

Neurotoxikológia XI.



**Neurotoxikológiai
vizsgálómódszerek - anatómia,
molekuláris biológia**

Neurotoxikológia

In vitro, ex vivo, in vivo, in silico vizsgálatok

Az expozíció

- akut vagy krónikus

A hatás

- reverzibilis vagy irreverzibilis

A változások

- működési vagy morfológiai változások

Alkalmazott vizsgálati technikák csoportjai:

- morfológiai vizsgálatok
- biokémiai, molekuláris biológiai vizsgálatok
- képanalízises vizsgálatok
- elektrofiziológiai vizsgálatok
- viselkedési vizsgálatok



Neurotoxikológia

Idegrendszer károsodását bizonyító kísérleti végpontok

Neurobehaviour

- Motor function

- Sensory functions (vision, audition, somatosensation, taste, olfaction, temperature control, nociception)

- Cognitive functions (learning and memory)

- Complex task (performance)

Neuropathology

- General staining (hematoxylin and eosin)

- Teased nerve fibre

- Transmission electron microscopy

- Morphometric methods

- Immunohistochemistry

Neurophysiology

- Electroencephalography

- Evoked Potentials (visual, auditory, somatosensory)

- Peripheral Nerve Conduction Velocity

- Electromyography

- Single cell recordings and ex-vivo

Neurochemistry

- General biochemistry (cellular toxicity, energy-linked functions, mRNA and protein synthesis of cell constituents)

- Cell specific markers

- Neurotransmission

Fig. 1. Endpoints used for in vivo neurotoxicity assessment and the related OECD and EC guidelines.



Molekuláris biológiai módszerek

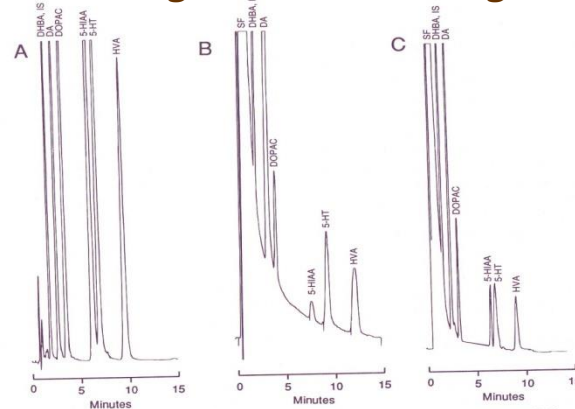
Transzmitter- és receptormennyiség vizsgálatok - neurokémiai változások

- HPLC, MS
- receptorkötési tesztek
- szinaptoszóma aktivitás mérés

HPLC-s vizsgálatok (nagy nyomású folyadék kromatográfia)

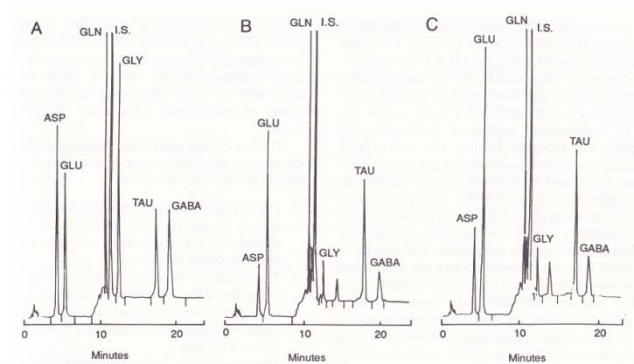


A biogén aminok vizsgálata



referencia csúcsok kontroll striatum MPTP kezelt

Aminosavak vizsgálata



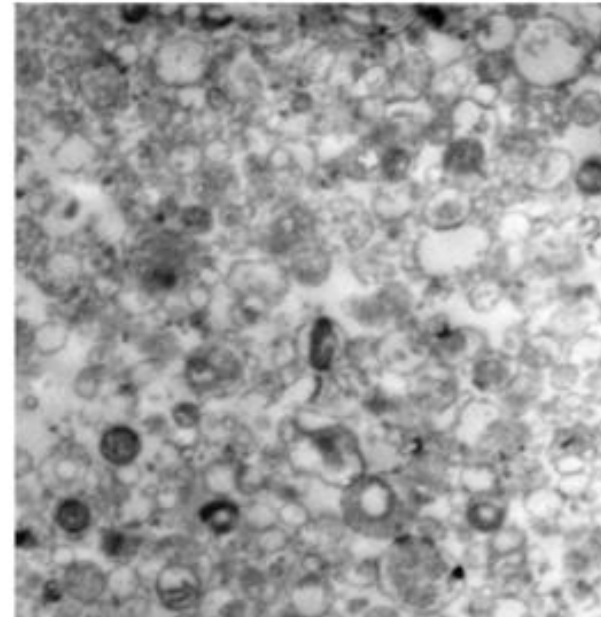
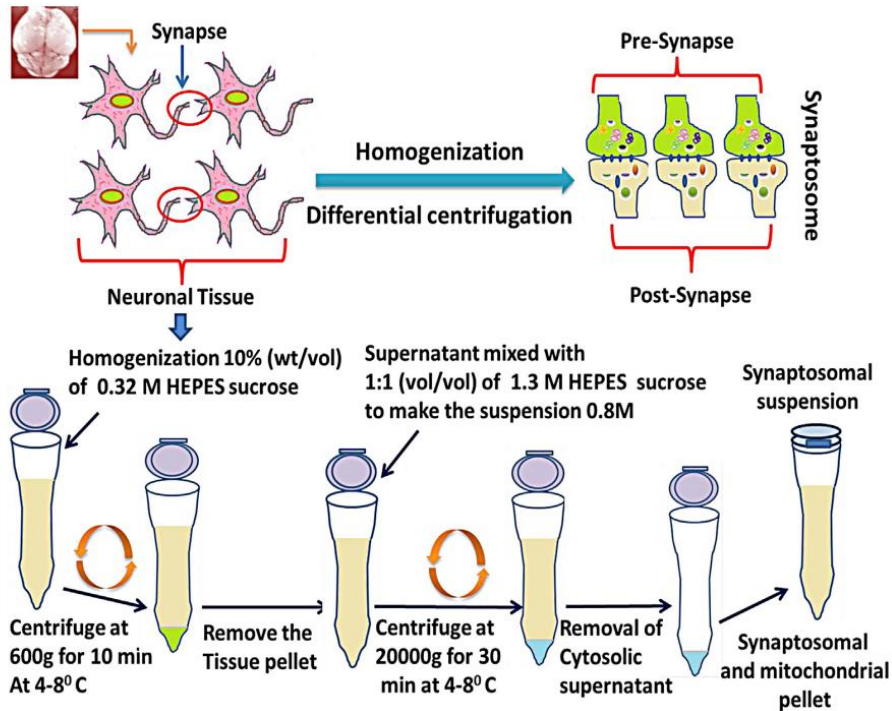
referencia csúcsok kontroll hpc toxin kezelt hippocampus

