

**UNIVERZITA KARLOVA
1. LÉKAŘSKÁ FAKULTA**

Studijní program: doktorský - Farmakologie a toxikologie (P0916D350001)

Studijní obor: Farmakologie a toxikologie (YFAT19)



**UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta**

Mgr. Jana Královičová

Aplikovaná farmakokinetika v preklinickém výzkumu

Applied pharmacokinetics in preclinical research

DISERTAČNÍ PRÁCE

Školitel: Doc. PharmDr. Martin Šíma, Ph.D.

Praha, 2022

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 31. 5. 2022

Jana Královičová

Podpis:

Identifikační záznam:

KRÁLOVIČOVÁ, Jana. *Aplikovaná farmakokinetika v preklinickém výzkumu. [Applied pharmacokinetics in preclinical research]*. Praha, 2022. 61 stran, 5 příloh. Disertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Farmakologický ústav. Školitel Šíma, Martin.

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} se pohybovalo se v rozmezí od 9,62 do 44,62 mg/ml.min.g). Při párovém porovnání jednotlivých paralelních skupin navíc konfidenční interval ve 4 případech z 15 nezahrnoval hodnotu 100 %. To znamená, že u více než čtvrtiny studií by 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 požití 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; AUC_{last} 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 modulátory 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. Jedná se o první studii, jež podrobně mapuje změny koncentrací alprazolamu v krvi a vybraných tkáních, k nimž po

smrti dochází. 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} ranged from 9.62 to 44.62 mg/ml.min.g). Furthermore, in 4 cases out of 15 pair comparisons of individual parallel groups, the confidence interval did not include the 100% value. That means that 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. This is the first study detailing changes in concentrations of alprazolam in blood and selected tissues that can be seen after death. 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

Obsah

Abstrakt.....	4
Abstract.....	6
Obsah	8
Seznam zkratk	9
Seznam vlastních publikací	10
Poděkování.....	12
1. Literární úvod	13
1.1. Výhody a nevýhody použití animálních modelů při studiu farmakokinetiky.....	14
1.2. Faktory ovlivňující absorpci léčiv.....	15
1.2.1. Vliv žaludečního pH na absorpci léčiv.....	15
1.2.2. Vliv potravy na absorpci léčiv.....	18
1.2.2.1. Typy potravy.....	18
1.2.2.2. Fyziologie gastrointestinálního traktu po jídle	20
1.3. Variabilita farmakokinetických studií.....	21
1.4. Paralelní vs. cross-over uspořádání studie	23
1.5. Post-mortem redistribuce	24
2. Hypotézy a cíle práce.....	26
3. Metody	27
4. Výsledky	29
5. Diskuze	44
6. Závěr	50
7. Použitá literatura	51
8. Seznam příloh	61

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
CYP	cytochrom P450
CV	variační koeficient
Event.	eventuálně
I.p.	intraperitoneálně
IIV	intra-individuální variabilita
Např.	například
P-gp	P-glykoprotein
P.o.	perorálně
S.c.	subkutánně
SD	směrodatná odchylka
T_{max}	čas, za který je dosaženo maximální plazmatické koncentrace léčiva
WHO	World Health Organization

Seznam vlastních publikací

1. HRIŇOVÁ, E., SKOŘEPOVÁ, E., ČERŇA, 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, 121854. (IF 2020 = 5,875)
2. **KRÁLOVIČOVÁ, J.**, BARTŮŇEK, 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)
3. 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)
4. **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.
5. 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)
6. **HOŘÍNKOVÁ, J.**, ŠÍMA, M., SLANAŘ, O. Pharmacokinetics of dasatinib. *Prague Med. Rep.*, 2019, 120, 2, 52-63.
7. 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.

Abstrakty, postery a přednášky na odborných konferencích:

1. **KRÁLOVIČOVÁ, J.;** KOZLÍK, P.; KŘÍŽEK, T.; MICHALIČKOVÁ, D.; ŠÍMA, M.; SLANAŘ, O. 2022. Post-mortem redistribution of alprazolam in rats. The Parc symposium.
2. **KRÁLOVIČOVÁ, J.;** MATĚJŮ, M.; HLOUŠEK, S.; DVOŘÁK, J.; RICHTER, I.; ŠÍMA, M.; SLANAŘ, O. 2021. Assessment of patient compliance with abiraterone therapy using principles of therapeutic drug monitoring. The Parc symposium.
3. **KRÁLOVIČOVÁ, J.;** ROUŠAROVÁ, J.; RYŠÁNEK, P.; ARORA, M.; ŠÍMA, M.; SLANAŘ, O. 2021. Pharmacokinetics of modified oil marbles with abiraterone acetate. The Parc symposium.
4. **KRÁLOVIČOVÁ, J.;** ROUŠAROVÁ, J.; RYŠÁNEK, P.; ARORA, M.; ŠÍMA, M.; SLANAŘ, O. 2021. Pharmacokinetics of novel formulations of rivaroxaban II. The Parc symposium.
5. **KRÁLOVIČOVÁ, J.;** ROUŠAROVÁ, J.; RYŠÁNEK, P.; ARORA, M.; ŠÍMA, M.; SLANAŘ, O. 2020. Pharmacokinetics of two novel formulations of rivaroxaban. The Parc symposium.
6. **KRÁLOVIČOVÁ, J.;** ROUŠAROVÁ, J.; RYŠÁNEK, P.; ŠÍMA, M.; KUTINOVÁ CANOVÁ, N.; SLANAŘ, O. 2020. Evaluation of variability across different studies with abiraterone. The Parc symposium.
7. **HOŘÍNKOVÁ, J.;** KUTINOVÁ CANOVÁ, N.; RYŠÁNEK, P.; MOŠKOŘOVÁ, D.; ŠÍMA, M.; SLANAŘ, O. 2019. pH žaludeční šťávy potkanů: in vivo model pro preklinické hodnocení pH-dependentní absorpce perorálně podávaných léčiv. 69. česko-slovenské farmakologické dny.
8. **HOŘÍNKOVÁ, J.;** ŠÍMA, M.; SVĚTLÍK, S.; KUTINOVÁ CANOVÁ, N.; MOŠKOŘOVÁ, D.; RYŠÁNEK, P.; SLANAŘ, O. 2019. In vivo evaluation of new formulation concept of dasatinib. The Parc symposium.

Poděkování

Velmi ráda bych poděkovala svému školiteli, doc. PharmDr. Martinu Šímovi, Ph.D., za jeho aktivní zájem o mé studium a za jeho nedocenitelnou pomoc a odborné rady. Svoji vděčnost si také přeji vyjádřit prof. MUDr. Ondřeji Slanařovi, Ph.D. za umožnění působení na Farmakologickém ústavu 1. LF UK a VFN a všem kolegům i spoluautorům publikací, díky nimž mohly být experimenty zrealizovány, jakož i studentům a školitelům zapojeným v projektu The Parc. Děkuji také svému manželovi Samuelovi i celé rodině za jejich nesmírnou podporu během celého mého studia.

1. Literární úvod

Farmakokinetika je farmakologický podobor, který studuje pohyb léčiva v organismu od okamžiku jeho aplikace až do jeho vyloučení z těla. Znalost farmakokinetických dějů, mezi něž patří absorpce, distribuce, metabolizace a exkrece, má pro použití každé látky zásadní význam. Díky podrobné farmakokinetické charakteristice totiž můžeme predikovat, jakých plazmatických koncentrací bude u dané látky při určitém způsobu podání a dávce dosaženo, což dále ovlivňuje nejen účinnost, ale i toxicitu léčby (Ette and Williams, 2004). Informace o absorpční fázi také hrají klíčovou roli při výběru optimální cesty podání a konkrétní lékové formulace (Hamman et al., 2007). Údaje o metabolizaci a exkreci zase umožňují predikovat, jak dlouho bude účinek léčiva přetrvávat nebo jaké jiné současně podané látky mají potenciál ovlivnit výsledky léčby (Ter Heine et al., 2010). To všechno jsou ovšem pouze některé příklady z mnoha různých možností využití farmakokinetických dat.

Farmakokinetické studie, kde můžeme výše uvedené údaje získat, jsou tedy nedílnou součástí farmaceutického vývoje. Podstatnou složku tohoto výzkumu tvoří i preklinické experimenty, jež přinášejí základní data o chování látky v organismu ještě předtím, než se nové léčivo poprvé podá lidským subjektům (Singh, 2006). Nemusí jít přitom pouze o nové, neznámé látky – takovéto studie nacházejí svoje uplatnění i při vývoji generik a inovativních lékových forem, kdy lze na základě komparativních studií s referenčním produktem rozhodnout, zdali má smysl ve vývoji lékové formy pokračovat (Jaiswal et al., 2014). Díky preklinickým studiím je také možné sledovat, co se děje s různými toxickými látkami poté, co se dostanou do organismu (Buchanan et al., 1997).

Kvalitní provedení preklinických farmakokinetických studií je tedy velmi důležité, protože může ovlivnit, jaký bude další postup testování a vývoje látek. Přesto se metodologii preklinických studií zdaleka nevěnuje tolik pozornosti, jako je tomu u studií klinických, jež mají metodologii velmi propracovanou. U studií na zvířatech se naproti tomu stále často využívají tradiční postupy z minulosti a k modernizaci dochází velice pomalu.

1.1. Výhody a nevýhody použití animálních modelů při studiu farmakokinetiky

Testování na zvířatech má dlouhou historii, sahající až do období před naším letopočtem (Hajar, 2011). S postupným rozvojem poznání a vědy se použití animálních modelů ve výzkumu vyvíjelo a proměňovalo až do současné podoby, kdy tyto modely tvoří běžnou součást farmaceutického bádání. A ačkoliv v posledních letech probíhá diskuze nad etikou a nezbytností použití zvířat ve výzkumu (Pound and Bracken, 2014, Mandal and Parija, 2013), dosud nebyly zavedeny alternativní modely, jež by v oblasti medicíny dokázaly testování na zvířatech plně nahradit (Garattini and Grignaschi, 2017). Živé organismy jsou totiž vysoce komplexní a pouze tehdy, když sledujeme chování látky v rámci fungování celého organismu, můžeme odhalit mnohé souvislosti, které bychom jinak nemohli pozorovat (Saeidnia et al., 2015).

Na druhou stranu je stále třeba mít na paměti, že mezi jednotlivými druhy zvířat a lidmi existují mnohé rozdíly. Právě tato skutečnost patří mezi největší limity preklinických *in vivo* studií. Naměřené hodnoty farmakokinetických parametrů u konkrétního zvířete se mohou lišit od hodnot získaných z pokusů s jinými druhy nebo z následných klinických studií. U myši bylo například pozorováno rychlejší vyprazdňování žaludku než u králíků, což může mít vliv na rychlost absorpce podaného léčiva (Watanabe et al., 1977). Stejně tak se může významně lišit i rychlost eliminace. Kupříkladu u myši byl zaznamenán několikanásobně kratší biologický poločas antibiotik než u lidí (Andes and Craig, 2002).

