

Základy Toxikologie

KBB/ZTOX



doc. Ing. Radim Vrzał, Ph.D.



Orgánová toxicita I.

Imuno- a Pulmonotoxicita



Cíle:



- ✗ Funkční a anatomické charakteristiky imunitního systému a plic
- ✗ Škodliviny působící na imunitní systém a plíce



Klíčové pojmy:

Hypersenzitivita, Fibróza, Kontaktní dermatitida,
Emfyzém, Ipomeanol, Paraquat



IMUNOTOXICITA



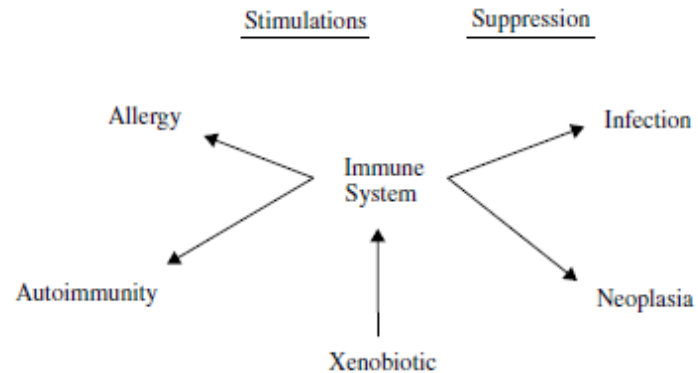
Imunotoxicita

Imunitní systém = obrana proti infekcím, nádorům, parazitům, etc.



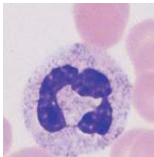
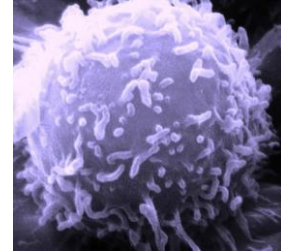
Imunitní systém = rozeznává vlastní od cizího

Imunotoxikologie = studium nežádoucích účinků vzniklých interakcí xenobiotik s imunitním systémem

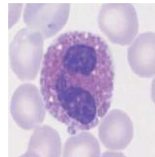


Bílé krvinky (leukocyty)

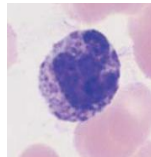
- obrana organismu = imunita
- $4 - 9 \times 10^9 / L$ krve – tvorba v kostní dřeni
- neutrofilní granulocyty – fagocytóza
- eosinofilní granulocyty – fagocytace alergen+protilátka
- basofilní granulocyty – uvolnění histaminu při alergických reakcích
- monocyty – přeměna na makrofágy = fagocytóza, APC
- lymfocyty – B- a T-, rozpoznání antigenu a aktivace
- lymfoidní orgány – slezina, kostní dřeň, mízní uzliny
- imunita
 - **nespecifická = vrozená** – profesionální fagocyty
 - **specifická = získaná** – antigen-presenting cells (APC) a maturace lymfocytů



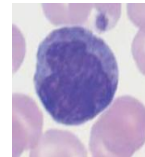
Neutrofil



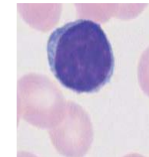
Eosinofil



Basofil



Monocyt



Lymfocyt

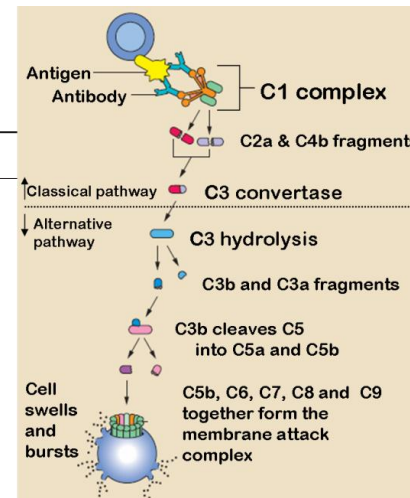
Vrozená imunita

- Neutrofily, monocyty (makrofágy) – fagocytace, extravazace
- Eosinofily, basofily
- Sérové proteiny - komplement

Fagocytoza:

Oxygen-dependent killing	Oxygen-independent killing
Reactive oxygen intermediates	Defensins
O_2^- (superoxide anion)	Tumor necrosis factor α
$OH^\cdot$ (hydroxyl radicals)	(macrophage only)
H_2O_2 (hydrogen peroxide)	Lysozyme
ClO^- (hypochlorite anion)	Hydrolytic enzymes
Reactive nitrogen intermediates	
NO (nitric oxide)	
NO_2 (nitrogen dioxide)	
HNO_2 (nitrous acid)	
Others	
NH_2CL (monochloramine)	

Type	Mechanism
<i>Anatomic barriers</i>	
Skin	Mechanical barrier retards entry of microbes. Acidic environment (pH 3–5) retards growth of microbes.
Mucous membranes	Normal flora compete with microbes for attachment sites and nutrients. Mucus entraps foreign microorganisms. Cilia propel microorganisms out of body.
<i>Physiologic barriers</i>	
Temperature	Normal body temperature inhibits growth of some pathogens. Fever response inhibits growth of some pathogens.
Low pH	Acidity of stomach contents kills most ingested microorganisms.
Chemical mediators	Lysozyme cleaves bacterial cell wall. Interferon induces antiviral state in uninfected cells. Complement lyses microorganisms or facilitates phagocytosis. Toll-like receptors recognize microbial molecules, signal cell to secrete immunostimulatory cytokines. Collectins disrupt cell wall of pathogen.
<i>Phagocytic/endocytic barriers</i>	Various cells internalize (endocytose) and break down foreign macromolecules. Specialized cells (blood monocytes, neutrophils, tissue macrophages) internalize (phagocytose), kill, and digest whole microorganisms.
<i>Inflammatory barriers</i>	Tissue damage and infection induce leakage of vascular fluid, containing serum proteins with antibacterial activity, and influx of phagocytic cells into the affected area.

