

# PREKLINICKÉ TESTOVÁNÍ LÉČIV

**Petra Plodíková**

Výzkumný ústav organických syntéz a.s.  
Rybitví

*Centralizovaný rozvojový projekt MŠMT č. C29:  
„Integrovaný systém vzdělávání v oblasti výskytu a eliminace reziduí léčiv v životním prostředí“*



# PREKLINICKÉ TESTOVÁNÍ

Poskytují informace o bezpečnosti látky a možných rizicích při podávání.

## Legislativa České Republiky

- Zákon 378/2007 Sb. Zákon o léčivech
  - Vyhláška 86/2008 o stanovení správné laboratorní praxe v oblasti léčiv
  - Vyhláška 226/2008 o Správné klinické praxi a bližších podmínkách hodnocení léčivých přípravků (implemantace ICH E6)
  - Vyhláška č. 255/2013 Sb., o registraci léčivých přípravků, ve znění pozdějších předpisů

## International Conference of Harmonisation (ICH)

- organizace byla založena s cílem harmonizovat požadavky na kvalitu a bezpečnost léčiv v Evropské Unii, Spojených státech a Japonsku.
- Jednotlivé pokyny jsou následně začleňovány do národních legislativ, čímž se stávají závaznými
- <http://www.ich.org>

# PREKLINICKÉ TESTOVÁNÍ

Požadované údaje:

- ❖ **Farmakokinetika a Toxikokinetika**
- ❖ **Akutní toxicita** – toxicita po jednorázovém podání
- ❖ **Subakutní , subchronická až chronická toxicita**
  - toxicita po opakovaném podání
- ❖ **Toxicita na reprodukci**
- ❖ **Mutagenita**
- ❖ **Kancerogenita**
- ❖ **Další specifické účinky**
  - např. lokální účinky – dráždivost, senzibilizace apod.

# PREKLINICKÉ TESTOVÁNÍ

## Akutní toxicita

**Akutní toxicita látky** - nepříznivé účinky, které se projeví po podání jedné dávky nebo více dávek látky během 24h.

**Cíl:** stanovení MTD – maximální tolerované dávky  
+ první odhad účinků pro další testování

Testovací model: obvykle dva druhy savců, hlodavec a nehlodavec

Způsob podání: orální; intravenózní, intraperitoneální, subkutánní, atd.

Vždy minimálně dva různé způsoby podání – terapeutický a parenterální

# PREKLINICKÉ TESTOVÁNÍ

## Akutní toxicita

Základní metodické postupy:

**OECD TG. 420 Acute Oral Toxicity – Fixed Dose Procedure Metoda fixní dávky**

modifikace pro jiný způsob podání

OECD TG. 423 Acute Oral Toxicity - Acute Toxic Class Method

OECD TG. 425 Acute Oral Toxicity – Up-and-Down Procedure

OECD TG. 436 Acute Inhalation Toxicity - Acute Toxic Class Method

OECD TG. 402 Acute Dermal Toxicity

# PREKLINICKÉ TESTOVÁNÍ

## Akutní toxicita orální

**Testovací systém:** albinotický potkan (Wistar), albinotický králík, myš...  
předepsaný věk (potkan 8 – 12 týdnů)

**Provedení:** příprava zvířat - odebrání potravy  
značení a vážení zvířat,  
aplikace – ve vhodném vehikulu

orientační studie – výběr vhodné výchozí dávky  
(2000, 300, 50, 5 mg/kg)

hlavní studie – dávka získaná při orientační studii

počet zvířat – orientační studie 1 až 4

hlavní studie (fixní dávka) – další 4

# PREKLINICKÉ TESTOVÁNÍ

## Akutní toxicita orální

### Klinické vyšetření

příznaky toxicity – změny kůže, srsti, očí, sliznic, dýchání a krevního oběhu, vegetativního a centrálního nervového systému, motorické aktivity a chování. Pozornost bude věnována také výskytu třesu, křečím, slinění, průjmu, letargii, spánku a kómatu.

### Makroskopická pitva

u všech zvířat použitých ve studii (uhynulých i utracených).

### Hodnocení:

hodnotí se mortalita, klinické symptomy intoxikace, přírůstky hmotnosti a patomorfologické změny v průběhu 14-denního experimentu.