minta előkészítés
eluenek
detektorok



Molekuláris biológiai módszerek

Szinaptoszóma preparátum



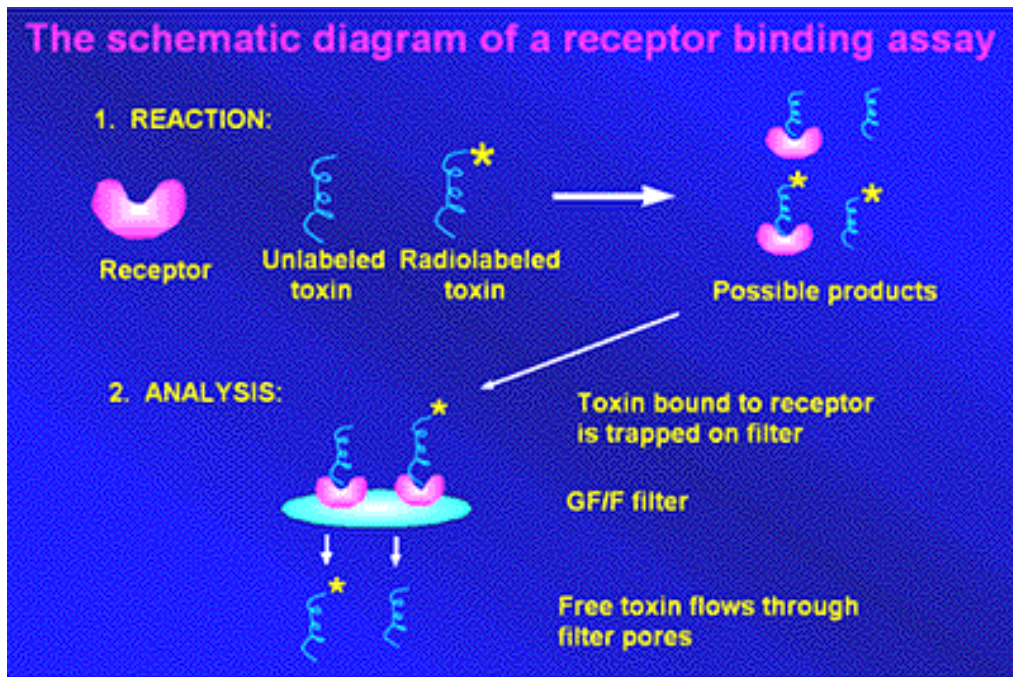
Kamat et al. / *MethodsX* (2014) 1:102–107

Szinaptikus fehérjék, receptorok, transzmitterek...
Funkcionális mérésre is alkalmas!
Radioligand mérés, HPLC, gélelektroforézis stb.



Molekuláris biológiai módszerek

Receptorkötési teszt



Felszínhez kötött technikák

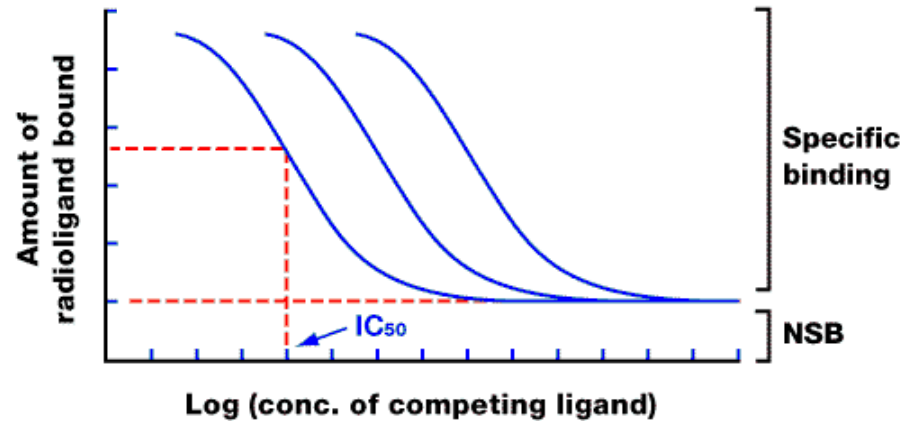
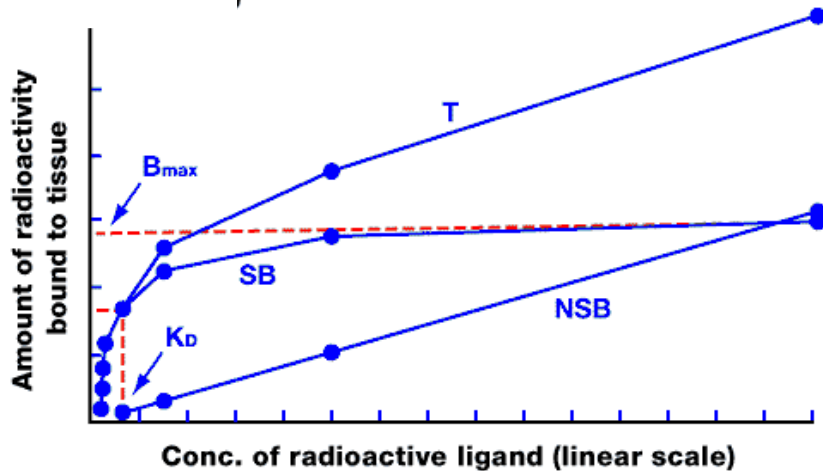
RIA - radioimmunoassay

ELISA - enzyme-linked immunosorbent assay



Molekuláris biológiai módszerek

Receptorkötési teszt



Szaturációs görbe

T: összes kötés

NSB: nem specifikus kötés, nem-szaturál

SB: specifikus kötés, ami B_{max} -nál szaturál

Ha az x-tengely logaritmikus, az SB görbe szigmoid lefutású

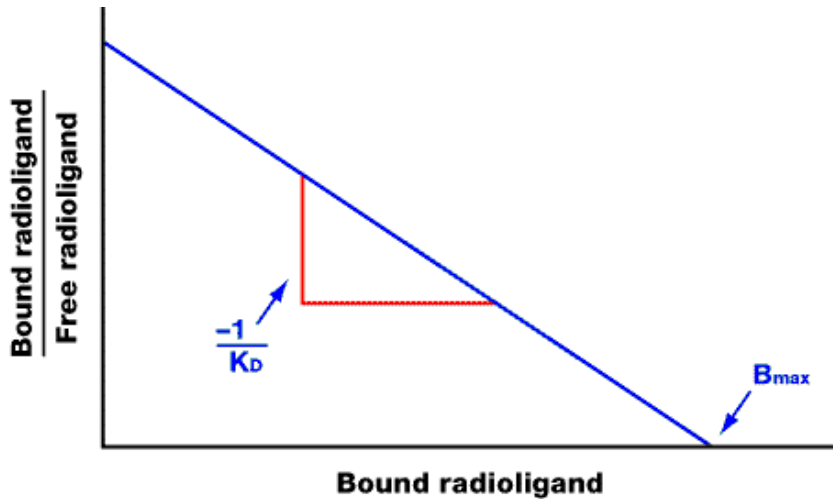
K_D az a ligandmennyiség, ami a receptorok 50%-át elfoglalja, a Scatchard görbéből lehet kiszámítani

IC_{50} : féltelítettség



Molekuláris biológiai módszerek

Scatchard plot

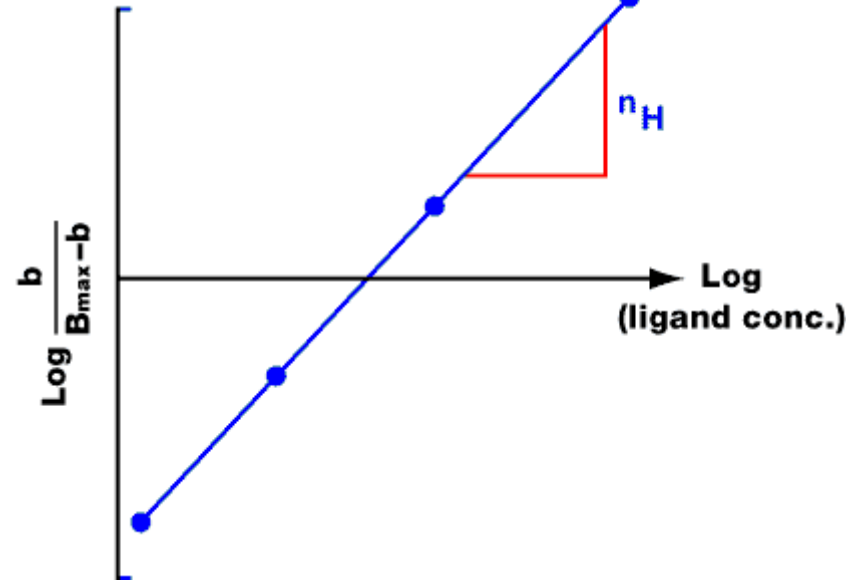


Scatchard analízis

Az y-tengely a kötött és szabad radioligandumok arányát mutatja.