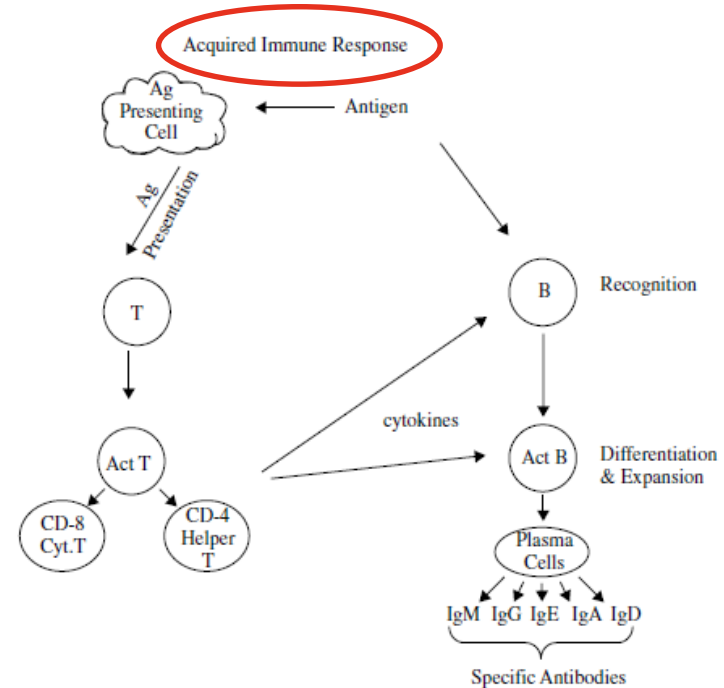


Získaná imunita

- Rozpoznání a eliminace cizích mikroorganismů a molekul (antigenů)
- Antigenní specifita - schopnost rozpoznat rozdílné proteiny
- Diverzita – produkce obrovského množství rozpoznávacích molekul
- Imunologická paměť – opakované setkání s antigenem produkuje silnější imunitní reakci
- Schopnost rozpoznat cizí od vlastního

Nutnost **kooperace** mezi Lymfocyty (T- i B-) a APC (makrofágy)

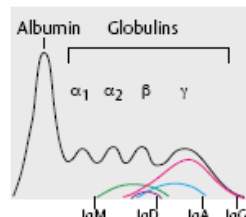
T-lymfocyt – rozpozná APC s navázaným antigenem



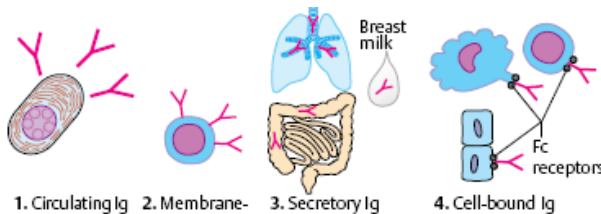
Získaná imunita

Protilátky:

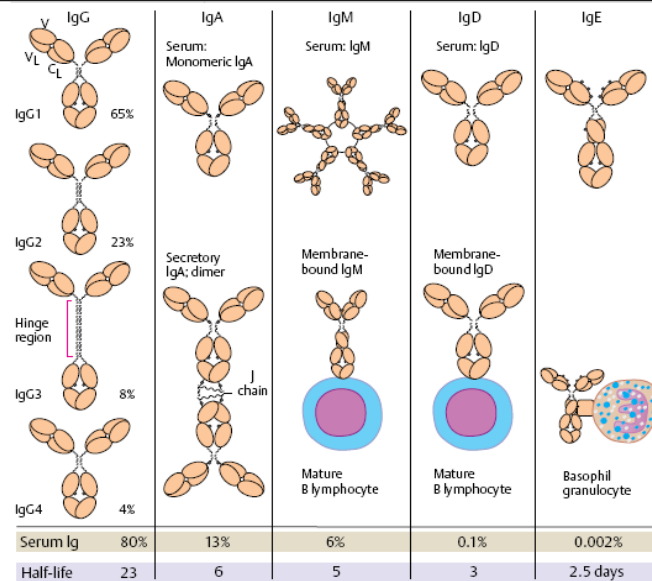
- Glykoproteiny, produkty plasmatických buněk (terminální stadium B-lymfocytů)
- dle těžkých řetězců → 5 tříd (izotypů)
- v B-lymfocytu IgM, IgD membránově vázané
- opsonizace, aktivace komplementu



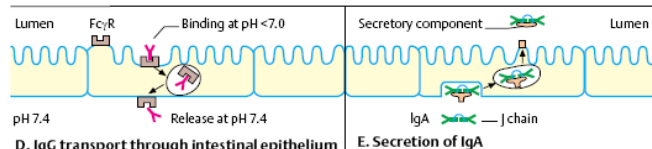
A. Protein electrophoresis



B. Different immunoglobulin types



C. Immunoglobulin structure and features



D. IgG transport through intestinal epithelium

E. Secretion of IgA

Látky s imunosupresivním účinkem

Drugs

Cyclosporin A, cyclophosphamide, glucocorticoids (Dexamethazone), azothioprine

Metals

Lead, cadmium, methylmercury, organotins^a

Pesticides

Chlorodane^a, DDT^a, Dieldrin^a

Industrial compounds

2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD), polychlorinated and polybrominated biphenyls (PCBs and PBBs), benzene, poly aromatic hydrocarbons^a

Addictive substances

Cocaine, ethanol, opiates, cannabinoids, nicotine

Air pollutants

Environmental tobacco smoke, ozone, nitrogen dioxide

Microbial toxins

Aflatoxin,^b ochratoxin A,^b trichothecenes T-2 toxin^b

Radiation

Ionizing, UV

Other

Asbestos, diethylstilbestrol (DES), dimethylnitrosamine

Imunosuprese

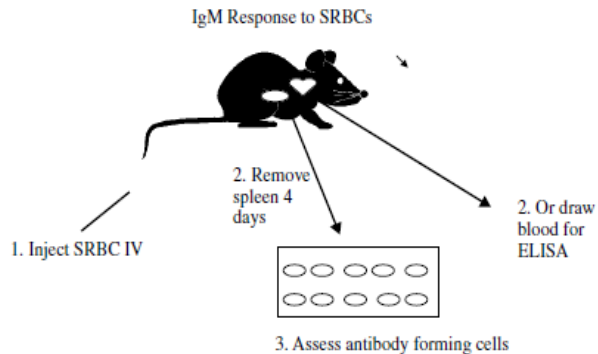
- **Potlačení vyzrávání T lymfocytů**
- **Vazba na povrchové receptory leukocytů**



