



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

IMUNOTOXIKOLOGIE – metody 1

Luděk Bláha

blaha@recetox.muni.cz

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



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Imunotoxicita = narušení rovnováhy fungování IS

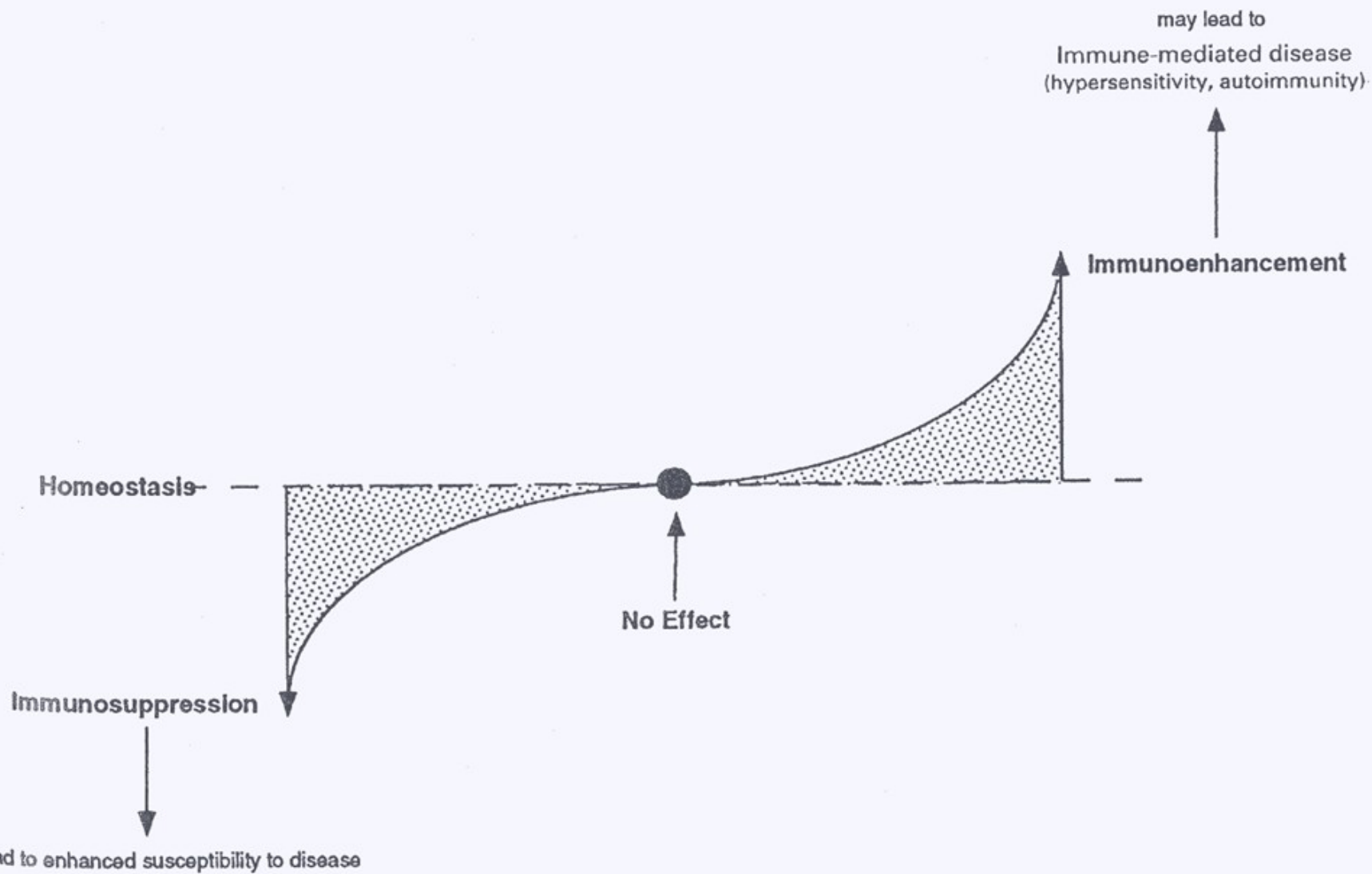


Figure 12-1. Potential consequences of immunomodulation.

Příčiny imunotoxicity / imunomodulací

- 1) Genetická fixace
 - 2) Vliv prostředí
 - získané během života
 - Zahrnují i chemické vlivy – předmět imunotoxikologie
- Důsledky imunomodulací (imunotoxicity)
 - porušení proti-infekční a proti-nádorové ochrany
 - neschopnost reagovat na vakcíny
 - imunopatologie (autoimunita, hypersensitivity)
 - Imunomodulační faktory mohou působit ...
 - přímo na buňky I.S.
 - na jiné buňky, které modulují I.S. (neuroendokrinní řízení)



Primární imunodeficiency

- PRIMÁRNÍ = genetická fixace
 - často vázané na X-chromozom (více ohrožení 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 jedinců se SCID



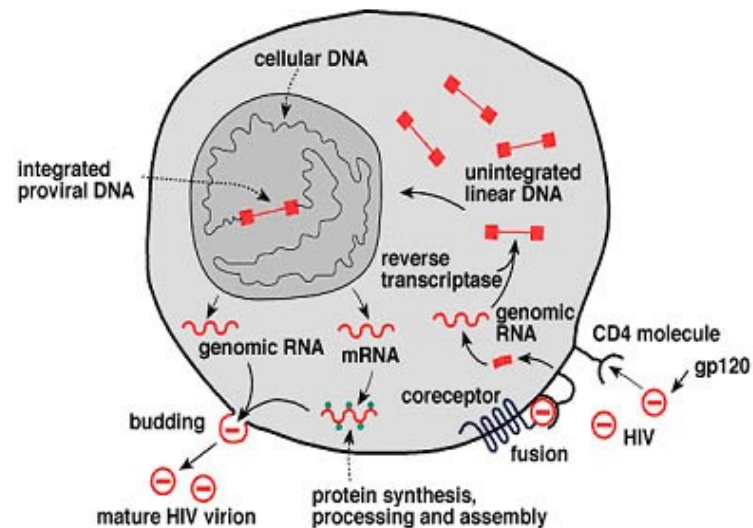
Sekundární imunodeficecence

- Řada faktorů během života
 - metabolismus a výživa
 - záření (včetně slunečního)
 - Věk
 - poranění (např. popáleniny)
 - chronické infekce
 - chemické látky
 - stres - *spojení s hormonálním řízením*

• AIDS

- způsoben retroviry - HIV-1, HIV-2
- integrace do genomu
- infikuje CD4+ T-b a některé APC
- důsledky: selhání IS
 - smrt v důsledku oportunních infekcí
 - neobvyklé nádory

Replication Cycle of HIV



Imunotoxikologie

- **Část toxikologie**
 - Základní princip: „Každá látka je toxická - o toxicitě rozhoduje jen dávka“
- **Cizorodá látka**
 - vstupuje do těla, kde prodělává řadu dějů, které ovlivňují výslednou „dávku“
- **Toxikokinetika**
 - Popisuje příjem, distribuce, metabolismus, vylučování látky v organismu
 - Závisí na povaze látek (velké x malé, hydro- filní x fobní ...)
- **Toxikodynamika**
 - Popisuje mechanismy interakce látek s „receptory“ (tj. cílovými místy)
 - Receptor v toxikodynamice – jakákoliv biologicky významná molekula
 - protein, NK, fosfolipid
 - jedna látka může mít více mechanismů toxicity
 - O tom, který mechanismus převáží rozhoduje toxikokinetika (tj. výsledná koncentrace v místě reakce a přítomnost „receptorů“)
 - **Příklady toxikodynamických reakcí v imunotoxikologii**
 - Přímá chemická reakce látky s MHC → vede k strukturní modifikaci MHC → imunomodulace
 - Nekovalentní vazba na receptor AhR v brzlíku → aktivaci AhR → apoptóza brzlíku

Jak lze prokázat, že látka působí imunotoxicky ?

- **1) Epidemiologické studie**

(+) vysoká informační hodnota - studie s populacemi lidí

(-) nákladné, velká přirozená variabilita
- řada kovariant (slunce, léky, stres ...)

- imunotoxicita byla epidemiologicky prokázána pouze pro několik málo skupin látek

- dioxiny (PCDD/Fs) a polychlorované bifenyly (PCBs)
- Azbest
- Olovo
- Některé pesticidy



Jak lze prokázat, že látka působí imunotoxicky ?

• 2) Laboratorní studie

- (+) lepší definice, nízká variabilita experimentů
lze hodnotit velké množství parametrů I.S. současně
prostudována řada chemických látek
- (-) výsledky „jen“ z laboratorních zvířat
„nejednotné“ efekty v různých vědeckých studiích
(*různé dávky, různé doby expozice ...*)



Cíle imunotoxikologických studií ?

? Poznání

- vědecká práce imunotoxikologů
- studie řady látek, různí vědci - různé experimentální přístupy
- Poznávání základních informací o možném účinku na IS

? Posouzení skutečných **RIZIKA** pro lidi, zvířata

- Co je riziko? (nebezpečnost vs. riziko)
 - Riziko = pravděpodobnost, že se projeví nebezpečná vlastnost
- látka zabíjí T-buňky = nebezpečnost
- látka je skutečně přítomna v toxické koncentraci = riziko
- Pokud existuje riziko
 - praktické a ekonomické dopady (řízení rizika): zákaz výroby ...
 - potřeba standardizovaných protokolů pro hodnocení toxicity (imunotoxicity): viz dále

Standardizace hodnocení imunotoxicity

- NEEEXISTUJE jednoznačné a komplexní nadnárodní doporučení nebo standard (OECD, ISO)
- Různé postupy/návody pro různé skupiny chemických látek
 - Doporučení pro Humánní léčiva (Guidelines Evropské agentury pro léčiva – EMA)
 - *studenti znají principy prostudovat (!)*
 - Zmínky v rámci dalších legislativ, neexistují jednoznačné postupy
 - REACH (průmyslové chemikálie)
 - Legislativa o pesticidech, biocidech
- Využívají se postupy vyvinuté národními agenturami
 - USA
 - Food and Drug Administration
 - National Toxicology Program (NTP) of National Institute of Environmental Health and Safety (NIEHS)
 - Holandsko
 - RIVM - National Institute for Public Health and the Environment

Praktické testování imunotoxicity

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

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

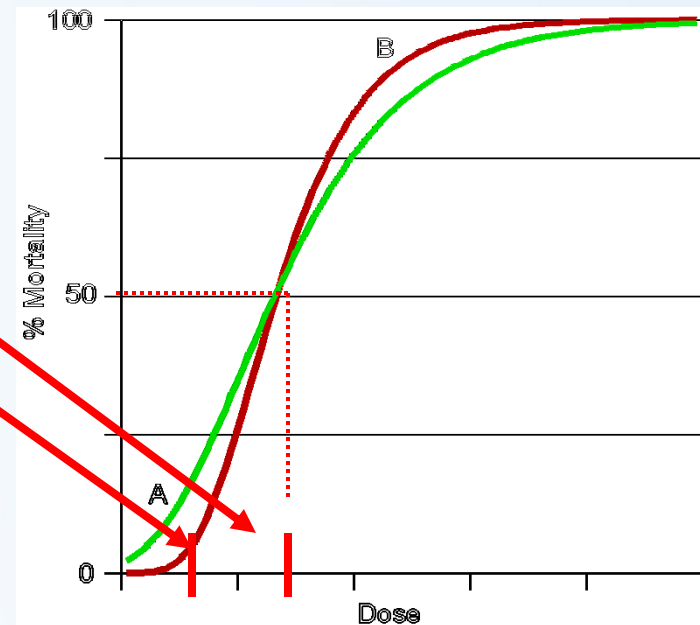
- Příklad experimentu

- 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
(LOAEL)

- Sledování známek imunotoxického působení (ovlivnění krevetvorby, orgánů...)