A B_{\max} és a K_D értéke számíthatók. Csak akkor egyenes az összefüggés, ha egyetlen kötőhely van.

Hill plot



Hill-összefüggés

Az y-tengely a radioligand által elfoglalt receptorok és a nem-elfoglalt receptorok arányát mutatja

b = a ligandkötés mértéke



Molekuláris biológiai módszerek

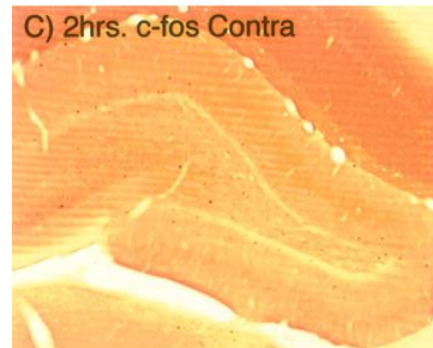
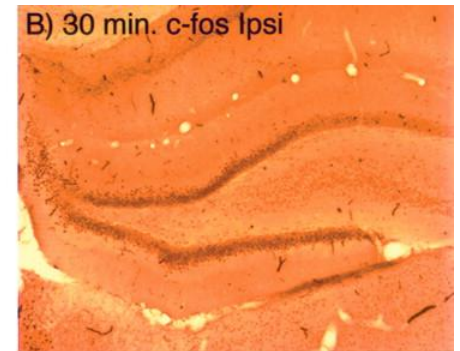
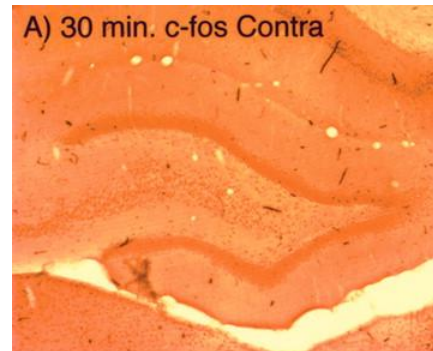
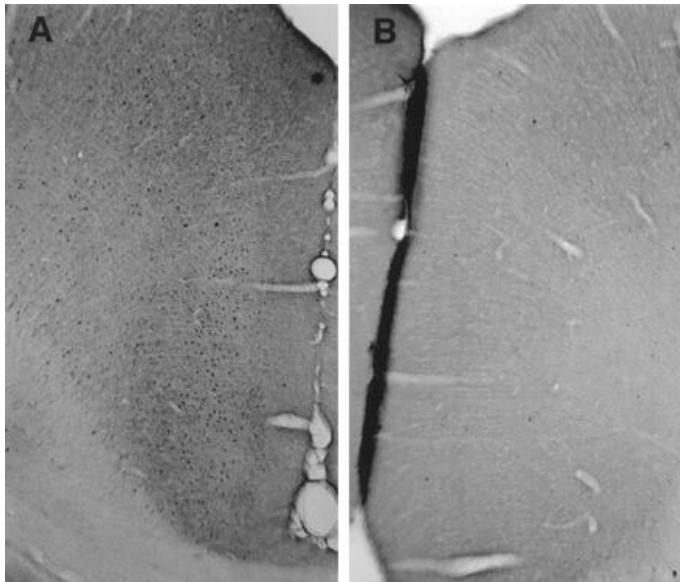
Molekuláris változások toxikus hatásra

- Korai gének aktiválódása, géntermék megjelenése (fos, jun) nukleinsav vizsgálat, fehérje kimutatás
- Stressz-fehérjék kimutatása
HSP-72 hősokkfehérje
ubiquitin
- Gliális fehérjék meghatározása (gliális aktiváció sérüléskor)
GFAP
laminin
- Nukleinsav kimutatása pl. fluoreszcens *in situ* hibridizációval, kvantitatív PCR-rel



Molekuláris biológiai módszerek

c-fos aktiváció - immuncitokémiai vizsgálatok a géntermék kimutatására



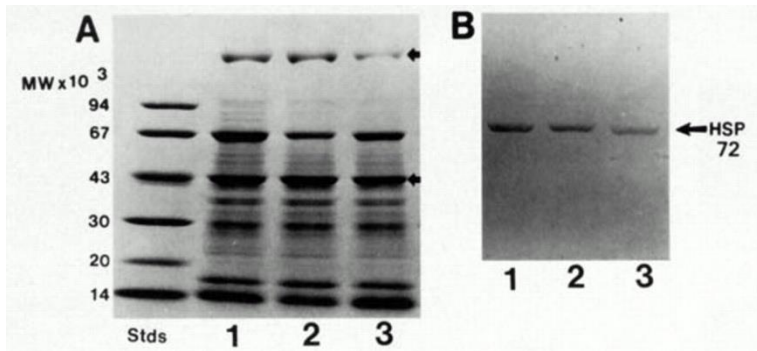
c-Fos patkány piriform kéreg



Molekuláris biológiai módszerek

Gélelektroforézises vizsgálatok - a fehérjék szétválasztása méret/töltésfüggő

Pl. a sejtek védekező mechanizmusának aktiválódására utal a hősokk fehérjék (HSP 72) termelődésének beindulása, ami kimutatható ezzel a technikával

