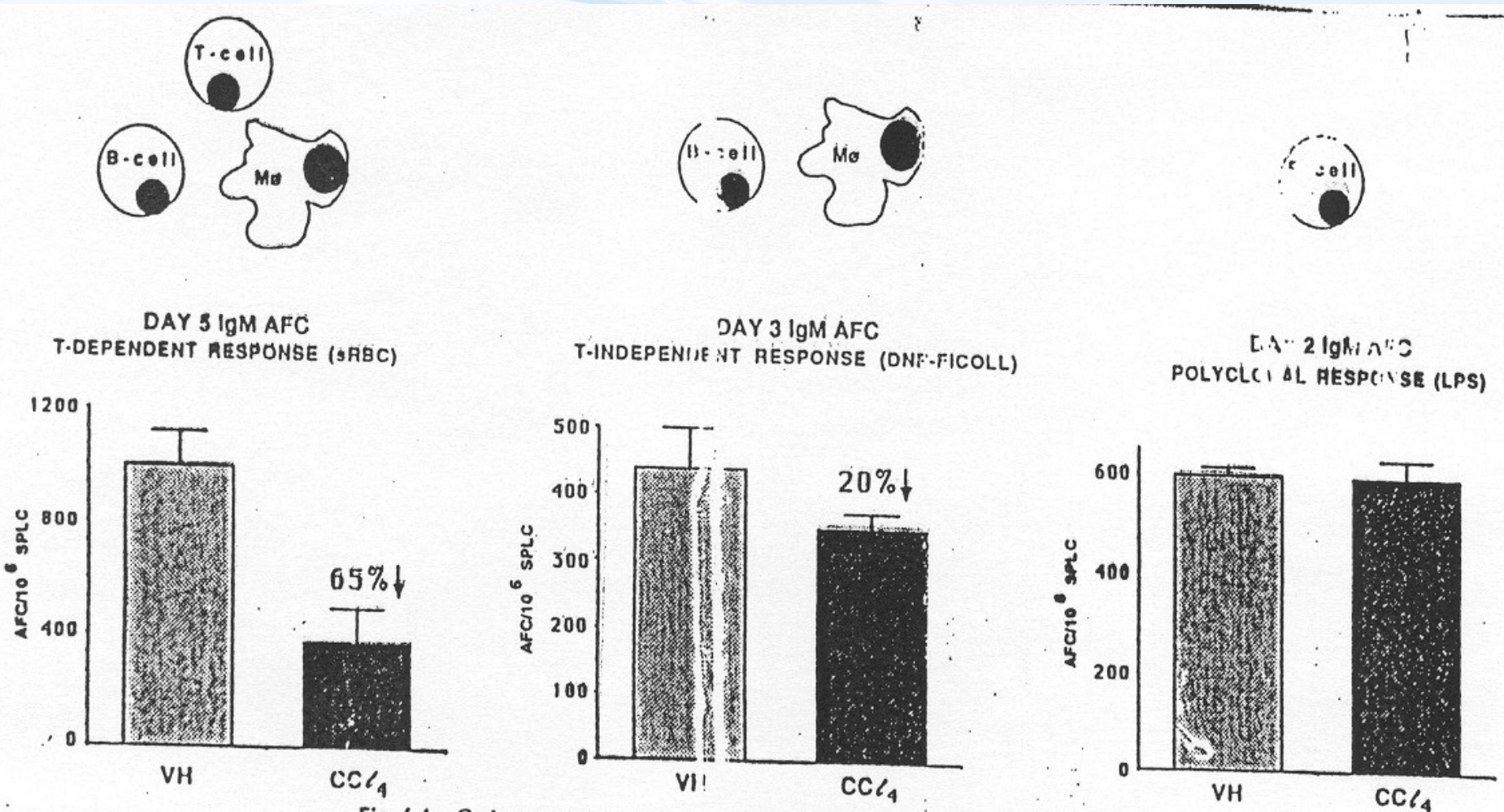


Fig. 6.4. Carbon tetrachloride (CC ... *In vitro* IgM antibody-forming cell responses.