2) Stanovení chronické toxicity

- Chronická toxicita
- 28 dní
- Použité dávky - dle akutní toxicity, tedy:
 - 1/2 akutní LD50
 - LOAEL
 - 1/10 LOAEL
- Sledování běžných toxikologických parametrů a parametrů, které by indikovali imunotoxikologické působení

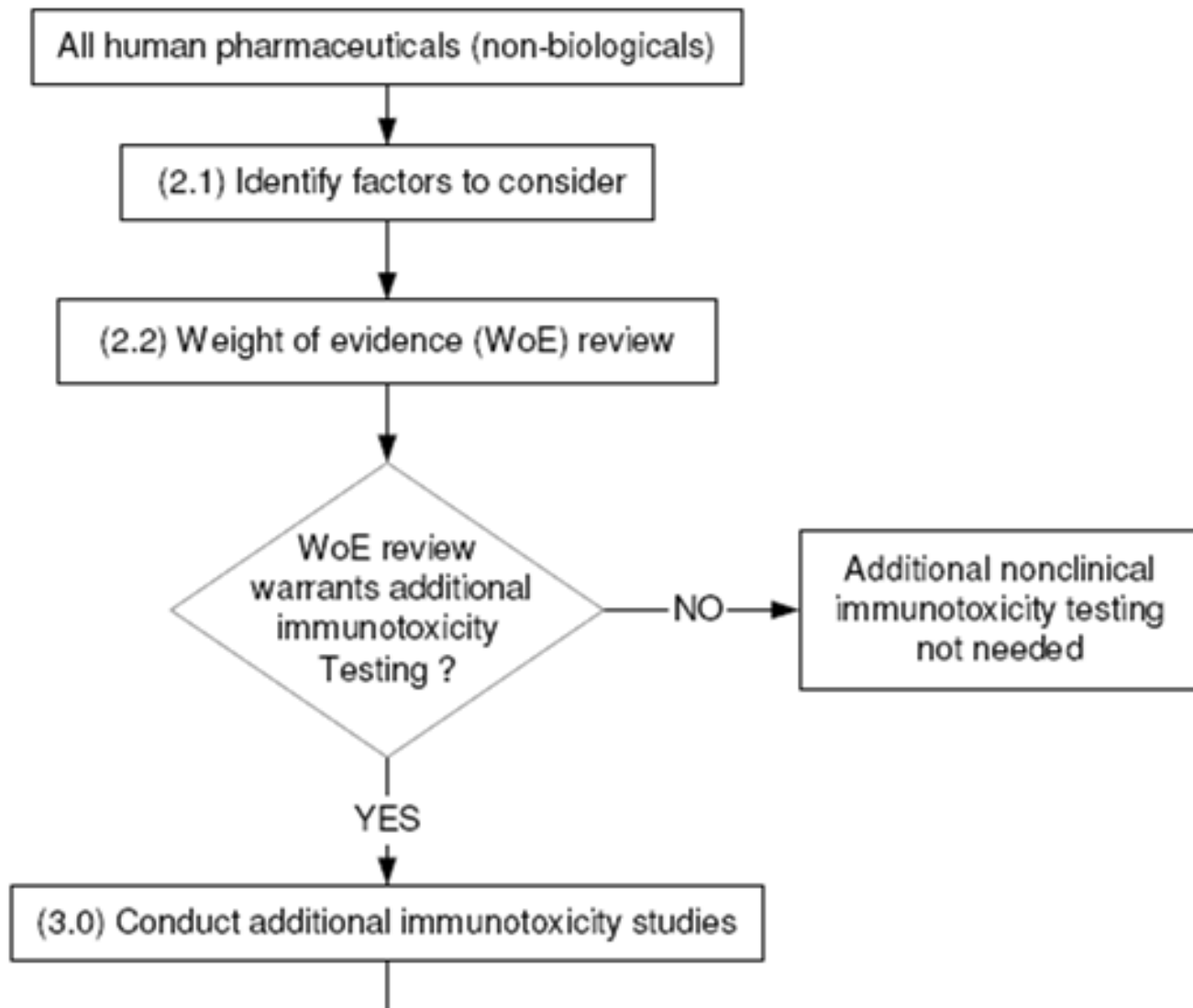
3) Specifické testování imunotoxicity

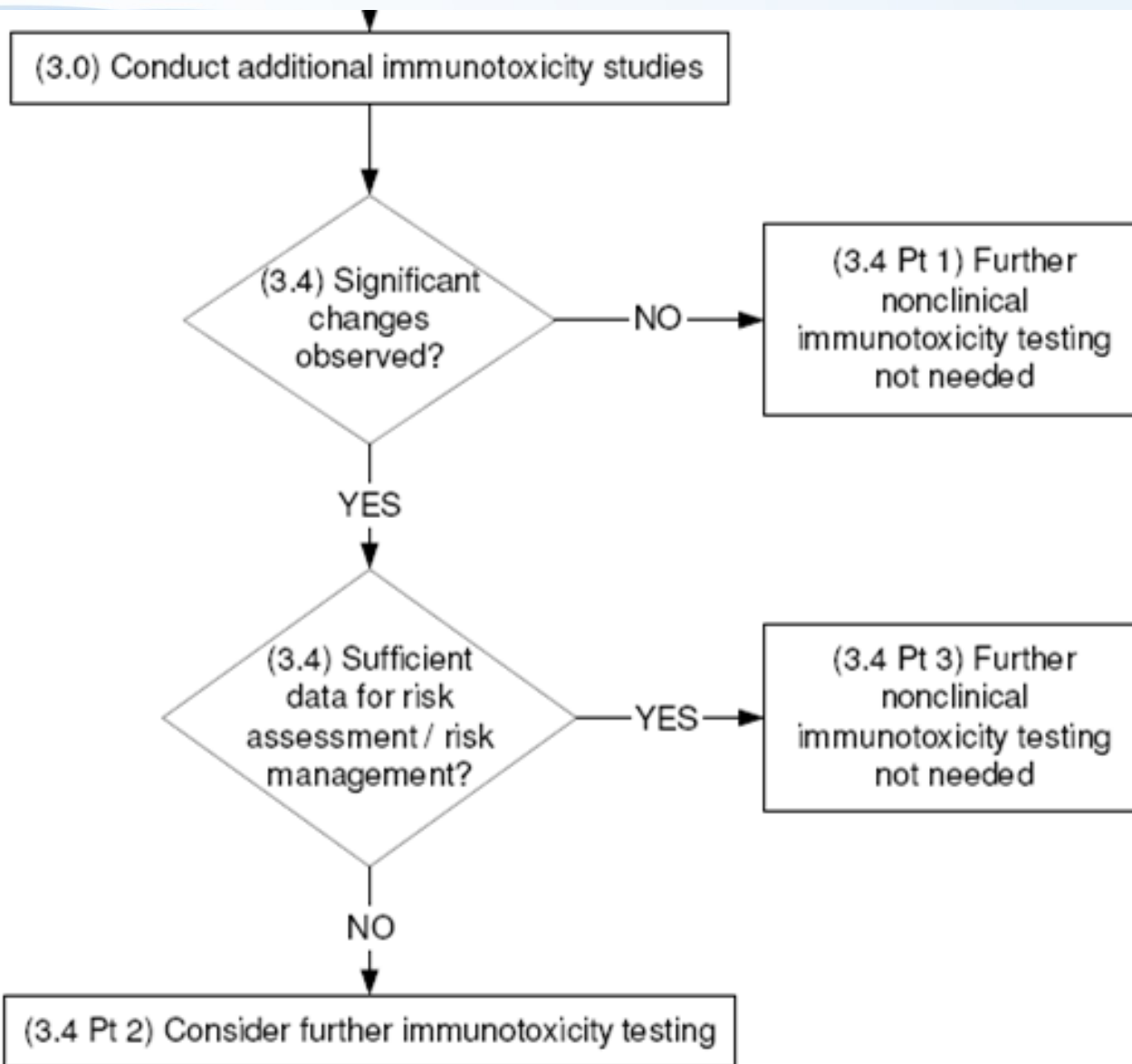
- Provádí se pokud standardizované testy toxicity indikují imunotoxicitu
- Detaily – viz dále