Nutnost postupného testování

1 úroveň testování – „strukturní end pointy“

Immunopathology	Hematology: Complete blood count and differential Weights: body, spleen, thymus Histology: Spleen, thymus, lymph node
Antibody-mediated immunity	IgM plaque-forming cell (PFC) response to T cell-dependent antigen (e.g., SRBC)
Cell-mediated immunity	Lymphoproliferative response: T cell mitogens (Con A and PHA) Allogeneic mixed leukocyte response (MLR)
Nonspecific immunity	Natural killer (NK) cell activity



- 1) Expozice xenobiotiku na 14-28 dní
- 2) Injekce antigenu SRBC (sheep red blood cells)
- 3) Analýza séra či sleziny
 - Jerne assay – množství IgM tvořících buněk
 - ELISA

Musí být funkční T-, B-lymfocyty a APC
Lze provést ex vivo !!

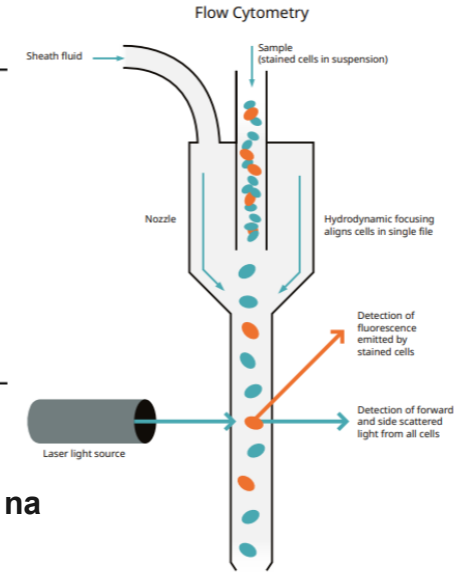
Testy druhé úrovně

Immunopathology	Quantitation of B and T cell numbers using flow cytometry
Antibody-mediated immunity	IgG PFC to SRBC IgM PFC to T cell-independent antigen (e.g., TNP-LPS)
Cell-mediated immunity	Cytotoxic T lymphocyte (CTL) cytotoxicity Delayed hypersensitivity response (DHR)
Nonspecific immunity	Macrophage: phagocytosis, bactericidal/tumoricidal activity Neutrophil: function (phagocytosis and bactericidal activity)
Host resistance models	Response to challenge with infectious agent or tumor cells

- Vyhodnocení subpopulací lymfocytů (B, T) – průtoková cytometrie

- Test buněčně zprostředkované imunity – expozice antigenu a následný test na **cytotoxické T-lymfocyty** (imunizující nádorová buňka) nebo na opožděnou hypersenzitivitu

- modely resistance – zvíře je vystaveno xenobiotiku a pak infekčnímu agens nebo nádorovým buňkám = **ultimátní test** (rozsah suprese, který může být tolerován je závislý na dávce, virulenci agens a na genetickém stavu hostitele)



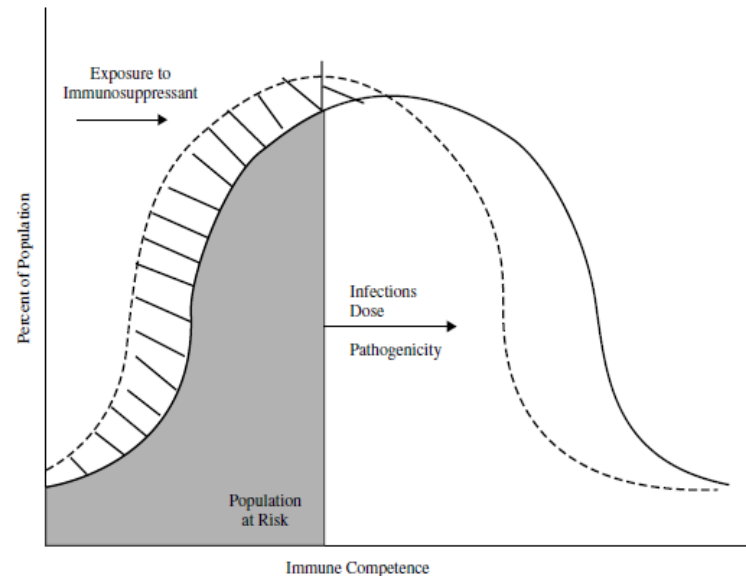
Jak interpretovat imunotoxická data ve vztahu k nežádoucím účinkům?

- a) předpoklad „lineárního vztahu“ – jakákoliv suprese je nežádoucí
nebo
- b) redundance a rezervní kapacita – určitá suprese je tolerovatelná

Čistě kvantitativní vztah mezi supresí a rizikem infekce – **nemožné**
(genetika hostitele, dávka, virulence infekčního agens)

Imunokompetence v populaci - křivka tvaru „obrácené U“ – resistantní, citliví a něco mezi (genetika, věk, predisponující nemoci)

Vystavení Imunosupresantu = posun doleva !!!

