

**Univerzita Karlova**  
**1. lékařská fakulta**

Autoreferát disertační práce



**UNIVERZITA KARLOVA**  
**1. lékařská fakulta**

Aplikovaná farmakokinetika v preklinickém výzkumu

Mgr. Jana Královičová

2022

**Doktorské studijní programy v biomedicině**  
*Univerzita Karlova a Akademie věd České republiky*

**Obor:**

Farmakologie a toxikologie (YFAT19)

**Předseda oborové rady:**

Prof. MUDr. Ondřej Slanař, Ph.D.

**Školící pracoviště:**

Farmakologický ústav 1. LF UK a VFN, Albertov 4, 128 00 Praha 2

**Školitel:**

Doc. PharmDr. Martin Šíma, Ph.D.

Disertační práce bude nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněna k nahlížení veřejnosti v tištěné podobě na Oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky Děkanátu 1. lékařské fakulty.

## ***Obsah***

Abstrakt .....	4
Klíčová slova .....	5
Abstract.....	6
Key words.....	7
Seznam zkratk.....	8
1. Úvod .....	9
2. Hypotézy a cíle práce.....	9
3. Materiál a metodika .....	10
4. Výsledky.....	12
5. Diskuse .....	15
6. Závěry.....	21
7. Použitá literatura.....	22
Seznam publikací.....	26

## **Abstrakt**

Tato disertační práce se věnuje vývoji a praktickému využití potkaních modelů u preklinických farmakokinetických studií. Analýza zabývající se dopadem intra- a inter-individuální variability na výsledky v rámci komparativních studií na zvířatech ukázala, že cross-over uspořádání přináší u těchto experimentů přesnější závěry než často využívaný paralelní design. Výsledky získané na základě paralelního uspořádání se v rámci tohoto rozboru velmi lišily ( $AUC_{last}$  9,62-44,62 mg/ml.min.g). U více než čtvrtiny studií by navíc bylo nesprávně usouzeno, že mají porovnávané lékové formulace jiné farmakokinetické vlastnosti, přestože jde ve skutečnosti o identický produkt.

Praktické využití cross-over uspořádání demonstrují farmakokinetické studie, porovnávající absorpci různých formulací s abirateronem a cinakalcetem. Nová, inovovaná formulace s abirateronem se nalačno vstřebávala lépe než reference ( $AUC_{last}$  reference 30,3 mg/ml.min.g, inovovaná formulace 81,0 mg/ml.min.g), což odpovídá očekáváním na základě předchozích *in vitro* dat. Podařilo se také vytvořit model pro testování vlivu současně požitě potravy na absorpci, jenž byl na těchto formulacích vyzkoušen. Ve shodě s literárními údaji zde referenční produkt s jídlem dosáhl dvojnásobně vyšších hodnot  $AUC_{last}$  než nalačno (80,7 mg/ml.min.g po jídle, 40,0 mg/ml.min.g nalačno). Současná aplikace abirateronu a cinakalcetu s cykloheximidem, inhibitorem sekrece chylomikronů, v obou případech vyústila ve sníženou absorpční schopnost oproti samostatnému podání ( $AUC_{last}$  pro abirateron samostatně 12,3 vs. 5,5 ng.hod/ml s cykloheximidem; pro cinakalcet samostatně 66,6 vs. 46,2 ng.hod/ml s cykloheximidem).

V rámci výzkumu bylo dále stanovováno žaludeční pH potkanů. Potkani mají v žaludku nalačno o něco vyšší pH (3,5), než jaké najdeme u lidí (1-2). Hodnoty lze ovšem upravit aplikací pentagastrinu, po němž se pH žaludku připodobňuje lidským podmínkám, nebo omeprazolu, kdy pH naopak roste k hodnotám, které se objevují u lidí trpících hypochlorhydrií. Tyto modulatory pH mohou být využity při sledování farmakokinetiky léčiv s pH-dependentní absorpcí, jak ukazuje praktický příklad studie s dasatinibem.

Poslední část práce se dotýká toxikokinetiky, kdy se zde popisuje model pro hodnocení post-mortem redistribuce alprazolamu u potkanů. Plazmatické koncentrace léčiva byly ve všech časových bodech vyšší než před úmrtím, přičemž celkových nejvyšších hodnot bylo dosaženo v tukové a jaterní tkáni. Zatímco v plicích se množství alprazolamu příliš neměnilo, v jaterní, ledvinné a srdeční tkáni byl v průběhu 24 hod zaznamenán

koncentrační vzestup. Navzdory limitům tohoto experimentu lze tedy očekávat, že i u lidí dochází po smrti k mírné redistribuci alprazolamu, jež může ovlivnit interpretaci toxikologických dat při vyšetřování úmrtí, která jsou s použitím alprazolamu spojená.

### ***Klíčová slova***

Farmakokinetika, potkaní model, variabilita, cross-over uspořádání, žaludeční pH, post-mortem redistribuce

## ***Abstract***

This thesis addresses the topic of development and practical utilization of rat models in preclinical pharmacokinetic studies. An analysis dealing with the impact of intra- and inter-individual variability on the results of animal comparative studies showed that cross-over design brings more accurate conclusions in these experiments than the often-used parallel setting. Results obtained on the basis of a parallel design significantly differed in our investigation ( $AUC_{last}$  from 9.62 to 44.62 mg/ml.min.g). Furthermore, in more than a quarter of studies it would be misjudged that the compared drug formulations have different pharmacokinetic properties, though they are in fact the same product.

The practical use of cross-over design is demonstrated in pharmacokinetic studies comparing the absorption of various formulations with abiraterone and cinacalcet. In a fasted state, a new, innovated formulation with abiraterone was better absorbed than the reference ( $AUC_{last}$  of a reference 30.3 mg/ml.min.g, innovated formulation 81.0 mg/ml.min.g). This corresponds to anticipations based on previous *in vitro* data. We also managed to develop a model for testing the influence of concomitantly consumed food on absorption, which has been tried out in these formulations. In accordance with information from literature, the reference product reached twice as high values of  $AUC_{last}$  with food than in a fasted state (80.7 mg/ml.min.g with food, 40.0 mg/ml.min.g in a fasted state). The concomitant application of abiraterone and cinacalcet with cycloheximide, an inhibitor of chylomicron secretion, in both cases lead to decreased absorption capacity in contrast to separate administration ( $AUC_{last}$  of abiraterone separately 12.3 vs. 5.5 ng.hod/ml with cycloheximide;  $AUC_{last}$  of cinacalcet separately 66.6 vs. 46.2 ng.hod/ml with cycloheximide).