# PREKLINICKÉ TESTOVÁNÍ

## Akutní toxicita inhalační

### Definice

stanovení toxicity testované látky po krátkodobé inhalační expozici.

### Testovací systém:

albinotický potkan (Wistar) – obojí pohlaví

**Příprava testované látky** – převedení do inhalovatelné formy: páry, aerosol...

inhalační box - průtok vzduchu, sledování koncentrace v dýchací zóně,

měření teploty a vlhkosti

### Provedení:

nejméně 4 hod expozice,

počet zvířat - 10 (5♀ + 5♂)

**úplná studie** - nejméně 3 hladiny

počet zvířat - 10 zvířat pro jednu dávku (5♀ + 5♂)



# PREKLINICKÉ TESTOVÁNÍ

## Akutní toxicita inhalační

### Hodnocení:

hodnotí se mortalita,

klinické symptomy intoxikace,

přírůstky hmotnosti

a patomorfologické změny v průběhu 14-denního experimentu,  
zvláštní zřetel - horní i dolní část dýchacího traktu

stanovení odhadu **MTD** nebo **LC<sub>50</sub>** pro dané pohlaví

# PREKLINICKÉ TESTOVÁNÍ

## Akutní toxicita dermální

### *Definice*

stanovení toxicity testované látky po krátkodobé dermální expozici.

**Testovací systém:** albinotický potkan (wistar) - samci a samice  
hmotnost (200g)

### **Provedení:**

příprava zvířat - holení, vážení, značení

» aplikace rovnoměrně na plochu asi 10% celkového povrchu těla  
(látka navlhčena - zajištění dobrého kontaktu s kůží)

doba expozice – 24 h. (testovaná látka je fixována pomocí mulového obvazu a nedráždivé náplasti – zabránění orálnímu příjmu)

» po uplynutí expozice zbytky odstraněny omytím vodou

# PREKLINICKÉ TESTOVÁNÍ

## Akutní toxicita dermální

**limitní test - 2000 mg/kg**

počet zvířat - 10 (5♀ + 5♂)

**celá studie** - tři dávkové úrovně

počet zvířat - 10 zvířat pro jednu dávku (5♀ + 5♂)

zvířata umístěna jednotlivě v klecích

pozorování - 14 dnů

sledování tělesné hmotnosti

klinické vyšetření

makroskopická pitva (15. den)

### **Hodnocení:**

na základě metodiky se hodnotí toxické reakce podle pohlaví a dávek, počet zvířat uhynulých nebo humánně utracených během testu, počet zvířat s příznaky toxicity, pitevní nálezy.

stanovení odhadu **MTD** nebo **LD50** pro dané pohlaví

# PREKLINICKÉ TESTOVÁNÍ

## Toxicita po opakované dávce

Vliv testované látky na organismu po opakovaném dlouhodobém podávání (14dní až 2 roky)

Cíl: stanovení cílových orgánů a efekt látky na tyto orgány  
najít závislost mezi dávkou a efektem  
reverzibilita změn

podklady pro odhad bezpečné dávky mající dostatečný účinek pro klinické studie na lidech

podklady pro monitoring v klinických studiích

# PREKLINICKÉ TESTOVÁNÍ

## Přehled testů dlouhodobé toxicity

OECD TG. 407	Subakutní toxicita orální (28denní)
OECD TG. 412	Subakutní toxicita inhalační (28denní)
OECD TG. 410	Subakutní toxicita dermální (28denní)
OECD TG. 408, 409	Subchronická toxicita orální (90denní)
OECD tg. 411	Subchronická toxicita dermální (90denní)
OECD TG. 413	Subchronická toxicita inhalační (90denní)
OECD TG. 452	Chronická toxicita
OECD TG. 451	Karcinogenita
OECD TG. 453	Kombinovaná chronická toxicita/karcinogenita

# PREKLINICKÉ TESTOVÁNÍ

## Toxicita po opakované dávce

### **Provedení:**

#### **Dávkové hladiny:**

minimálně 3 koncentrace testované látky + kontrolní skupina (pouze vehikulum)

dávky vycházejí z výsledků akutních studií, literatury, popř.