Největší rozdíly mezi jednotlivými druhy zvířat a lidmi bývají způsobené variacemi v látkovém metabolismu, zejména pak hepatálním. Enzymy, účastníci se přeměny xenobiotik, se u různých živočichů exprimují různým způsobem a mohou mít jinou aktivitu (Rodrigues et al., 1994, Gamble et al., 2002). Zatímco například kodein se u lidí metabolizuje prostřednictvím cytochromu P450 (CYP) 2D6, u potkanů tuto úlohu přebírá izoforma 2D1 nebo 2D2 (Grobe et al., 2012, Martignoni et al., 2006). Některé enzymy mohou dokonce i u zvířat vykazovat pohlavní dimorfismus, který u lidí nenajdeme. U potkaních samců byla naměřena 16x vyšší hladina CYP 2C oproti samicím (Janeczko et al., 1990). Podobně CYP 3A, důležitá skupina podílející se na metabolismu mnoha léčiv u lidí, se u potkaních samic exprimuje ve velmi omezené míře (Tomlinson et al., 1997).

Další nevýhodou animálních experimentů je jejich vyšší ekonomické zatížení oproti *in vitro* a *in silico* metodám (Fontana et al., 2021). Samotná cena zvířat včetně nákladů na zabezpečení jejich základních potřeb se odvíjí od druhu zvířete a obecně lze říci, že roste

s velikostí zvířete. Navíc každé pracoviště, jež chce se zvířaty pracovat, musí získat příslušné oprávnění (Vyhláška č. 419/2012 Sb.).

Neopomenutelným aspektem pokusů se zvířaty je etická stránka. Při provozování experimentů se každé pracoviště musí řídit platnou legislativou, přičemž základním pilířem této práce napříč mnoha zeměmi je zásada 3R (replacement, reduction and refinement), jejíž formulaci lze najít v úmluvě z roku 1966 s názvem Animal Welfare Act (Public Law 89-544, 1966). Na základě tohoto ujednání je třeba všechny pokusy pečlivě plánovat a využívat pouze nezbytně nutné množství zvířat. Zároveň, pokud existuje alternativa, mělo by se dát přednost metodě, pro kterou zvířata vůbec potřebná nejsou. V každém případě by se vždy mělo se zvířaty zacházet tak, aby trpěla minimálně. To v sobě zahrnuje používání adekvátních analgetik a anestetik k utlumení bolesti a opatrné zacházení, aby zvířata prožívala co nejméně stresu (Fontana et al., 2021).

Mezi zvířata, jež se k preklinickým pokusům volí nejčastěji, patří hlodavci (myši, potkani, křečci nebo morčata) (Deacon, 2006). Péče o ně není tak finančně náročná a jednoduše se s nimi manipuluje. Velmi dobře se tak hodí k prvotním experimentům za účelem získání základních dat o neznámé látce nebo lékové formě. Díky pokrokům v oblasti genového inženýrství lze nyní k experimentům využívat i hlodavce s upravenou genetickou informací. Například myši s knock-outovanými geny pro určité enzymy nacházejí svoje uplatnění ve studiu metabolismu různých xenobiotik (Gonzalez, 2003).

Mezi větší savce, kteří se při preklinickém testování používají, patří králíci, psi, prasata nebo primáti (Walker et al., 1999, Bogaards et al., 2000). Z hlediska podobnosti s lidským organismem poskytují samozřejmě nejlepší prediktivní výsledky primáti (např. makak jávský), kteří se svojí genetickou informací i tělesnými funkcemi lidem podobají nejvíce (Iwasaki and Uno, 2009, Miyamoto et al., 2017).

1.2 Faktory ovlivňující absorpci léčiv

1.2.1 Vliv žaludečního pH na absorpci léčiv

Již dlouho je znám fakt, že stav gastrointestinálního traktu ovlivňuje, jak a do jaké míry se z něj léčiva mohou absorbovat. Jedním z takových významných faktorů je žaludeční pH. Jeho hodnoty se mezi jednotlivci často liší, což vede k rozdílné

vstřebatelnosti některých látek jak mezi zvířaty, tak i mezi lidmi (Blum et al., 1991, Russell et al., 1994, Krishna et al., 2009).

Hodnota žaludečního pH se u konkrétního jedince mění v závislosti na přítomnosti potravy v žaludku. Ve stavu nalačno u zdravých lidí dosahuje pH v žaludku kyselých hodnot, nejčastěji v rozmezí od 1 do 2 (Dressman et al., 1990, Kalantzi et al., 2006). U velkého množství lidí však bývá funkce žaludeční sekrece narušená, ať už kvůli probíhajícím patologickým procesům nebo užívání léčiv, jež vylučování žaludečních kyselin blokuje (např. inhibitory protonové pumpy (Tolman et al., 1997)). V takovém případě žaludeční pH nabývá výrazně vyšších hodnot, což ovšem může představovat problém, pokud se daný pacient zároveň léčí látkami, jejichž adekvátní absorpce je na kyselém pH závislá.

Po jídle pH v žaludku roste jako následek mísení žaludečních tekutin spolu s přijatou potravou o vyšším pH. Hodnoty žaludečního pH pak mohou být bezprostředně po jídle velmi rozmanité v závislosti na tom, o jakou potravu konkrétně jde. Nejčastěji se jedná o hodnoty mezi 4,5 až 6,7 (Dressman et al., 1990, Kalantzi et al., 2006, Gardner et al., 2002). Po požití stravy se do žaludečního lumen začne uvolňovat kyselina chlorovodíková, díky čemuž pH postupně během 2 až 3 hod opět klesne na svoji původní hodnotu (Dressman et al., 1990, Gardner et al., 2002).

Přestože se podařilo velmi dobře zmapovat pH lidského žaludku, u zvířat existuje mnohem méně dostupných informací. Ačkoliv potkani patří mezi nejpoužívanější zvířata v preklinickém testování, zatím se pouze málokdo zabýval formou, jak přistupovat ke zkoumání vstřebávání léčiv s pH-dependentní absorpcí na potkaních modelech (Lubach et al., 2013, McConnell et al., 2008). Publikovaná data ukazují, že žaludeční pH potkanů ve stavu nalačno se nachází o něco výše než u lidí a odpovídá hodnotám mezi 3 a 4 (McConnell et al., 2008, Ward and Coates, 1987). Podobná situace panuje i u myši, kde byly rovněž naměřeny průměrné hodnoty pH mezi 3 a 4 (McConnell et al., 2008, Langhans et al., 1997).

Absorpci, která závisí na žaludečním pH, nejčastěji vykazují léčiva, která mají povahu slabých zásad a patří do skupiny BCS II (málo rozpustná ve vodě, vysoce permeabilní) (Lubach et al., 2013, Abuhelwa et al., 2017). Jedním z důvodů je ionizace, k níž u takových léčiv v kyselém vodném prostředí žaludku dochází. V ionizované podobě se díky tomuto jevu zvyšuje rozpustnost, a tedy i vstřebatelnost léčiva. Při vyšších hodnotách pH ale k disociaci zásad nemůže docházet v tak vysoké míře, což má za následek horší rozpustnost, a tedy i nižší biologickou dostupnost.

Příklady látek, u nichž dochází vlivem žaludečního pH k rozdílné absorpci, jsou uvedeny v tabulce 1.

Tab. 1: Příklady léčiv, u kterých byla pozorována pH-dependentní absorpce.

Název léčiva	Efekt zvýšení pH	Reference
Ketokonazol	Snížená absorpce	(Blum et al., 1991, Lubach et al., 2013)
Posakonazol	Snížená absorpce	(Krishna et al., 2009)
Dipyridamol	Snížená absorpce	(Russell et al., 1994, Gu et al., 2005)
Dasatinib	Snížená absorpce	(Lubach et al., 2013)
Cinnarizin	Snížená absorpce	(Gu et al., 2005)
Erlotinib	Snížená absorpce	(Kletzl et al., 2015)
Entrectinib	Snížená absorpce	(Parrott et al., 2020)
Itrakonazol	Snížená absorpce	(Jaruratanasirikul and Sriwiriyan, 1998)
Indinavir	Snížená absorpce	(Carver et al., 1999)
Enoxacin	Snížená absorpce	(Grasela et al., 1989)
Cefpodoxim-proxetil	Snížená absorpce	(Saathoff et al., 1992)

Při testování farmakokinetiky léčiv s pH-dependentní absorpcí je tedy nezbytné zajistit adekvátní pH žaludečního obsahu subjektů. Jelikož potkani mají o něco vyšší žaludeční pH než lidé, je žádoucí toto pH upravit tak, aby odpovídalo lidským hodnotám, aby pak bylo možné výsledky extrapolovat na lidi. Toho lze dosáhnout podáním pH modulátorů těsně před aplikací testovaného léčiva.

Příkladem takového pH modulátoru je pentagastrin, analog gastrinu, jehož použití je dobře známé především u psů. Jedná se o polypeptid, jenž dokáže u savců stimulovat sekreci kyseliny chlorovodíkové, a tím zajistit dostatečně kyselé pH v žaludku (Lubach et al., 2013). Při intramuskulárním podání se u psů účinek pentagastrinu projeví za 20 až 30 min a přetrvává po dobu 2 až 2,5 hod (Akimoto et al., 2000, Zhou et al., 2005, Cundy et al., 1997, Fancher et al., 2011). Alternativně byla popsána i intravenózní aplikace s průměrným nástupem účinku po 20 min (Polentarutti et al., 2010).

Jinou možností skýtá využití betain hydrochloridu, jenž funguje opačným způsobem než antacida – navozuje okyselení žaludečního obsahu na chemickém podkladu (Yago et al., 2013). Betain, který se z původní molekuly uvolňuje, patří mezi aminokyseliny, které se standardně vyskytují v mnoha potravinách. Podává se perorálně, účinek se objevuje velmi rychle, přičemž svého maxima u lidí dosahuje mezi 15 a 30 min po aplikaci. Lze jej využít také jako doplněk stravy u lidí, kteří trpí hypochlorhydrií s následnými dyspeptickými obtížemi (Guilliams and Drake, 2020).

Pokud bychom naopak chtěli zkoumat chování látky při vyšším žaludečním pH, lze využít léčiva, která se standardně terapeuticky používají při stavech spojených s přílišnou aciditou gastrointestinálního traktu. Může se jednat buď o krátkodobě působící antacida, nebo o pH modulátory, které mají delší efekt – H₂-antihistaminika (nizatidin, famotidin) a inhibitory protonové pumpy (omeprazol, lansoprazol, rabeprazol) (Eley et al., 2009, Yago et al., 2014, Lubach et al., 2013, Takahashi et al., 2012, Jaruratanasirikul and Sriwiriyan, 1998).

1.2.2 Vliv potravy na absorpci léčiv

1.2.2.1 Typy potravy

Vstřebávání léčiv při perorálním podání je dále často významně ovlivněno současně požitou potravou. Jídlo a jeho charakter může pozměnit nejen rychlost, ale i míru absorpce daného léčiva. Tato interakce přitom může mít jak pozitivní, tak i negativní dopad na terapii, a vždy je potřeba s ní při vývoji léčiv počítat.