Gastric pH of rats was also determined within the research. Rats have slightly higher gastric pH in a fasted state (3,5) compared to humans (1-2). However, the values can be modified either by the administration of pentagastrin, after which the pH in the stomach resembles human conditions, or omeprazole, resulting in the pH growing to values of people suffering from hypochlorhydria. These modulators of pH can be used in observation of the pharmacokinetics of drugs with pH-dependent absorption, as it is shown in a practical example of a study with dasatinib.

The last part of the thesis concerns toxicokinetics, describing a model for the evaluation of post-mortem redistribution of alprazolam in rats. Plasma concentrations of the drug at all time points were higher than before death, whereas overall peaks were reached in adipose and liver tissue.

Although the total amount of alprazolam in the lungs had not changed much, a rise in concentration was recorded in the liver, renal and heart tissues in the course of 24 hours. Despite the limits of this experiment, it can be expected that moderate post-mortem redistribution of alprazolam occurs in humans. That can have an impact on the interpretation of toxicological findings in the investigation of deaths related to the use of alprazolam.

***Key words***

Pharmacokinetics, rat model, variability, cross-over design, gastric pH, post-mortem redistribution

## *Seznam zkratek*

$AUC_{last}$	plocha pod křivkou průběhu plazmatických koncentrací léčiva od počátku měření do času poslední naměřené koncentrace
BCS	biofarmaceutický klasifikační systém
$C_{max}$	maximální plazmatická koncentrace léčiva
CI	konfidenční interval
CV	variační koeficient
I.p.	intraperitoneálně
IIV	intra-individuální variabilita
P.o.	perorálně
S.c.	subkutánně
SD	směrodatná odchylka
$T_{max}$	čas, za který je dosaženo maximální plazmatické koncentrace léčiva



## 1. Úvod

Kvalitní provedení preklinických farmakokinetických studií je důležitým kamenem při vývoji nových léčiv, ať už se jedná o látky zcela nové, nebo o vývoj nových lékových formulací s inovovanými vlastnostmi. A přestože klinické farmakokinetické studie mají velmi propracovanou metodologii, postupům v rámci výzkumu na zvířatech se zdaleka nevěnuje tolik pozornosti, často se zde stále využívají tradiční postupy a k modernizaci dochází pomalu. Ve své práci jsem se zaměřila na faktory, které mohou provedení těchto preklinických studií a kvalitu získaných výsledků ovlivnit, a na vývoj modelů pro různé farmakokinetické a toxikokinetické studie prováděné na potkanech.

## 2. Hypotézy a cíle práce

Stanovené hypotézy:

1. Cross-over uspořádání u krátkodobých komparativních farmakokinetických studií významně snižuje dopad variability ve farmakokinetice a přináší přesnější výsledky při možné redukci počtu zvířat.
2. Žaludeční pH potkanů se bude měnit v závislosti na náplni žaludku a podání omeprazolu/pentagastrinu.
3. Post mortem koncentrace alprazolamu se budou v krvi/různých orgánech v čase měnit. Tohoto principu lze využít pro stanovení doby úmrtí.

Cílem práce bylo:

1. Porovnat dopad inter- a intra-individuální variability ve farmakokinetice na výsledky *in vivo* preklinických studií při paralelním a cross-over uspořádání; příloha 1.
2. Vyvinout a zavést inovativní design preklinického *in vivo* testování bioekvivalence ve stavu nalačno a dále jej upravit pro hodnocení vlivu současně požitě potravy na absorpci léčiva; přílohy 2 a 3.

3. Stanovit žaludeční pH potkanů nalačno a po aplikaci omeprazolu/pentagastrinu, a vyvinout tak animální model pro testování vlivu pH v gastrointestinálním traktu na absorpci léčiv po podání *per os*; příloha 4.
4. Vytvořit model pro hodnocení post-mortem redistribuce alprazolamu na potkanech; příloha 5.

### **3. Materiál a metodika**

Metody experimentů jsou v plném rozsahu uvedeny v příložených publikacích.

Všechny studie byly provedeny na potkanech kmene Wistar. U farmakokinetických studií porovnávajících absorpci dvou nebo více formulací jsme zvolili cross-over uspořádání. Většina těchto studií probíhala v režimu nalačno, kdy měli potkani odepřený přístup k potravě po dobu 4 hod před podáním testované látky a následně další 4 hod po aplikaci lékové formulace. Pokud jde o studii zabývající se vlivem potravy na absorpci, tento postup byl za účelem standardizace rovněž dodržen, přičemž současně s podanou dávkou léčiva potkani obdrželi přímo do žaludku směs 1 ml olivového oleje a 1 ml tekuté výživy Nutridrink (Nutricia, Danone, Amsterdam, Nizozemsko). Po vyhodnocení výsledků této studie jsme však zjistili, že stav po jídle není navozen dostatečně. Toto následně potvrdily také *in vitro* experimenty provedené na VŠCHT. Proto byla studie zopakována s drobnými úpravami. Tentokrát měli potkani, zařazení do skupiny s aplikací po jídle, neomezený přístup k potravě po celou dobu experimentu. Směs olivového oleje a Nutridrinku byla navíc 3 min před aplikací zhomogenizována za použití vortexu, abychom zajistili stabilnější směs.

Příloha 3 se zabývá porovnáním dvou různých metod používaných ke zkoumání lymfatické absorpce léčiv. V rámci této publikace jsem spolupracovala na dvou studiích, jež měly za cíl ohodnotit vliv cykloheximidu, inhibitoru sekrece chylomikronů, na absorpci abirateronu a cinakalcetu. V první periodě se stanovoval farmakokinetický profil

samostatně aplikovaných léčiv, ve druhé periodě byli potkani premedikováni cykloheximidem v dávce 3 mg/kg (i.p. 1 hod před aplikací léčiva). Dávkování léčiva opět probíhalo ve stavu nalačno (4 hod před a 4 hod po aplikaci). Při testování abirateronu byly vzorky krve odebírány po dobu 10 hod, u cinakalcetu jsme zvolili delší časový úsek, 24 hod.