z pilotního experimentu s omezeným počtem zvířat a zkrácenou dobou aplikace

satelitní skupiny (ke zjištění reverzibility změn): kontrola a nejvyšší dávka

#### **Aplikace: odpovídá terapeutickému způsobu podání**

Orální – žaludeční sondou

Dermální – fixace na cca 10% povrchu těla

Inhalační – expozice 6 hodin

# PREKLINICKÉ TESTOVÁNÍ

## Toxicita po opakované dávce

**Vyšetření:**

**Hmotnost zvířat**

**Spotřeba potravy, vody**

**Klinická vyšetření:** kontrola zdravotního stavu, neurobehaviorální vyšetření

**Oftalmologické vyšetření**

**Laboratorní vyšetření:**

- vyšetření moče
- hematologické vyšetření
- biochemické vyšetření
- patologické vyšetření
- biometrie orgánů
- histopatologické vyšetření
- » stanovení **NOAEL** = no adverse effect level (rozlišení dle pohlaví)

# PREKLINICKÉ TESTOVÁNÍ

## Toxicita pro reprodukci

Poskytují informace o možných toxických účincích testované látky na reprodukční schopnost samce či samice či na vývoj potomstva tj.:

- funkci pohlavních žláz
- průběh estrálního cyklu
- chování při páření, březosti, porodu a laktaci
- mortalitu, růst a vývoj potomstva



# PREKLINICKÉ TESTOVÁNÍ

## Toxicita pro reprodukci

OECD TG. 421      Reprodukční/vývojová toxicita – Screening test

OECD TG. 414      Prenatální vývojová toxicita (teratogenita)

OECD TG. 415      Jednogeneční reprodukční test

OECD TG. 416      Dvougenerační reprodukční test

OECD TG. 422      Kombinovaný test

- Opakovaná toxicita a Reprodukční/vývojová Toxicita

Kombinace testů: např. Jednogeneční reprodukční test a subchronická toxicita

Screeningové testy na endokrinní disruptory (uterotrofický, Hershberger)

OECD TG. 443      Rozšířený jednogeneční reprodukční test

# PREKLINICKÉ TESTOVÁNÍ

## Toxicita pro reprodukci

**Obecné podmínky:** viz dlouhodobé testy

**Provedení:**

**parentální generace** – tj. rodičovská generace (P)

**filiální generace** – tj. potomstvo (F1, F2...)

**aplikace testované látky** po určitou dobu před pářením (screening – 2 týdny, jednogeneční – 10 týdnů), po dobu páření, po dobu březosti a určitou dobu laktace (screening – do 4. dne, jednogeneční – do 21. dne)

# PREKLINICKÉ TESTOVÁNÍ

## Toxicita pro reprodukci

### Další vyšetření:

**kontrola zdrav. stavu:** denně před aplikací

**klinické vyšetření samců a samic:**

minimálně 1x denně po aplikaci

**tělesná hmotnost a spotřeba krmiva:**

v týdenních intervalech

**hmotnost vrhu:** 0. nebo 1. a v určené dny po porodu dle metodiky porodu

**klinické vyšetření mláďat:** co nejdříve po narození a pak denně

# PREKLINICKÉ TESTOVÁNÍ

## Toxicita pro reprodukci

### Poporodní vývoj mláďat:

potkan Wistar: bezprostředně po narození jsou mláďata holá, masově růžová, mají slepená oční víčka, zarostlé zvukovody, nemají prořezané zuby a váží asi 5 – 7g. Asi 2.-3. den dochází u mláďat k odklopení ušních boltců a začíná jim růst srst. Zevní zvukovody se otevírají 4. den, kdy mláďata váží asi 9 – 12g.

# PREKLINICKÉ TESTOVÁNÍ

## Toxicita pro reprodukci

**Další vyšetření – samci:**

**patologické vyšetření** - po ukončení aplikace (minim. 28 dnů)

**biometrie pohlavních orgánů a hypofýzy**

**vyšetření spermií**

- motilita

- morfologie

- počet

**histologické vyšetření orgánů**

# PREKLINICKÉ TESTOVÁNÍ

## Vývojová toxicita - teratogenita

Zjišťuje účinek prenatální expozice na březí samici a na vyvíjející se organismus v děloze.