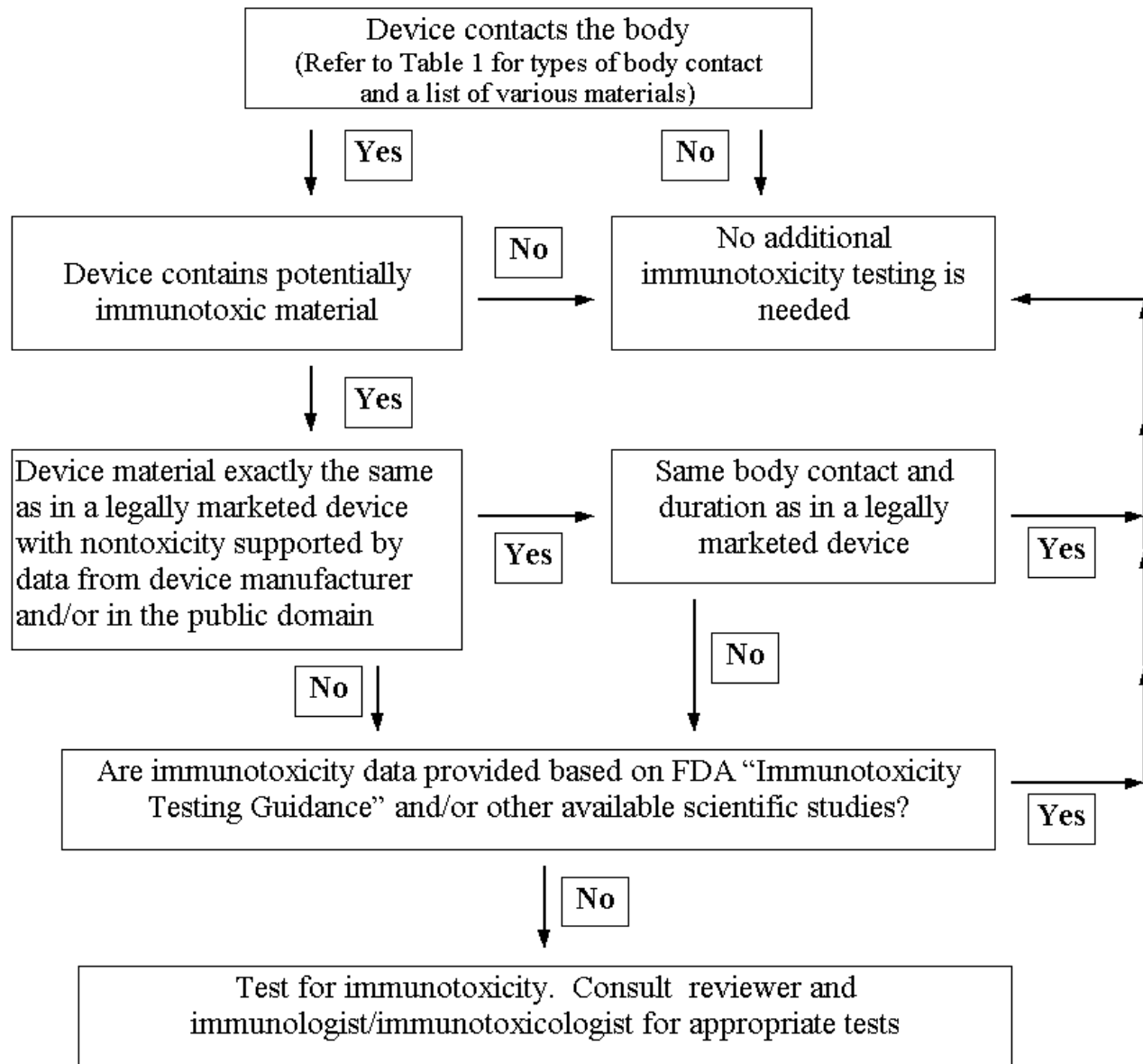
Poznámky k praktickým aspektům testování

- Nutné jsou **in vivo experimenty**
 - potřeba velkého množství zvířat
 - realizace jen v oprávněných případech
- Existují rozhodovací schémata (viz příklad) - kdy a jak testovat?
- ? Lze in vivo nahradit in vitro ?
 - v některých případech ANO - viz dále

Figure 1: Flow Diagram for Recommended Immunotoxicity Evaluation

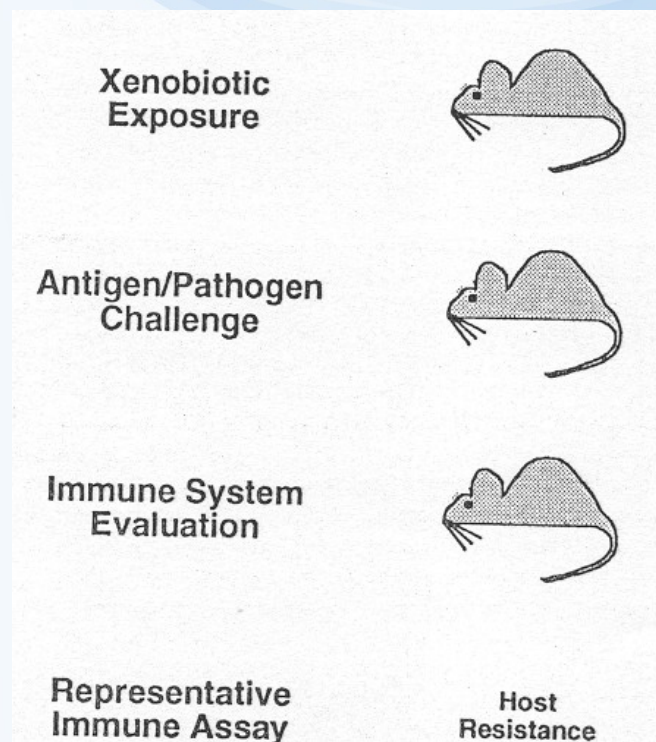






Testování imunotoxicity – „tiered“ approach

- Tier 1 (test chronické toxicity – viz dříve)
 - aplikace xenobiotika
 - sledování vlivu na obecné a základní vlastnosti IS
- Tier 2 (specifická imunotoxicita)
 - aplikace xenobiotika
 - sledování funkční odpovědi na specifické antigeny (*aplikace antigenů*)



TIER 1 (příklad léčiva – EMA)

„Standarní testy toxicity“ - Sledování známek imunotoxicity

2.1.1 *Standard Toxicity Studies*

Data from STS should be evaluated for signs of immunotoxic potential. Signs that should be taken into consideration are the following:

- 1) Hematological changes such as leukocytopenia/leukocytosis, granulocytopenia/granulocytosis, or lymphopenia/ lymphocytosis;
- 2) Alterations in immune system organ weights and/or histology (e.g. changes in thymus, spleen, lymph nodes, and/or bone marrow);
- 3) Changes in serum globulins that occur without a plausible explanation, such as effects on the liver or kidney, can be an indication that there are changes in serum immunoglobulins;
- 4) Increased incidence of infections;
- 5) Increased occurrence of tumors can be viewed as a sign of immunosuppression in the absence of other plausible causes such as genotoxicity, hormonal effects, or liver enzyme induction.



Standardizované „národní“ postupy

Zahrnují Tier 1 + 2

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



TABLE 2. Part 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
Humoral immunity	Histology—spleen, thymus, lymph nodes IgM antibody PFCs to T-cell-dependent antigen (SRBCs) LPS mitogen response
Cell-mediated immunity	Lymphocyte blastogenesis (Con A) and MLR against allogeneic leukocytes NK cell activity
Nonspecific immunity Comprehensive (tier II)	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)
FACS analysis Humoral immunity Cell-mediated immunity Host resistance challenge models (and points) ^b	

*The testing panel was developed using B6C_{3F₁} female mice.

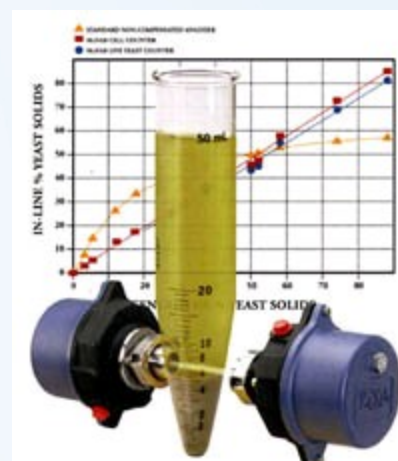
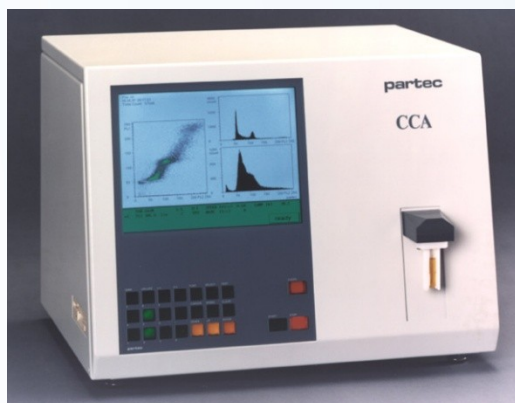
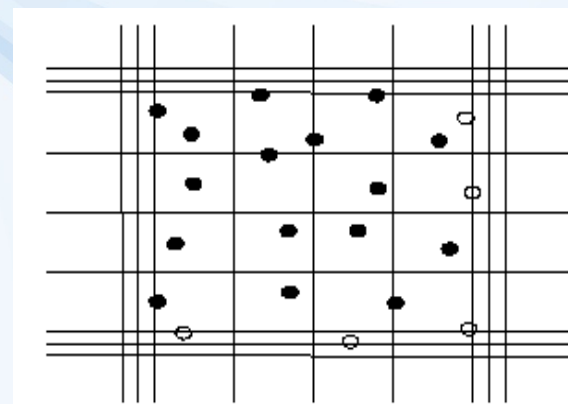
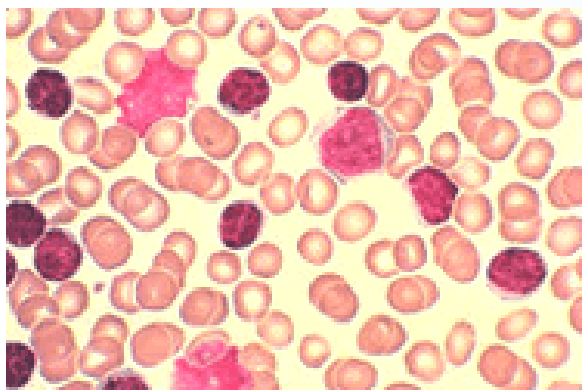
^bFor any particular chemical tested only two or three host resistance models are selected for examination.