Při hodnocení žaludečního pH jsme se rozhodli pro delší interval lačnění, a sice 12 hod před měřením. Potkanům byly podány následující modulátory žaludečního pH: omeprazol i.p. 2 hod a 12 hod před měřením a pentagastrin s.c. 20 min před měřením žaludečního pH.

Následně jsme provedli další komparativní farmakokinetickou studii s dasatinibem, představitelem léčiva s pH-dependentní absorpcí. Porovnávaly se dvě různé formulace (reference a test) při aplikaci s omeprazolem nebo pentagastrinem ve stavu nalačno. Dasatinib byl aplikován p.o. gastrickou gaváží v dávce 3,75 mg ve formě vodné suspenze. Mezi dávkováními v první a druhé periodě jsme ponechali wash-out periodu 48 hod. Vzorky krve byly odebírány prostřednictvím kanyly před dávkováním a následně 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 4; 5; 6; 8 a 10 hod po podání dasatinibu. Ostatní postupy jako kanylace, perioperační péče nebo zpracování krevních vzorků probíhaly obdobně jako u jiných komparativních farmakokinetických studií. Ke statistické analýze a vytvoření grafů byl použit software Phoenix WinNonlin® 8.3 (Certara, Princeton, USA) a GraphPad Prism 3.02 (GraphPad Software, San Diego, USA).

Post-mortem redistribuce alprazolamu, kterou se zabývá Příloha 5, byla studována opět na potkanech. Po uvedení do anestezie pomocí isofluranu (2 až 5 %) byl všem potkanům aplikován alprazolam (i.p., 4 mg pro potkany s hmotností  $\leq$  250 g, 6 mg pro potkany s vyšší hmotností). Po 30 min následoval odběr vzorku kardiální krve pomocí punkce a následně byli všichni potkani usmrceni cervikální dislokací. V časech ihned po usmrcení, 2 hod, 6 hod a 24 hod po smrti pak byly potkanům odebrány vzorky krve a některých tkání (játra, ledvina, srdce, plíce, mozek a abdominální tuk). Získané vzorky jsme dále použili k analýze koncentrací alprazolamu.

#### 4. Výsledky

Výsledky experimentů lze najít v plném rozsahu v příložených publikacích.

Studium vlivu paralelního a cross-over uspořádání na míru inter- a intra-individuální variability při farmakokinetických studiích je popsáno v Příloze 1. Celkem 24 potkanům, rozděleným do 6 skupin (A-F), byla za stejných podmínek podávána stejná formulace s abirateron acetátem. Geometrický průměr  $AUC_{last}$  jednotlivých skupin se pohyboval v rozmezí od 9,62 do 44,62 mg/ml.min.g, přičemž celkový geometrický průměr (90% CI) všech hodnot z těchto skupin činil 24,36 (23,79-41,00) mg/ml.min.g. Jiné skupině potkanů (n=6) byla stejná formulace podána ve dvou za sebou následujících periodách (IIV1 a IIV2). Geometrický průměr  $AUC_{last}$  (90% CI) této skupiny měl hodnotu 26,29 (20,56-47,00 mg/ml.min.g.

Pro všechny možné dvojkombinace paralelních skupin A-F a dále pro obě periody z IIV studie byla vypočítána bioekvivalence. Konfidenční intervaly při párovém porovnání skupin A-F ve 4 případech z 15 neobsahovaly hodnotu 100 %.

Dále byly na základě inter-individuální variability pozorované v paralelních a cross-over skupinách vytvořeny simulace pravděpodobnosti, že výsledný poměr spadne do rozmezí 80-125 % (standardní akceptační rozmezí hodnocení bioekvivalence). Tato pravděpodobnost pro cross-over design činila 76 %, zatímco pro paralelní uspořádání pouze 49 %.

Příloha 2 popisuje dvě modelové studie na potkanech, při kterých byly porovnávány farmakokinetické profily různých formulací s abirateronem. První studie porovnávala referenční produkt s inovovanou formulací nalačno. Rychlost absorpce byla u testované formulace podstatně vyšší než u reference, což potvrzuje přibližně 4x vyšší hodnota  $C_{max}$  a nižší  $T_{max}$  (přestože rozdíl mezi hodnotami  $T_{max}$  mezi oběma formulacemi nebyl signifikantní). Celkově dosáhla testovaná formulace přibližně 2,7x vyšší míry absorpce v porovnání s referenčním produktem.

Druhá studie popsaná v Příloze 2 se zabývala vlivem potravy na absorpci stejných dvou formulací abirateronu jako v předešlém případě (reference a inovovaná testovaná formulace). Reference se zde výrazně lépe

vstřebávala po jídle, jak potvrzuje přibližně 2,4x vyšší hodnota  $C_{\max}$  a 2x vyšší hodnota  $AUC_{\text{last}}$ . U testované formulace naopak nebyly zaznamenány přílišné rozdíly mezi podáním nalačno a po jídle.

Studie hodnotící vliv premedikace cykloheximidem na absorpci abirateronu a cinakalcetu detailněji popisuje Příloha 3. Cykloheximid významně snížil absorpci obou léčiv, kdy u abirateronu byl zaznamenán pokles AUC na méně než polovinu. V případě cinakalcetu byl pokles AUC během prvních 12 hod ještě výraznější (AUC při aplikaci s cykloheximidem dosahovalo pouze třetinové hodnoty). Během dalších 12 hod však došlo k masivnímu vstřebávání cinakalcetu, díky čemuž byla výsledná hodnota AUC po 24 hod u cykloheximidu pouze o jednu třetinu nižší než při aplikaci bez cykloheximidu.  $T_{\max}$  tak byl u cykloheximidové skupiny významně opožděný v porovnání se skupinou bez premedikace.

Výsledky studie zabývající se žaludečním pH potkanů a možnostmi jeho ovlivnění popisuje Příloha 4. V kontrolní skupině bez jakéhokoliv pH modulátoru odpovídala výsledná hodnota mediánu (interkvartilové rozpětí) 3,5 (2,7-4,2), s premedikací omeprazolem 2 h před měřením 6,7 (4,7-7,0), s omeprazolem 12 hod před měřením 5,6 (3,5-6,4) a s podáním pentagastrinu 20 min před měřením 2,2 (3,5-6,4).