Potrava interaguje s léčivem buď přímou cestou, nebo nepřímo změnou prostředí gastrointestinálního traktu (např. pH) (Deng et al., 2017). Často se jedná o komplexní děje, do nichž se zapojuje více různých mechanismů, jež k celkovému efektu přispívají. Klíčovým faktorem přitom zůstává, jaký charakter má daná potrava. Kromě vyváženého jídla, v němž najdeme rovnoměrně zastoupeny všechny složky, můžeme potravu podle její skladby rozdělit do několika následujících (extrémních) kategorií: s vysokým obsahem tuků, proteinů, vlákniny nebo sacharidů.

Vysokotučná strava bohatá na kalorie se doporučuje právě u studií, jež mají za cíl zkoumat interakce mezi potravou a léčivem (FDA, 2002). Takové jídlo by mělo obsahovat 800 až 1000 kalorií, přičemž větší část by měla tvořit tuková složka (500 až 600 kalorií). Zbytek se skládá ze sacharidů (250 kalorií) a proteinů (150 kalorií). Taková porce tedy

může vypadat například následovně: dvě smažená vejce, dva plátky slaniny, dva plátky toastového chleba s máslem, 110 g brambor a 220 ml mléka. Důvod, proč se ve studiích používá tak kalorické jídlo, je ten, že by se měl při této skladbě projevit vliv potravy na vstřebávání léčiva v nejvyšší možné míře, a je tak možné jej snadněji zachytit.

Při požití vysokotučné stravy dochází oproti nízkotučné stravě k významnému zpomalení vyprazdňování žaludku, což může prodloužit čas, během něhož je dosaženo maximální plazmatické koncentrace léčiva (Cecil et al., 1999). Lipofilní látky se v tomto prostředí rozpouštějí snadněji, díky čemuž jejich biologická dostupnost roste (např. albendazol nebo isotretinoin) (Schmidt and Dalhoff, 2002).

Vysokotučná strava také stimuluje sekreci žlučových kyselin, které rovněž napomáhají vstřebávání některých léčiv díky tvorbě micel ve střevech (např. cinnarizin) (Yeap et al., 2013). Povrchově aktivní žlučové kyseliny dále ovlivňují membrány enterocytů a zvyšují jejich permeabilitu (Moghimipour et al., 2015). Na druhou stranu takto může být u některých hydrofilních léčiv absorpce naopak snížena, a sice právě v důsledku uzavření a uvěznění uvnitř micel, které se tentokrát vstřebávají hůře (např. atenolol) (Charman et al., 1997, Barnwell et al., 1993).

Mezi další mechanismy, jakými vysokotučná strava zvyšuje biologickou dostupnost léčiv, patří stimulace střevního lymfatického systému, díky níž se lipofilní látky prostřednictvím mízy snáze dostávají do krevního oběhu (Gershkovich and Hoffman, 2007). Přítomnost velkého množství lipidů v trávicím traktu také může mít inhibiční účinek na některé efluxní epiteliální transportéry, jako je P-glykoprotein (P-gp). Utlumení jejich funkce tak může přispívat k lepší vstřebatelnosti jejich substrátů (Custodio et al., 2008).

Je ovšem také třeba mít na paměti, že vysokotučná strava může v některých případech vyvolat průjem, čímž se zkracuje čas, po který se léčivo nachází v kontaktu s trávicím traktem, a výsledkem je potom jeho nižší biologická dostupnost.

Vysokoproteinová strava může ovlivnit absorpci léčiv jinými způsoby. Proteiny se v trávicím traktu rozkládají na peptidy a jednotlivé aminokyseliny, které se ze střev vstřebávají pomocí specifických transportérů. Může tak docházet ke kompetici s léčivou s podobnou strukturou jako peptidy a aminokyseliny, které ke svému vstřebání potřebují využít stejné transportéry. Příkladem takových léčiv je levodopa nebo penicilamin, které se absorbují pomocí PepT1 transportéru (Robertson et al., 1991, Hironaka et al., 2009).

Na druhou stranu se objevují zmínky, že by strava bohatá na proteiny mohla vést k up-regulaci různých střevních transportérů, což by vedlo ke zvýšení absorpce léčiv, jež jsou jimi přenášena (např. gabapentin) (Gidal et al., 1996).

Jiným typem stravy je potrava s vysokým obsahem vlákniny. Přítomnost vlákniny v žaludku může zpomalit jeho vyprazdňování, díky čemuž se absorpce léčiva prodlužuje (Qi et al., 2018, Bortolotti et al., 2008). Vlákna také může zhoršovat vstřebatelnost současně podaných lipofilních léčiv. Vlákna na sebe totiž navazuje žlučové kyseliny, a tím je inaktivuje. Přitom jak již bylo popsáno výše, žlučové kyseliny důležitým způsobem podporují absorpci lipofilních látek. Tímto způsobem může dojít k ovlivnění vstřebávání například etravirinu (Scholler-Gyure et al., 2008). Léčivo se také může na molekuly vlákniny adsorbovat (Marcus, 1985). Pokud pak nedojde k uvolnění, nemůže se takto zachycené léčivo vstřebat.

Posledním základním typem stravy je strava s vysokým podílem sacharidů. V tomto případě se obecně velmi obtížně předpovídá, jakým způsobem dojde k pozměnění farmakokinetiky léčiv, a záleží spíše na konkrétní látce.

1.2.2.2 Fyziologie gastrointestinálního traktu po jídle

Absorpce léčiva, které je aplikováno současně s jídlem, je ovlivněna změnami, k nimž přijetím potravy dochází. Přítomnost tráveniny v trávicím traktu zvyšuje viskozitu prostředí, což zpomaluje difuzi léčiv směrem k epitelu tenkého střeva, kde dochází k jejich vstřebání, a trávenina tak tvoří fyzickou bariéru mezi léčivem a střevní stěnou (Schiller et al., 2005, Cvijic et al., 2014).

Jídlo také zpomaluje vyprazdňování žaludku, takže v něm léčivo stráví delší dobu. Jelikož se hlavní část vstřebávání většiny léčiv odehrává až ve střevech, absorpce je tak zahájena s delší časovou prodlevou, což se projeví prodloužením doby, než dojde k dosažení maximální plazmatické koncentrace (Reigner et al., 1998, Smith and Nicholson, 2007, Caille et al., 1989).

V některých případech zpomalený průchod trávicím traktem biologickou dostupnost nemění (Dostert et al., 1997). Jindy však může dojít k významnému ovlivnění – např. u látek, jež se vstřebávají v tenkém střevu a jež zároveň ke svému průchodu epitelovými buňkami potřebují specifické transportéry. Při rychlejším průchodu nalačno se totiž tyto transportéry snadno nasatí, a absorpce je tím omezená. Při zpomalení pasáže střevním traktem se však prodlužuje doba, kdy může ke vstřebávání docházet. Biologická dostupnost se zvyšuje také u proléčiv ve formě esterů, protože při delším pobytu v žaludku

mají více času na to, aby došlo k deesterifikaci a uvolnění vlastní aktivní sloučeniny (Hughes et al., 1989).

Mezi jiné jevy, ke kterým po přijetí jídla dochází, patří zvýšené prokrvení ve splachnické oblasti za účelem podpory procesu trávení (Sieber et al., 1992). To může vést ke zvýšení biologické dostupnosti některých látek, způsobené omezením jejich first-pass metabolismu (např. labetalol nebo propranolol) (Daneshmend and Roberts, 1982, Liedholm and Melander, 1986).

1.3 Variabilita farmakokinetických studií

Důležitým aspektem všech *in vivo* experimentů je variabilita, jež patří mezi významné zdroje nepřesnosti výsledků. Uplatňují se přitom dva základní druhy variability – intra-individuální (v rámci jednoho subjektu při opakování experimentu) a inter-individuální (rozdíly mezi jednotlivými subjekty v rámci jedné skupiny). Existuje mnoho příčin variability ve farmakokinetických studiích, z nichž většina pramení buď z odlišností mezi participanty v daný okamžik, nebo z nedostatečně standardizovaných postupů během studie.

Některé rozdíly mezi subjekty jsou dány pohlavím. U žen se například žaludek vyprazdňuje o něco pomaleji než u mužů, což může být důsledek jejich odlišné motorické aktivity (Bennink et al., 1998). Roli v tomto mohou hrát i hormony estradiol a progesteron, protože tlumí motilitu trávicího traktu (progesteron mimo jiné snižuje plazmatickou hladinu motilinu) (Datz et al., 1991). Podobným způsobem ovlivňuje přítomnost odlišných pohlavních hormonů i jiné děje, které se v organismu odehrávají. Tyto odlišnosti mezi pohlavími jsou sice nejlépe známé u lidí, ale lze předpokládat, že se v určité míře vyskytují i u zvířat.

Velice významný vliv pohlaví byl pozorovaný u metabolických dějů. Podobně jako u lidí, i u zvířat existují mnohé rozdíly v expresi a aktivitě enzymů, jež se těchto dějů účastní. Jako příklad slouží enzym CYP3A9, který se u potkaních samic vyskytuje v mnohonásobně větším množství než u samců (Anakk et al., 2003). U potkaních samic také byla popsána mohutnější konjugace látek se zbytky kyseliny sírové než u samců (Zhong et al., 2010). Častěji se ovšem setkáme s opačným případem, kdy ve vyšší míře xenobiotika metabolizují samci. Tak je tomu u 3,4-methylendioxyamfetaminu,

substrátu CYP1A2, nebo triptolidu, diterpenoidní látky biotransformované především prostřednictvím CYP3A a CYP2B (Fonsart et al., 2008, Liu et al., 2010).

Bylo by chybou, kdybychom při uvažování nad rozdíly mezi subjekty opomenuli roli genetického polymorfismu, kdy se pro určitý znak v populaci vyskytují dvě nebo více různých variant. V důsledku pak funguje metabolismus léčiv u jedinců s odlišnými alelami jiným způsobem. Jedná se o rychlé nebo pomalé metabolizátory, u nichž se léčivo přeměňuje rychleji, nebo naopak pomaleji oproti většině populace. U potkanů byl například pozorován polymorfismus aldehyd-oxidázy, enzymu zapojeného do transformace mnoha látek jako pyridoxal, serotonin, fenylethylamin, citalopram nebo tamoxifen (Adachi et al., 2007, Dalvie and Di, 2019). Podobně byl u potkanů výskyt různých variant zaznamenán i pro CYP2D1, prostřednictvím něhož se metabolizuje např. betablokátor karteolol (Hasegawa et al., 2014, Iwaki et al., 2018, Umehara et al., 1997).

Rozdíly v aktivitě specifických enzymů však nemusí být způsobeny jen výskytem různých variant genů kódujících enzymy. Expresi enzymů ovlivňují i dalšími faktory jako stáří, výživa, přirozené fyziologické cykly (např. cirkadiální rytmus), těhotenství a laktace, akutní infekční nemoci nebo hepatální či renální dysfunkce a jiné patologické procesy, které v těle probíhají (Thummel and Lin, 2014). Kombinace všech těchto faktorů vede k tomu, že se u každého jedince v závislosti na aktuálních podmínkách aktivita enzymů mění, což se na inter- i intra-individuální variabilitě ve farmakokinetických studiích podepisuje velice významně.