Centrum pro výzkum toxických látek v prostředí

Příklad - casein – toxicita pro T-buňky a Makrofagy

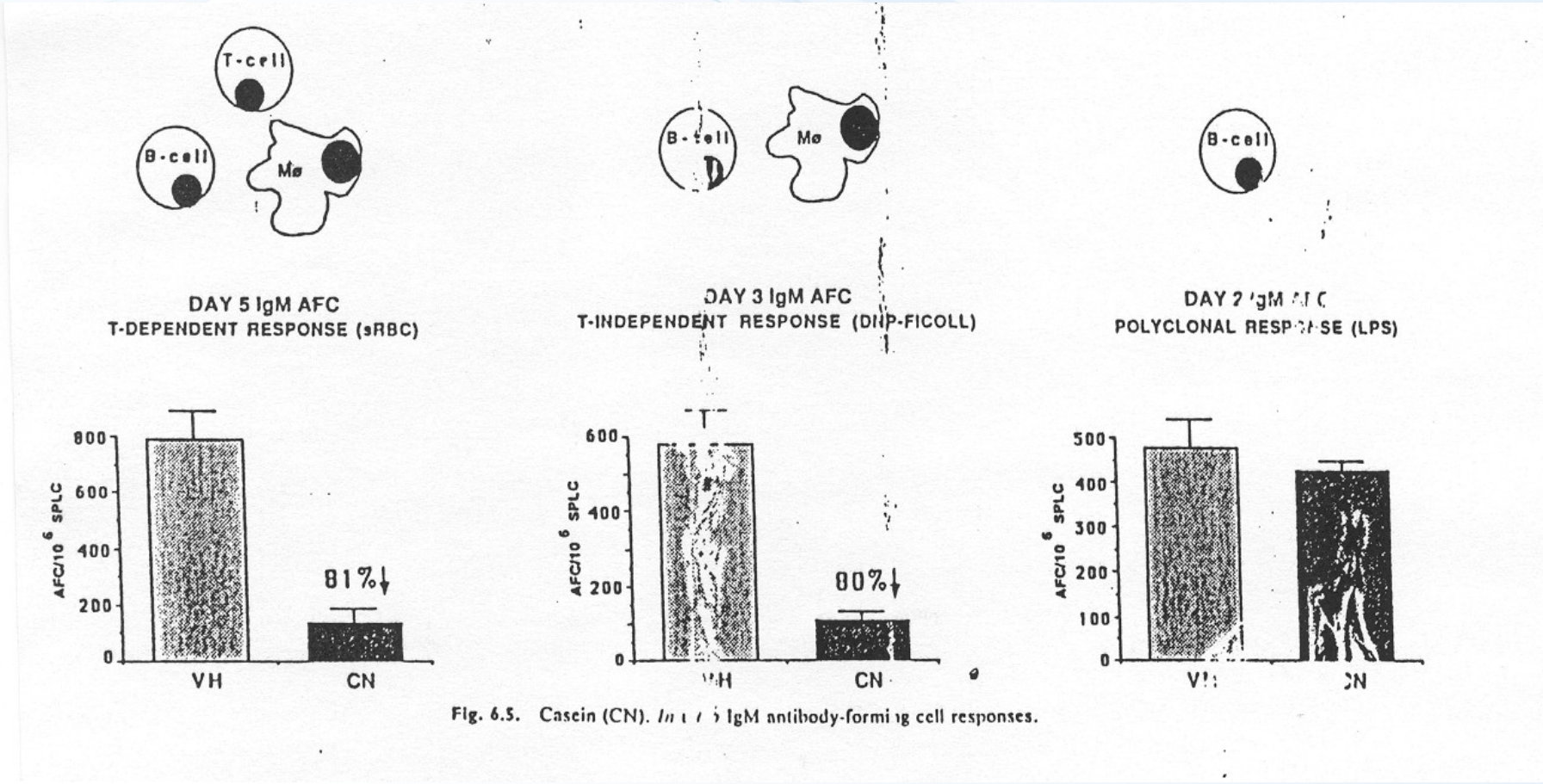


Fig. 6.5. Casein (CN). In vivo IgM antibody-forming cell responses.