Na základě naměřených hodnot žaludečního pH byla uskutečněna studie porovnávající absorpci dvou formulací s dasatinibem za použití modulátorů žaludečního pH. Při podání s pentagastrinem jsme získali u obou formulací podobný farmakokinetický profil. Podobnost potvrzují i oba bioekvivalenční poměry s hodnotami 115,29 % pro  $C_{\max}$  a 117,0 % pro  $AUC_{\text{last}}$ . Při konkomitantní aplikaci omeprazolu dosáhla testovaná formulace 1,4x vyšší hodnoty  $C_{\max}$  a 1,3x vyšší hodnoty  $AUC_{\text{last}}$  než reference.

U reference se významně projevil efekt žaludečního pH, kdy byla po podání s omeprazolem naměřena 2,4x nižší hladina  $C_{\max}$  a 1,8x nižší hodnota  $AUC_{\text{last}}$  než s pentagastrinem. Absorpce se také s omeprazolem zpomalila, jak dokládá nárůst hodnoty  $T_{\max}$  ze 180 min na 273 min. Testovaná formulace rovněž vykazovala nižší míru absorpce, nicméně nedosáhla takových rozdílů (1,3x nižší  $C_{\max}$  a 1,2x nižší  $AUC_{\text{last}}$ ). V tomto případě se naopak dasatinib vstřebával rychleji s omeprazolem ( $T_{\max}$  o 60 min kratší než s pentagastrinem).

Příloha 5 se zabývá post-mortem redistribucí alprazolamu. U všech skupin se objevila významně zvýšená koncentrace alprazolamu v krvi post-mortem oproti hodnotám před smrtí. Poměry mediánů post-mortem a ante-mortem plazmatických koncentrací alprazolamu činily 1,78; 1,54 a 1,39 v časech 2, 6 a 24 hod po smrti. Distribuce alprazolamu v plicích se během 24 hod po smrti příliš neměnila. U tukové, jaterní a ledvinné tkáně jsme během prvních hodin zaznamenali nárůst koncentrace alprazolamu. V případě tukové tkáně byl dále tento vzestup nahrazen poklesem koncentrace. V srdeční a mozkové tkáni naopak prvotní úbytek nahradil pozdější nárůst koncentrace alprazolamu.

## 5. Diskuse

Diskuze všech výsledků shrnutých v této dizertační práci je v plném rozsahu dostupná v příložených publikacích.

Také tato práce si klade za cíl přispět k rozvoji metodologie preklinických farmakokinetických studií. Za tímto účelem vznikla analýza zabývající se dopadem intra- a inter-individuální variability na získané výsledky v rámci komparativních studií na zvířatech (Příloha 1). Pro tuto analýzu jsme vybrali jako modelovou molekulu abirateron acetát. Jedná se o léčivo, jež spadá do BCS třídy IV, což znamená, že se při popisu jeho farmakokinetiky objevuje vysoká intra- i inter-individuální variabilita (Daublain et al., 2017). Právě tato skutečnost je pro naše studium vhodná, neboť dovoluje, aby se naplno projevilo co nejvíce faktorů, které mohou výslednou variabilitu ovlivňovat.

Výsledky naší analýzy ukazují, že geometrický průměr (90% CI) hodnot  $AUC_{last}$  abirateronu všech paralelních skupin A-F a obou period IIV skupiny s párovým uspořádáním se od sebe významně neliší [24,36 (23,79-41,00) vs. 26,29 (20,56-47,00) mg/ml.min.g]. Přesto, pokud se podíváme na výsledky jednotlivých skupin v rámci paralelního uspořádání, vidíme, že se hodnoty náhodně pohybují v širokém rozmezí od 9,62 do 44,62 mg/ml.min.g. Tyto rozdíly dosáhly tak velkých rozměrů, že nejvyšší hodnota  $AUC_{last}$  je dokonce čtyřnásobně vyšší než minimální hodnota. Navíc, při párovém porovnání skupin A-F neobsahovaly konfidenční intervaly ve 4 případech z 15 hodnotu 100 %. To znamená, že by byl v 27 % případů mylně učiněn závěr, že se léková formulace vstřebává jiným způsobem, přestože ve skutečnosti byla všechna zvířata nadávkována stejnou formulací. Jde o názorný příklad falešné pozitivivity, k níž může u studií s paralelním uspořádáním dojít, pokud se neprovede na dostatečně velkém vzorku subjektů.

Vytvořit totožné podmínky pro všechna zvířata je velmi náročný úkol. Bylo popsáno, že i přes veškerou snahu o standardizaci se během studie s paralelním designem vyskytovala vysoká variabilita mezi jednotlivými skupinami (Crabbe et al., 1999). I v naší studii byly po celou dobu zachovány stejné podmínky, a to jak při péči o potkany před experimentem,

všechny procesy během pokusů i následná analýza získaných vzorků a dat. Přesto jsme mezi paralelními skupinami zaznamenali vysokou variabilitu, již lze vysvětlit těžko ovlivnitelnými rozdíly mezi potkany a jejich chováním – ať už jde o odlišnou genetickou výbavu, vnímavost ke stresu, fyzickou aktivitu, příjem potravy nebo fyziologický stav.

Součástí analýzy tvořila i studie hodnotící intra-individuální variabilitu (IIV), která proběhla v cross-over designu a v rámci níž byla všem potkanům aplikována stejná formulace abirateronu. Mezi oběma periodami nebyl zaznamenán signifikantní rozdíl, což svědčí o nízké míře intra-individuální variability. Při porovnání s výsledky z paralelního uspořádání vedl cross-over design k poklesu CV z 96 % na 73 %. To umožňuje výraznou redukci počtu zvířat při zachování stejné síly experimentů.