Kromě toho, že patologické procesy, jež v těle probíhají, ovlivňují aktivitu enzymů, podílejících se na metabolismu xenobiotik, přispívají různé fyziologické dysfunkce k variabilitě i jiným způsobem. U chronických jaterních onemocnění, mezi něž patří cirhóza nebo fibróza, se snižuje průtok krve játry, produkce a vylučování žluči a funkce hepatocytů. To vše se také odráží na rychlosti a intenzitě metabolismu látek (Thummel and Lin, 2014). Zhoršení renálních funkcí omezuje exkreci léčiv, jež se primárně vylučují ledvinami. Může však ovlivnit i metabolismus látek, kterých se eliminace prostřednictvím ledvin přímo netýká, neboť funkce ledvin a jater jsou velmi úzce spojené a renální dysfunkce může vést i k odchýlkám v hepatálním metabolismu (Sun et al., 2006).

Tyto patologické změny často souvisejí s věkem subjektu. Na stáří ale závisí i mnohé fyziologické děje a anatomické odlišnosti. Mladší jedinci mohou mít jiné žaludeční pH, motilitu gastrointestinálního traktu, vazbu na plazmatické bílkoviny, jiný krevní průtok játry nebo množství tukové tkáně (Thummel and Lin, 2014). Aktivita enzymů se v nižším věku také liší, a mnohé metabolické děje tak probíhají odlišným způsobem než ve stáří.

Jak již bylo popsáno výše, farmakokinetiku léčiva zásadním způsobem ovlivňuje současně podávaná strava. K variabilitě ale přispívají i obecné stravovací návyky jedince, tedy jaký charakter má jeho jídelníček v dlouhodobějším měřítku. Konzumace určitého typu jídla má totiž také vliv na expresi některých enzymů. U lidí bylo například pozorováno, že určitý typ zeleniny vyústil v odlišnou aktivitu CYP1A2 v porovnání se subjekty, kteří ji nekonzumovali (Lampe et al., 2000).

Přestože se obvykle při provádění farmakokinetických studií implementují veškerá možná opatření k zajištění stejných podmínek pro všechny subjekty, je prakticky nemožné eliminovat všechny tyto zmíněné vnější i vnitřní vlivy. Pokusy, které byly provedené na myších, ukazují, že i přes přísnou standardizaci zvířata v různých laboratořích reagují jiným způsobem (Crabbe et al., 1999). Dokonce i v rámci jedné laboratoře se výsledky studií při zachování identického postupu lišily (Karp et al., 2014). Variabilitu ve farmakokinetických studiích tak nelze zcela odstranit a je třeba věnovat pozornost možnostem, jak její rozsah a dopady snížit.

1.4 Paralelní vs. cross-over uspořádání studie

V současnosti se při farmakokinetických komparativních studiích používají dva hlavní způsoby uspořádání – paralelní a zkřížené (cross-over). Klasické paralelní uspořádání se realizuje o něco snadněji. Subjekty se v tomto případě náhodně rozdělí do dvou a více ramen, kde každé rameno reprezentuje jednu látku (event. formulaci nebo placebo) (Ofori-Asenso and Agyeman, 2015). Každému subjektu je tak aplikována pouze jedna z testovaných látek v závislosti na tom, do kterého ramene je zařazen. Studie by přitom měla ve všech ramenech probíhat ve stejný časový úsek, aby se co nejvíce eliminovaly další faktory, které by výsledky mohly ovlivnit.

V cross-over uspořádání jsou každému subjektu postupně aplikovány všechny látky, přičemž v každém rameni se látky podávají v jiném pořadí. Studie má tedy sice složitější provedení, ale přináší velikou výhodu, neboť každý subjekt zároveň sám sobě slouží jako kontrola – testované látky jsou totiž hodnoceny na stejných subjektech (Elbourne et al., 2002). Díky tomu se významně snižuje inter-individuální variabilita, jež může být v případě paralelního uspořádání velmi vysoká (Mills et al., 2009).

Dále, protože každému subjektu jsou podány všechny testované látky, postačí u cross-over designu menší množství zařazených participantů, abychom dosáhli stejné

statistické síly jako u paralelního uspořádání (Ofori-Asenso and Agyeman, 2015). Získané výsledky ovšem ve skutečnosti disponují vyšší přesností právě díky nižší inter-individuální variabilitě (Sedgwick, 2015).

Při plánování cross-over studie je nezbytné si dát pozor na dva jevy, které mohou potenciálně negativně ovlivnit kvalitu výsledků. Prvním z nich je efekt periody, při němž se mění schopnost subjektu reagovat na látku mezi jednotlivými periodami (Sedgwick, 2015). Systematicky tak může dojít k chybě, kdy např. v důsledku stárnutí zvířat bude v druhé periodě u všech jedinců snižená absorpce.

Druhý nežádoucí fenomén tvoří carry-over efekt, kdy účinek léčiva podaného v první periodě přetrvává a zasahuje i do druhé periody (Curtin et al., 2002). Nejčastěji se setkáme s pozitivním carry-over efektem, kdy se rozdíl mezi dvěma formulacemi zdánlivě umenšuje, což poté vede k podhodnocení nové lékové formulace oproti kontrole. K tomuto může dojít, pokud se mezi jednotlivými periodami neponechá dostatečný časový odstup, v němž by se léčivo z těla plně eliminovalo (tzv. wash-out perioda). Opačným případem je negativní carry-over efekt, kdy se např. při sledování účinnosti léčiva po jeho vysazení na konci první periody symptomy zhorší více než v druhé skupině, která nejprve užívala placebo, a teprve poté jí bylo aplikováno léčivo.

Mezi další nevýhody komplexnějších cross-over studií patří delší doba trvání oproti paralelním studiím. V důsledku toho ne všichni probandi vytrvávají v experimentu až do konce a může být problematické získat kompletní výstupy (Sedgwick, 2015). Proto se cross-over uspořádání velmi hodí ke krátkodobým studiím, mezi něž ovšem farmakokinetické studie obvykle patří (Ofori-Asenso and Agyeman, 2015).

1.5 Post-mortem redistribuce

Další oblastí, jíž jsem se během svého studia zabývala, byla post-mortem redistribuce alprazolamu. Předávkování léčivy patří celosvětově mezi velmi časté příčiny úmrtí. Podle WHO bylo v roce 2015 zaznamenáno celkově 167 000 úmrtí přímo spojených s užíváním léčiv (EMCDDA, 2019). Statistické údaje ze Spojených států amerických za poslední roky přitom ukazují, že takových případů velmi rychle přibývá (např. mezi lety 2016 a 2017 tento počet narostl o 10 %). A přestože většina těchto úmrtí připadá na muže, s úmyslnými předávkováními se setkáme mnohem častěji u žen. Nejčastěji se úmrtí po předávkování pojí s aplikací opioidů (především heroin), kokainu, syntetických

kanabinoidů, látek tlumících centrální nervový systém (včetně benzodiazepinů), nebo jde o kombinace více různých léčiv.

Při soudním vyšetřování těchto případů se velmi často zjišťuje množství látky v různých částech těla a podle něj se usuzuje na okolnosti úmrtí, včetně dávky a způsobu podání. Interpretaci takových toxikologických výsledků ale může ovlivnit, pokud u daného léčiva dochází k významné post-mortem redistribuci, kdy se koncentrace látky v jednotlivých částech těla i po smrti mění. Obecně post-mortem redistribuci podléhají především zásadité, lipofilní látky s vysokým distribučním objemem, jako jsou tricyklická antidepresiva, digoxin, haloperidol nebo thioridazin (Castaing et al., 2006, Yarema and Becker, 2005).

Na posmrtných přesunech léčiva se podílí více mechanismů. Buňky postupně začínají odumírat, což se pojí s vylitím intracelulárního obsahu, jenž se může dále přesouvat do jiných tělesných částí (Yarema and Becker, 2005). Léčivo na základě koncentračního gradientu difunduje z tkání s vyšší koncentrací do míst, kde se vyskytuje nižší koncentrace, směrem k rovnovážnému stavu (přestože ho nakonec nemusí být dosaženo) (Pounder and Jones, 1990). Tím lze vysvětlit, proč se mnoho léčiv po smrti přesouvá z tkání, jako jsou plíce, játra nebo gastrointestinální trakt, do cév, a proč tedy mohou být post-mortem plazmatické koncentrace vyšší než ante-mortem (Hilberg et al., 1994). Cévy se léčivo dále může přesouvat do srdce. Pohyb cévy také usnadňují změny související s nastupující posmrtnou ztuhlostí. Dále se na redistribuci podílejí změny pH nebo činnost střevních bakterií, jež léčivé látky rozkládají (Sawyer and Forney, 1988, Yarema and Becker, 2005).

2. Hypotézy a cíle práce

V rámci postgraduálního studia jsem se věnovala vývoji modelů pro různé farmakokinetické a toxikokinetické studie prováděné na potkanech.

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 požití potravy na absorpci léčiva.
 - Příloha 2 a Příloha 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. Metody

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 byl zvolen 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. Této studii se zúčastnilo celkem 20 potkanů.

Následně jsme provedli další komparativní farmakokinetickou studii s dasatinibem, představitelem léčiva s pH-dependentní absorpcí. Porovnávaly se dvě různé formulace (reference a test) ve třech sekvencích. Studie proběhla s výjimkou třetí sekvence v cross-

over uspořádání, pro všechny sekvence ve stavu nalačno obdobným způsobem jako předchozí farmakokinetické studie (bez přístupu k potravě 4 hod před a 4 hod po dávkování léčivem). Pro simulaci vstřebávání u lidí při různých hodnotách pH byla vždy podávána premedikace pentagastrinem (20 min před dávkováním 0,25 mg/kg, s.c.) nebo omeprazolem (2 hod před dávkováním, 20 mg/kg, i.p.).

Celkem 36 potkanů s hmotností 222 až 377 g jsme náhodně rozdělili do 6 skupin. Přehled podávaných formulací dasatinibu a použité premedikace shrnuje tabulka 2. 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 a jsou popsány v příloze 2. 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).

Tab. 2: Přehled aplikovaných formulací (*R* – reference, *T* – test) spolu s premedikací (*P* – pentagastrin, *OME* – omeprazol) v jednotlivých skupinách.