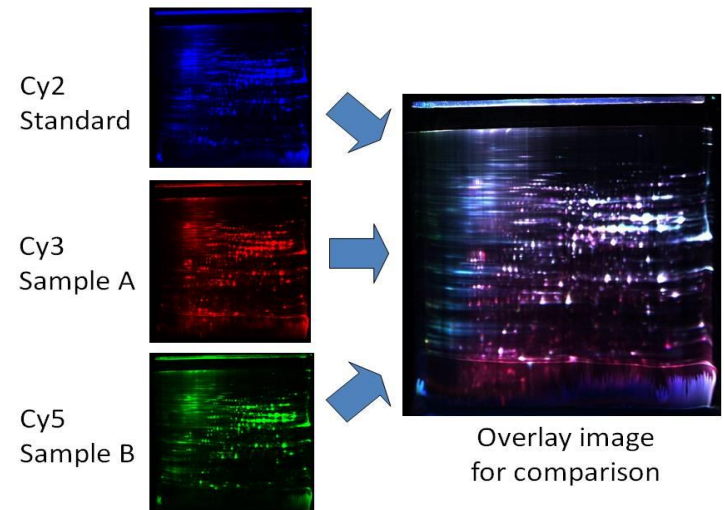


SDS
sodium dodecil sulphate

PAGE
polyacrylamide-
gelelectrophoresis

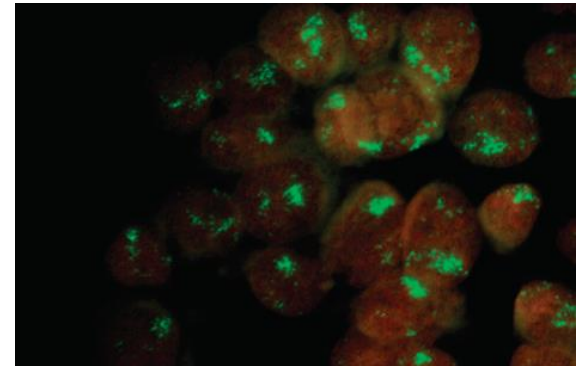
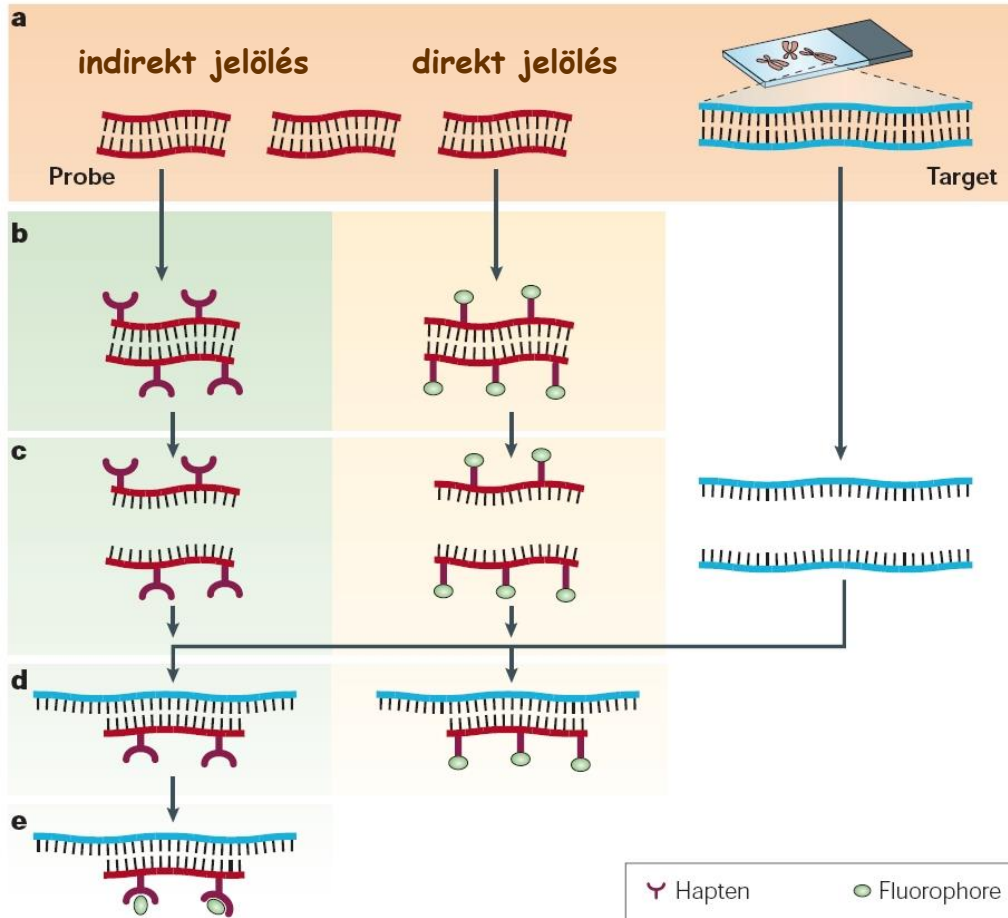


Két dimenziós differenciál gél elektroforézis (DiGE)

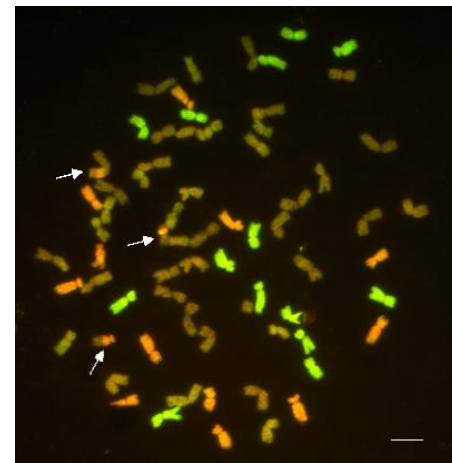


Molekuláris biológiai módszerek

Fluorescence In Situ Hybridization (FISH)



fénymikroszkópos vizsgálat



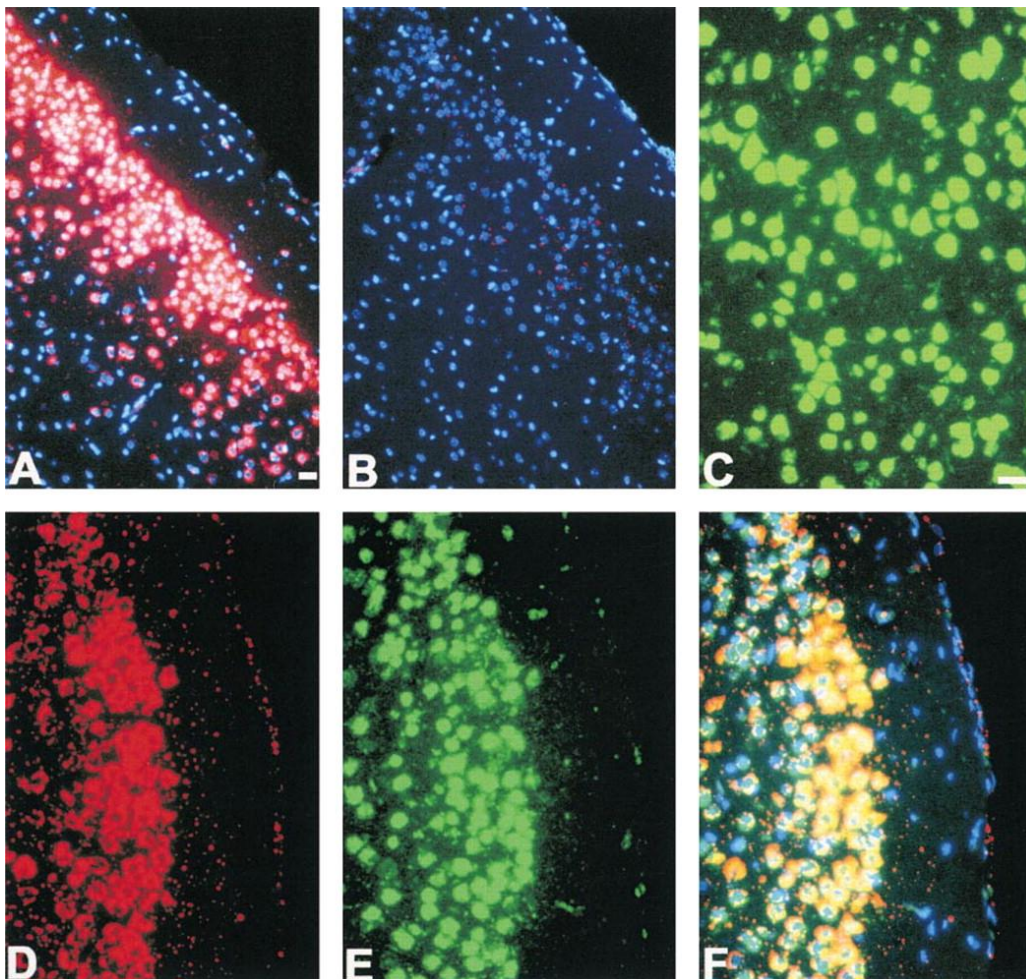
kromoszóma jelölés

O'Connor, C. (2008) Fluorescence in situ hybridization (FISH). *Nature Education* 1(1):171