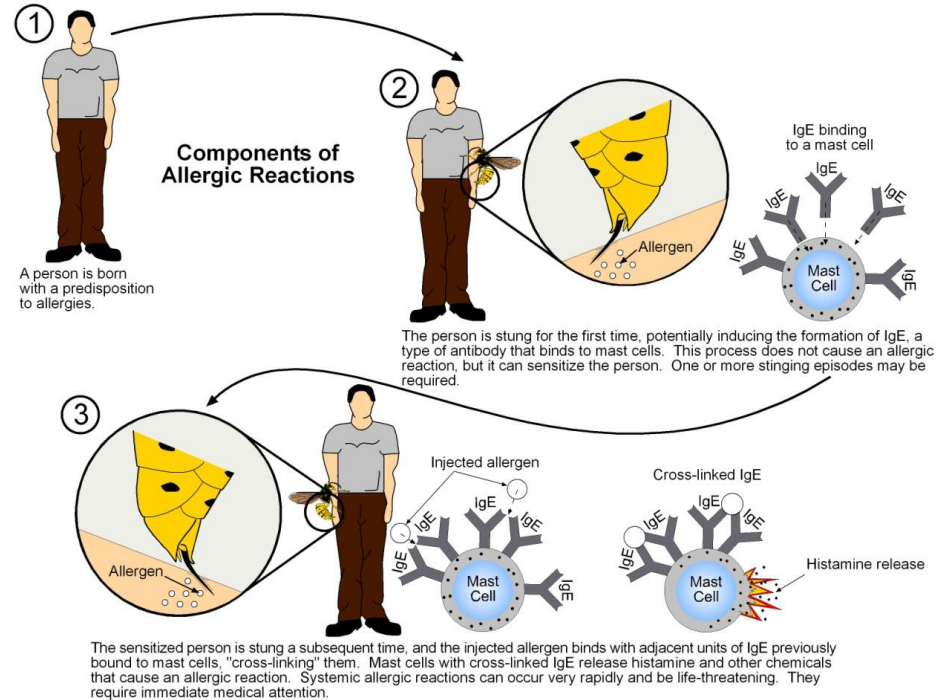


Hypersensitivita – poškozující reakce imunitního systému (**alergie**)

Stádia:

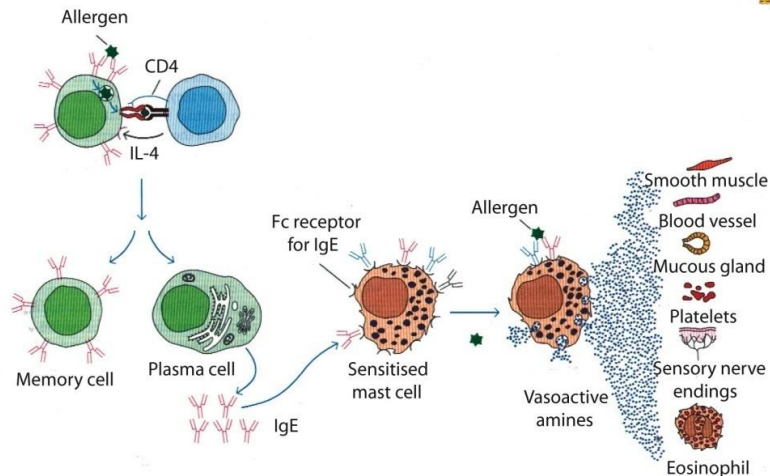
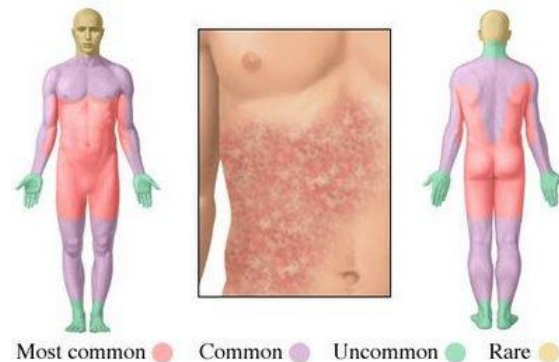
Indukce (senzitivace) – dostatečné množství zcitlivující látky

Elicitace (vyvolání reakce) – u senzitivovaných jedinců po opakovaném vystavení škodlivině



Typ I – atopie – okamžitá odpověď na alergen
(senná rýma, ekzém, vyrážky)

- vasodilatace, vtok kapalin do tkání,
- stimulace smyslové části nervového systému
- provázání IgE vázaných na basofily po vazbě alergenu → uvolnění histaminu



**I
(immediate)**

Clonal expansion of B cells; Cytophilic antibody (IgE) generated; binds to mast cells

Antigen binds to cell bound antibody, cross-links receptors, causing release of mediators

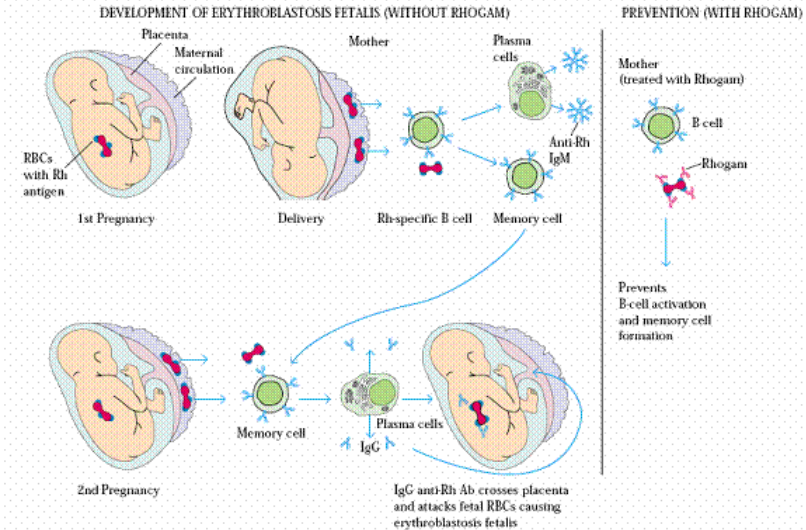
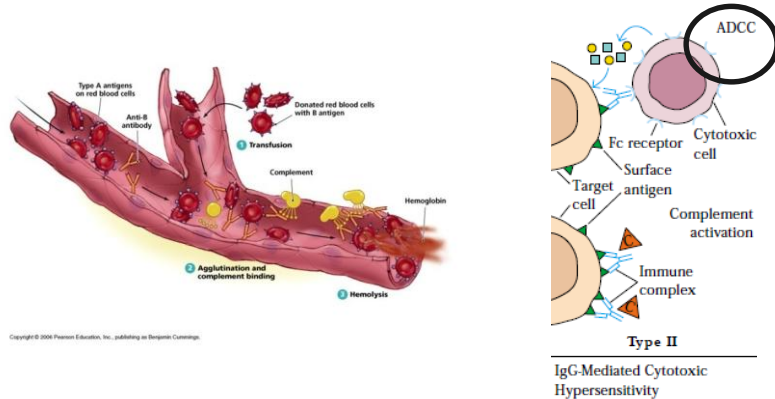
Anaphylactic response to bee sting