» aplikace látky pouze po určitou dobu – od 5. dne březosti (tj. od implantace vajíčka v děloze) do 19. dne březosti

Odběr plodů poslední den březosti

Vyšetření: makroskopické a histologické - změny měkkých tkání  
mikroskopické – vývoj skeletu

# PREKLINICKÉ TESTOVÁNÍ

## Toxicita pro reprodukci

Hodnocení:

Výpočet individuálních a skupinových parametrů reprodukce

Stanovení **NOAEL** pro reprodukční schopnost samců a samic

Stanovení **NOAEL** pro vývoj mláďat

# PREKLINICKÉ TESTOVÁNÍ

## Mutagenita

**Princip:** zjišťování **mutace** – poškození DNA (změna genetického materiálu)

### Rozdělení mutací:

**genové** - změny v molekule DNA

**chromozomální** - chromozomální aberace (změny struktury a tvaru

chromozómu)

**genomové** - změny v chromozomálním počtu

**nechromozomální** - mimojaderné



# PREKLINICKÉ TESTOVÁNÍ

## Přehled testů mutagenity

- OECD TG. 473 Mutagenita - test chromozómových aberací u savčích buněk *in vitro*
- OECD TG. 475 Mutagenita - test chromozómových aberací v kostní dřeni savců *in vivo*
- OECD TG. 474 Mutagenita *in vivo* mikronukleus test v savčích erythrocytech
- OECD TG. 487 Mutagenita - *in vitro* mikronukleus test v savčích buňkách
- OECD TG. 471 Mutagenita - test reverzních mutací u bakterií
- OECD TG. 480 Genové mutace - *Saccharomyces cerevisiae*
- OECD TG. 481 Mitotické rekombinace *Saccharomyces cerevisiae*
- OECD TG. 476 Mutagenita - test genových mutací v savčích buňkách *in vitro*
- OECD TG. 482 Poškození DNA reparace - neplánovaná syntéza DNA - savčí buňky *in vitro*
- OECD TG. 479 SCE - výměna sesterských chromatid *in vitro*
- OECD TG. 477 Recesivní letální mutace vázané na pohlaví u *Drosophilla melanogaster*
- OECD TG. 478 Dominantní letální test u hlodavců
- OECD TG. 483 Analýza chromozómových aberací u savčích spermatogónií
- OECD TG. 484 Spot test u myši
- OECD TG. 485 Přenosné translokace u myši (i strukturální aberace)
- OECD TG. 486 Test neplánované syntézy DNA v savčích jaterních buňkách *in vivo*

# PREKLINICKÉ TESTOVÁNÍ

## Mutagenita – test reverzních mutací u bakterií

Detekce **genových mutací** – mutace v genu pro syntézu His (Trp)

(esenciální aminokyseliny tryptofan a histidin)

Porovnání počtu narostlých kolonií po působení testované látky s negativní kontrolou

Po třech kulturách na koncentraci, NC; po dvou kulturách na PC

Stanovení toxických dávek

# PREKLINICKÉ TESTOVÁNÍ

## Mutagenita - test chromozómových aberací u savčích buněk *in vitro*

**Chromozomové aberace** = změny ve struktuře nebo počtu chromozomů (Ho – 46)

Použití **kultury savčích lymfocytů periferní krve** » expozice buněk testovanou látkou (po 2 kulturách na koncentraci) » zpracování kultury, barvení, vyhodnocení pod mikroskopem

**Hodnocení 200 mitóz** (hodnotí se v metafázi – tj. fáze buněčného dělení, kdy jsou chromozómy dobře viditelné)

Výsledek: procento aberentních buněk vůči negativní kontrole

# PREKLINICKÉ TESTOVÁNÍ

## Mutagenita - *in vitro* mikronukleus test v savčích buňkách

Test validován ECVAM (2006) jako alternativa k MNT testu *in vivo*

**Princip testu:** expozice kultury savčích lymfocytů periferní krve testované látky » odstranění testované látky » kultivace exponovaných buněk zpracování kultury, barvení a vyhodnocení pod mikroskopem:

detekce mikrojadra

# PREKLINICKÉ TESTOVÁNÍ

## Mutagenita – test genových mutací v savčích buňkách *in vitro*

**Princip:** stanovují se genové mutace v **savčích buněčných liniích**

Používají se například TK (thymidinkináza) deficientní buňky (mutace TK<sup>+/-</sup> TK<sup>-/-</sup>) a selektivní médium (prostředí trifluorthymidinu - u kmenů TK<sup>+/-</sup> toxické účinky, přežijí jen mutanty)