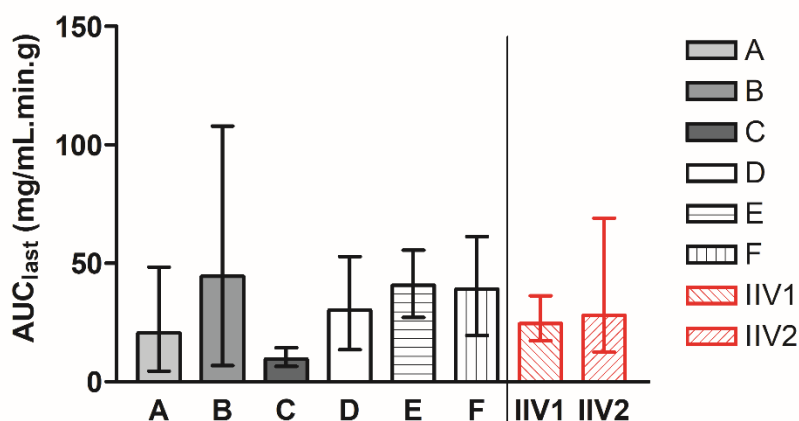
Sekvence	Perioda 1	Perioda 2
1	R + P	T + P
	T + P	R + P
2	R + OME	T + OME
	T + OME	R + OME
3	R + P	R + OME
	T + P	T + OME

Post-mortem redistribuce alprazolamu, kterou se zabývá Příloha 5, byla studována opět na potkanech (n = 32). Po uvedení do anestezie pomocí isofluranu (2 až 5 %) byl všem potkanům aplikován alprazolam (i.p., 4 mg pro potkany s hmotností ≤ 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

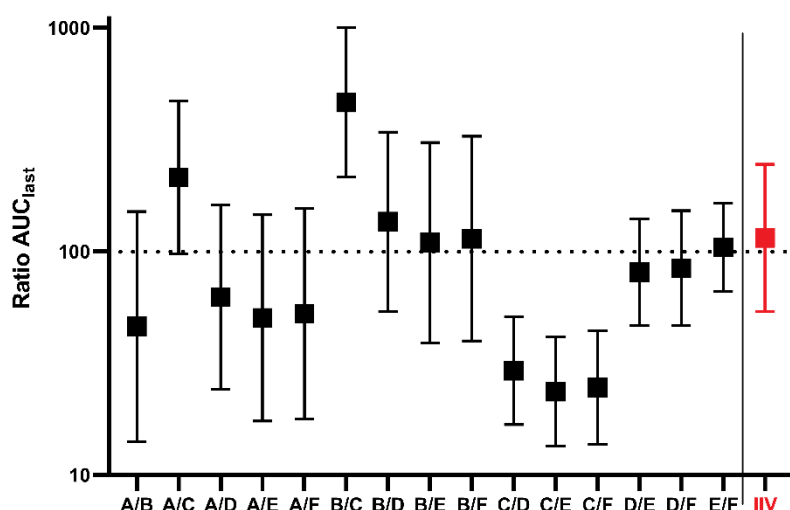
Výsledky experimentů lze najít v plném rozsahu v příložených publikacích.

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. Geometrické průměry všech skupin jsou zobrazeny v obrázku 1.



Obr. 1: Geometrický průměr AUC_{last} (90% CI) jednotlivých paralelních skupin A-F. Napravo od dělicí čáry jsou zvlášť uvedeny průměrné hodnoty AUC_{last} pro 1. a 2. periodu studie IIV.

Pro všechny možné dvojkombinace paralelních skupin A-F a dále pro porovnání obou period z IIV studie byly vypočítány bioekvivalenční poměry AUC_{last} . Získané poměry jsou uvedeny v obrázku 2.



Obr. 2: Výsledky porovnání bioekvivalence a poměry AUC_{last} (90% CI) mezi skupinami A-F v paralelním uspořádání. Napravo od dělicí čáry je znázorněn poměr AUC_{last} obou period z IIV studie v cross-over uspořádání. Pro osu y bylo použito logaritmické měřítko.

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). Kritéria a výsledky simulací uvádí tabulka 3.

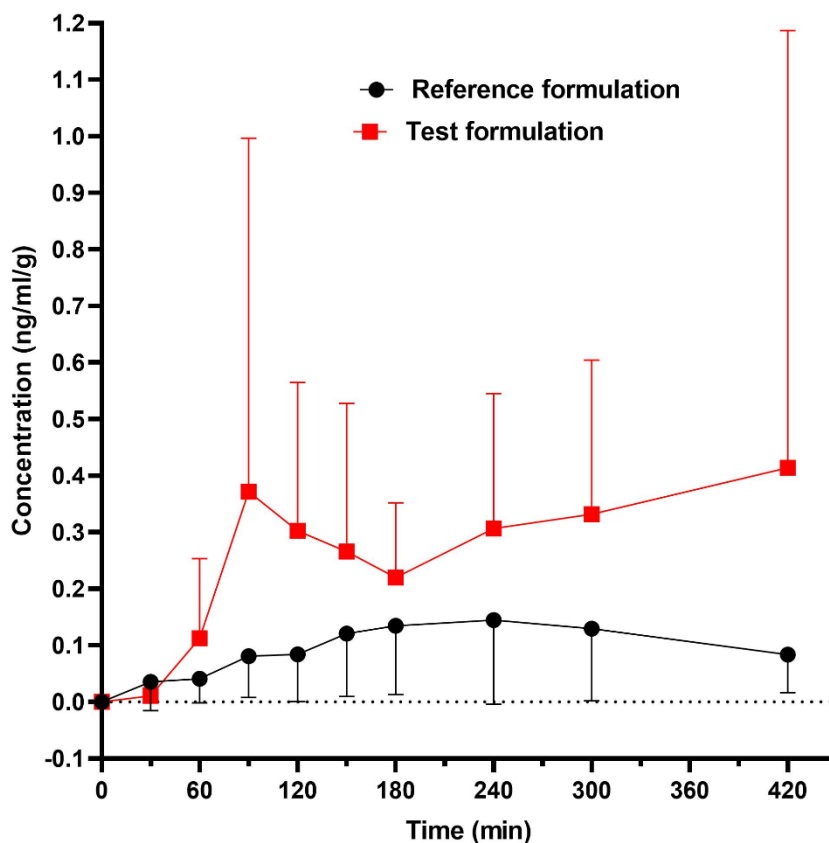
Tab. 3: Parametry simulací spolu s vypočítanou pravděpodobností, že se výsledný poměr bude nacházet v rozmezí 80-125 %. CV: intra-individuální pro cross-over, celkový pro paralelní uspořádání.

	Cross-over	Paralelní
Počet simulací	10 000	10 000
Velikost vzorku	24	24
CV	73 %	96 %
Poměry 80-125%	76 %	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. Výsledné hodnoty farmakokinetických parametrů včetně bioekvivalenčních poměrů jsou uvedeny v tabulce 4. 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. Průměrné farmakokinetické profily obou formulací zobrazuje obrázek 3.

Tab. 4: Farmakokinetické parametry po podání dvou formulací abirateronu (*R* – reference, *T* – test) potkanům nalačno ($n=8$). Hodnoty T_{max} jsou uvedeny jako medián (interkvartilové rozpětí). C_{max} , AUC_{last} a poměry test/reference jsou uvedeny jako geometrický průměr (90% CI).

Formulace	C_{max} (ng/ml.g)	T/R C_{max} (%)	AUC_{last} (mg/ml.min.g)	T/R AUC_{last} (%)	T_{max} (min)
Reference	0,143 (0,073-0,281)	N/A	30,3 (14,3-64,2)	N/A	244 (228-420)
Test	0,569 (0,206-1,566)	397,8 (213,8-740,1)	81,0 (32,1-204,4)	267,4 (165,7-431,6)	168 (114-252)



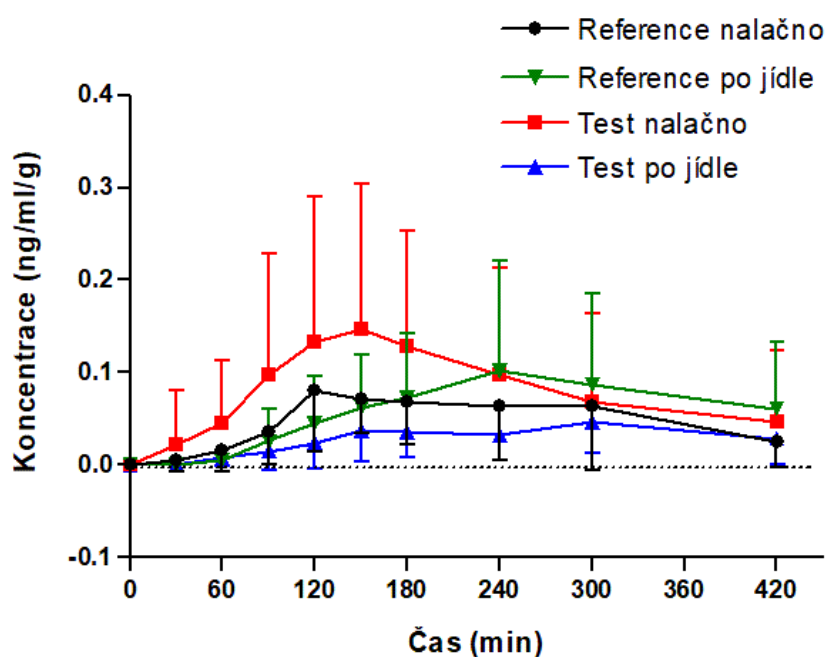
Obr. 3: Průměrné (\pm SD) farmakokinetické profily abirateronu po podání dvou formulací s abirateronem potkanům nalačno ($n=8$).

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). Tato studie musela být zopakována, neboť napoprvé bylo na základě výsledků zjištěno, že stav po jídle nebyl navozen správným způsobem.

Farmakokinetické parametry jednotlivých formulací nalačno a po jídle při prvním pokusu (pokus I) jsou uvedeny v tabulce 5. U reference bylo ve stavu nalačno dosaženo podobných hodnot C_{max} i AUC_{last} jako po jídle, doba T_{max} se 1,6x prodloužila po jídle. Testovaná formulace se mnohem lépe vstřebávala nalačno, o čemž svědčí přibližně 2,8x vyšší hodnota průměrné C_{max} i AUC_{last} . Průměrné farmakokinetické profily jednotlivých formulací při podmínkách nalačno a po jídle znázorňuje obrázek 4.

Tab. 5: Pokus I: Farmakokinetické parametry po podání dvou formulací abirateronu potkanům nalačno a po jídle (n=23). Hodnoty C_{max} a AUC_{last} jsou uvedeny jako aritmetický průměr (SD). Hodnoty T_{max} jsou uvedeny jako medián (interkvartilové rozpětí).