Indukce

Elicitace

Příklad

Typ II (cytolytická) – léky (penicilin, acetaminofen) reagují s membránami a vytváří „antigeny“ → vazba IgG a aktivace komplementu = lýze buněk



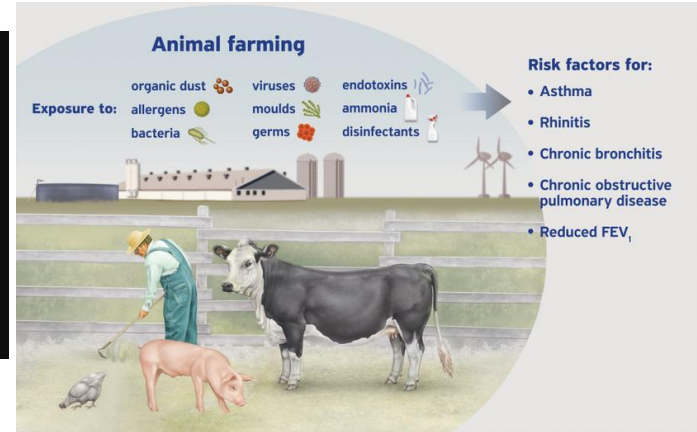
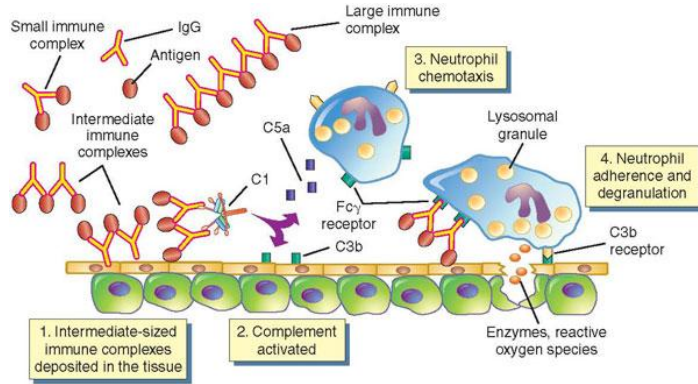
II
(cytolytic)

Clonal expansion of B cells; IgM, IgG generated. Antigen binds to cell membrane

Anamnestic^a Ig response; binds to cell bound antigen and in the presence of complement or activated macrophages cell lysis occurs

Rh factor incompatibility, Hemolytic anemia in reaction to drug treatment

Typ III – komplexy se hromadí v tkáni a atrahují makrofágy a lymfocyty (**Arthrusova reakce**) - Farmářovy plíce



III
(Arthus)

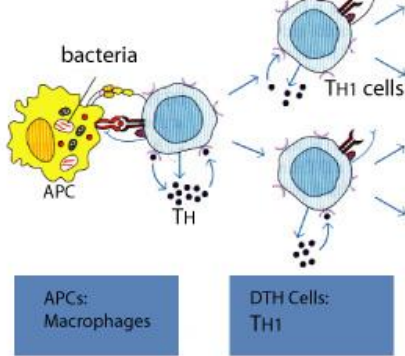
Clonal expansion of B cells; IgM, IgG generated

Anamnestic Ig response; antigen antibody complexes form in some tissues leading to inflammation

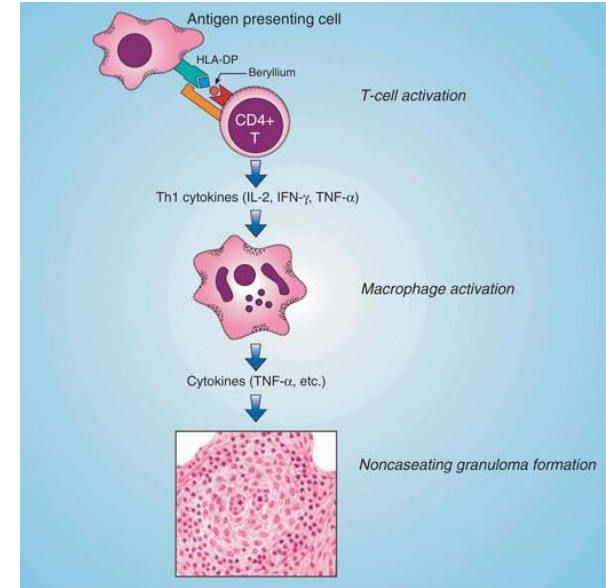
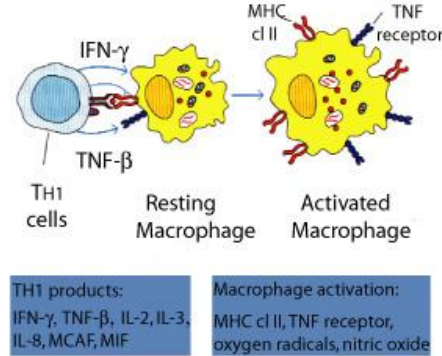
glomerular nephritis, rheumatic heart disease, farmers lung

Typ IV – opožděná reakce (DTH), 24 až 48h po expozici – T-lymfocyty + makrofágy
 - reakce na Škumpu jedovatou (Poison Ivy), inhalaci Be (berylóza)