K buňkám v suspenzi nebo jednovrstevné kultuře se přidá testovaná látka v řadě koncentrací, příp. metabolická aktivace

Po skončení expozice promytí » kontrola **počtu přeživších buněk** » zjištění počtu mutantních buněk

Hodnotí se zvýšení počtu mutací vzhledem k celkovému počtu buněk v kultuře (**mutační frekvence**)

**Pozitivní výsledek:**

Závislost na dávce, trojnásobné zvýšení počtu mutantů proti negativní kontrole

# PREKLINICKÉ TESTOVÁNÍ

## Mutagenita - *in vivo* mikronukleus test v savčích buňkách

**Princip testu:** expozice zvířat testované látce » eutanázie zvířat » hodnocení obarveného nátěru z kostní dřeně: detekce mikrojadér, která vznikají poruchami dělení během mitózy v polychromních erythrocytech (nezralých erythrocytech)

**Mikrojádru (micronucleus):** tvořeno fragmentem chromozómu nebo celým chromozómem (odděleným od jádra) a nachází se v cytoplasmě vedle hlavního jádra, má podobu malého jadérka.

**Pozitivní výsledek:** zvýšený počet mikrojadér v erythrocytech a současně změna v poměru zralých a nezralých erythrocytů v kostní dřeni.

# PREKLINICKÉ TESTOVÁNÍ

## Přehled testů lokální toxicity

### Kožní dráždivost/leptavost

OECD TG. 431 *In vitro* test kožní leptavosti: model lidské kůže

OECD TG. 430 *In vitro* test kožní leptavosti: test transkutánní elektrické rezistence (TER)

OECD TG. 439 *In vitro* test kožní dráždivosti: rekonstruovaný model lidské epidermis

OECD TG. 404 Akutní toxicita: Kožní dráždivost/leptavost

### Oční dráždivost/leptavost

OECD TG. 437 Opacita a permeabilita hovězí rohovky – testovací metoda pro identifikaci látek leptavých a silně dráždivých pro oko (BCOP)

OECD TG. 438 Izolované kuřecí oko - testovací metoda pro identifikaci látek leptavých a silně dráždivých pro oko

OECD TG. 405 Akutní toxicita: Oční dráždivost/leptavost

### Kožní senzibilizace

OECD TG. 429 Test lokálních mízních uzlin

OECD TG. 406 Maximizační test na morčatech

# PREKLINICKÉ TESTOVÁNÍ

## *In vitro* test kožní leptavosti: model lidské kůže

**Validovaný kožní model:** Episkin, SkinEthic....  
(rekonstruovaná epidermis s funkční stratum corneum)

**Princip:** nanesení testované látky na povrch trojrozměrného modelu lidské kůže » omytí fosfátovým puftrem » inkubace s MTT (žlutá tetrazoliová sůl) » zjištění účinku látky na životnost buněk » výpočet relativní životnosti buněk vzhledem k negativní kontrole.

**Cytotoxicita:** vyjadřuje se jako redukce aktivity mitochondriální dehydrogenázy měřením aktivity tvorby formazanu z MTT - měří se spektrofotometricky.

(Pozn.: v mitochondriích živých buněk je MTT redukována dehydrogenázou na modrý formazanový precipitát, ten je přes noc z buněk vyextrahován okyseleným izopropanolem a kvantifikován spektrofotometricky.)