Formulace	C_{max} (ng/ml.g)	AUC_{last} (mg/ml.min.g)	T_{max} (min)
Reference nalačno	0,1085 (0,0609)	20,44 (14,96)	150 (122-152)
Reference po jídle	0,1385 (0,1118)	25,03 (21,83)	241 (198-390)
Test nalačno	0,1744 (0,1559)	34,06 (31,79)	133 (120-155)
Test po jídle	0,0632 (0,0271)	12,09 (6,70)	149 (140-301)



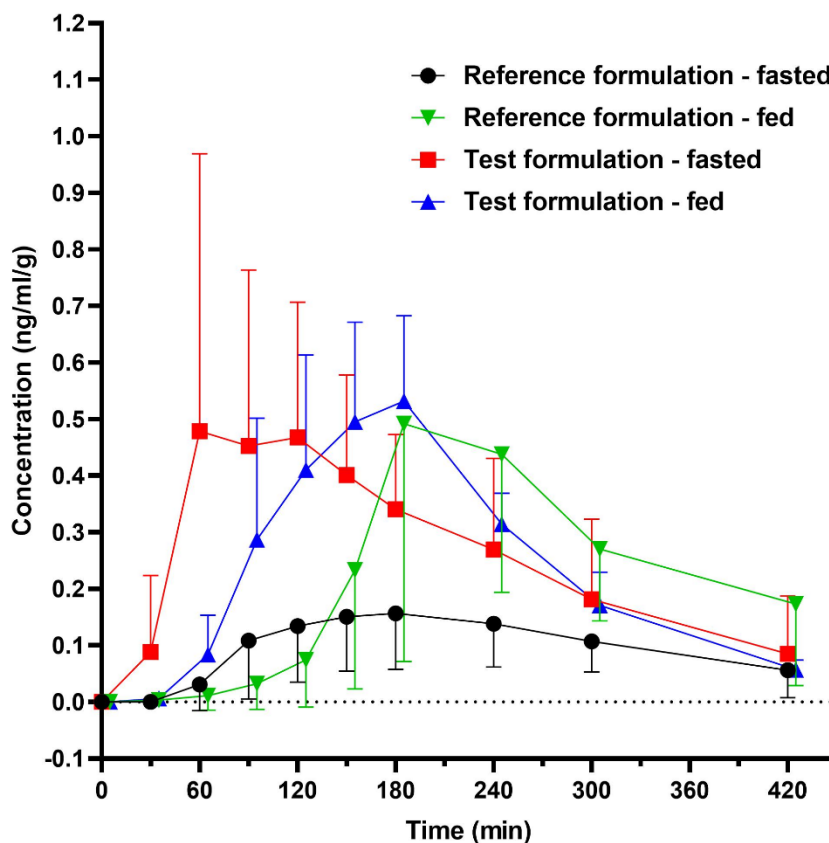
Obr. 4: Pokus I: Průměrné (\pm SD) farmakokinetické profily abirateronu po podání dvou formulací s abirateronem potkanům nalačno a po jídle.

Farmakokinetické parametry jednotlivých formulací nalačno a po jídle při druhém pokusu (pokus II) jsou uvedeny v tabulce 6. Tentokrát se reference výrazně lépe

vstřebávala po jídle, jak potvrzuje přibližně 2,4x vyšší hodnota C_{max} a 2x vyšší hodnota AUC_{last} . U testované formulace naopak nebyly zaznamenány přílišné rozdíly mezi podáními nalačno a po jídle. Průměrné farmakokinetické profily jednotlivých formulací při podmínkách nalačno a po jídle znázorňuje obrázek 5.

Tab. 6: Pokus II: Farmakokinetické parametry po podání dvou formulací abirateronu potkanům nalačno a po jídle ($n=11$). Hodnoty C_{max} , AUC_{last} a bioekvivalenční poměry jsou uvedeny jako geometrický průměr (90% CI). Hodnoty T_{max} jsou uvedeny jako medián (interkvartilové rozpětí).

Formulace	C_{max} (ng/ml.g)	Po jídle / nalačno C_{max} (%)	AUC_{last} (mg/ml.min.g)	Po jídle / nalačno AUC_{last} (%)	T_{max} (min)
Reference nalačno	0,231 (0,176- 0,302)	N/A	40,0 (31,3- 51,1)	N/A	179 (157- 226)
Reference po jídle	0,550 (0,318- 0,950)	238,5 (131,1- 433,9)	80,7 (40,6- 160,4)	201,8 (86,7- 469,4)	218 (185- 288)
Test nalačno	0,546 (0,199- 1,480)	N/A	94,7 (43,2- 207,4)	N/A	125 (68- 178)
Test po jídle	0,530 (0,351- 0,801)	103,8 (58,3- 184,9)	93,6 (62,6- 140,1)	105,1 (76,4- 144,5)	152 (148- 178)



Obr. 5: Pokus II: Průměrné (\pm SD) farmakokinetické profily abirateronu po podání dvou formulací s abirateronem potkanům nalačno a po jídle.

Studie hodnotící vliv premedikace cykloheximidem na absorpci abirateronu a cinakalcetu detailněji popisuje Příloha 3. Cykloheximid signifikantně 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 dosahovala 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. Farmakokinetické parametry obou studií jsou uvedeny v tabulkách 7 a 8.

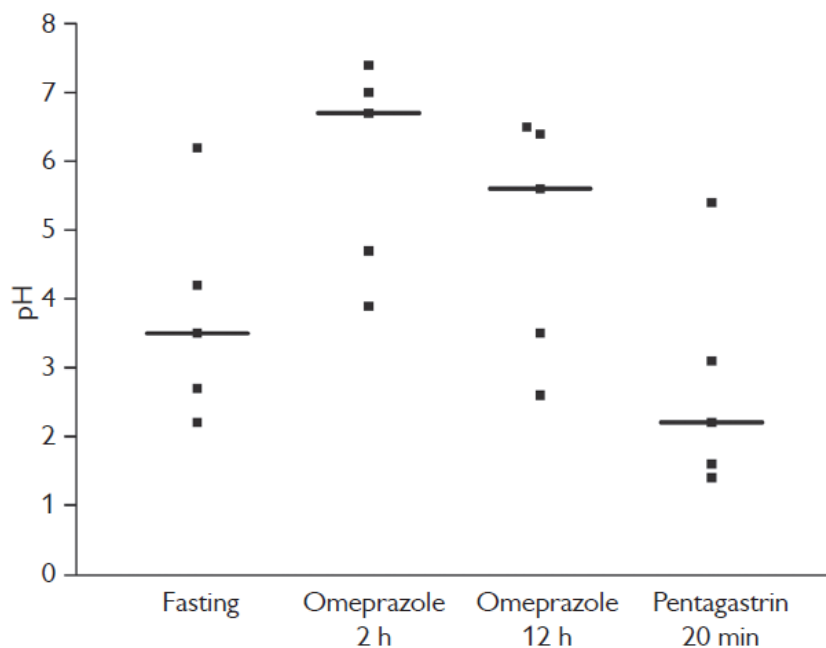
Tab. 7: Průměrné (\pm SD) farmakokinetické parametry abirateronu při aplikaci samostatně ($n=8$) nebo s cykloheximidem ($n=6$).

	samostatně	cykloheximid
C_{max} (ng/ml)	4,2 \pm 2,4	1,4 \pm 1,0
T_{max} (hod)	2,9 \pm 0,8	3,5 \pm 1,1
T_{1/2} (hod)	1,9 \pm 0,7	17,9 \pm 12,6
AUC₀₋₇ (ng.hod/ml)	12,3 \pm 5,5	5,5 \pm 4,3

Tab. 8: Průměrné (\pm SD) farmakokinetické parametry cinakalcetu při aplikaci samostatně nebo s cykloheximidem ($n=8$).

	samostatně	cykloheximid
C_{max} (ng/ml)	5,2 \pm 1,2	4,6 \pm 1,8
T_{max} (hod)	10,0 \pm 2,6	24,2 \pm 0,1
T_{1/2} (hod)	4,8 \pm 0,3	N/A
AUC₀₋₁₂ (ng.hod/ml)	36,3 \pm 6,7	10,9 \pm 4,5
AUC₀₋₂₄ (ng.hod/ml)	66,6 \pm 12,3	46,2 \pm 14,4

Výsledky studie zabývající se žaludečním pH potkanů a možnostmi jeho ovlivnění popisuje Příloha 4. Jednotlivé naměřené hodnoty žaludečního pH všech potkanů jsou vyneseny v obrázku 6. 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).

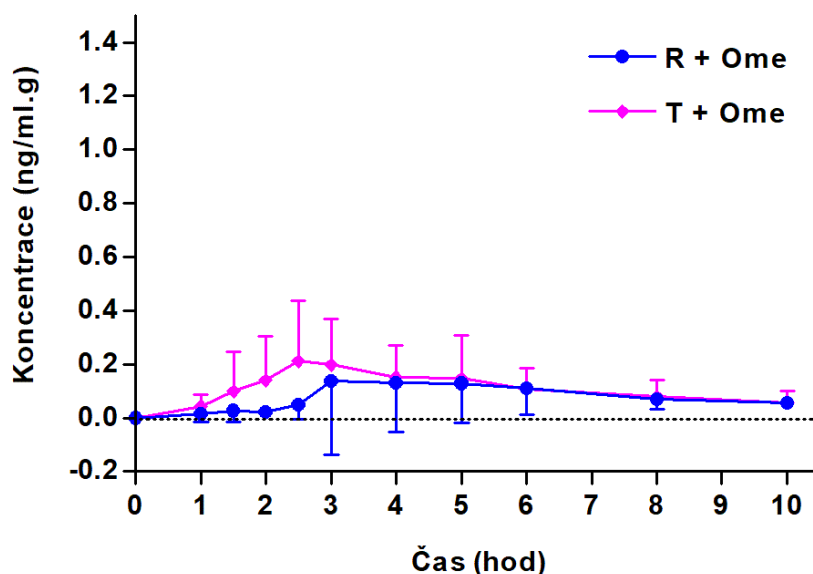
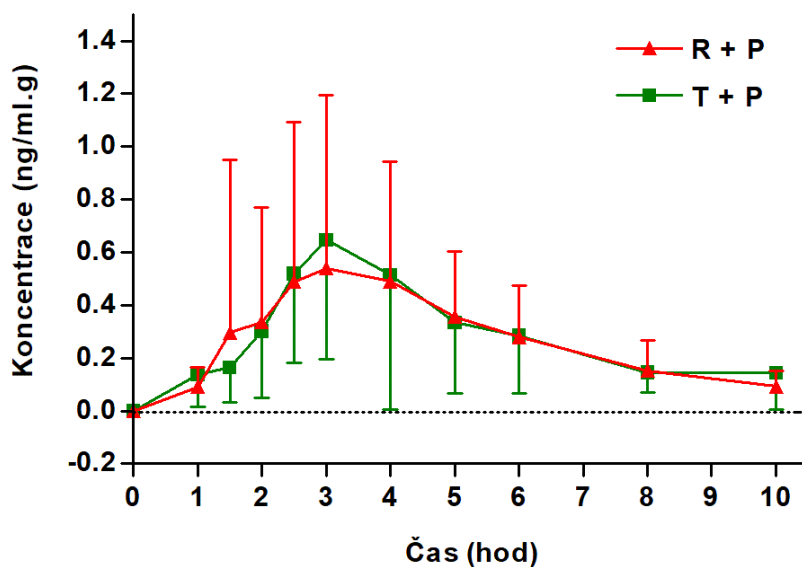


Obr. 6: Jednotlivé hodnoty žaludečního pH u potkanů nalačno – kontrolní skupina a premedikace omeprazolem nebo pentagastrinem.