(a) sensitisation phase



(b) effector phase



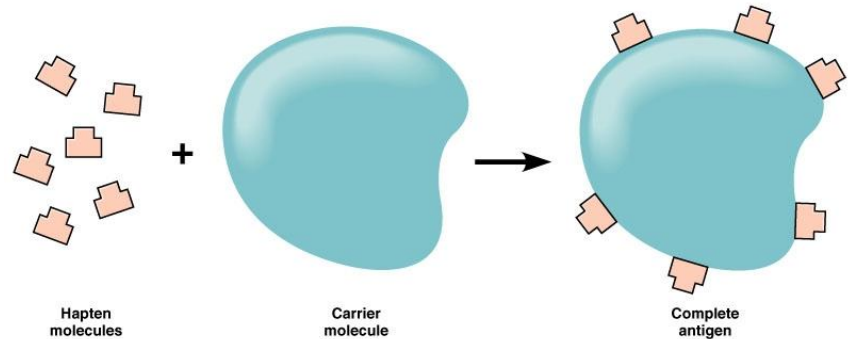
Tuberkulinový test



© Healthline, Incorporated

Xenobiotika - malé molekuly – hapteny
- vazba na protein

↓
Imunitní reakce



Copyright © 2004 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

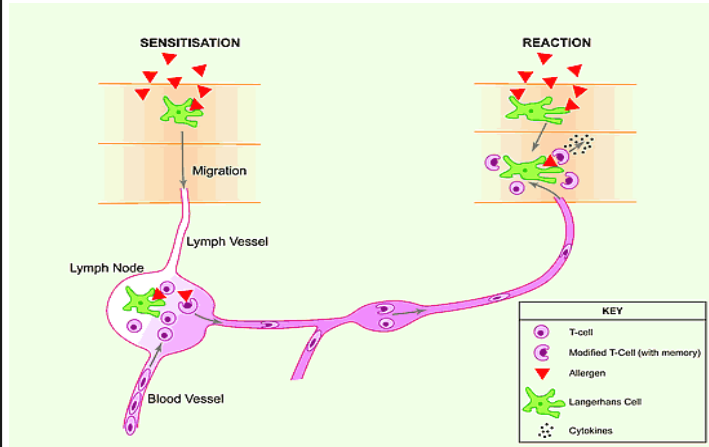
Hapteny – asociace s - kontaktní dermatitida, respirační hypersenzitivita
Proteiny – asociace s - alergie na jídlo, respirační hypersensitivita

2 typy dávek – senzitivizující (velká dávka) a elicitující reakci

Adjuvans – zvyšují vývoj alergické sensitisace

Alergická kontaktní dermatitida (ACD) / kontaktní hypersensitivita (CHS)

- nejběžnější pracovní zdravotní problém
- **typ IV** – kontakt kůže s haptenem – reakce s kožními proteiny a fagocytace Langerhansovými buňkami (APC) → přechod do lymfatických uzlin – prezentace lymfocytům, vznik paměťových buněk a jejich přesun do kůže → reexpoze chemikálii = rychlá aktivace T-lymfocytů a produkce erythemu a edemu – např. poison ivy (škumpá jedovatá)

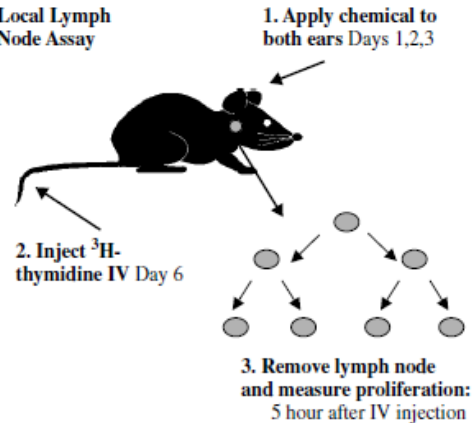


Metody detekce ACD/CHS – odhad koncových výstupů (edem, erytém)

- maximizační test morčat - i.d. injekce testované látky s adjuvans
- Buehlerův uzavírací test - lokální senzitivace
 - oba testy – po 2 týdnech aplikace na různá místa kůže a zhodnocení výskytu erythemů a edemů za 24 a 48h

Látka je senzitivující = 30% (maximizace) nebo 15% (Buehler) zvířat má příznaky

Local Lymph
Node Assay



Levnější alternativa – test lokálních lymfatických uzlin (LLNA) – aplikace látky do ucha a měření klonální expanze T-lymfocytů

U člověka – **Patch test**



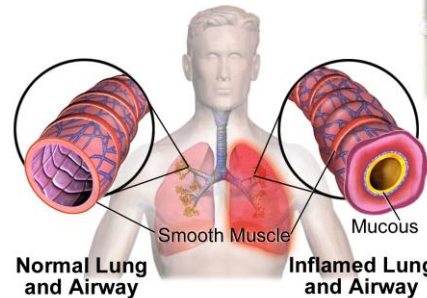
Respirační Alergeny – pracovní / environmentální chemikálie

- alergické astma – Typ I (IgE) hypersensitivita s mediátory bronchokonstrikce
- 2-8h po okamžité odpovědi – astmatici prodělávají pozdní reakci - mukosní hypersekrece, bronchokonstrikce, „dýchavičnost“ na nespecifické stimuly (histamin) a zánět s eosinofily

<i>Proteins</i>	<i>Low molecular weight (<3000)-haptens</i>	<i>Adjuvants</i>
Enzymes	Toluene diisocyanate	Ozone
Latex	Diphenylmethane diisocyanate	Nitrogen dioxide
Animal dander	Phthalic anhydride	Diesel exhaust
Dust mite	Trimellitic anhydride	Residual oil fly ash
Molds	Platinum salts	
Cockroach	Reactive dyes	
Microbial pesticides		

Jedinci citliví k alergii = atopici

Broncho-provocation test –
inhalace aerosolu – spirometrie
– měření FEV1 (maximální
objem vzduchu, který lze silou
vyfouknout)



Potravní alergie

= bezpečnost „Geneticky Modifikovaných Potravin“

- obavy, že vložení nového genu do úrody → nový alergen
- řídký výskyt – 5% dětí, 2-3% dospělých = pokud jsou → hrozné následky – např. arašidy
- současný stav poznání plně **nerozumí vztahu struktury proteinu a vzniku alergie** u některých jedinců



- povolení od FDA:

a) vyvolává donor alergii?