Simulace pravděpodobnosti, že získáme při bioekvivalenčních studiích přesné výsledky, ukázaly, že za použití výše uvedených hodnot CV a stejného počtu subjektů (n=24) dojdeme u cross-over designu k mnohem přesnějším závěrům než u paralelního uspořádání. Cross-over uspořádání přineslo 76% pravděpodobnost, že dojde k správnému usouzení na podobnost farmakokinetických parametrů, zatímco paralelní design vedl pouze k 49% pravděpodobnosti.

Tato zjištění se shodují s pokyny regulačních autorit, které cross-over uspořádání dlouhodobě doporučují i pro klinické farmakokinetické studie, při nichž se porovnávají dvě lékové formulace (EMA, 2010, FDA, 2014, FDA, 2021). Nespornou nevýhodou však je komplikovanější metodologie, jež vyžaduje pokročilejší chirurgické techniky a kvalitnější péči o zvířata, která jsou vystavena delší zátěži.

V rámci našeho výzkumu jsme se dále zaměřili na vývoj modelu, který by bylo možné použít k farmakokinetickému testování v cross-over režimu u potkanů (Příloha 2 a 3). Experimenty sestávaly ze dvou period, v nichž byla stejným zvířatům perorálně podána v každé periodě jiná formulace (s výjimkou studie zkoumající vliv současně požitě potravy, kde se jednalo o stejnou formulaci v obou periodách, ale lišily se podmínky aplikace).

Pro odběry krve jsme zvolili metodu kanylace, protože umožňuje pohodlné odnímání vzorků i během delšího časového období. Všeobecně se chirurgický zákrok, během něž se kanyla zavede do cévy potkanů,



nejčastěji provádí jeden den před zahájením vlastního pokusu (Remsberg et al., 2015, Zhou et al., 2007). V našem případě jsme mezi kanylací a prvním dávkováním léčiva ponechali delší časovou prodlevu, 72 hod, aby tak měla zvířata více času k zotavení se z pro ně poměrně náročného zákroku, a lépe díky tomu zvládala absolvovat obě periody. Doba odebrání vzorků krve byla pro každou látku stanovena individuálně na základě dostupných informací z literatury a na základě předchozí, pilotní studie s abirateronem, jež na našem ústavu proběhla (Boleslavská et al., 2020, Gurav et al., 2012, Ramiseti and Bompelli, 2014). Obdobně wash-out perioda byla stanovena podle literárních údajů o biologickém poločasu tak, aby mezi oběma dávkováními uběhla doba alespoň 5 biologických poločasů. Dostatečnost této doby byla v průběhu experimentu ověřena odebráním pre-dose vzorků krve těsně před zahájením druhé periody a stanovením plazmatických koncentrací, které měly ve všech případech hodnotu nižší než limit kvantifikace.

Předchozí *in vitro* hodnocení dvou formulací s abirateronem ukázalo, že inovovaná formulace by se nalačno měla vstřebávat lépe než reference. Tomu odpovídají i výsledky našeho *in vivo* experimentu, kde byly pro novou formulaci naměřeny několikanásobně vyšší hodnoty  $C_{\max}$  i  $AUC_{\text{last}}$ , a potvrzují tak použitelnost našeho modelu.

O abirateronu v jeho současně používané podobě se ví, že podléhá silnému vlivu společně požití potravy, kdy se s jídlem absorpce až několikanásobně zvyšuje (Chi et al., 2015). Zrealizovali jsme tedy preklinickou studii, která měla za cíl tento vliv ohodnotit. Pro simulaci stavu po jídle byla potkanům současně s abirateronem podávána směs olivového oleje s Nutridrinkem. Olej se právě pro tyto účely používá standardně, přičemž Nutridrink, představitel vysokoenergetické tekuté výživy, byl přidán za účelem zajištění dostatku vodné fáze, nutné k rozpuštění želatinových kapslí s abirateronem (Brocks and Wasan, 2002, Shayeganpour et al., 2005).

Výsledky studie odpovídaly předpokladům, kdy referenční produkt vykazoval silný food efekt s vyšší absorpcí spolu s jídlem. U inovované formulace naopak došlo ke zmírnění tohoto vlivu, kdy i přes opožděné vstřebávání společně s jídlem dosáhla celková absorpce podobné míry jak s jídlem, tak i nalačno. Tento model se tak hodí pro použití i při jiných

studiích s cílem studovat vliv potravy na vstřebávání. Přesto je nutné vzít v potaz limity tohoto modelu – potkani všeobecně nepatří mezi nejvhodnější zvířata pro studování vlivu potravy na farmakokinetiku, protože se fyziologie jejich trávicího traktu liší od lidského více než u jiných druhů (DeSesso and Jacobson, 2001). I tak lze ovšem tento model využít k získání prvních cenných informací o vlivu potravy na absorpci a mohou napovědět, jak se tato formulace bude chovat u vyšších druhů, případně u lidí.

Studie zaměřená na porovnání farmakokinetiky formulací s abirateronem a cinakalcetem při aplikaci samostatně a po předchozí premedikaci cykloheximidem rovněž přinesla očekávané výsledky – cykloheximid vedl u obou formulací k výrazně snížené absorpci léčiva. Podobný efekt cykloheximidu byl popsán i u jiných lipofilních látek a je pravděpodobně způsoben omezením tvorby chylomikronů, jež hrají důležitou roli ve vstřebávání látek lymfatickou cestou (Dahan and Hoffman, 2005, Lind et al., 2008). Překvapivým jevem bylo mohutné zvýšení plazmatické koncentrace cinakalcetu u potkanů s cykloheximidem po 12 hod od aplikace. Podobný fenomén byl zaznamenán i u halofantrinu a lze jej vysvětlit zpožděnou absorpcí snížením motility gastrointestinálního traktu způsobeným cykloheximidem (Lind et al., 2008, Plattner et al., 2001).

Další část práce (Příloha 4) se věnuje žaludečnímu pH u potkanů a možnostmi jeho ovlivnění při preklinických farmakokinetických studiích. Ve stavu nalačno bez jakéhokoliv modulátoru jsme u potkanů stanovili pH vyšší, než jaké se uvádí u lidí (3,5 vs. 1-2) (Dressman et al., 1990, Kalantzi et al., 2006). Naměřená hodnota se zároveň neliší od dříve publikovaných dat u potkanů (McConnell et al., 2008, Ward and Coates, 1987). Lidskému žaludečnímu pH však velmi dobře odpovídá situace, kdy byli potkani premedikováni pentagastrinem. Při podání omeprazolu se žaludeční pH podle očekávání zvýšilo a pokud byl aplikován 2 hod před měřením, žaludeční pH odpovídalo hodnotám u lidí po konzumaci jídla (Dressman et al., 1990, Kalantzi et al., 2006, Gardner et al., 2002). K podobným výsledkům vedly i jiné předchozí experimenty, které naše data potvrzují (Yasumuro et al., 2018).

