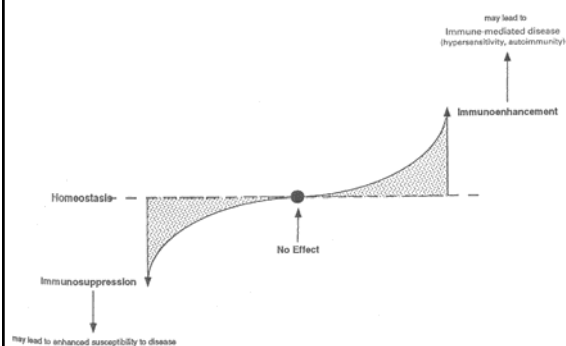


Imunotoxikologie - metody 1

Imunomodulace a její důsledky



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 ohrožení M)
- deficity B-buněk a produkce Ab
- neschopnost vyrovnávat se s bakteriemi
- deficity 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 bifenylly (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 ≠ 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)

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 post-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



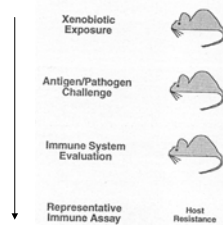
„Tiered“ approach

Tier 1

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

Tier 2

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



Parameters	Procedures
Tier 1 Nonfunctional	Routine hematology; in vitro 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 In vitro phagocytosis and killing of <i>Listeria</i> monocytogenes by adherent spleen and peritoneal cells Cytotoxicity of YAC-1 lymphoma cells by adherent spleen and peritoneal cells
NK cell function	Cytotoxicity of YAC-1 lymphoma cells by nonadherent spleen and peritoneal cells
Host resistance	<i>Trichinella spiralis</i> challenge (muscle larvae counts and worm excretion) <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)
Cell-mediated immunity	LPS mitogen response Lymphocyte blastogenesis (Con A) and MLR against allogeneic leukocytes NK cell activity
Nonspecific immunity	
Comprehensive (tier II)	
FACS analysis	Quantitation of splenic B and T cell numbers
Humoral immunity	IgG antibody response to SRBCs (PFCs)
Cell-mediated immunity	CTL cytotoxicity or DTH response
Host resistance challenge models (round points)*	Syngeneic: tumor cells—PYB6 sarcoma (tumor incidence), B16 melanoma (lung burden) Bacterial models— <i>Listeria monocytogenes</i> (mortality), <i>Streptococcus</i> species (mortality) Viral models—influenza (mortality) Parasite models— <i>Plasmodium yoelii</i> (parasitemia)

*The testing panel was developed using B6C3F1 female mice.
*For 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	prežívá: 10
Expozice - koncentrace 1	5 zvířat	prežívá: 5
- koncentrace 4	5 zvířat	prežívá: 4
- koncentrace 20	5 zvířat	prežívá: 2
- koncentrace 100	5 zvířat	prežívá: 1
- koncentrace 500	5 zvířat	prežívá: 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**

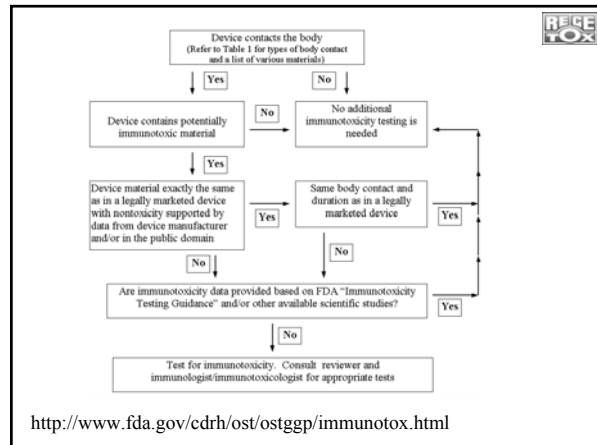
viz dále

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: 10⁸ buněk

- 4-8% adheruje 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)
 : beraní erytrocyty (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

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

Homogenizace
 a izolace buněk
 -lyza erytrocytů

Oplach radioaktivního media
 Stanovení radioaktivity (CPM) v buněk

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

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)

Plaková metoda - varianty

APPROACH No 1
in vivo-in vivo
 CHEMICAL EXPOSURE
 4 DAYS
 MEASURE PFC RESPONSE

APPROACH No 2
in vivo-in vitro
 CHEMICAL EXPOSURE
 ISOLATE SPLEEN CELLS
 SRBC
 5 DAYS
 MEASURE PFC RESPONSE

APPROACH No 3
in vitro-in vitro
 ISOLATE SPLEEN CELLS
 SRBC
 5 DAYS
 MEASURE PFC RESPONSE

APPROACH No 4
in vitro-in vitro
 plus a MAS
 MAS
 CHEMICAL EXPOSURE
 ISOLATE SPLEEN CELLS
 SRBC
 4 HOURS
 5 DAYS
 MEASURE PFC RESPONSE

Fig. 6.1. Mechanistic approaches to study 3-trig-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 páse (3-5 den)
- po 10 dnech: Ag do jednoho ucha (solvent do druhého)