Příklad TCCD - toxicita zejména pro B-buňky

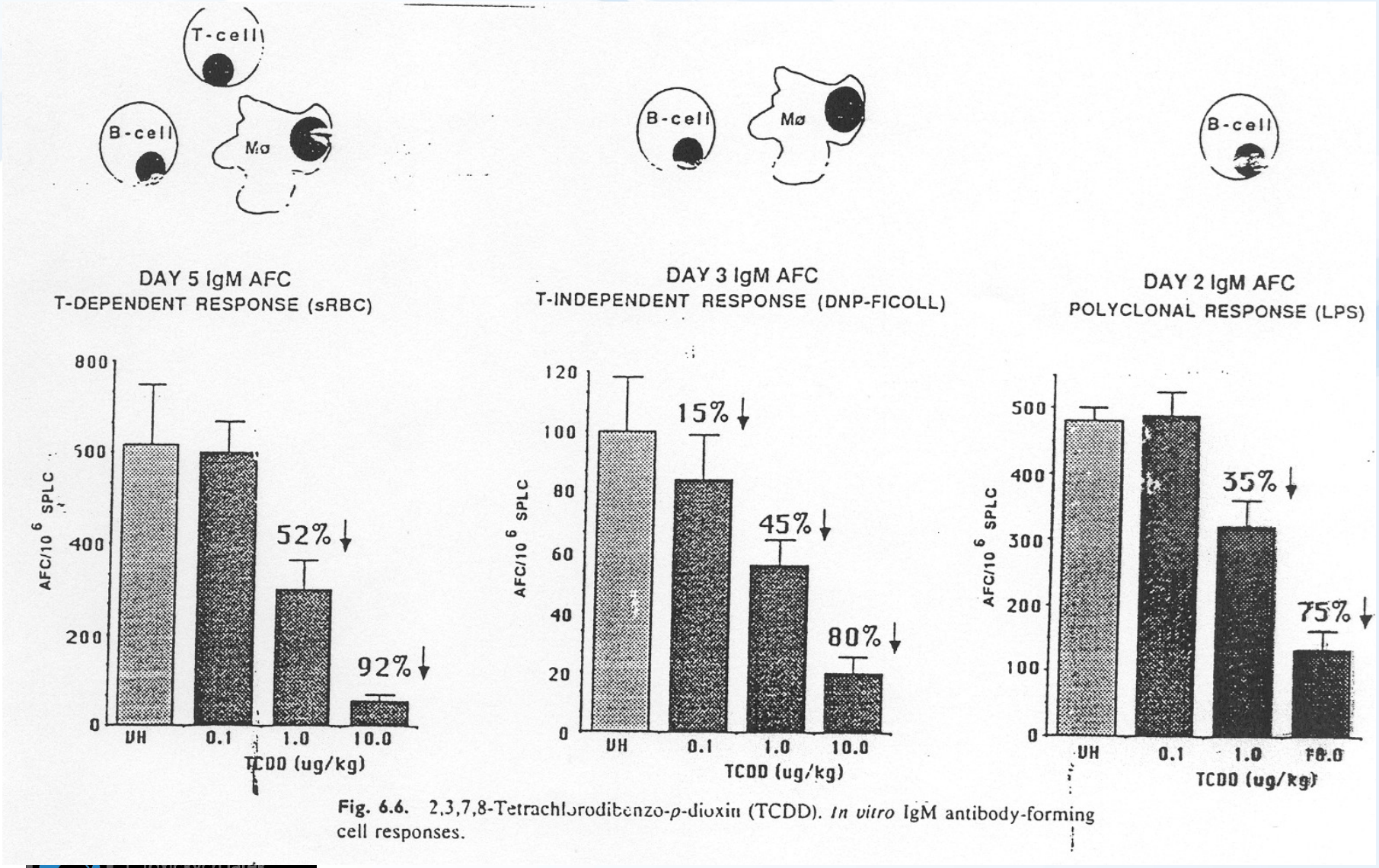
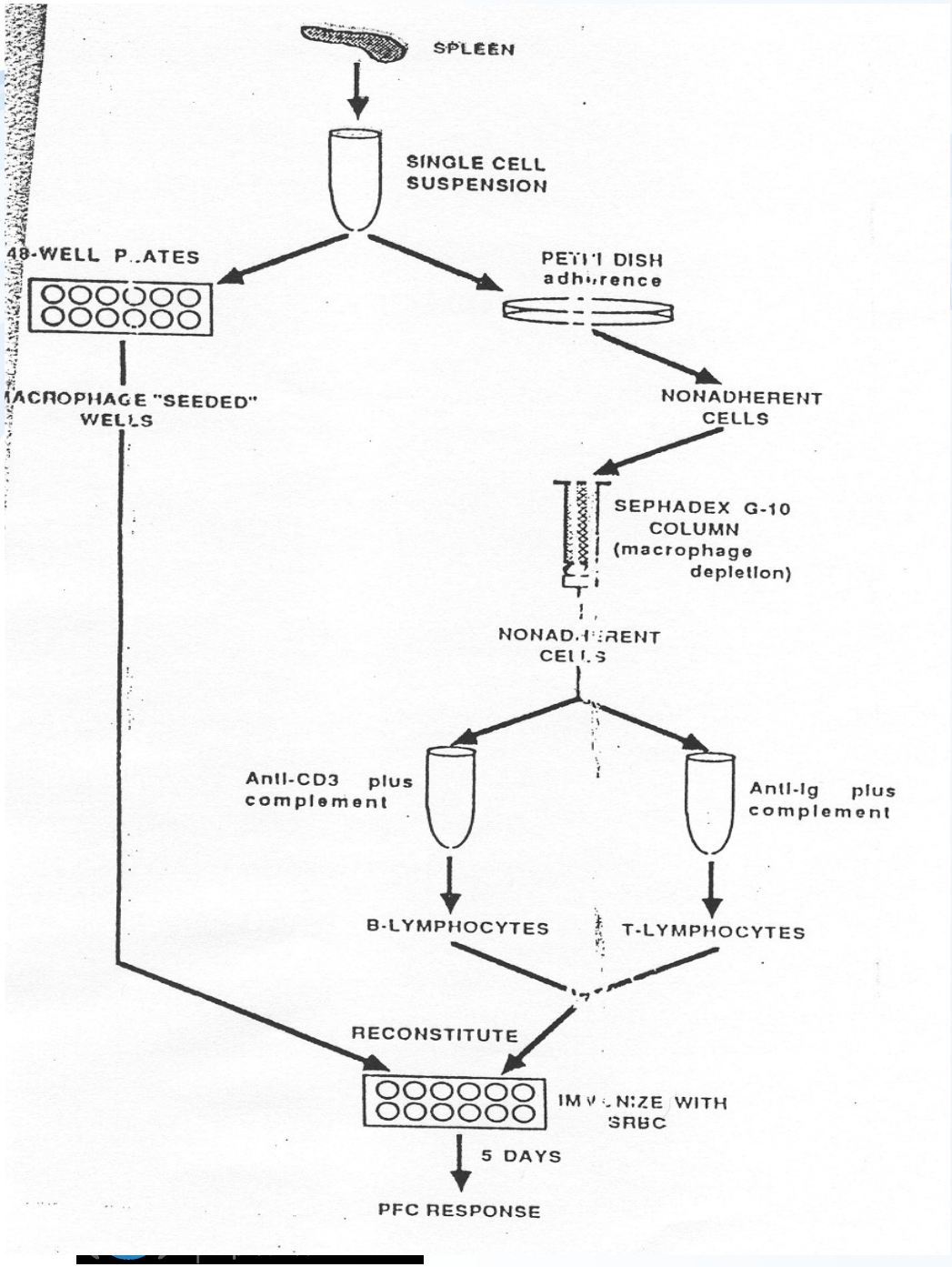