Na základě naměřených hodnot žaludečního pH byla uskutečněna studie porovnávající absorpci dvou formulací s dasatinibem za použití modulátorů žaludečního pH. Výsledné farmakokinetické parametry včetně bioekvivalenčních poměrů sekvence 1 a 2 jsou uvedeny v tabulce 9. 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_{last} . Při konkomitantní aplikaci omeprazolu dosáhla testovaná formulace 1,4x vyšší hodnoty C_{max} a 1,3x vyšší hodnoty AUC_{last} než reference. Průměrné farmakokinetické profily sekvencí 1 a 2 ukazuje obrázek 7.

Tab. 9: *Sekvence 1 a 2: Farmakokinetické parametry po podání dvou formulací dasatinibu (R – reference, T – test, P – pentagastrin, OME - omeprazol) potkanům nalačno (n=24). Hodnoty T_{max} jsou uvedeny jako medián (interkvartilové rozpětí). Pro C_{max} , AUC_{last} a poměry test/reference byl použit geometrický průměr (90% CI).*

Sekvence	Formulace	C_{max} (ng/ml.g)	T/R C_{max} (%)	AUC_{last} (mg/ml.min.g)	T/R AUC_{last} (%)	T_{max} (min)
1	R+P	0,4584 (0,3416- 1,1590)	N/A	109,70 (81,06- 235,10)	N/A	210 (152- 298)
	T+P	0,5284 (0,4487- 0,9973)	115,29 (75,12- 176,90)	128,30 (100,50- 236,10)	117,0 (84,7- 161,7)	180 (179- 245)
2	R+OME	0,1337 (0,0634- 0,3461)	N/A	36,05 (22,29- 71,41)	N/A	329 (239- 418)
	T+OME	0,1879 (0,1688- 0,4231)	140,54 (71,27- 277,10)	46,86 (39,28- 89,98)	130,0 (77,5- 218,0)	210 (150- 296)



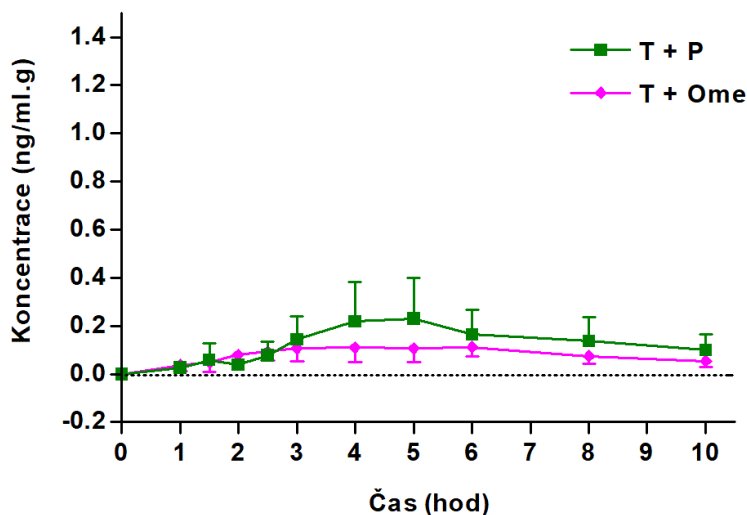
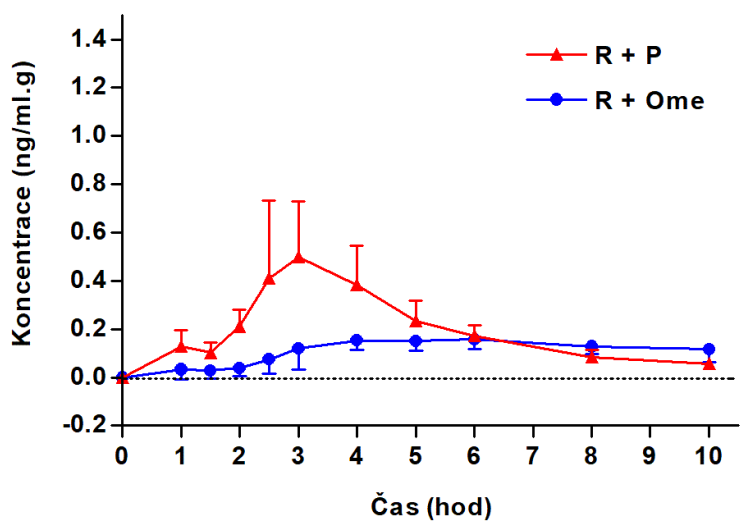
Obř. 7: Průměrné (\pm SD) farmakokinetické profily dasatinibu po podání dvou formulací s pentagastrinem (sekvence 1) nebo omeprazolem (sekvence 2) potkanům nalačno. R = reference, T = test, P = pentagastrin, Ome = omeprazol.

Výsledky sekvence 3 shrnuje tabulka 10. 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_{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_{last}). V tomto případě se naopak dasatinib vstřebával rychleji

s omeprazolem (T_{max} o 60 min kratší než s pentagastrinem). V obrázku 8 jsou vyneseny křivky plazmatických koncentrací dasatinibu v sekvenci 3.

Tab. 10: *Sekvence 3: Farmakokinetické parametry po podání dvou formulací dasatinibu (R – reference, T – test, P – pentagastrin, OME - omeprazol) potkanům nalačno (n=12). Hodnoty T_{max} jsou uvedeny jako medián (interkvartilové rozpětí). C_{max} a AUC_{last} jsou uvedeny jako geometrický průměr (90% CI).*

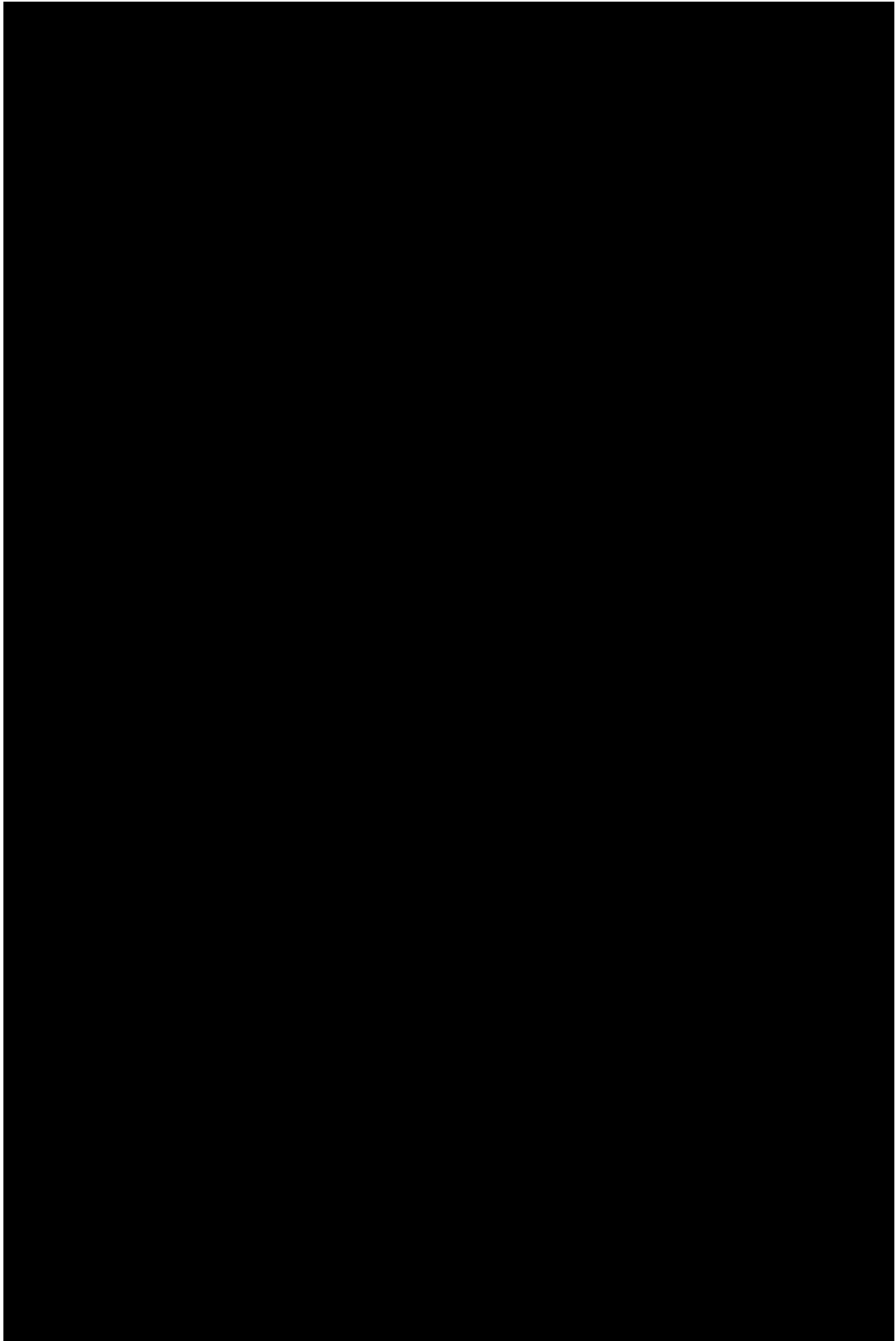
Formulace	C_{max} (ng/ml.g)	AUC_{last} (mg/ml.min.g)	T_{max} (min)
R + P	0,4856 (0,2965-0,8004)	111,80 (87,47-143,80)	180 (161-184)
R + OME	0,1985 (0,1712-0,2317)	61,08 (46,62-80,50)	273 (196-347)
T + P	0,1867 (0,1014-0,4434)	56,39 (33,82-120,70)	270 (238-301)
T + OME	0,1401 (0,1073-0,1824)	46,91 (37,31-59,15)	210 (135-331)



Obr. 8: *Sekvence 3: Průměrné (\pm SD) farmakokinetické profily dasatinibu po podání dvou formulací potkanům nalačno, vždy s pentagastrinem v 1. periodě a omeprazolem v 2. periodě. R = reference, T = test, P = pentagastrin, Ome = omeprazol.*

Příloha 5 se zabývá post-mortem redistribucí alprazolamu. Dávka alprazolamu, která byla potkanům aplikovaná, se pohybovala v rozmezí 16,4-24,7 mg/kg. Vývoj změn v koncentracích v krvi a jednotlivých tkáních je vyneseno v obrázku 9. 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. Míru distribuce

alprazolamu v jednotlivých tkáních vyjádřenou v procentech celkově podané dávky lze najít v tabulce 11.



Obr. 9: *Post-mortem změny koncentrací alprazolamu v krvi a tkáních, normalizované na dávku 20 mg/kg. Hodnoty jsou vyjádřené jako medián (interkvartilové rozpětí). * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$ vs. 0 hod po smrti.*

Tab. 11: Distribuce alprazolamu v jednotlivých tkáních vyjádřená v procentech celkové podané dávky alprazolamu v různých časech (medián). * $p < 0,05$ vs. 0 hod po smrti.