Následně provedená farmakokinetická studie s dasatinibem názorně ukazuje, jakým způsobem je možné na základě dříve zjištěných výsledků modulátory žaludečního pH využít v praxi. Dasatinib patří mezi léčiva, jejichž absorpce je silně ovlivněná hodnotami žaludečního pH (Lubach et al., 2013). Jedná se o slabou zásadu, jež v kyselém prostředí podléhá disociaci a v této podobě se snadněji rozpouští. Při vyšších hodnotách pH se ale míra ionizace snižuje, a tím i rozpustnost společně se vstřebatelností.

Tento efekt můžeme pozorovat i v naší studii, kdy jsme u obou formulací zaznamenali při premedikaci pentagastrinem vyšší míru absorpce než při předchozí aplikaci omeprazolu. Zatímco u reference se tento jev projevil velmi výrazně, u nové, inovované formulace, která byla připravena za účelem snížit vliv žaludečního pH na vstřebávání, byl rozdíl mezi podáním s pentagastrinem a s omeprazolem menší. Vidíme tedy, že vhodným načasováním látek, jež jsou schopny ovlivnit žaludeční pH, můžeme upravit model pro preklinické testování farmakokinetiky léčiv tak, aby více odpovídalo podmínkám, jaké se vyskytují u lidí, a zpřesnit tak zkoumání látek s pH dependentní absorpcí.

Poslední část práce (Příloha 5) se zabývá post-mortem redistribucí alprazolamu na potkaním modelu. Posmrtné změny koncentrací v krvi a tkáních již byly pro některá léčiva popsány. Pro alprazolam, jenž často hraje roli v úmrtích, která jsou spojená s užitím léčiv, dosud existuje jen málo informací, které naznačují, že by i tato látka mohla být subjektem posmrtné redistribuce (Han et al., 2012). Tato studie tedy jako první poskytuje ucelený popis změn koncentrací alprazolamu v jednotlivých tkáních, k nimž po smrti u živých organismů dochází.

Po smrti potkanů jsme ve všech časových bodech po usmrcení potkanů naměřili signifikantně vyšší plazmatické hladiny alprazolamu oproti vzorkům před smrtí. Podobný jev byl zaznamenán i u jiných látek, jako jsou thioridazin, morfin nebo citalopram (Koren and Klein, 1992, Kugelberg et al., 2004, Castaing et al., 2006). Nejvyšších koncentrací alprazolamu bylo dosaženo v tukové a jaterní tkáni, zatímco nejméně se léčivo vyskytovalo v plicích a mozku (30 min po smrti). Obdobný distribuční vzorec byl popsán i u živých potkanů 30 min po i.v. aplikaci <sup>14</sup>C-alprazolamu (Banks

et al., 1992) a odpovídá post-mortem redistribučním datům získaných u jiných léčiv ze skupiny benzodiazepinů (Shiota et al., 2004).

Zatímco koncentrace v plicích se během 24 hod po smrti příliš neměnila, v játrech a ledvině docházelo k postupné kumulaci alprazolamu. Nárůst koncentrace alprazolamu můžeme pozorovat i v srdeční tkáni, nicméně zde došlo nejprve k výraznému úbytku množství alprazolamu, což mohlo být způsobeno rychlým přesunem léčiva do krve (Pelissier-Alicot et al., 2003). K obdobným změnám koncentrací došlo i u mozku, kde se po prvotním poklesu projevila tendence k dosažení rovnováhy s krevními hladinami.

Jelikož mají potkani mnohem menší velikost než lidé, najdeme zde i menší vzdálenosti mezi jednotlivými orgány, díky čemuž látky snadněji difundují, a výsledky tak nemusí plně korespondovat s ději pozorovanými u lidí. I přes tuto skutečnost námi naměřené poměry mezi koncentracemi alprazolamu v ledvině a jaterní tkáni a plazmě odpovídají hodnotám zjištěných u lidí (0,2-4,1 pro ledviny a 0,9-9,2 pro játra u potkanů vs. 1,7 pro ledviny a 4,2 pro játra u lidí) (Jenkins et al., 1997).

## 6. Závěry

Tato disertační práce se zaměřuje na vývoj a praktické využití potkaních modelů u preklinických farmakokinetických studií a rovněž v hodnocení toxikokinetiky. Závěry lze shrnout následovně:

- Implementace cross-over designu zajišťuje i při použití nižšího počtu zvířat kvalitnější výstupy než v případě paralelního uspořádání.
- Získané výsledky modelových komparativních farmakokinetických studií na potkanech, demonstrující použití cross-over designu, odpovídají předpokladům na základě předešlých *in vitro* experimentů a literárních dat.
- Žaludeční pH potkanů nalačno má o něco vyšší hodnotu než u lidí.
- Pro simulaci podmínek žaludečního pH, jaké najdeme u lidí, se nejvíce hodí premedikace pentagastrinem potkanům krátce před aplikací léčiva s pH-dependentní absorpcí.
- Obdobné prostředí žaludku, jaké najdeme u lidí trpících hypochlorhydrií, nejlépe u potkanů navozuje podání omeprazolu 2 hod před testovaným léčivem.
- Alprazolam vykazuje u potkanů mírnou post-mortem redistribuci.