Hodnocení imunotoxicity – postup dle RIVM

Tier 1

Tier 1 – Hematologie a buněčnost

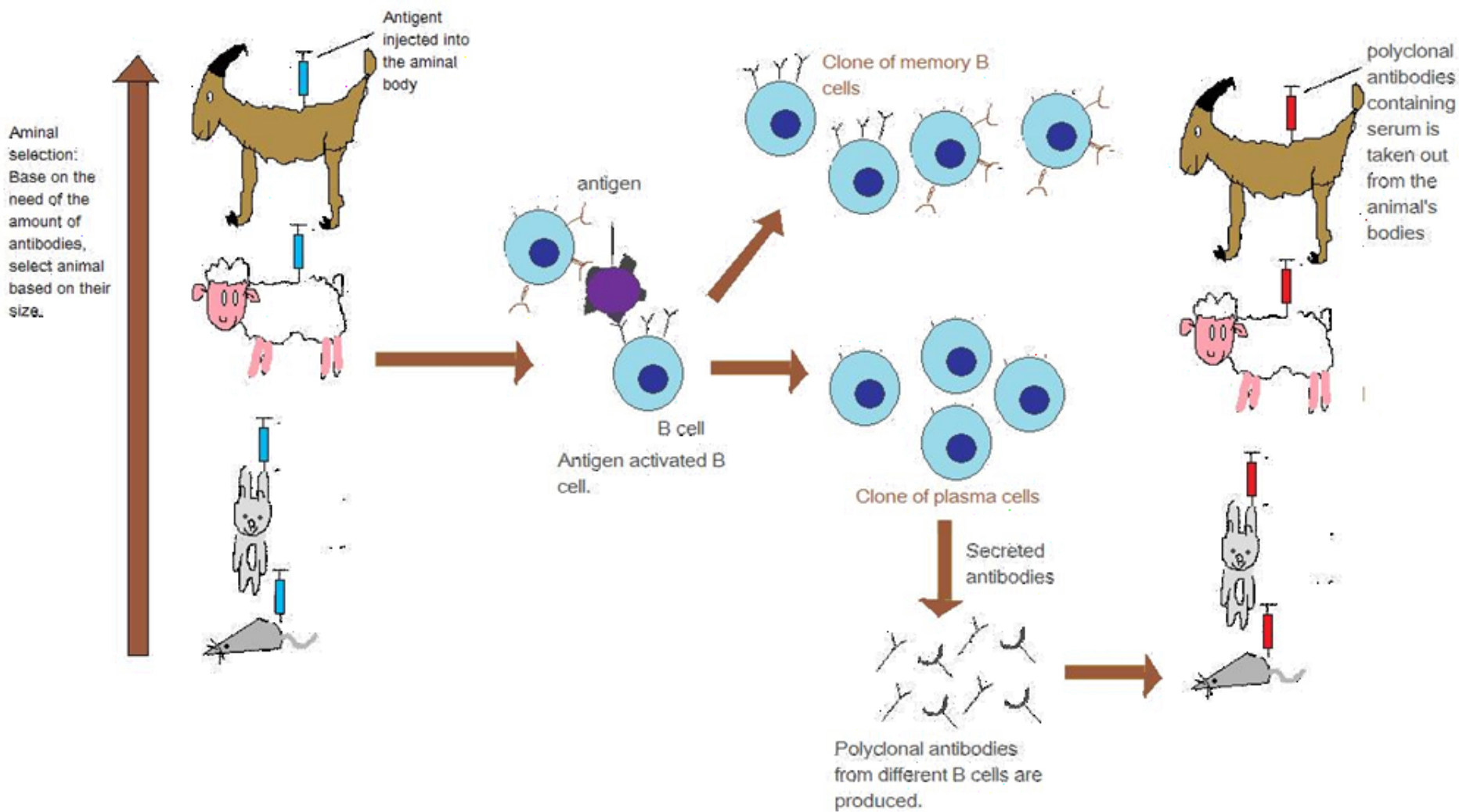
- Celkové počty krevních buněk/mL
- Počty leukocytů, lymfocytů („diferenciál“)
 - : stanovení
 - mikroskopie: počítací komůrka
 - jednoduché počítače - „cell counter“



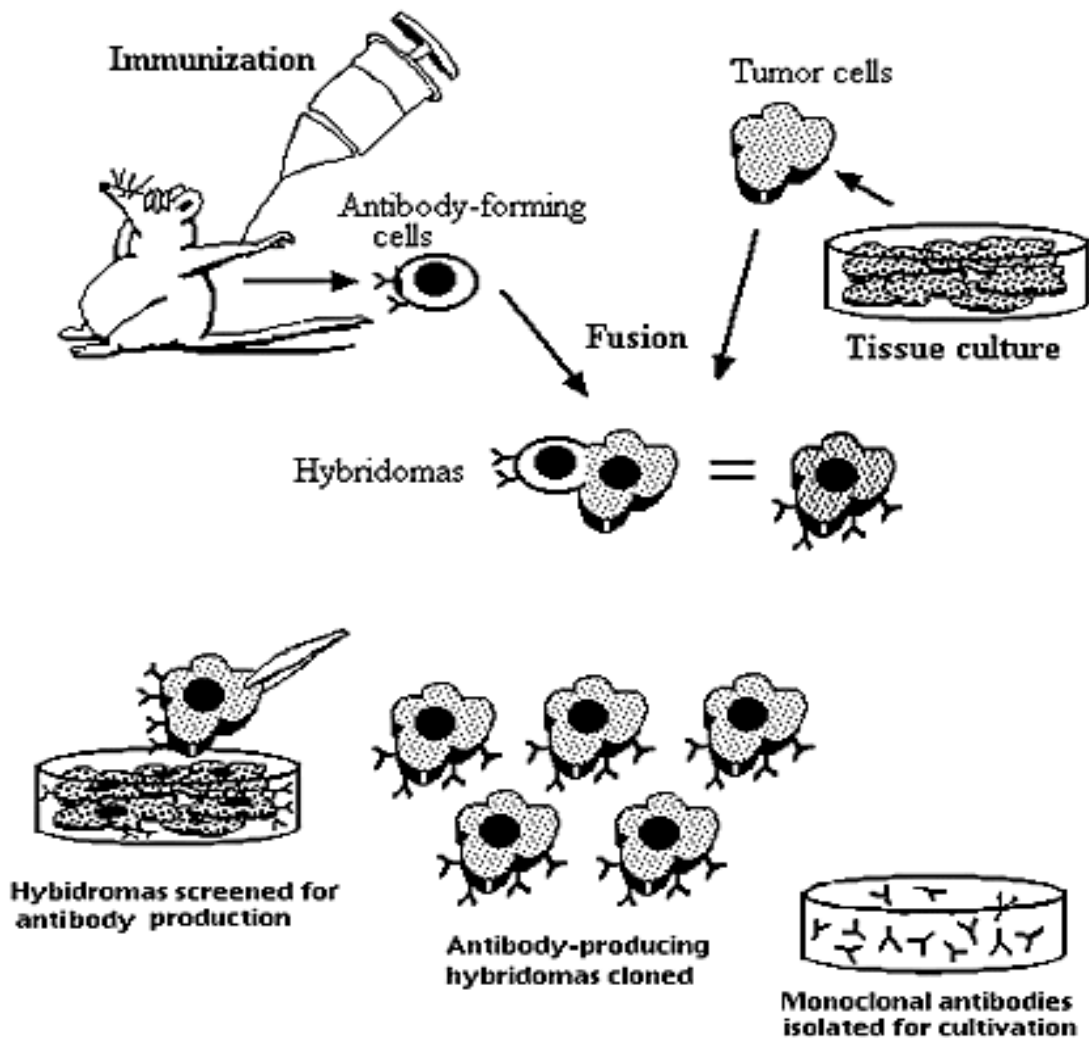
Tier 1 – množství a třídy protilátek

- **ELISA proti Fc fragmentům IgG, IgM, IgE**
– **Enzyme-linked ImmunoSorbent Assay**
- !!! Znat princip ELISA proti protilátkám
- Základní postup
 - Získání protilátek proti „Fc“ fragmentu jednotlivých tříd IgG
 - Polyklonální nebo monoklonální protilátky
 - Jeden „díl“ protilátek se využívá pro imobilizaci („sorbcí“) reakce v mikrodiskách
 - Druhý díl se využívá pro vizualizaci rozpoznávací reakce:
Protilátky s navázanou značkou (enzymem)

