

NETECHNICKÉ SHRnutí PROJEKTU POKUSŮ dle EK (od 2021)

Název projektu pokusů

Kombinace nových kanabinoidů a pokročilých metod formulace v léčbě revmatoidní artritidy – preklinické studie na potkanech

Doba trvání projektu pokusů v měsících	29
Klíčová slova	farmakokinetika
kanabinoidy	revmatoidní artritida
biologická dostupnost	technologické formulace

Účely projektu pokusů

Základní výzkum: Další základní výzkum [PB13]

Základní výzkum: Svalová a kosterní soustava [PB6]

0

0

Cíle projektu pokusů

Cílem projektu je připravit nové lékové formulace vybraných kanabinoidů na bázi emulzí a kokystalů se zvýšenou biologickou dostupností, buď cestou lymfatické absorpce, nebo standardní cestou přímé absorpce do krve, a následně otestovat jejich farmakokinetické vlastnosti a účinnost na zvířecím modelu revmatoidní artritidy (RA). Zaměřit se chceme na deriváty, u nichž byly popsány protizánětlivé účinky (kanabidiol, kanabigerol, kanabichromen, tetrahydrokanabivarin), nebo nové silné agonisty receptorů CB2 (MDA 19 a L-759633). K dosažení tohoto obecného cíle bude navrhovaný projekt zaměřen na následující dílčí cíle:

- In vitro testování antirevmatoidních a cytotoxických účinků výše zmíněných kanabinoidů.
- Jejich formulace do nano- a mikro-emulzí pro perorální užívání.
- Jejich formulace do kokystalů pro perorální užívání.
- Preklinické testování farmakokinetiky a terapeutické účinnosti v modelu kolagenem indukované artritidy (CIA) u potkanů.

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 terapeutický potenciál a/nebo výhodný farmakokinetický profil nově testovaných technologických formulací, mohou být perspektivně využity pro přípravu/výrobu odvozených humánních lékových forem.

Postupy, které budou na zvířatech zpravidla používány

Testovaná látka bude aplikována:

- buď perorální gaváží jednorázově a celkem maximálně 2x s rozestupem min 48 hod.
- nebo opakovaně, 1x denně po dobu 25 dnů, perorální gaváží

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).

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.

Indukce CIA bude prováděna metodou popsanou v literatuře. Bovinní kolagen II se rozpustí v 0,05 M kyselině octové a emulguje se

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]	70	0	360	0

0	0	0	0	0
0	0	0	0	0
0	0	0	0	0
Druhy a přibližné počty zvířat, která nebudou na konci pokusu usmrcena, a předpokládané nakládání s nimi				
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	
Důvody pro výše uvedené nakládání se zvířaty				
Jedná se o experimenty na jejichž konci musí být laboratorní zvířata usmrcena (odběry biologického materiálu, náročný chirurgický zákrok atd)				
Uplatňování 3R				
Nahrazení používání zvířat				
Vzhledem k charakteru plánovaného in vivo experimentu, 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 látky a technologické formulace do in vivo studií budou vybírány s ohledem na výsledky předcházejících in vitro experimentů. V in vivo studiích budou testovány pouze látky a formulace, které se na základě in vitro testů budou jevit jako perspektivní.				
Omezení používání zvířat				
Bude použit minimální počet 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 a tak i snížit počet zvířat zařazených do experimentu. 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). Potkani 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. (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. (2) Joseph W. Lubach et al. (2013) Mol. Pharmaceutics, 10, 3997–4004; dx.doi.org/10.1021/mp400283j				
Šetrné zacházení se zvířaty				
Experimenty budou prováděny v akreditovaném zvířetníku 1. LF UK v souladu se zákonem a s ohledem na maximální welfare zvířat. Potkani 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 kontrolováni. Před aplikací testované látky ve farmakokinetické studii budou potkani nalačno 4 hod a začnou být krmeni 4 hodiny po perorálním podání látky, po celou dobu budou mít neomezený přístup k vodě. 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. Ve farmakodynamických experimentech budou potkani chováni ve standardních konvenčních podmínkách v odpovídajících klecích v				
Použité druhy zvířat - vysvětlení				

Tento typ experimentů 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 popsané linie experimentálních zvířat a to buď dospělé konvenční laboratorní potkany outbredního kmene Wistar (obojího pohlaví, hmotnost 200-350 g, stáří minimálně 8 týdnů), kteří jsou dle literárních údajů vhodní pro tento typ studií.