Molekuláris biológiai módszerek

Nukleinsav kimutatása FISH + klasszikus immuncitokémia



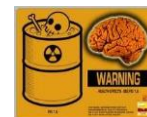
Zöld: Neu-N -
idegsejt

Kék: Hoechst-
festés - mag

Piros: gliális
neurotrofikus
faktor receptor
mRNS

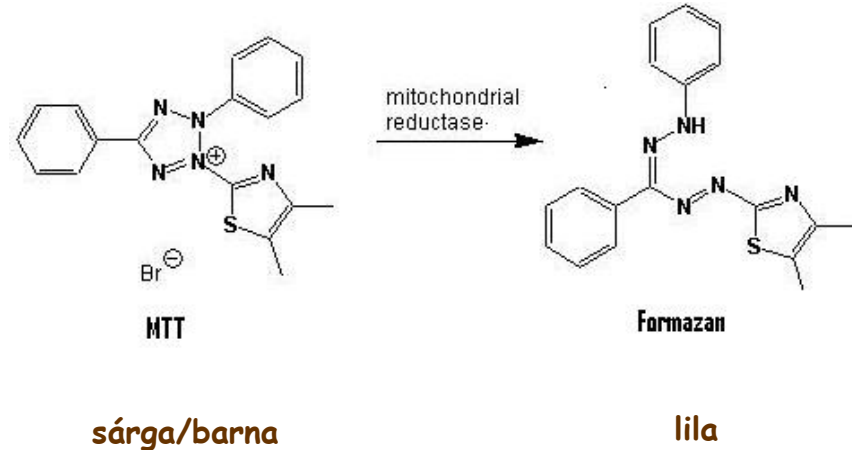
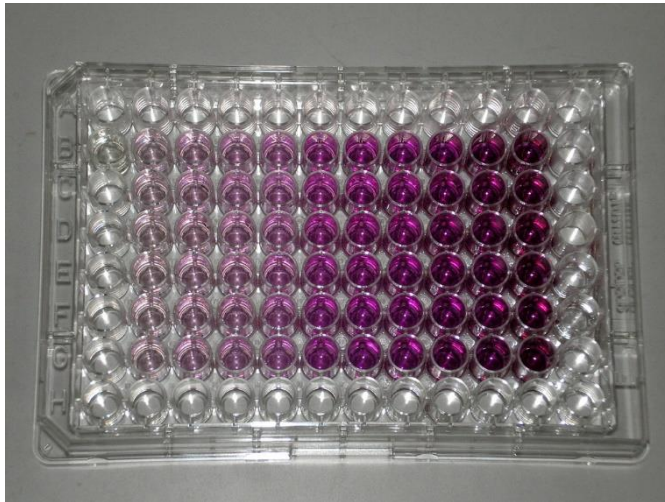
Scale bar: 25 μ m

Figure 2 Neuronal localization of GFR α 2 mRNA in paraformaldehyde-fixed, paraffin-embedded mouse brain sections. Zaidi A U et al. J Histochem Cytochem 2000;48:1369-1375



Sejtbiológiai módszerek

MTT életképességi teszt



Pl. idegsejttenyészet

Sejtek metabolikus aktivitását tükrözi!

Citoszolikus/mitokondriális oxidoreduktáz enzimek

Élő sejtek számának csökkenése, sejtproliferáció gátlása, anyagcsere-változás

Egyéb citotoxicitási tesztek

(LDH aktivitás, neutrálvörös felvétel...)



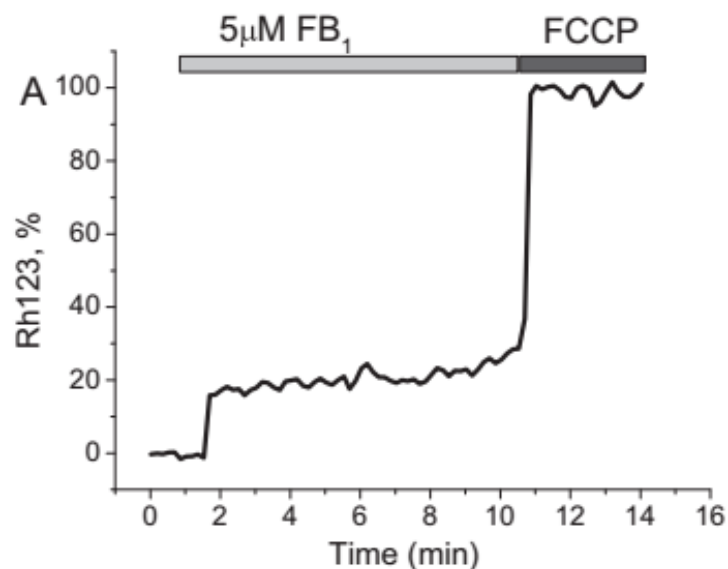
Sejtkárosodás kimutatása

Idegsejtek energiaháztartása

- mitokondriális membránpotenciál (MMP)
- intracelluláris ATP szint
- oxidatív stressz - ROS, lipidperoxidáció, glutation...

Excitotoxicitás

- Ca²⁺ szint (pl. fura-2)
- NMDA-receptorok aktivitása



Rhodamin a polarizált mitokondriumokba felvevődik, fluoreszcencia a polarizáltság csökkenésével arányos
FCCP - szétkapcsolószer (100%)



Anatómiai módszerek

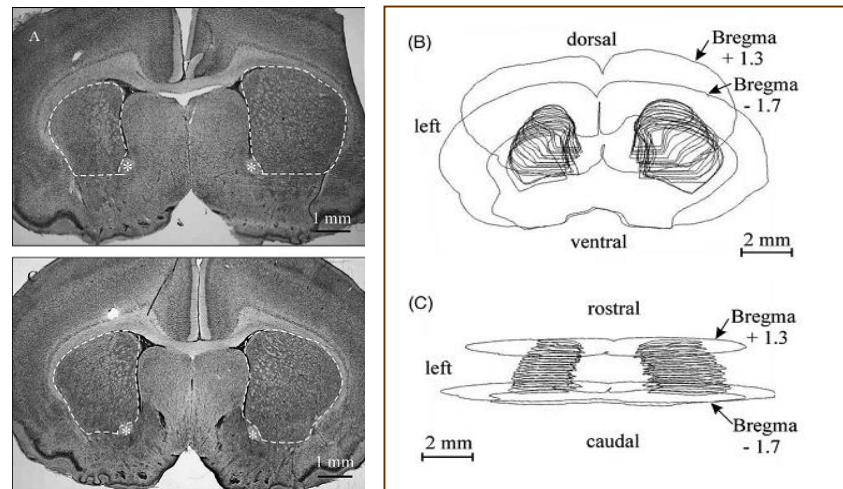
Strukturális változások

- makroszkópikus
súlymérés
térfogatmérés

Súly- és méretmeghatározás



Morfometriai vizsgálat



Anatómiai módszerek

Strukturális változások

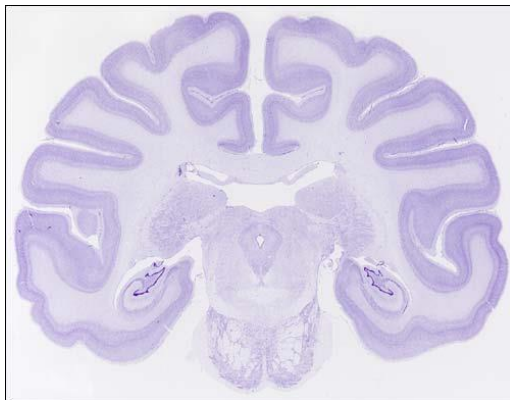
- mikroszkópikus

fénymikroszkópos (immunhisztokémia, autoradiográfia)

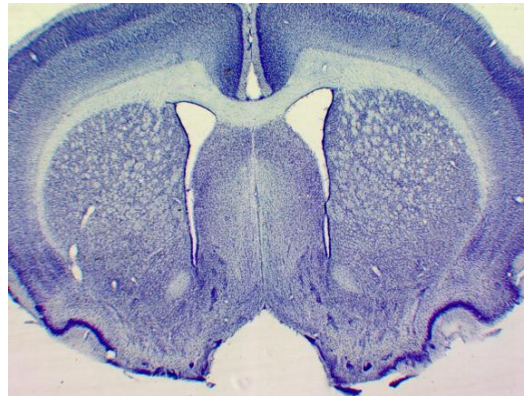
elektronmikroszkópos vizsgálatok

Hisztopatológia, rétegvastagság, sejtszám...