Získání protilátek pro ELISA reakci – „polyklonální“ Ab



Získání protilátek pro ELISA reakci – „monoklonální“ Ab

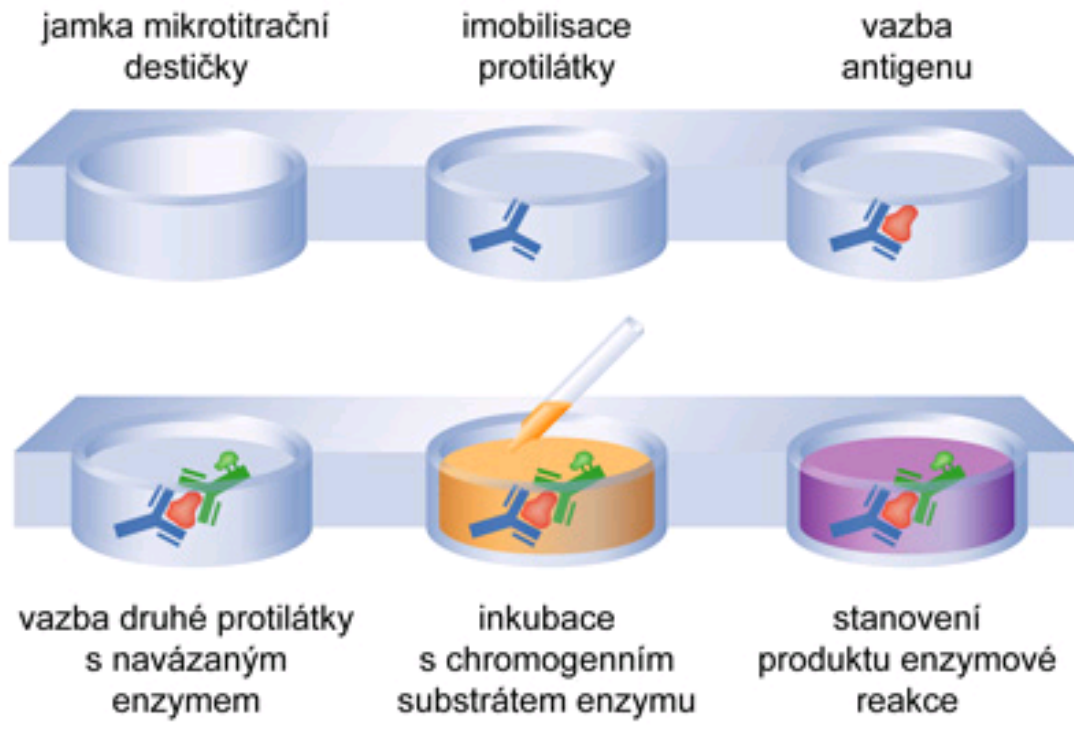


Monoclonal Antibody Production



Princip ELISA - stanovení tříd protilátek

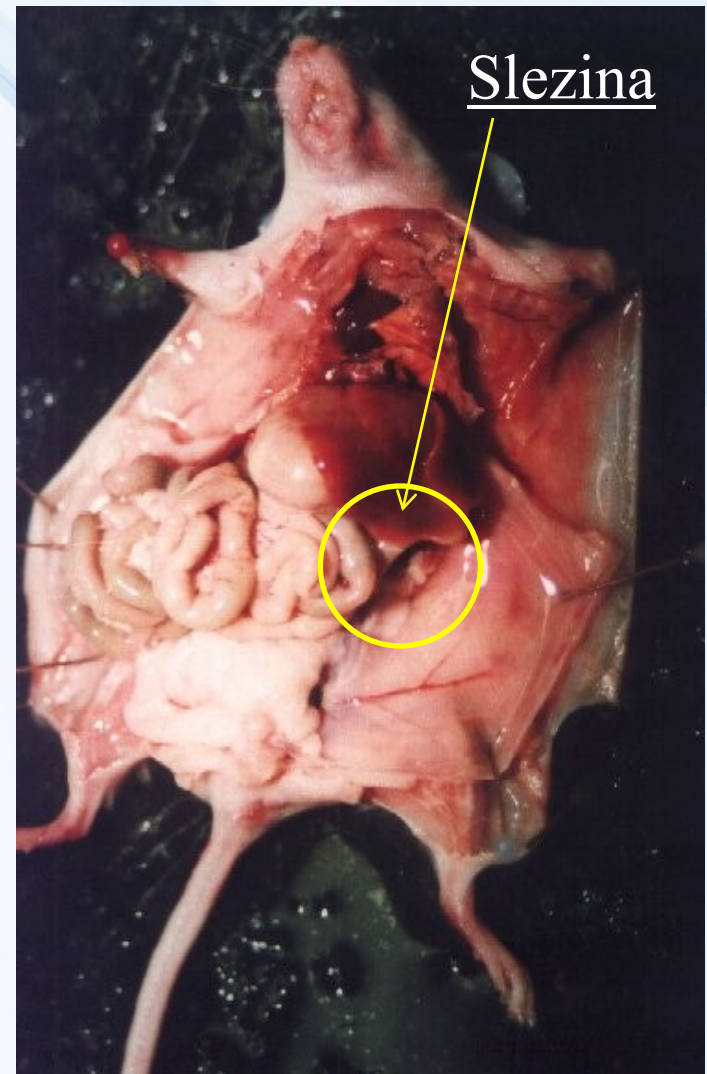
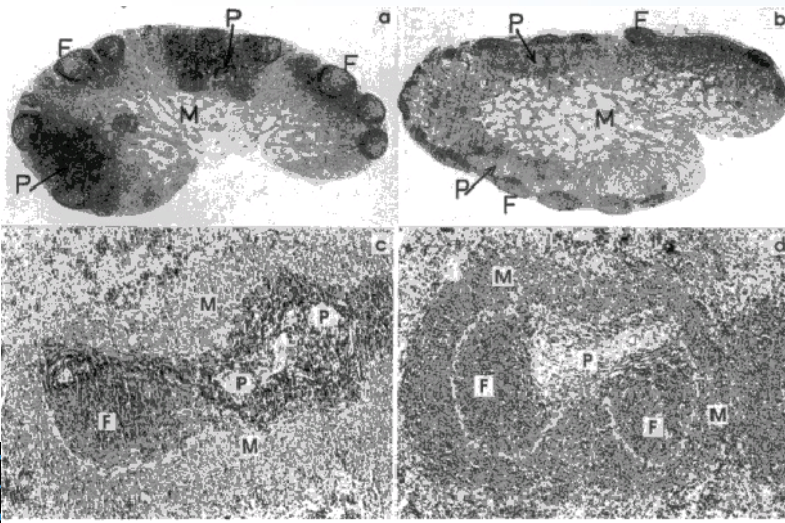
- Princip – viz obrázky
- Stanovení „titru“ - čím vyšší ředění - tím více protilátek
- *Vždy srovnání Kontrola vs. Exponované*



Tier 1 – hodnocení histologie

http://www.youtube.com/watch?feature=player_detailpage&v=RaTzR3II10Q#t=4s

- 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 histopatologie
 - Nutná je expertíza



Tier 1 - Stanovení BUNĚČNOSTI

- **Buněčnost v kostní dřeni**
(viz dále)

- preparace femuru
- odstříhnutí hlavic
- výplach kostní dřeni

- **Buněčnost ve slezině**

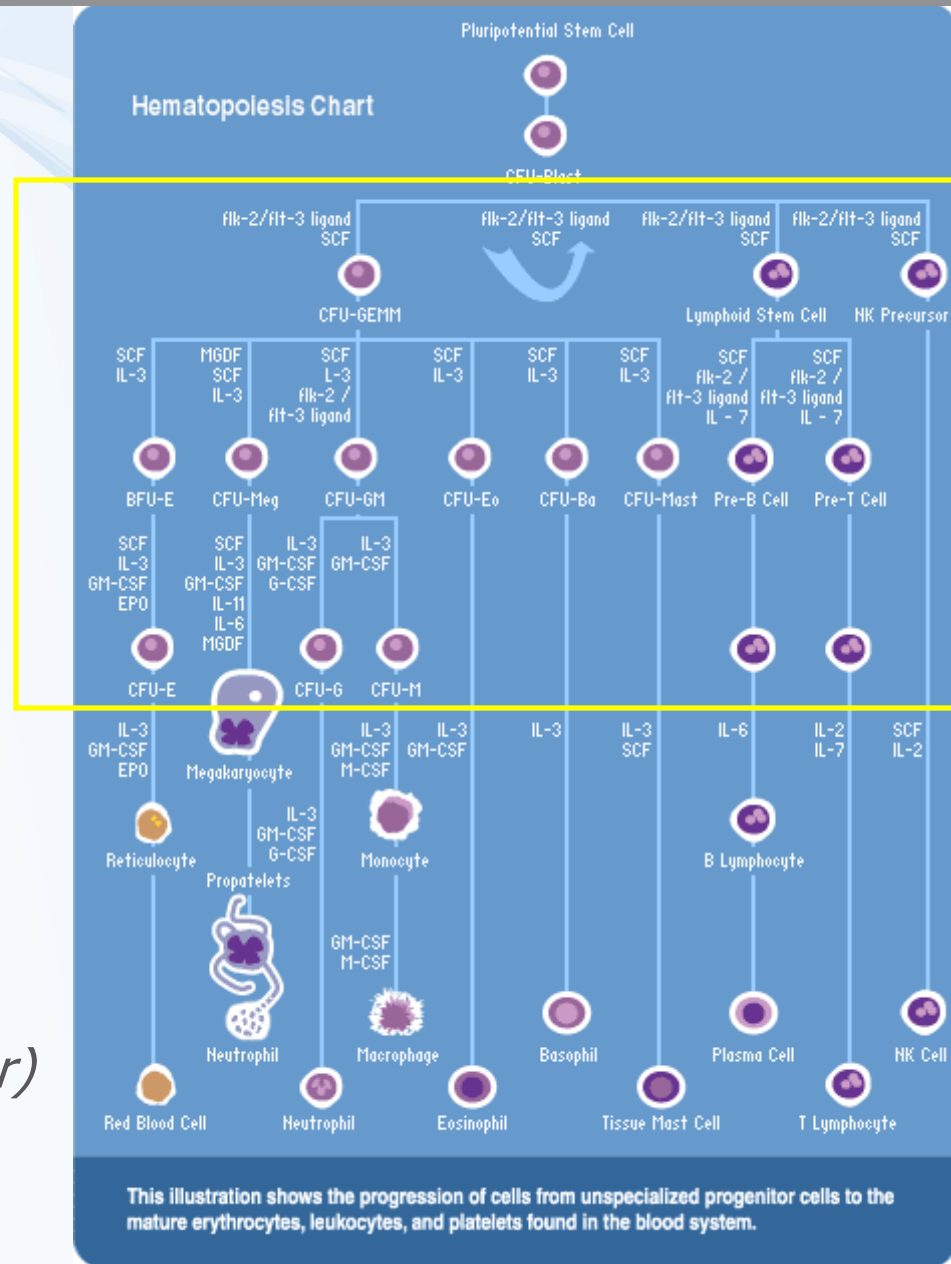
- slezina / homogenizace

- **Slezina** - myš: 10^8 buněk

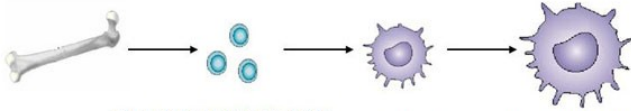
- 4-8% adhekuje MF
- 60% B-b
- 40% T-b.

- Stanovení počtů bb. (*cell counter*)

- Stanovení typů bb. (*flow cytometer*)



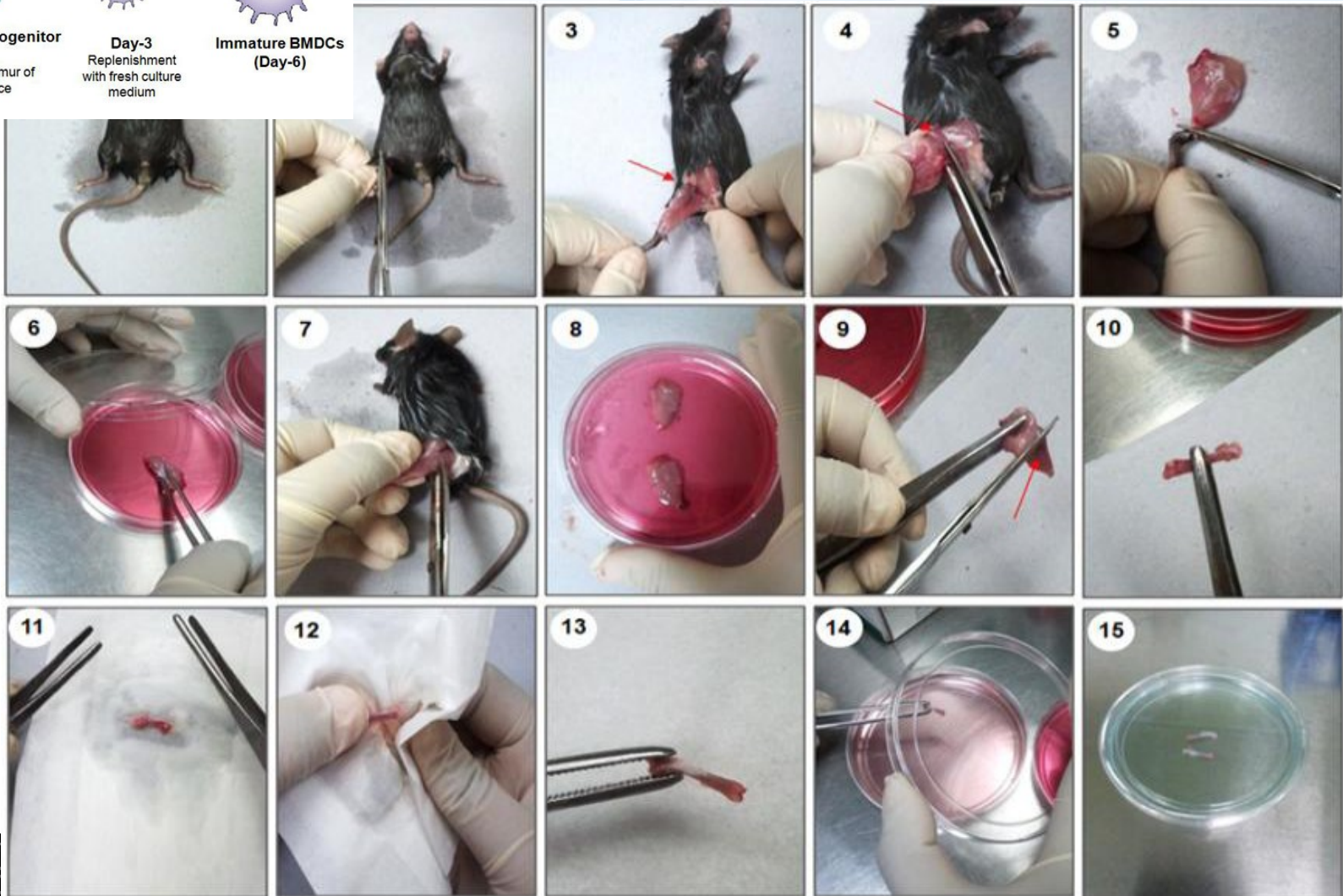
RPMI-1640 + 10 % FBS, 20 mM penicillin/streptomycin and 20 ng/ml rmGMCSF at 37 °C in a humidified 5% CO₂ atmosphere