**Výsledek:** látka leptavá či neleptavá pro kůži



# PREKLINICKÉ TESTOVÁNÍ

## Akutní toxicita: Kožní dráždivost/leptavost

**Testovací systém:** albinotický králík bez rozlišení pohlaví – maxim. 3 králíci

**Princip:** testovaný materiál se nanáší na povrch kůže a sleduje se stupeň podráždění kůže a jiné toxické účinky, pH  $\leq 2$  nebo  $\geq 11,5$  – netestuje se

**Provedení:** aplikace 0,5ml nebo 0,5g testované látky na oholenou kůži (6 cm<sup>2</sup>): 1 zvíře (expozice: 3 min., 1h., 4h.) » potvrzující zkouška – 2 zvířata (expozice: 4h.) - fixace pomocí mulového obvazu a nedráždivé náplasti

**Pozorování:** stupeň podráždění kůže - erytém a edém za 1 hod, 24, 48, 72 hodin a dále pokud je nutné 1x denně + jiné toxické účinky - 14 dní; hodnotí se vratnost a nevratnost kožních lézí »  
hodnocení: látka leptavá nebo dráždivá pro kůži

# PREKLINICKÉ TESTOVÁNÍ

## Test BCOP (bovine corneal opacity and permeability) - pro detekci látek leptavých a silně dráždivých pro oko

**Testovací systém:** rohovky poraženého mladého hovězího dobytka (ex vivo - odpad z jatek)

**Princip:** aplikace testované látky na rohovku » poškození rohovky je stanoveno kvantitativním měřením změn permeability a opacity. Míra poškození rohovky je vyjádřena kvantitativně jako IVIS (*in vitro* irritancy score), pomocí něhož je přiřazena kategorie dráždivosti pro odhad *in vivo* očního dráždivého potenciálu testované látky.

**Opacita:** množství světla prošlého rohovkou

**Permeabilita:** množství fluoresceinu sodného, které proniklo všemi buněčnými vrstvami rohovky

# PREKLINICKÉ TESTOVÁNÍ

## Test BCOP (bovine corneal opacity and permeability) - pro detekci látek leptavých a silně dráždivých pro oko

**Postup:** odpreparování vybraných nepoškozených rohovek s minimální opacitou (zakalením) z očního bulbu » umístění do speciálních držáků » aplikace testované látky » inkubace (10 min nebo 4 h dle skupenství látky), omytí, měření opacity (opacitometr) » aplikace fluoresceinu do přední komory držáku » odebrání média ze zadní komory » změření absorbance pomocí spektrofotometru (průchodnosti rohovky pro fluorescein) » porovnání hodnot s negativní kontrolou.

**Vyhodnocení :** in vitro skóre (IVIS), pomocí něhož je přiřazen dráždivý potenciál dané látky.

**IVIS** = průměrná hodnota opacity + (15x průměrná hodnota permeability)

>55,1 látka žíravá nebo silně dráždivá pro oko

# PREKLINICKÉ TESTOVÁNÍ

## Další alternativy k oční dráždivosti

**ICE** – izolované kuřecí oko, princip podobný jako BCOP, sleduje se tloušťka (otok) rohovky, zákal rohovky a zádrž fluoresceinu

### Další metody doporučené k validaci:

**IRE** – králík, stejný princip jako ICE a BCOP, sleduje se zákal, otok rohovky, histologie, oči většinou nelze získat na jatkách

**HET-CAM** – chorioalantoidní membrána slepičího vejce = prokrvený obal embrya, sleduje se poškození cév po působení chemické látky, v podstatě test *in vivo*

**EpiOcular** – imitace rohovky (lidské keratinocyty - skvamozní epitelium modelující rohovku, princip stejný jako u testů na EpiDermu, složité na provedení, výstupem je  $ET_{50}$ , v současné době probíhá validace.

# PREKLINICKÉ TESTOVÁNÍ

## Akutní toxicita: Oční dráždivost/leptavost

**Testovací systém:** albinotický králík bez rozlišení pohlaví – maxim. 3 králíci

**Princip:** Testovaná látka se aplikuje každému zvířeti do spojivkového vaku jednoho oka. Druhé oko slouží jako kontrola. Po skončení doby aplikace se zvířata pozorují v různých časových intervalech. Hodnotí se stupeň zakalení rohovky, zarudnutí spojivek, zduření víček, reakce duhovky a reverzibilita pozorovaných změn.

**Dráždivé účinky:** vyvolání změn v oku po aplikaci zkoušené látky na přední povrch oka. Tyto změny jsou plně vratné do 21 dnů po aplikaci.

**Leptavé účinky:** vyvolání poškození oční tkáně nebo závažné fyzické zhoršení vidění po aplikaci zkoušené látky na přední povrch oka. Toto poškození není plně vratné do 21 dnů po aplikaci.

