

## NETECHNICKÉ SHRnutí PROJEKTU POKUSŮ dle EK (od 2021)

### Název projektu pokusů

Preklinické testování farmakokinetických vlastností vybraných léčivých látek a jejich technologických formulací na zvířecím modelu (potkan, myš)

|                                        |                     |
|----------------------------------------|---------------------|
| Doba trvání projektu pokusů v měsících | 36                  |
| Klíčová slova                          | farmakokinetika     |
| léčivá látka                           | laboratorní zvířata |
| biologická dostupnost                  | 0                   |

### Účely projektu pokusů

Základní výzkum: Další základní výzkum [PB13]

0

0

0

### Cíle projektu pokusů

Cílem výzkumného projektu bude stanovit vliv různých faktorů (technologické formulace léčiva, fyziologický stav GIT, věk zvířete) na farmakokinetiku již používaných léčivých látek po jednorázovém podání laboratorním zvířatům v běžném nebo ve zkříženém (cross-over) uspořádání studie.

### Potenciální přínosy projektu pokusů

Výstupy projektu mají přispět k vytváření vědeckých podkladů pro postupy ve farmakoterapii s důrazem na optimalizaci dávkování a bezpečnosti podávání konkrétního léčiva. Pokud bude prokázán výhodný farmakokinetický profil nově testovaných technologických formulací, mohou být perspektivně využity pro úpravu dalších léčivých látek a/nebo přípravu/výrobu odvozených humánních lékových forem.

### Postupy, které budou na zvířatech zpravidla používány

API (aktivní farmaceutická látka) bude aplikována:

- buď perorální gaváží jednorázově a celkem maximálně 2x s rozestupem min 48 hod.
- nebo jednorázově intravenózně předem zavedeným jugulárním katetrem
- nebo jednorázově intraperitoneální injekcí

Chirurgický zákrok (kanylace jugulární žíly) bude proveden v celkové anestézii jednorázově (doba chirurgického zákroku max. 30 min) s následným podáváním analgetik dle klinického stavu. Doba experimentu (od chirurgického zákroku do utracení zvířete bude maximálně 8 dní). Během experimentu budou potkanům opakovaně odebírány vzorky krve (maximálně 10 odběrů po 0,1-0,15 mL krve za 48 hod). Cca 150 potkanů/rok.

Kanylace ductus thoracicus (hrudní mízovod) bude provedena v hluboké anestezii, kdy potkani po chirurgickém zákroku již nenaberou vědomí, v průběhu nabírání vzorků lymfy budou udržováni v anestezii a na konci experimentu budou utraceni. Délka experimentu bude max. 8 hodin. Cca 120 potkanů/rok.

### Předpokládané dopady / nepříznivé účinky na zvířata, a doba trvání těchto účinků

Dávky budou voleny tak, aby odpovídaly buď terapeutickým dávkám referenční API obvyklým při podávání u lidí, event. takovým, které byly použity v odpovídajících experimentálních farmakokinetických studiích s referenční API a nevykazují toxické účinky na pokusná zvířata.

- Myši/potkani mláďata/potkani ke stanovení lymfatické absorpce API (kanylace ductus thoracicus) budou po aplikaci API uvedeni do celkové anestezie a již nenaberou vědomí.
- Mírná závažnost pokusů (snížená hybnost, stres) se předpokládá u pokusných zvířat umístěných do klece na dobu nepřesahující 24 hodin (dle vyhl. č.419/2012 Sb).
- Pro potkany podstupující operační chirurgický zákrok v celkové anestézii se zavedením jugulární kanyly na dobu maximálně 8 dní spojené s jednorázovým či opakovaným (max. 2krát) podáním různých formulací látky s opakovanými odběry mírně přesahující 10% objemu krve v oběhu s doplněním objemu se předpokládá střední závažnost pokusů. Po chirurgickém zákroku (kanylace) lze očekávat pokles hmotnosti a bolest. Podáváním vysokoproteinové stravy 2 dny před chirurgickým výkonem a po něm po celou

### Druhy a přibližné počty zvířat, jejichž použití se předpokládá, a předpokládaná závažnost pokusu

| Druh zvířat                                 | Odhadovaný počet zvířat podle závažnosti |       |         |         |
|---------------------------------------------|------------------------------------------|-------|---------|---------|
|                                             | Nenabude vědomí                          | Mírná | Střední | Závažná |
| potkan laboratorní (Rattus norvegicus) [A2] | 522                                      | 90    | 450     | 0       |