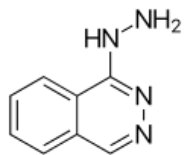
b) je AA sekvence podobná sekvenci allergenu ?

c) jsou přenášené proteiny rezistentní na digesci?



Autoimunita

- cca 3% populace, orgánově specifická (diabetes I) a systematické (lupus erythematosus)
- citlivost zahrnuje genetickou komponentu, v některých případech ženy citlivější než muži
- léky vyvolaný LE – např. hydralazine, procainamide



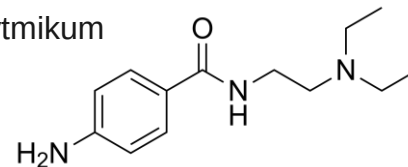
antihypertensivum



- rizikový faktor pro revmatoidní artritidu (RA) – cigaretový kouř – korelace nárůstu protilátek proti citrulinovaným proteinům



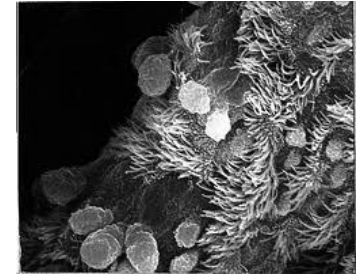
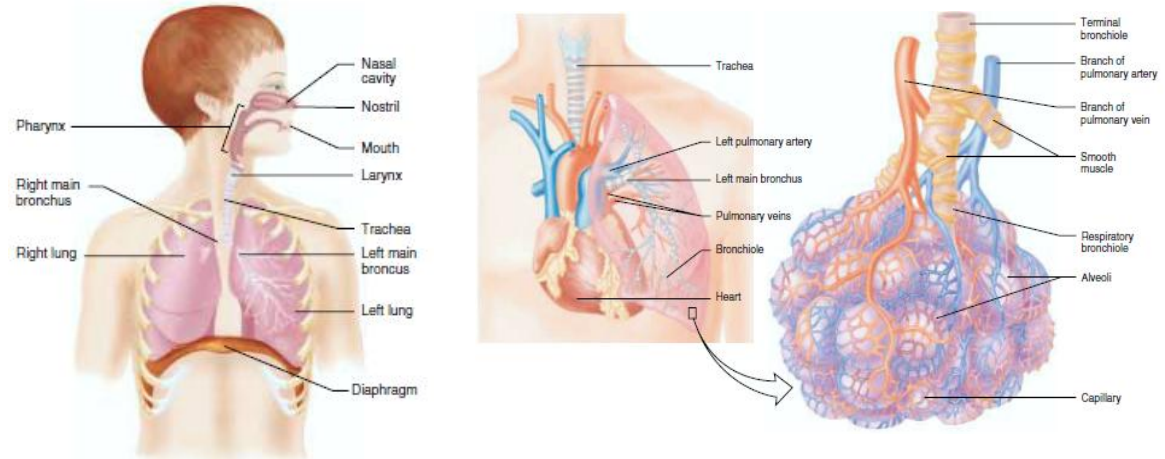
antiarytmikum



PULMONOTOXICITA



Anatomie



Nasal
Tracheo-bronchial
region
Bronchioles
Alveoli

Stratified squamous to mucociliated epithelium with olfactory cells
Mucociliated epithelium (ciliated, mucous cells, basal cells); smooth
muscle cells; fibroblasts; neuroendocrine cells; immune cells
Mucociliated epithelium with Clara cells in distal bronchioles and
alveolar ducts
Type I and type II epithelium, alveolar macrophages

Plíce – eliminační systém

-Těkavé sloučeniny

- Výměna plynů mezi krví a alveolem pasivní difusí

- plyny, aerosoly, dým, organické /anorganické částice

Nos – první bariéra pro vstup toxikantů – nosní epitel obsahuje CYPy a FMO →detoxifikace (indukované léze)

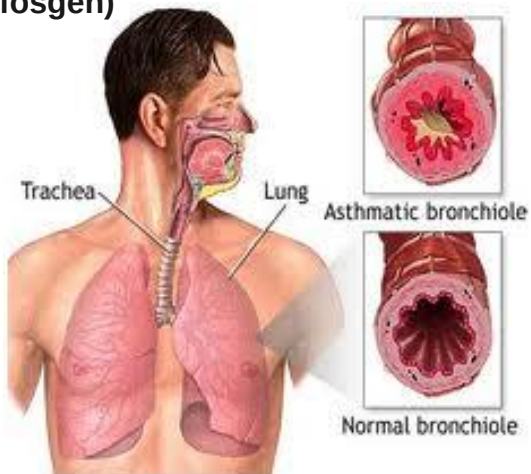
Trachea a bronchi – produkce tekutin a tvorba hlenu – pohyb přes řasinky – odnášení zachycených částic – eliminace polknutím nebo vykašláním

Plíce – výměna plynů O_2 / CO_2

Toxicant	Source	Damage
Aluminum dust	Ceramics, paints, fireworks, electrical goods	Fibrosis
Ammonia	Manufacture of fertilizers, explosives, ammonia	Irritation
Arsenic	Manufacture of pesticides, glass, pigments, alloys	Lung cancer, bronchitis
Asbestos	Mining, construction, shipbuilding	Asbestosis, lung cancer
Beryllium	Ore extraction, ceramics, alloys	Fibrosis, lung cancer
Cadmium oxide	Welding, smelting, manufacture of electronics, alloys, pigments	Emphysema
Chlorine	Manufacture of pulp and paper, plastics, chlorinated chemicals	Irritation
Chromium	Manufacture of Cr compounds, paint pigments	Lung cancer
Coal dust	Coal mining	Fibrosis
Hydrogen fluoride	Manufacture of chemicals, plastics, photographic film, solvents	Irritation, edema
Iron oxides	Welding, steel manufacturing, mining, foundry work	Fibrosis
Nickel	Nickel extraction and smelting, electroplating	Nasal cancer lung cancer, edema
Nitrogen oxides	Welding, explosive manufacturing	Emphysema
Ozone	Welding, bleaching, deodorizing	Emphysema
Phosgene	Production of pesticides, plastics	Edema
Silica	Mining, quarrying, farming	Fibrosis (silicosis)
Sulfur dioxide	Bleaching, refrigeration, fumigation coal combustion	Irritation
Talc	Rubber industry, cosmetics	Fibrosis
Tetrachloroethylene	Dry cleaning, metal degreasing	Edema