## 7. Použitá literatura

- BANKS, W. R., YAMAKITA, H. & DIGENIS, G. A. Metabolism and distribution of 1-[14C]alprazolam in rats. *J Pharm Sci*, 1992, 81, 8, 797-801.
- BOLESLAVSKA, T., SVETLIK, S., ZVATORA, P., BOSAK, J., DAMMER, O., BERANEK, J., KOZLIK, P., KRIZEK, T., CANOVA, N. K., SIMA, M., SLANAR, O. & STEPANEK, F. Preclinical evaluation of new formulation concepts for abiraterone acetate bioavailability enhancement based on the inhibition of pH-induced precipitation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2020, 151, 81-90.
- BROCKS, D. R. & WASAN, K. M. The influence of lipids on stereoselective pharmacokinetics of halofantrine: Important implications in food-effect studies involving drugs that bind to lipoproteins. *J Pharm Sci*, 2002, 91, 8, 1817-1826.
- CASTAING, N., TITIER, K., CANAL-RAFFIN, M., MOORE, N. & MOLIMARD, M. Postmortem redistribution of two antipsychotic drugs, haloperidol and thioridazine, in the rat. *J Anal Toxicol*, 2006, 30, 419-425.
- CRABBE, J. C., WAHLSTEN, D. & DUDEK, B. C. Genetics of mouse behavior: interactions with laboratory environment. *Science*, 1999, 284, 5420, 1670-1672.
- DAHAN, A. & HOFFMAN, A. Evaluation of a chylomicron flow blocking approach to investigate the intestinal lymphatic transport of lipophilic drugs. *Eur J Pharm Sci*, 2005, 24, 4, 381-388.
- DAUBLAIN, P., FENG, K. I., ALTMAN, M. D., MARTIN, I., MUKHERJEE, S., NOFSINGER, R., NORTHRUP, A. B., TSCHIRRET-GUTH, R., CARTWRIGHT, M. & MCGREGOR, C. Analyzing the Potential Root Causes of Variability of Pharmacokinetics in Preclinical Species. *Mol Pharm*, 2017, 14, 5, 1634-1645.
- DESESSO, J. M. & JACOBSON, C. F. Anatomical and physiological parameters affecting gastrointestinal absorption in humans and rats. *Food and Chemical Toxicology*, 2001, 39, 3, 209-228.
- DRESSMAN, J. B., BERARDI, R. R., DERMENTZOGLOU, L. C., RUSSELL, T. L., SCHMALTZ, S. P., BARNETT, J. L. & JARVENPAA, K. M. Upper gastrointestinal (GI) pH in young, healthy men and women. *Pharm Res*, 1990, 7, 756-761.
- EMA. *Guideline on the Investigation of Bioequivalence* [online]. Londýn, 2010 [cit. 12.4.2022]. Dostupné z:

- [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-investigation-bioequivalence-rev1\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-investigation-bioequivalence-rev1_en.pdf)
- FDA. *Guidance for Industry: Bioavailability and Bioequivalence Studies Submitted in NDAs or INDs—General Considerations* [online]. 2014 [cit. 12.4.2022]. Dostupné z: <https://www.fda.gov/files/drugs/published/Bioavailability-and-Bioequivalence-Studies-Submitted-in-NDAs-or-INDs-%E2%80%94-4-General-Considerations.pdf>
- FDA. *Guidance for industry: Bioequivalence Studies with Pharmacokinetic Endpoints for Drugs Submitted under an ANDA* [online]. 2021 [cit. 12.4.2022]. Dostupné z: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/bioequivalence-studies-pharmacokinetic-endpoints-drugs-submitted-under-abbreviated-new-drug>
- GARDNER, J. D., CIOCIOLA, A. A. & ROBINSON, M. Measurement of meal-stimulated gastric acid secretion by in vivo gastric autotitration. *J Appl Physiol*, 2002, 92, 2, 427-434.
- GURAV, S., PUNDE, R., FAROOQUI, J., ZAINUDDIN, M., RAJAGOPAL, S. & MULLANGI, R. Development and validation of a highly sensitive method for the determination of abiraterone in rat and human plasma by LC-MS/MS-ESI: application to a pharmacokinetic study. *Biomed Chromatogr*, 2012, 26, 6, 761-768.
- HAN, E., KIM, E., HONG, H., JEONG, S., KIM, J., IN, S., CHUNG, H. & LEE, S. 2012. Evaluation of postmortem redistribution phenomena for commonly encountered drugs. *Forensic Sci Int*, 2012, 219, 1-3, 265-271.
- CHI, K. N., SPRATLIN, J., KOLLMANNNSBERGER, C., NORTH, S., PANKRAS, C., GONZALEZ, M., BERNARD, A., STIELTJES, H., PENG, L., JIAO, J., ACHARYA, M., KHEOH, T., GRIFFIN, T. W., YU, M. K., CHIEN, C. & TRAN, N. P. Food effects on abiraterone pharmacokinetics in healthy subjects and patients with metastatic castration-resistant prostate cancer. *J Clin Pharmacol*, 2015, 55, 12, 1406-1414.
- JENKINS, A. J., LEVINE, B., LOCKE, J. L. & SMIALEK, J. E. A fatality due to alprazolam intoxication. *Journal of Analytical Toxicology*, 1997, 21, 3, 218-220.
- KALANTZI, L., GOUMAS, K., KALIORAS, V., ABRAHAMSSON, B., DRESSMAN, J. B. & REPPAS, C. Characterization of the human upper gastrointestinal contents under conditions simulating bioavailability/bioequivalence studies. *Pharm Res*, 2006, 23, 165-176.
- KOREN, G. & KLEIN, J. Postmortem Redistribution of Morphine in Rats. *Therapeutic Drug Monitoring*, 1992, 14, 6, 461-463.