**Hodnocení:** látka způsobující nevratné účinky pro oko, látka dráždivá pro oko.

# PREKLINICKÉ TESTOVÁNÍ

## Senzibilizace kůže *in vivo*

Je imunologicky zprostředkovaná kožní reakce na látku.

U člověka mohou být reakce charakterizované svěděním, zarudnutím kůže, otokem, pupenci, puchýři nebo kombinací těchto příznaků.

U zvířat mohou být reakce odlišné a lze zjistit pouze zarudnutí a otok.

**Princip:** střet kůže se senzibilizátorem vyvolá transport antigenů z kůže do lymfatických uzlin » aktivace T lymfocytů » nárůst počtu T-lymfocytů - měřitelný ukazatel reakce organismu na kontakt s látkou mající senzibilizační potenciál.

# PREKLINICKÉ TESTOVÁNÍ

## Test lokálních mízních uzlin

**Testovací systém:** myš, samice, stáří 8-12 týdnů, Kmen - BALB/c

**Minimální počet zvířat ve studii:** 20

- 3 různé koncentrace test. látky = 3 x 4 zvířata
- kontrolní skupina negativní = 4 zvířata (např. aceton/olivový olej)
- kontrolní skupina pozitivní = 4 zvířata (dinitrochlorbenzen)

**Provedení:**

**den 1** vážení, značení zvířat

**den 1 - 3** aplikace test. látky na dorsální stranu obou uší

**den 4 - 5** žádná aplikace

**Den 6** vážení zvířat, aplikace fyziologického roztoku obsahujícího radionuklidu ( $^3\text{H}$  thymidinu nebo  $^{125}\text{I}$  deoxyuridinu), 5 hodin po aplikaci: utracení zvířat a odběr aurikulárních mízních uzlin

# PREKLINICKÉ TESTOVÁNÍ

## Test lokálních mízních uzlin

**Další postup:** mízní uzliny se mechanicky rozruší přes 200 mm sítku při proplachování PBS, inkorporace radionuklidu se měří příslušnou scintilační metodou, výsledky měření - v rozpadech za minutu (dpm)

**Hodnocení:** výpočet **Indexu stimulace**

= prům. hodnota dpm expon. skupiny/prům. hodnota dpm kontr. skupiny

**Klasifikace:**  $IS \geq 3$  » látka senzibilizující pro kůži.



# PREKLINICKÉ TESTOVÁNÍ

## Maximizační test na morčatech

### Princip:

#### Indukční fáze

kontaktem kůže se senzibilizátorem jsou aktivovány T-lymfocyty a dochází k jejich proliferaci (jako u testu LLNA)

#### Provokační fáze

opakovaným kontaktem se senzibilizátorem je u zvířete vyvolána alergická reakce – kontaktní dermatitida

**Testovací systém:** albinotická morčata obou pohlaví – 30 zvířat

(váha 150 – 250 g, kmen – BFC)

20 zvířat - skupina exponovaná

10 zvířat - skupina kontrolní

.

# PREKLINICKÉ TESTOVÁNÍ

## Maximizační test na morčatech

### *Provedení:*

**den 0** - vážení, značení zvířat

**den 1** - indukční expozice intradermální

- Exponovaná skupina - aplikace test. látky

- Kontrolní skupina – aplikace vehikula

**den 7** - lokální indukce dermální

- Exponovaná skupina - aplikace test. látky

- Kontrolní skupina – aplikace vehikula

**doba expozice 48 hodin**

**den 21** - provokace

- obě skupiny zvířat aplikovány stejně:

např.: pravý bok zvířete - testovaná látka, levý bok zvířete - vehikulum

**doba expozice 24 hodin**

**den 22** - očištění testované plochy, klid

**den 23 a 24** - odečet kožní reakce

# PREKLINICKÉ TESTOVÁNÍ

## Maximizační test na morčatech

### Hodnocení:

24 a 48 hodin po aplikaci se vyhodnotí kožní reakce (zarudnutí, otok)

Porovnává se reakce kůže exponované testovanou látkou a reakce kůže exponované vehikulem

Pozitivní výsledek = 30% morčat má pozitivní reakci na kůži  
tj. zarudnutí případně otok

Klasifikace – stejná jako u testu LLNA – látka senzibilizující pro kůži