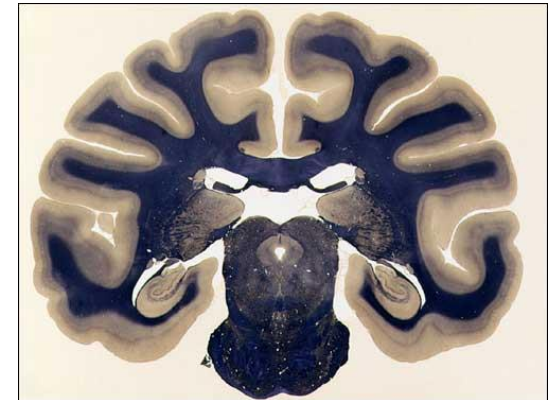
A Nissl-festés a normál szövet alap festésére szolgál, a RER-t festi



A krezil-ibolya festés a Nissl-hez hasonló általános festés



A Weil-festés a myelinizált axonok alapfestésére szolgál (A myelin a króm sókat króm-dioxidá redukálja)

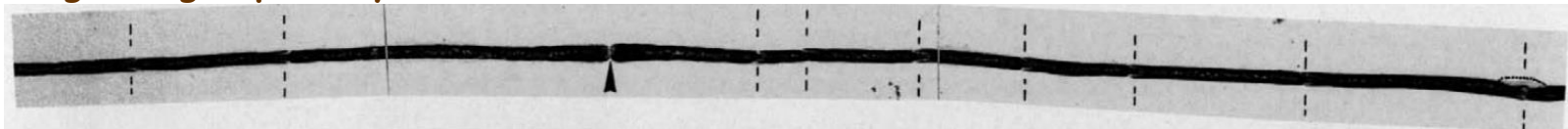


Anatómiai módszerek

Perifériás idegrostok vizsgálata -teased-fiber technique

-1 cm hosszú idegszál fixálása, festés Sudan feketével, majd glicerinen rostok széthúzása mikroszkóp alatt

egészséges patkány n. ischiadicus



Ranvier-befűződés

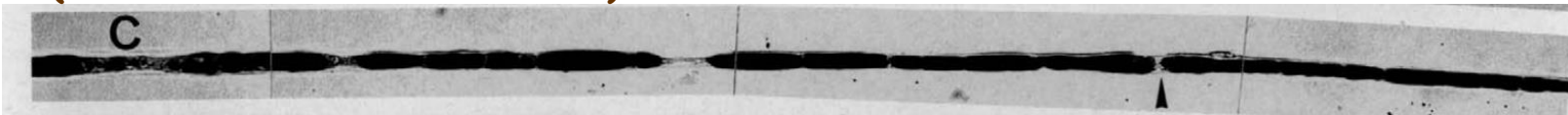
Schwann-sejt magja

neuropátiás patkány n. tibialis



mielin fragmentáció

Waller-féle degeneráció patkány n. tibialisban
(n. ischiadicus átmetszése után)

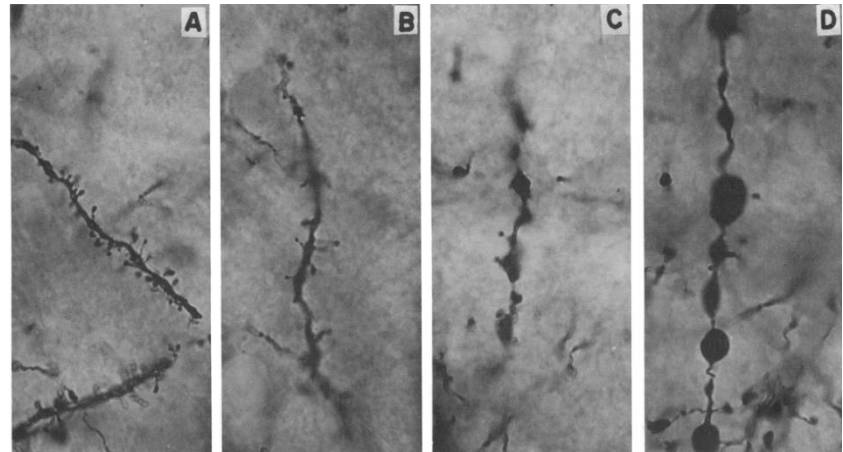
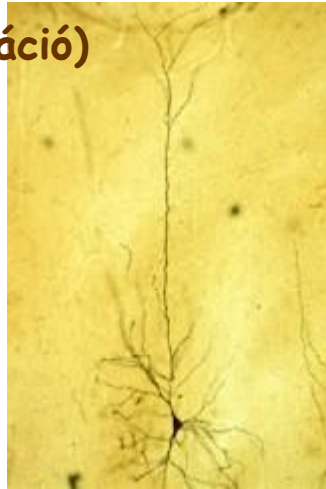


Krinke et al. /Toxicologic pathology 28(1) (2000) 113–121

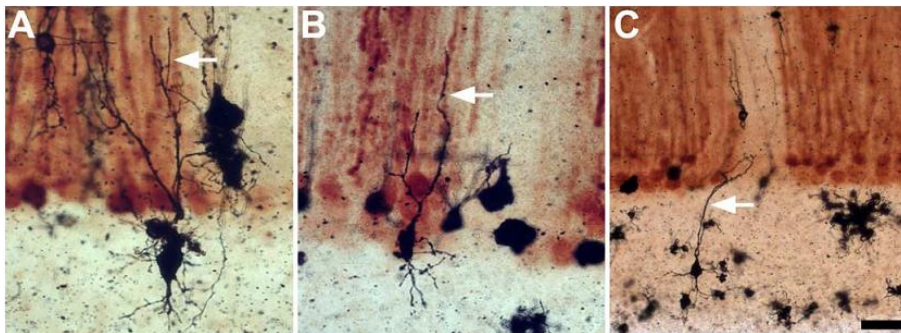


Anatómiai módszerek

Golgi-festés
(Ag^+ -impregnáció)



- A) kontroll dendrit dendrittüskékkel
- B) más morfológiájú dendrit
- C) besugárzás hatása
- D) mérgezés hatása