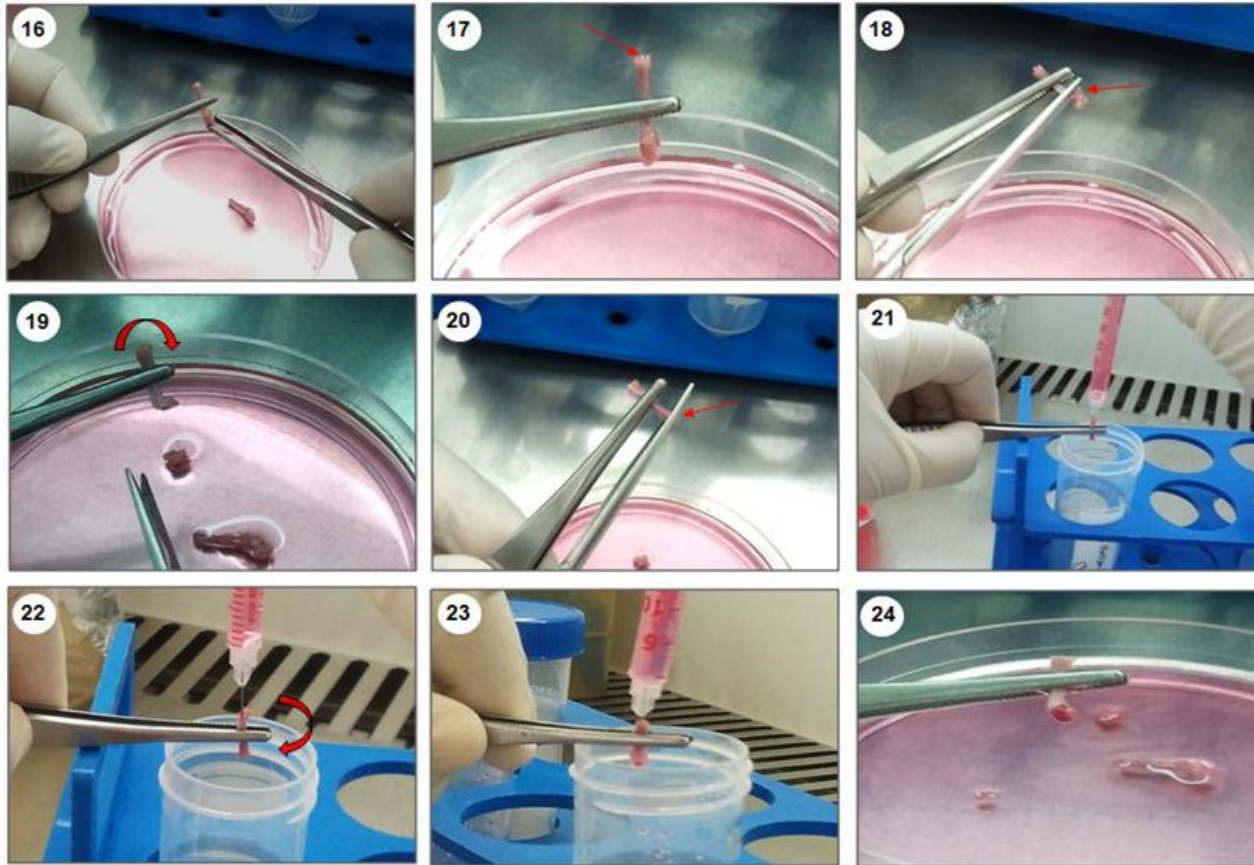


Bone marrow progenitor cells
Isolated from femur of C57BL/6 mice

Day-3
Replenishment with fresh culture medium

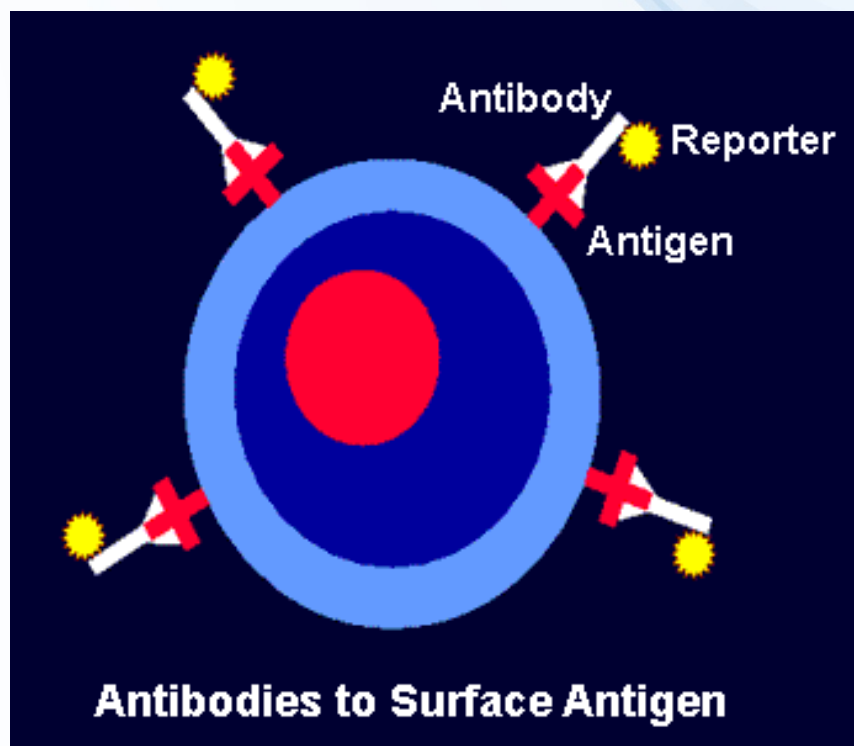
Immature BMDCs (Day-6)





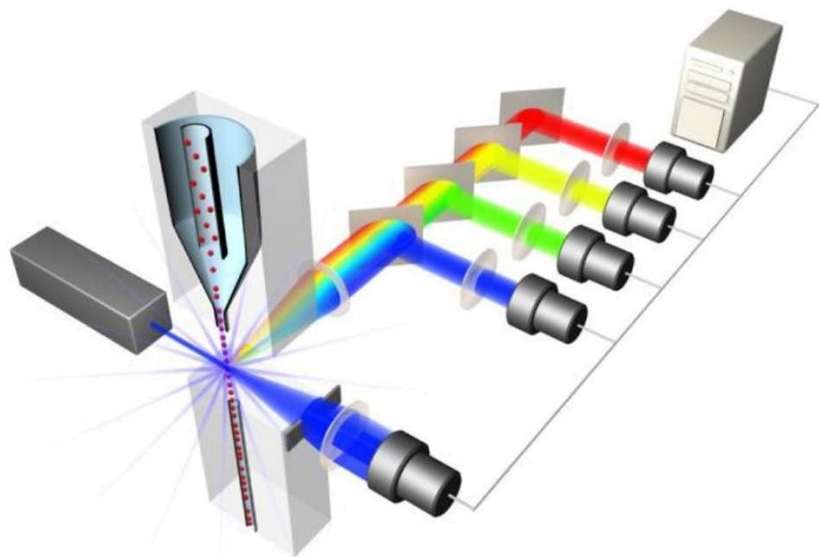
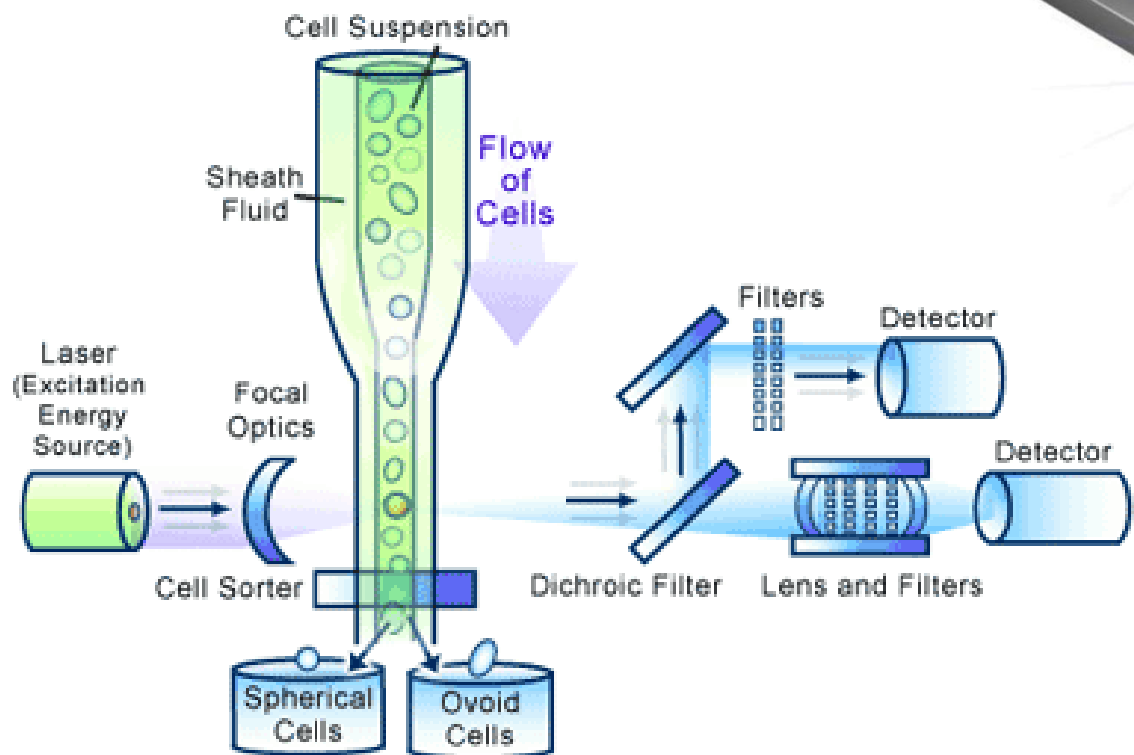
Průtoková cytometrie – základní principy

- Stanovení typů buněk (např. typů lymfocytů)
- Fluorescenčně značené protilátky proti povrchovým antigenům
 - CD3, CD4 ...