- KUGELBERG, F. C., DRUID, H., CARLSSON, B., AHLNER, J. & BENGTTSSON, F. Postmortem redistribution of the enantiomers of citalopram and its metabolites: an experimental study in rats. *J Anal Toxicol*, 2004, 28, 8, 631-637.
- LIND, M. L., JACOBSEN, J., HOLM, R. & MULLERTZ, A. Intestinal lymphatic transport of halofantrine in rats assessed using a chylomicron flow blocking approach: the influence of polysorbate 60 and 80. *Eur J Pharm Sci*, 2008, 35, 3, 211-218.
- LUBACH, J. W., CHEN, J. Z., HAU, J., IMPERIO, J., CORAGGIO, M., LIU, L. & WONG, H. Investigation of the rat model for preclinical evaluation of pH-dependent oral absorption in humans. *Mol Pharm*, 2013, 10, 11, 3997-4004.
- MCCONNELL, E. L., BASIT, A. W. & MURDAN, S. Measurements of rat and mouse gastrointestinal pH, fluid and lymphoid tissue, and implications for in-vivo experiments. *J Pharm Pharmacol*, 2008, 60, 1, 63-70.
- PELISSIER-ALICOT, A. L., GAULIER, J. M., CHAMPSAUR, P. & MARQUET, P. Mechanisms underlying postmortem redistribution of drugs: A review. *Journal of Analytical Toxicology*, 2003, 27, 8, 533-544.
- PLATTNER, V., LERAY, V., LECLAIR, M. D., AUBE, A. C., CHERBUT, C. & GALMICHE, J. P. Interleukin-8 increases acetylcholine response of rat intestinal segments. *Aliment Pharmacol Ther*, 2001, 15, 8, 1227-1232.
- RAMISETTI, N. R. & BOMPELLI, S. LC-MS/MS determination of cinacalcet enantiomers in rat plasma on Chirobiotic V column in polar ionic mode: application to a pharmacokinetic study. *Biomed Chromatogr*, 2014, 28, 12, 1846-1853.
- REMSBERG, C. M., MARTINEZ, S. E., AKINWUMI, B. C., ANDERSON, H. D., TAKEMOTO, J. K., SAYRE, C. L. & DAVIES, N. M. Preclinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics and Content Analysis of Gnetol in Foodstuffs. *Phytother Res*, 2015, 29, 1168-1179.
- SHAYEGANPOUR, A., JUN, A. S. & BROCKS, D. R. Pharmacokinetics of Amiodarone in hyperlipidemic and simulated high fat-meal rat models. *Biopharm Drug Dispos*, 2005, 26, 6, 249-257.
- SHIOTA, H., NAKASHIMA, M., TERAZONO, H., SASAKI, H., NISHIDA, K., NAKAMURA, J. & TANIYAMA, K. Postmortem changes in tissue concentrations of triazolam and diazepam in rats. *Leg Med*, 2004, 6, 4, 224-232.



- WARD, F. W. & COATES, M. E. Gastrointestinal pH measurement in rats: influence of the microbial flora, diet and fasting. *Lab Anim*, 1987, 21, 3, 216-222.
- YASUMURO, O., UCHIDA, S., KASHIWAGURA, Y., SUZUKI, A., TANAKA, S., INUI, N., WATANABE, H. & NAMIKI, N. Changes in gefitinib, erlotinib and osimertinib pharmacokinetics under various gastric pH levels following oral administration of omeprazole and vonoprazan in rats. *Xenobiotica*, 2018, 48, 11, 1106-1112.
- ZHOU, Q., GUO, P., KRUIH, G. D., VICINI, P., WANG, X. & GALLO, J. M. Predicting human tumor drug concentrations from a preclinical pharmacokinetic model of temozolomide brain disposition. *Clin Cancer Res*, 2007, 13, 14, 4271-4279.

## Seznam publikací

1. publikace *in extenso*, které jsou podkladem disertace

a) s IF

- **KRÁLOVIČOVÁ, J.**, BARTŮNEK, A., HOFMANN, J., KRÍŽEK, T., KOZLÍK, P., ROUŠAROVÁ, J., RYŠÁNEK, P., ŠÍMA, M., SLANAŘ, O. Pharmacokinetic variability in pre-clinical studies: sample study with abiraterone in rats and implications for short-term comparative pharmacokinetic study designs. *Pharmaceutics*, 2022, 14(3), 643. (IF 2020 = 6.321)
- RYŠÁNEK, P., GRUS, T., LUKÁČ, P., KOZLÍK, P., KRÍŽEK, T., POZNIAK, J., ROUŠAROVÁ, J., **KRÁLOVIČOVÁ, J.**, KUTINOVÁ CANOVÁ, N., BOLESLAVSKÁ, T., BOSÁK, J., ŠTĚPÁNEK, F., ŠÍMA, M., SLANAŘ, O. Validity of cycloheximide chylomicron flow blocking method for the evaluation of lymphatic transport of drugs. *Br J Pharmacol*, 2021, 1-12. (IF 2020 = 8.739)
- BOLESLAVSKÁ, T., RYCHECKÝ, O., KROV, M., ŽVÁTORA, P., DAMMER, O., BERÁNEK, J., KOZLÍK, P., KRÍŽEK, T., **HOŘÍNKOVÁ, J.**, RYŠÁNEK, P., ROUŠAROVÁ, J., KUTINOVÁ CANOVÁ, N., ŠÍMA, M., SLANAŘ, O., ŠTĚPÁNEK, F. Bioavailability enhancement and food effect elimination of abiraterone acetate by encapsulation in surfactant-enriched oil marbles. *AAPS J*, 2020, 22(6), 1-12. (IF 2020 = 4,009)

a) bez IF

- **HOŘÍNKOVÁ, J.**, KOZLÍK, P., KRÍŽEK, T., MICHALIČKOVÁ, D., ŠÍMA, M., SLANAŘ, O. Post-mortem redistribution of alprazolam in rats. *Prague Med. Rep.*, 2020, 121(4), 244-253.
- ŠÍMA, M., KUTINOVÁ-CANOVÁ, N., RYŠÁNEK, P., **HOŘÍNKOVÁ, J.**, MOŠKOŘOVÁ, D., SLANAŘ, O. Gastric pH in rats: Key determinant for preclinical evaluation of pH-dependent oral drug absorption. *Prague Med. Rep.*, 2019, 120(1), 5-9.

2. publikace *in extenso* bez vztahu k tématu disertace

a) s IF

- HRIŇOVÁ, E., SKOŘEPOVÁ, E., ČERNÁ, I., **KRÁLOVIČOVÁ, J.**, KOZLÍK, P., KRÍŽEK, T., ROUŠAROVÁ, J., RYŠÁNEK, P., ŠÍMA, M., SLANAŘ, O., ŠOÓŠ, M. Explaining dissolution properties of rivaroxaban cocrystals. *Int J Pharm*, 2022, 622. (IF 2020 = 5,875)

b) bez IF

- **HOŘÍNKOVÁ, J.**, ŠÍMA, M., SLANAŘ, O. Pharmacokinetics of dasatinib. *Prague Med. Rep.*, 2019, 120(2), 52-63.