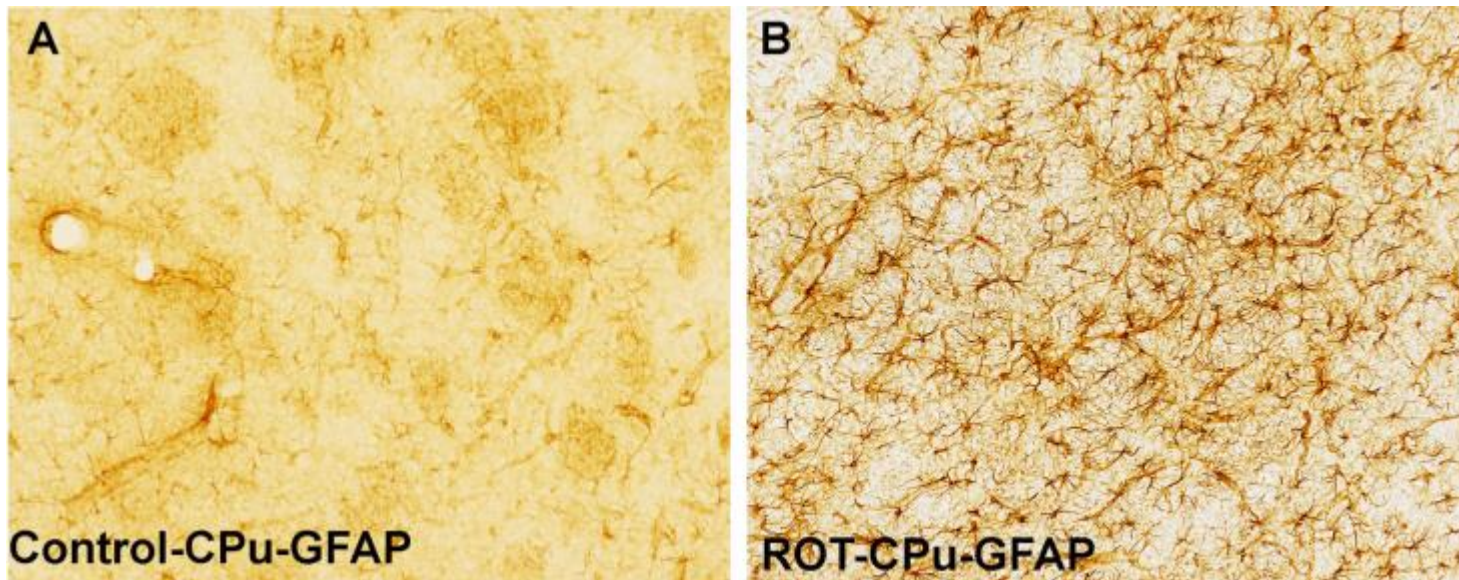


Kisagy fejlődési probléma
(sejtvándorlás visszamaradása)
kimutatása



Anatómiai módszerek

Sérülés hatására bekövetkező asztroglózis kimutatása



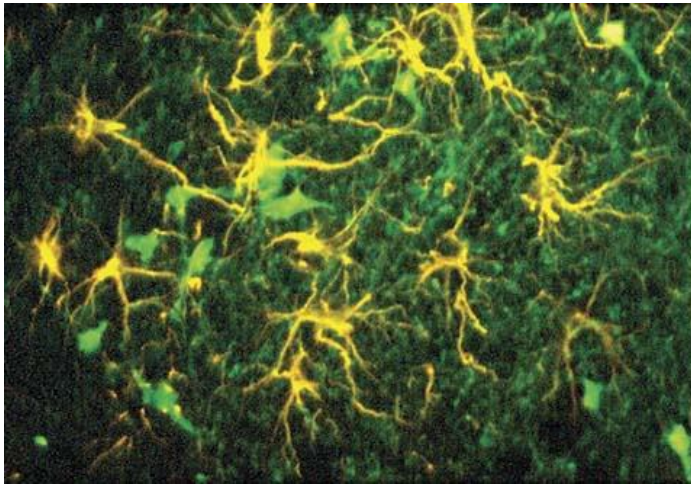
GFAP immuncitokémia (DAB vizualizáció)
- patkány striatum rotenon kezelés után

S. Sarkar et al. / Neuroscience
Letters 606 (2015) 53–59



Sejtpusztulás kimutatása

fluoro JadeB jelölés

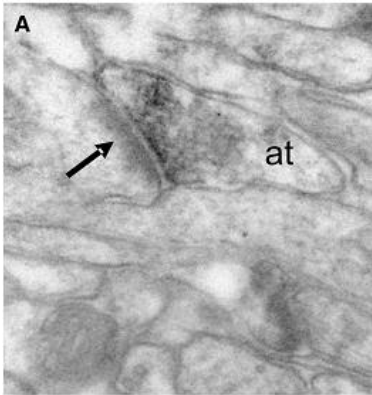


zöld degenerálódó neuronok
fluoro JadeB-vel és sárga
asztrociták GFAP-val festve

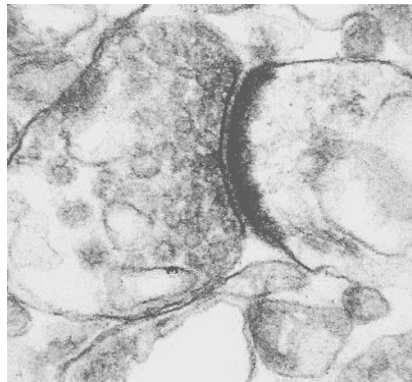
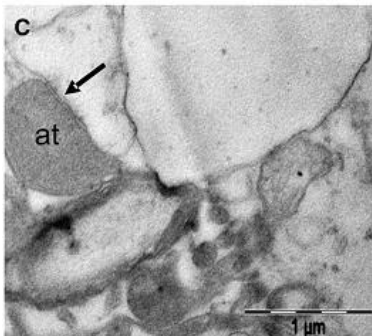
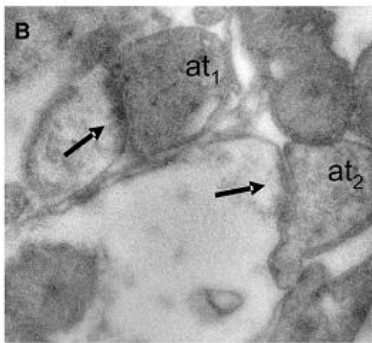


Anatómiai módszerek

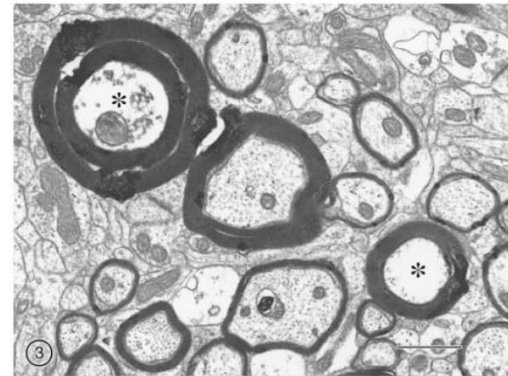
Elektronmikroszkópos vizsgálatok



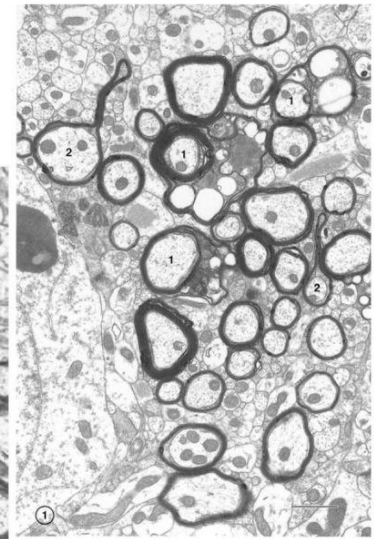
Szinapszisok elváltozásának kimutatása



Axonok degenerációjának kimutatása



* - üres myelinburkok



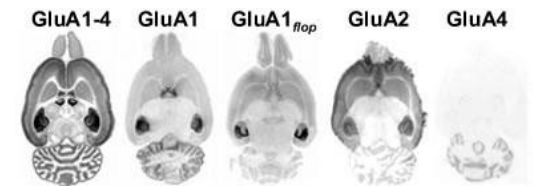
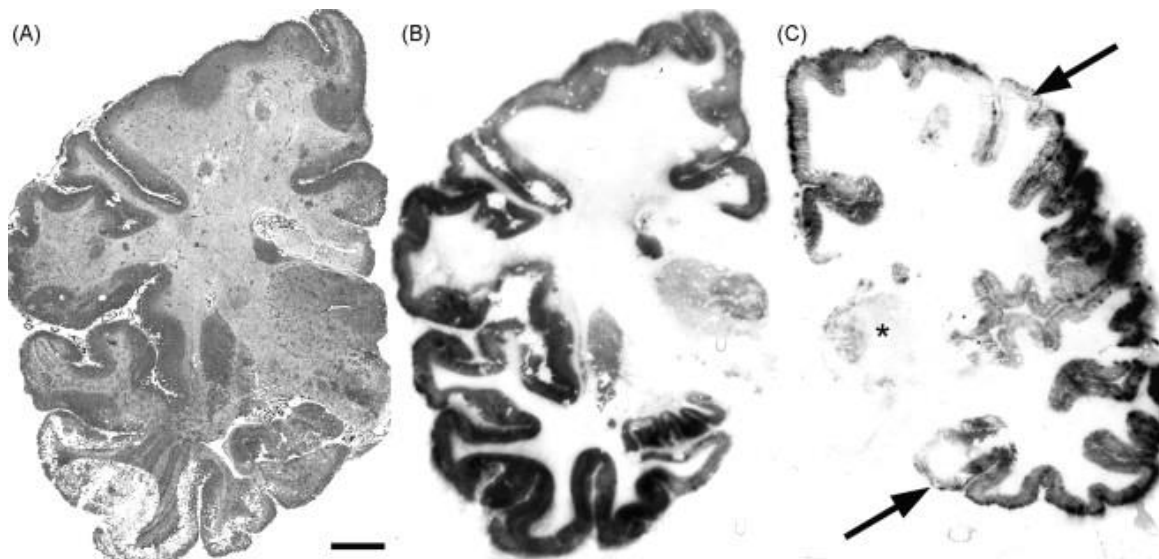
abnormális myelinburkok