Průtoková cytometrie – základní principy

Zástin na detektoru = „buňka a její velikost“
Fluorescence = Typ buňky

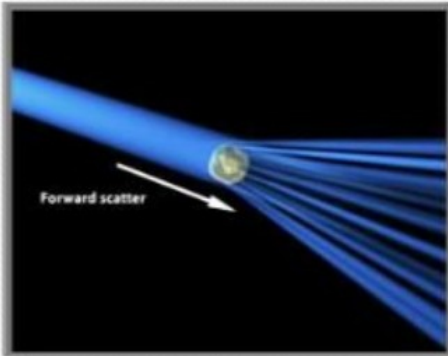


Průtoková cytometrie – instrumentace

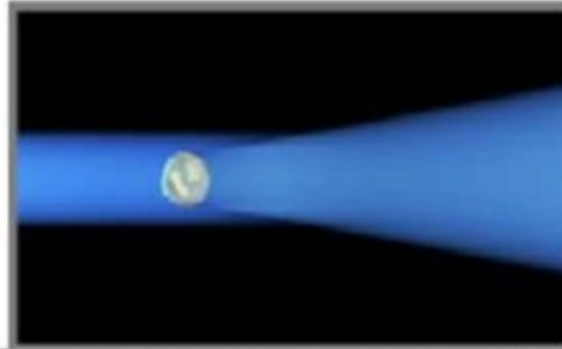


Průtoková cytometrie – principy

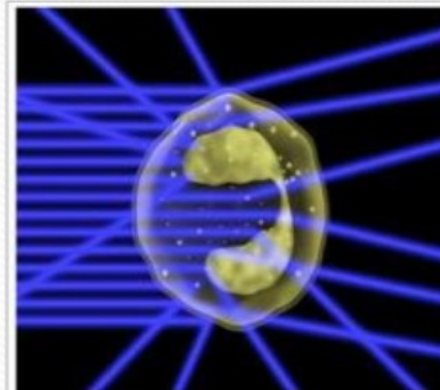
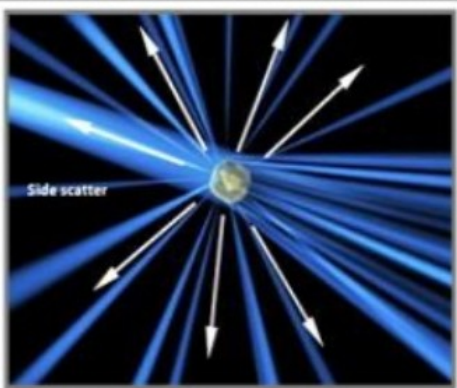
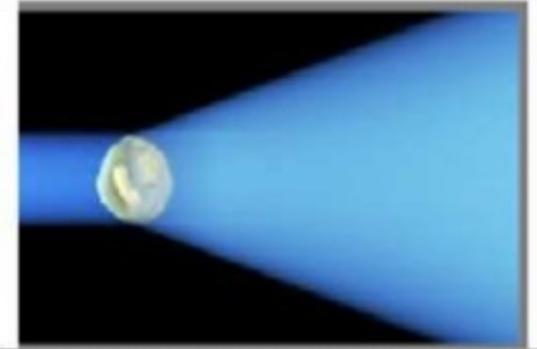
FSC



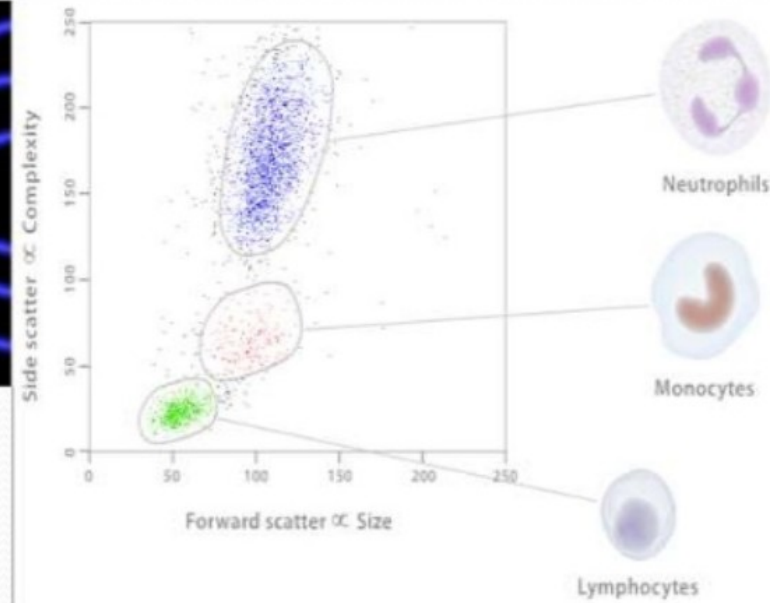
Small



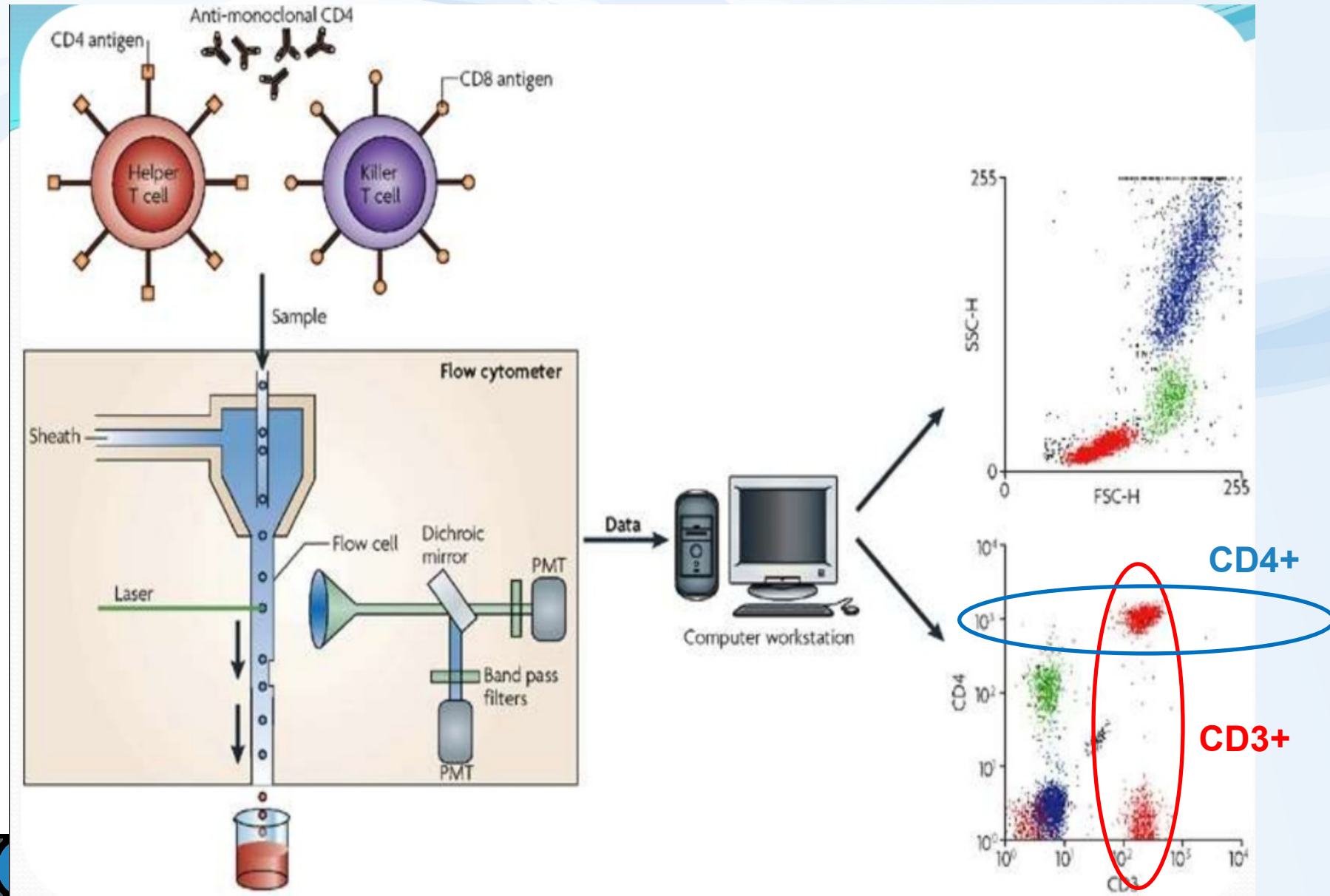
Large



SSC



Průtoková cytometrie – principy



Hodnocení imunotoxicity – postup dle RIVM

Tier 2

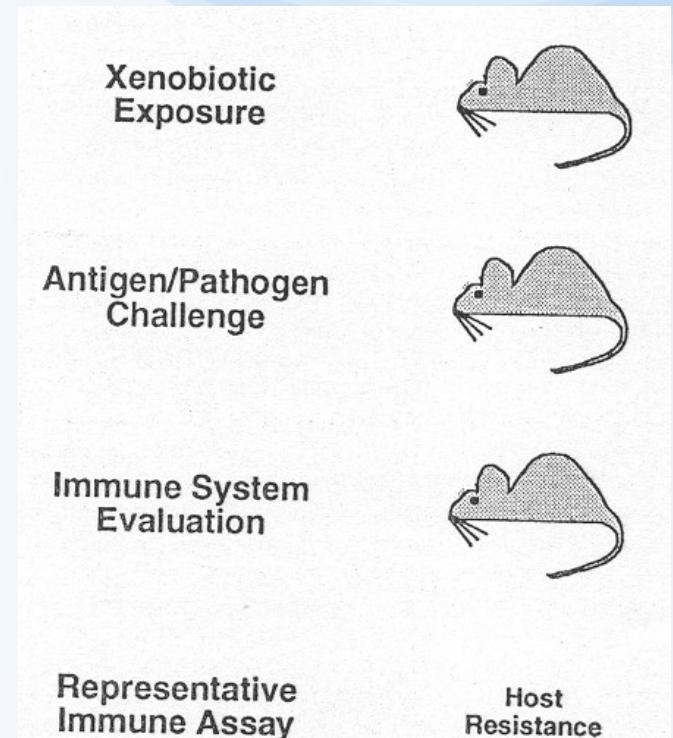


Testování imunotoxicity – Tier 2

- Tier 1 (test chronické toxicity – viz dříve)
 - aplikace xenobiotika
 - sledování vlivu na obecné a základní vlastnosti IS

- **Tier 2 (specifická imunotoxicita)**

- aplikace xenobiotika
- aplikace antigenů
 - sledování funkční odpovědi na specifické antigeny