Fig. 6.6. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD). *In vitro* IgM antibody-forming cell responses.

In vitro možnosti studia vlivu xenobiotik na IS

- 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
- ½ lyza T-buněk
- ½ lyza B-buněk

4) oddělené expozice cizorodé látce

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

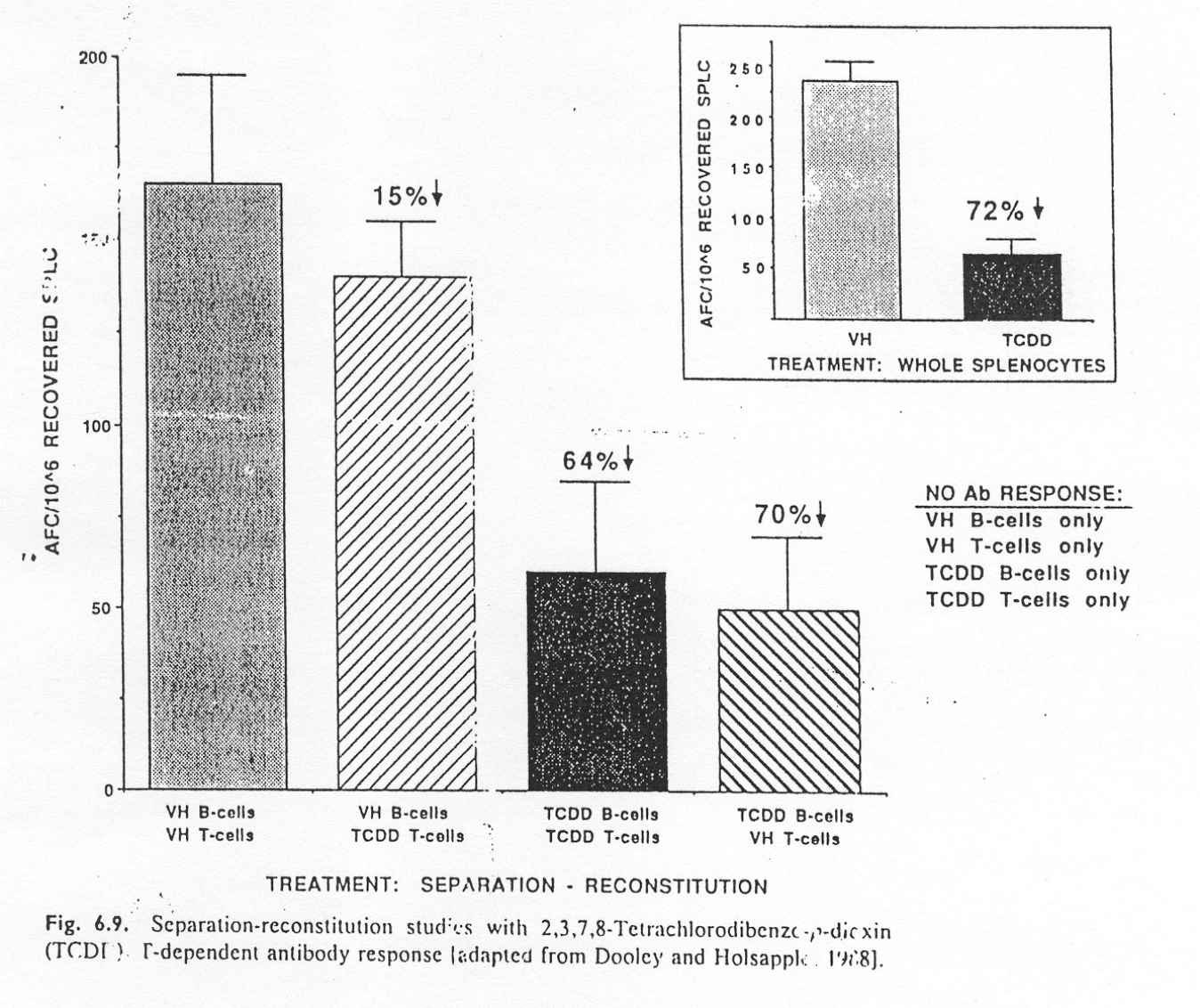


Fig. 6.9. Separation-reconstitution studies with 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). T-dependent antibody response [adapted from Dooley and Holsapple, 1988].

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

Centrum pro výzkum toxických látek v prostředí