Anatómiai módszerek

Hisztoblot technika

- Fixált metszeteket nitrocellulóz membránra nyomják
- Membránon immuncitokémiai festés, majd szkennelés
- Képelemzés (optikai denzitás)
- Pl. receptorszám változás mennyiségi kimutatására



GluR alegységek területi megoszlása patkányban

Beliczai et al 2008. *Neurochemistry International* 53:181–183

A: hematoxilín-festett humán agymetszet, B-C: Neu-N hisztoblot kontroll ill. Alzheimer (Scale bar: 1 cm)

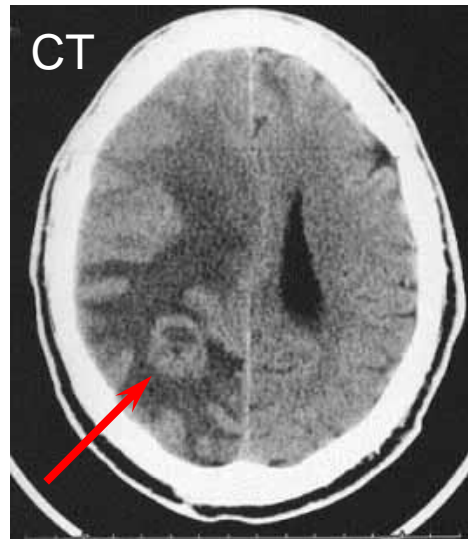


Képképző módszerek

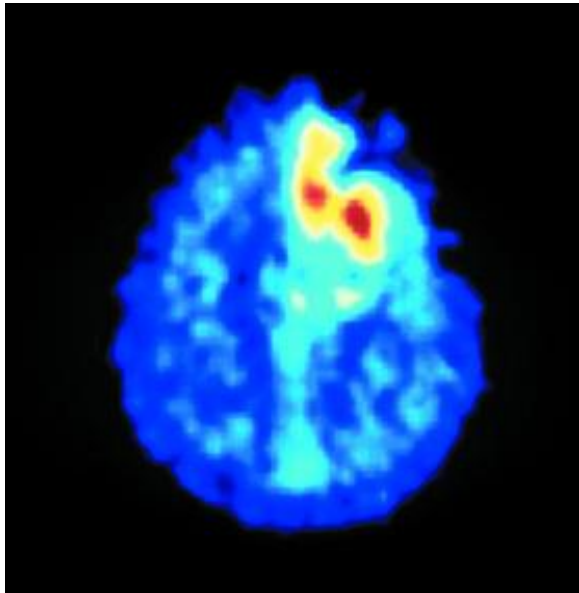
- daganatok, egyéb elváltozások kimutatása
- funkcionális vizsgálatok (agyterületek vérátáramlása, anyagcséréje)

Számítógépes rétegfelvételezés (Computer Tomography, CT)

- Röntgen, kontrasztanyaggal javítva
- Sugárforrás és detektor síkként körbeforog
- Hátrány: sugárterhelés, viszonylag alacsony felbontás



Pozitron emissziós topográfia (PET)



Metionin transverzális PET kép.
Jobb oldali frontális glioma

A képalkotáshoz a radiofarmakonból felszabaduló γ -fotonokat használja

A szervezetbe radioaktív izotóppal jelzett farmakonokat juttatnak. A beadott anyagok a felhasználás helyein felhalmozódnak. A beadott anyagok mennyiségi változása időben követhető.

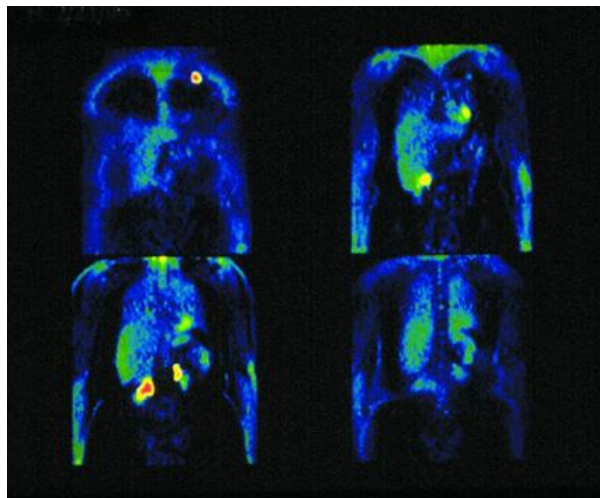
Radiofarmakonok:

^{18}F -dezoxi-D-glükóz (FDG) \Rightarrow a cukor felhasználást mutatja

^{11}C -metionin \Rightarrow az aminosav anyagcserét jelzi

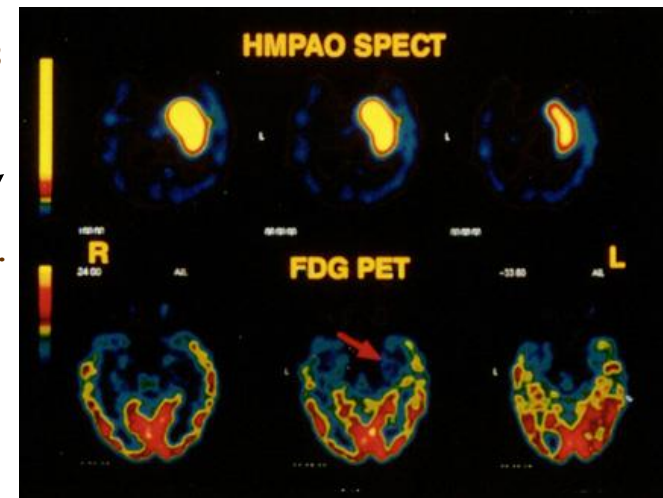
^{18}F -Dopa \Rightarrow preszinaptikus D2 receptoraktivitást jelzi

^{11}C -racloprid \Rightarrow poszt-szinaptikus D2 receptoraktivitást jelzi

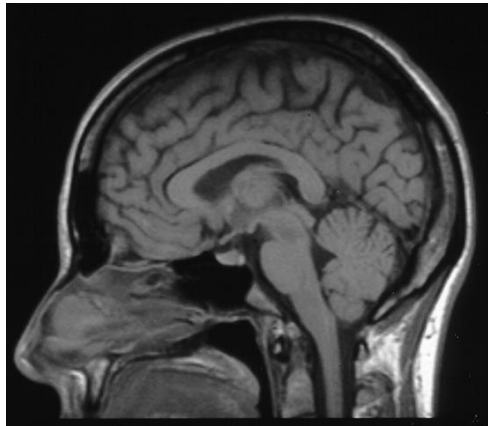


^{18}F -FDG coronalis mellkas
PET. Tüdő daganat és
áttétei

^{18}F -FDG transverzális PET kép.
Csökkent cukoranyagcsere bal
oldalon az epileptogén areának
megfelelően (alsó sor, nyíl);
ugyanitt vérátáramlás fokozódás
ictalis SPECT vizsgálat során
(felső sor)



Mágneses rezonancia képalkotás (MRI)



Előnye: jó felbontású (mm) kép
4-8 s-nyi időfelbontás
→ Funkcionális MRI (fMRI)