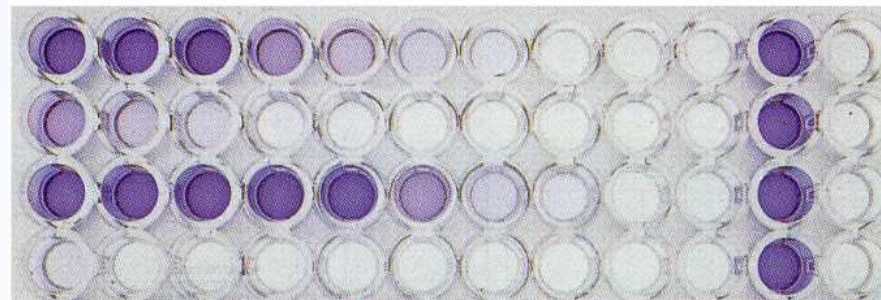
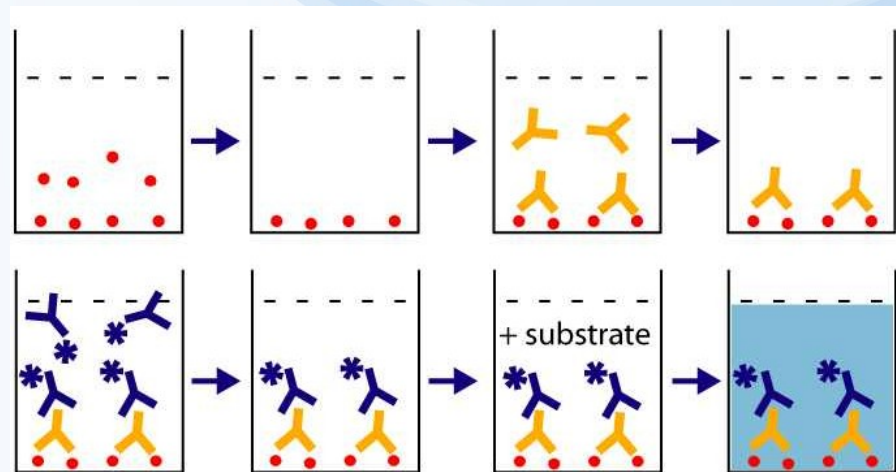


Tier 2 – Stanovení protilátkové odpovědi

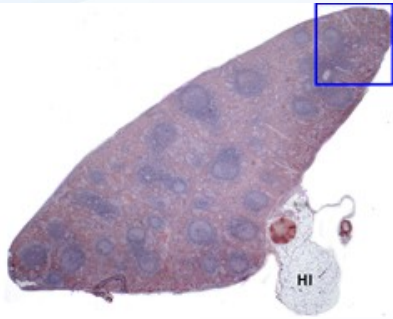
- Protilátková odpověď:
 - Stanovení produkce protilátek
 - Stanovení kvality B-buněk (proliferační odpověď)
 - Stanovení **POČTŮ BUNĚK**, které produkují protilátky (Ab)

1) Stanovení produkce protilátek

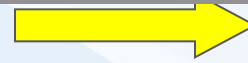
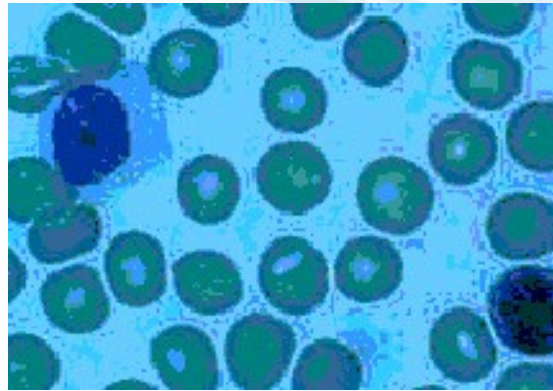
- ELISA proti IgM na T-nezávislý Ag (LPS)
- Antigenně specifické ELISA
 - ELISA proti T-závislým Ag
- **Modelové T-závislé antigeny**
 - tetanový toxin (anaT)
 - beraní erytrocyty (SRBC)



Stanovení proliferační odpovědi B-lymfocytů



Homogenizace
a izolace buněk
-lyza erytrocytů
Buňky do mikrodostiček



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

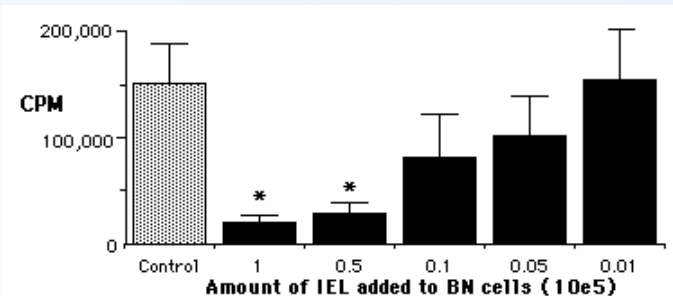


Přidání ³H-Thy

*Inkorporace do DNA
dělicích se buněk
(24 h)*



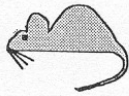
Oplach radioaktivního media
Stanovení radioaktivity (CPM) v buňkách



Stanovení počtů B-buněk, které produkují Ab („Plaková metoda“)

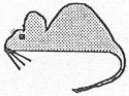
2

Xenobiotic Exposure

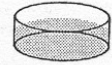


- aplikace xenobiotika vs. kontrola
- podání antigenu (=SRBC)
- izolace buněk ze sleziny → agar

Antigen/Pathogen Challenge

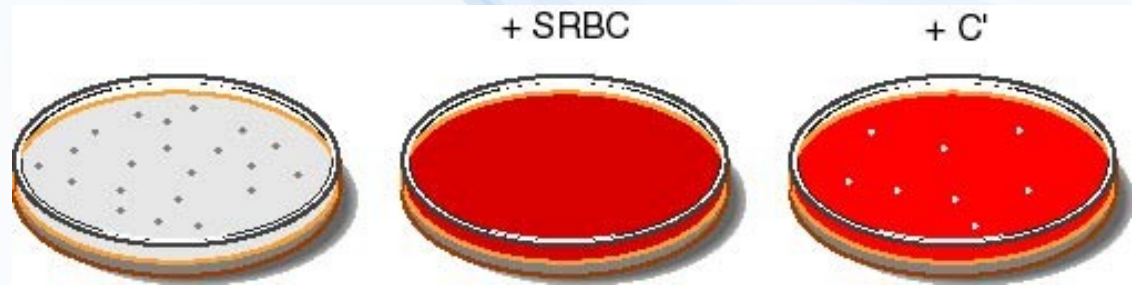


Immune System Evaluation



Representative Immune Assay

Plaque Assay



- opět přidání stejného antigenu (SRBC) a přidání komplementu (morče) do agaru

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

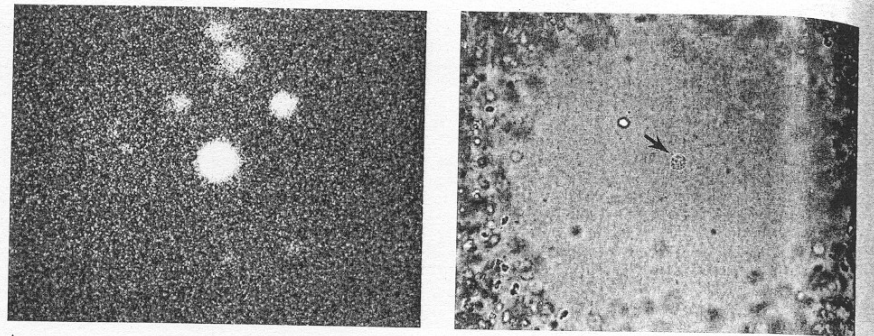
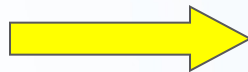
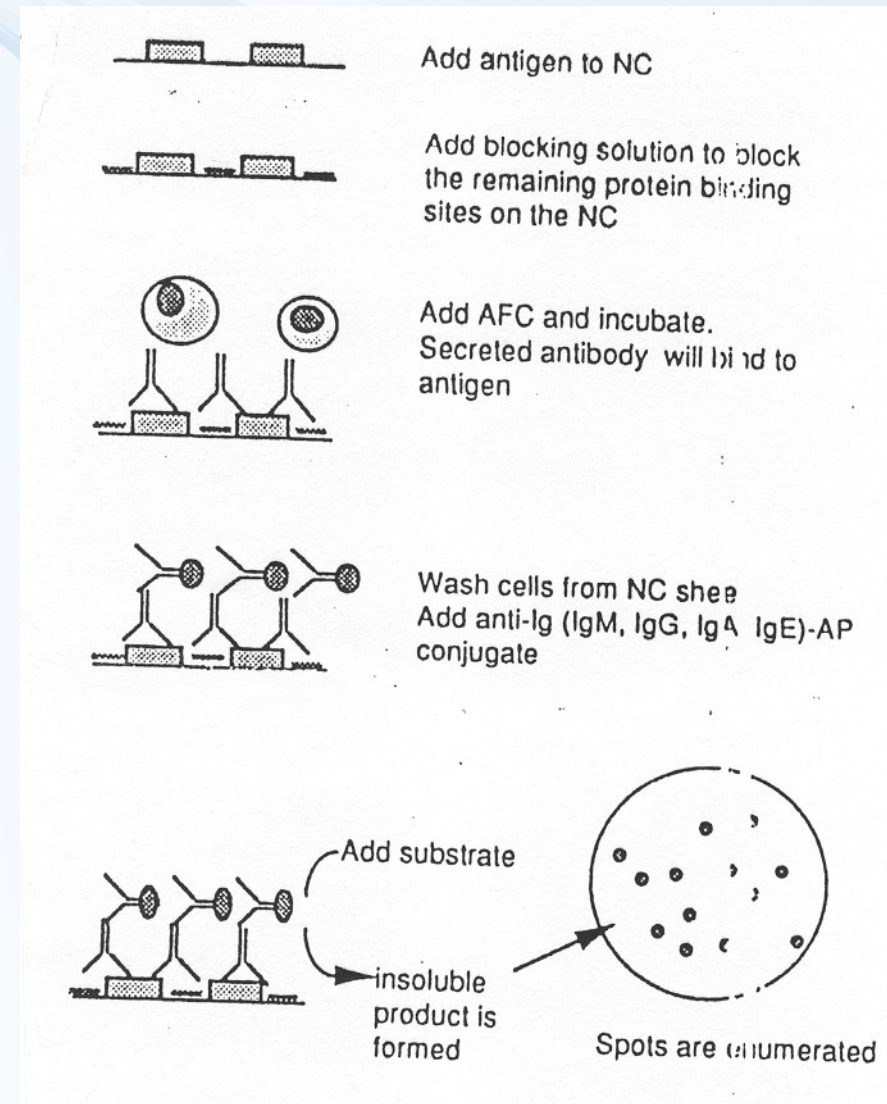


Figure 12-11. The plaque-forming cell (PFC) assay.

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)].

Varianta – stanovení počtu buněk technikou ELISPOT

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



Stanovení funkčnosti T-buněk - proliferační odpověď

- Design stejný jako u proliferace B-buněk
- Přidání T-specifických mitogenů
 - lectiny/sacharidy - ConA, PHA
 - lymfocyty z jiného zvířete (smíšená lymfocytová reakce - MLR)
 - specifické antigeny (SRBC, anaT)