| myš laboratorní (Mus musculus) [A1]                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 0                       | 240                                          | 0                  | 0 |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|----------------------------------------------|--------------------|---|
| 0                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 0                       | 0                                            | 0                  | 0 |
| 0                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 0                       | 0                                            | 0                  | 0 |
| <b>Druhy a přibližné počty zvířat, která nebudou na konci pokusu usmrcena, a předpokládané nakládání s nimi</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                         |                                              |                    |   |
| Druh zvířat                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | Odhadovaný počet zvířat |                                              |                    |   |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | Opětovné použití        | Navrácení do chovu, do přírodního stanoviště | Do zájmového chovu |   |
| 0                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 0                       | 0                                            | 0                  |   |
| 0                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 0                       | 0                                            | 0                  |   |
| 0                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 0                       | 0                                            | 0                  |   |
| 0                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 0                       | 0                                            | 0                  |   |
| <b>Důvody pro výše uvedené nakládání se zvířaty</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                         |                                              |                    |   |
| Jedná se o experimenty na jejichž konci musí být laboratorní zvířata usmrcena (odběry biologického materiálu, náročný chirurgický zákrok atd)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                         |                                              |                    |   |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                         |                                              |                    |   |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                         |                                              |                    |   |
| <b>Uplatňování 3R</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                         |                                              |                    |   |
| <b>Nahrazení používání zvířat</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                         |                                              |                    |   |
| Vzhledem k charakteru plánovaného in vivo experimentu, tj. aplikace API laboratorním zvířatům s následným sledováním koncentrací API v tělesných tekutinách/tkáních, nemá tento experiment jinou alternativu. Tuto skutečnost jsme ověřili také v databázi validovaných alternativních metod schválených a přijatých Evropskou společností pro alternativní metody (European Centre for the Validation of Alternative Methods, ECVAM). Testované technologické formulace API budou vybírány s ohledem na výsledky předcházejících in vitro experimentů, které se zaměřují na stanovení jejich fyzikálně-chemických vlastností. V in vivo studiích budou testovány pouze formulace, které se na základě in vitro testů budou jevit jako perspektivní.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                         |                                              |                    |   |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                         |                                              |                    |   |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                         |                                              |                    |   |
| <b>Omezení používání zvířat</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                         |                                              |                    |   |
| Bude použit minimální počet myši a potkanů zajišťující statistickou významnost pokusu, a to na základě řady literárních údajů. Zkřížené (cross-over) farmakokinetické studie umožní minimalizovat možné interindividuální rozdíly ve farmakokinetice studovaných formulací API a tak i snížit počet zvířat zařazených do experimentu. Maximální počet potkanů ve skupině byl stanoven na 10 ks v 1 skupině v případě, že získaná data budou hodnocena pomocí ANOVA s Duncan Multiple Range testem na hladině významnosti 5% dle referenčních studií (1,2). V případě myši/potkaních mláďat, vzhledem k nutnosti usmrcení zvířat v každém časovém bodě, byl stanoven nejnižší, ještě pro statistické účely hodnotitelný, počet myši 3 ks pro jeden časový interval v jedné skupině (3).<br>Potkani a myši budou průběžně nakupováni v co nejnižším počtu pouze pro účely daného pokusu, proto výše uvedený roční počet zvířat je maximální a lze předpokládat menší množství použitých zvířat.<br>(1) Aghazadeh-Habashi A1, Sattari S, Pasutto F, Jamali F. (2002). Single dose pharmacokinetics and bioavailability of glucosamine in the rat. J Pharm Pharm Sci. 2002 May-Aug;5(2):181-4.                                                                                                                                                                                                                       |                         |                                              |                    |   |
| <b>Šetrné zacházení se zvířaty</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                         |                                              |                    |   |
| Experimenty budou prováděny v akreditovaném zvířetníku v souladu se zákonem a s ohledem na maximální welfare zvířat. Potkani a myši budou chováni ve standardních konvenčních podmínkách v odpovídajících klecích v počtu max. 3 zvířata na klec (voda a potrava ad libitum, pravidelná výměna podestýlky, atd.) a budou denně kontrolovány. Před a po aplikaci API bude potkanům odebrána potrava na maximálně 8 hodin, přístup k vodě nebude omezen. Pouze na dobu odběru krve (několik minut) budou potkani omezeni v pohybu pomocí standardního „restraineru“ určenému k užití pro potkany v závislosti na tělesné hmotnosti. Na tento krátkodobý imobilizační stres budou potkani postupně habituováni ještě před zahájením experimentu. Po chirurgickém výkonu až do ukončení odběrů krve budou potkani ponecháni odděleni - jednotlivě v klecích, aby nedocházelo k vzájemnému napadání a poškozování zavedených kanyl. Potkani budou pooperačně pozorováni v intervalech 2 hodiny po dobu alespoň 4 hodin, nebo dokud nebudou patrný žádné známky bolesti, a pak jednou denně. V případě neuspokojivého zdravotního stavu zvířete bude pokus ukončen a zvíře usmrceno. Myši/potkaní mláďata po anestézii s odběrem krve již nenabudou vědomí. Se zvířaty bude zacházeno co nejšetrněji dle zákona č. 246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání. O pokusná zvířata bude pečovat osoba způsobilá k této |                         |                                              |                    |   |
| <b>Použití druhů zvířat - vysvětlení</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                         |                                              |                    |   |

Tento typ experimentů (stanovení koncentrací API po její aplikaci v tělesných tekutinách/tkáních) není možné realizovat jinak, než s použitím laboratorních zvířat – v současné době není k dispozici žádný alternativní systém či model, kterým by bylo možné laboratorní zvíře nahradit.

Budeme využívat široce používané a dobře popsane linie experimentálních zvířat a to buď dospělé konvenční laboratorní potkany outbredního kmene Wistar (samci, hmotnost 200-350 g, stáří minimálně 8 týdnů) nebo myši inbredních kmenů C57BL/6J, BALB/c nebo outbredního kmene CD-1 vždy jednoho pohlaví (hmotnost 25-40 g, věk minimálně 7 týdnů), kteří/které jsou dle literárních údajů vhodné pro farmakokinetické studie. Pro sledování vlivu vývojových změn na farmakokinetiku léčiv plánujeme použít laboratorní potkany outbredního kmene Wistar ve věku 1-42 dní.