Typy toxické odpovědi:

- **iritace** (dráždění) – těkavé sloučeniny (NH_3 , Cl_2) – zúžení dýchacích cest – edém či sekundární infekce po dlouhodobé či silné iritaci (ozon, fosgen)

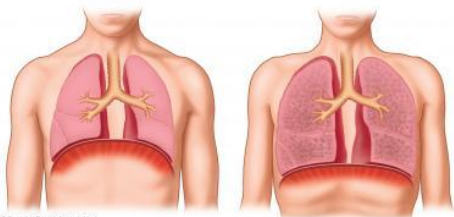


- **fibróza** – tvorba kolagenové tkáně
- **Silikosa** (inhalace SiO_2) – snaha fagocytace makrofágy – produkce ROS, chemokinů, tvorba kolagenu - lýza vlastním lysosomem → nekróza
- **Azbestosa** (inhalace hořčnatých silikátů) = zkrácení dechu, kašel

NESLUČITELNÁ s funkcí plic



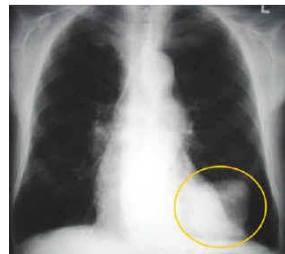
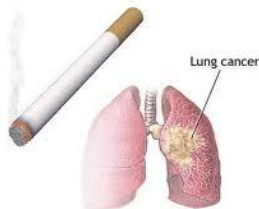
- **emfyzém** – zvětšení objemu plic s destrukcí povrchu kde probíhá výměna plynů (kouření)



© Brenatus Technologies, Inc.

- **alergické odpovědi** – mikroorganismy, prach – zúžení dýchacích cest - Farmářovy plice = spóry plísní rostoucí na vlhkém seně; chronická bronchitida = bavlněný, lněný prach

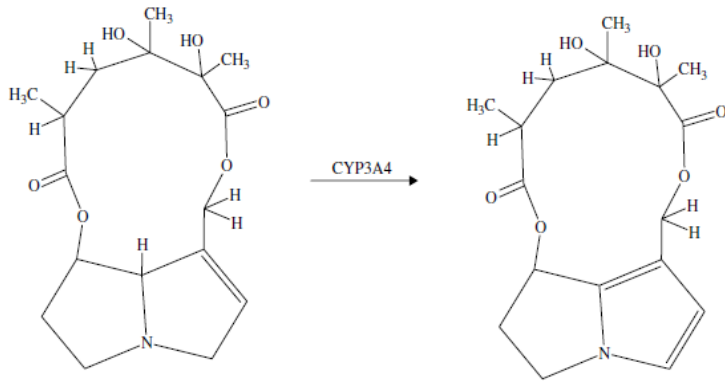
- **rakovina** – kouření cigaret = PAH (benzo[a]pyren) – metabolizace CYP za vzniku reaktivních metabolitů



Činitelé poškození plic – ROS ($\cdot\text{O}_2$; $\cdot\text{OH}$) – peroxidace lipidů – poškození membrán, DNA (genotoxicita)

Činitelé vyžadující aktivaci:

Monocrotalin (alkaloid *Crotalaria spectabilis*) – nižší dávky jsou jen slabě hepatotoxické, spojené s poškozením plic a pulmonární hypertenzí a následnou smrtí
- **aktivace v játrech**





Sladké
brambory

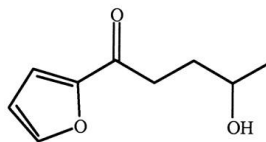


Sladké brambory
napadené plísní
Fusarium solani

**Ipomeanol – aktivován v plicích (dobytěk) -
produkt plísně *Fusarium solani* - sladké
brambory → plicní edém u dobytka**

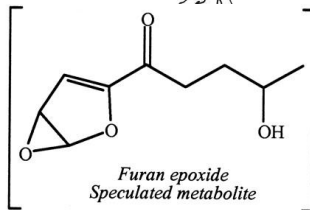


CYP1A2,
CYP3A4



4-*Ipomeanol*

Epoxidation

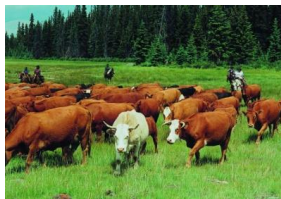


*Furan epoxide
Speculated metabolite*

Covalent binding
to DNA and
proteins

Poškození jater

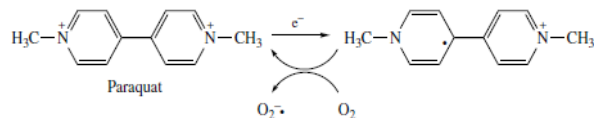
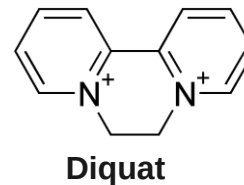
Poškození plic



Paraquat (PQ) – herbicid

- iniciace progresu a lézí v plicích mechanismem „**redoxního cyklování**“ → tvorba radikálu a následný vznik superoxidu a peroxidace membrán

- Nedochází k metabolizaci v játrech – selektivní vychytávání přes „**polyaminový transporter**“ v Alveolárních buňkách I a II → polyaminy jsou inhibitory vychytávání PQ plicní tkání



Slovo závěrem ...

© Original Artist
Reproduction rights obtainable from
www.CartoonStock.com



search ID: gmco123



Zdravé plíce po celý život !!!



THANKS!

Do you have any questions?

youremail@freepik.com

+34 654 321 432

yourwebsite.com



CREDITS: This presentation template was created by [Slidesgo](#), and includes icons by [Flaticon](#), and infographics & images by [Freepik](#)

Please keep this slide for attribution