	Skupina 1 0 hod	Skupina 2 2 hod	Skupina 3 6 hod	Skupina 4 24 hod
Játra	5,17	7,11	8,17*	7,38
Ledvina (levá)	0,29	0,34	0,42	0,43*
Srdce	0,32	0,22	0,23	0,32
Plíce (levá)	0,08	0,08	0,09	0,10
Mozek	0,21	0,10	0,14	0,24

5. Diskuze

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

Na rozdíl od klinických studií, v preklinickém výzkumu dosud nejsou zakotveny jasné metodologické postupy, které by detailně určovaly, jak se mají provádět farmakokinetické studie. Pozvolna se nicméně objevují první snahy o větší standardizaci experimentů, jež by přispěla k racionálnějšímu a efektivnějšímu využívání zvířat (Jaiswal et al., 2014, Valic et al., 2020). Mezi důležité aspekty práce s pokusnými zvířaty patří implementace principů 3R (reduction, replacement, refinement), jež zahrnují redukci počtu zvířat na možné minimum, nahrazení animálních modelů jinými technikami všude, kde existuje jiná alternativa, a nakládání se zvířaty tak, aby pociťovala co nejméně bolesti a stresu (Public Law 89-544, 1966). Úsilí naplňovat tyto zásady se rovněž promítá do diskuze ohledně metodologie preklinických experimentů (Aarons and Ogungbenro, 2010, Takemoto et al., 2010).

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 projevil 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 chybné interpretace, 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, při všech procesech během pokusů i během následné analýzy 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.

Cross-over design dnes již v rámci preklinického farmakokinetického testování někteří používají (Xiang et al., 2006, Kamath et al., 2008, Guyonnet et al., 2010, Chowdary, 2013, Rachid et al., 2018, Garcia et al., 2018). Nejčastěji se jedná o

experimenty zahrnující větší zvířata, jako jsou např. psi, neboť snáze snášejí složitější operační techniky a delší průběh studie.

V rámci našeho výzkumu jsme se 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 požití potravy, kde se jednalo o stejnou formulaci v obou periodách, ale lišily se podmínky aplikace).

Pro odběry krve byla zvolena metoda kanylace, protože umožňuje pohodlné odnámání vzorků i během delšího časového období. Všeobecně se chirurgický zákrok, během něž se kanyla zavádí do cévy potkanů, nejčastěji provádí jeden den před zahájením vlastního pokusu (Remsburg 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). Během tohoto experimentu se totiž plazmatické hladiny měřily pouze 4 hod po aplikaci léčiva, což se ukázalo jako nedostatečné pro zachycení celého průběhu farmakokinetického profilu. 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_{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 jídlom absorpce až několikanásobně zvyšuje (Chi et al., 2015). Zrealizovali jsme tedy preklinickou studii, která měla za cíl tento vliv ohodnotit. Pro simulaci stavu po jídlu 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).

Při prvním pokusu nicméně pravděpodobně nedošlo k dostatečnému promísení této směsi, což se projevilo tím, že se reference navzdory známému food efektu vstřebávala ve stavu nalačno i po jídle podobným způsobem. Druhá, testovaná, reference se také nechovala podle očekávání, kdy namísto potlačení vlivu potravy se abirateron z testované formulace s jídlem vstřebával velmi špatně. Zopakování pokusu s větším důrazem na dostatečnou homogenizaci směsi oleje s Nutridrinkem těsně před aplikací přineslo výsledky, jež mnohem více odpovídaly předpokladům. Stejně jako v předešlých výzkumech, 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 i některé limity – 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 již 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 u preklinických farmakokinetických studií. 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 malé množství 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 ^{14}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 ledvinné 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. Závěr

Tato disertační práce se zaměřuje na vývoj a praktické využití potkaních modelů u preklinických farmakokinetických studií a rovněž v hodnocení toxikokinetiky. V první řadě se věnuje porovnání dopadů paralelního a cross-over uspořádání na variabilitu těchto studií. Závěrem této analýzy je, že implementace cross-over designu zajišťuje i při použití nižšího počtu zvířat kvalitnější výstupy než v případě paralelního uspořádání. Tato metoda s sebou sice přináší i nevýhodu v podobě složitější realizace, nicméně vložit úsilí do zvládnutí všech nezbytných technik, které s tím souvisejí, se v konečném důsledku jistě vyplatí.

Použití cross-over designu názorně demonstrují uskutečněné komparativní farmakokinetické studie na potkanech, jež porovnávaly vstřebávání různých formulací s abirateronem a cinakalcetem. Získané výsledky, které odpovídají předpokladům na základě předešlých *in vitro* experimentů a literárních dat, potvrzují širší využitelnost tohoto modelu i pro jiné lékové formulace v budoucnu.

Práce se dále zabývá stanovením žaludečního pH potkanů a možnostmi jeho ovlivnění podáním různých modulátorů. Z výsledků zkoumání vyplývá, že má pH v žaludku potkanů nalačno o něco vyšší hodnotu než u lidí. Pokud bychom tedy chtěli lépe u potkanů simulovat lidské podmínky pro rozpouštění léčiv s pH-dependentní absorpcí, jako nejlepší varianta se jeví premedikace pentagastrinem krátce před aplikací léčiva. Obdobné prostředí žaludku, jaké najdeme u některých lidí trpících hypochlorhydrií, nejlépe u potkanů navozuje podání omeprazolu 2 hod před testovaným léčivem. Tato zjištění byla následně aplikována i v další komparativní farmakokinetické studii, jež porovnávala profil dvou různých formulací s dasatinibem za použití námi zkoumaných modulátorů žaludečního pH.

Poslední část práce se věnuje studiu post-mortem redistribuce alprazolamu na potkaním modelu. Ukazuje, jak se během 24 hod po smrti koncentrace alprazolamu v krvi a různých tkáních mění. Tyto informace mohou pomoci při interpretaci toxikologických dat při vyšetřování úmrtí, která jsou s požitím alprazolamu spojená.

7. Použitá literatura

- Vyhláška č. 419/2012 Sb. ze dne 22. listopadu 2012 o ochraně pokusných zvířat. In: *Sbírka zákonů České republiky*. 2012.
- AARONS, L. & OGUNGBENRO, K. Optimal design of pharmacokinetic studies. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2010, 106, 3, 250-255.
- ABUHELWA, A. Y., WILLIAMS, D. B., UPTON, R. N. & FOSTER, D. J. Food, gastrointestinal pH, and models of oral drug absorption. *Eur J Pharm Biopharm*, 2017, 112, 234-248.
- ADACHI, M., ITOH, K., MASUBUCHI, A., WATANABE, N. & TANAKA, Y. Construction and expression of mutant cDNAs responsible for genetic polymorphism in aldehyde oxidase in Donryu strain rats. *J Biochem Mol Biol*, 2007, 40, 6, 1021-1027.
- AKIMOTO, M., NAGAHATA, N., FURUYA, A., FUKUSHIMA, K., HIGUCHI, S. & SUWA, T. Gastric pH profiles of beagle dogs and their use as an alternative to human testing. *Eur J Pharm Biopharm*, 2000, 49, 2, 99-102.
- ANAKK, S., KU, C. Y., VORE, M. & STROBEL, H. W. Insights into gender bias: Rat cytochrome P450 3A9. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2003, 305, 2, 703-709.
- ANDES, D. & CRAIG, W. A. Animal model pharmacokinetics and pharmacodynamics: a critical review. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2002, 19, 4, 261-268.
- Public Law 89-544, 1966: *Animal Welfare Act* [online, cit. 12.4.2022] Dostupné z: <https://www.govinfo.gov/content/pkg/USCODE-2013-title7/pdf/USCODE-2013-title7-chap54.pdf>
- 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.
- BARNWELL, S. G., LAUDANSKI, T., DWYER, M., STORY, M. J., GUARD, P., COLE, S. & ATTWOOD, D. Reduced Bioavailability of Atenolol in Man - the Role of Bile-Acids. *International Journal of Pharmaceutics*, 1993, 89, 3, 245-250.
- BENNINK, R., PEETERS, M., VAN DEN MAEGDENBERGH, V., GEYSENS, B., RUTGEERTS, P., DE ROO, M. & MORTELMANS, L. Comparison of total and compartmental gastric emptying and antral motility between healthy men and women. *Eur J Nucl Med*, 1998, 25, 9, 1293-1299.
- BLUM, R. A., D'ANDREA, D. T., FLORENTINO, B. M., WILTON, J. H., HILLIGOSS, D. M., GARDNER, M. J., HENRY, E. B., GOLDSTEIN, H. & SCHENTAG, J. J. Increased gastric pH and the bioavailability of fluconazole and ketoconazole. *Ann Intern Med*, 1991, 114, 9, 755-757.
- BOGAARDS, J. J. P., BERTRAND, M., JACKSON, P., OUDSHOORN, M. J., WEAVER, R. J., VAN BLADEREN, P. J. & WALTHER, B. Determining the best animal model for human cytochrome P450 activities: a comparison of mouse, rat, rabbit, dog, micropig, monkey and man. *Xenobiotica*, 2000, 30, 12, 1131-1152.
- 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.

- BORTOLOTTI, M., LEVORATO, M., LUGLI, A. & MAZZERO, G. Effect of a balanced mixture of dietary fibers on gastric emptying, intestinal transit and body weight. *Ann Nutr Metab*, 2008, 52, 221-226.
- 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.
- BUCHANAN, J. R., BURKA, L. T. & MELNICK, R. L. Purpose and guidelines for toxicokinetic studies within the National Toxicology Program. *Environ Health Perspect*, 1997, 105, 5, 468-471.
- CAILLE, G., DUSOUICH, P., BESNER, J. G., GERVAIS, P. & VEZINA, M. Effects of Food and Sucralfate on the Pharmacokinetics of Naproxen and Ketoprofen in Humans. *American Journal of Medicine*, 1989, 86, 6, 38-44.
- CARVER, P. L., FLEISHER, D., ZHOU, S. Y., KAUL, D., KAZANJIAN, P. & LI, C. Meal composition effects on the oral bioavailability of indinavir in HIV-infected patients. *Pharm Res*, 1999, 16, 5, 718-724.
- 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.
- CECIL, J. E., FRANCIS, J. & READ, N. W. Comparison of the effects of a high-fat and high-carbohydrate soup delivered orally and intragastrically on gastric emptying, appetite, and eating behaviour. *Physiol Behav*, 1999, 67, 2, 299-306.
- CRABBE, J. C., WAHLSTEN, D. & DUDEK, B. C. Genetics of mouse behavior: interactions with laboratory environment. *Science*, 1999, 284, 5420, 1670-1672.
- CUNDY, K. C., SUE, I. L., VISOR, G. C., MARSHBURN, J., NAKAMURA, C., LEE, W. A. & SHAW, J. P. Oral formulations of adefovir dipivoxil: in vitro dissolution and in vivo bioavailability in dogs. *J Pharm Sci*, 1997, 86, 12, 1334-1338.
- CURTIN, F., ELBOURNE, D. & ALTMAN, D. G. Meta-analysis combining parallel and cross-over clinical trials. III: The issue of carry-over. *Statistics in Medicine*, 2002, 21, 15, 2161-2173.
- CUSTODIO, J. M., WU, C. Y. & BENET, L. Z. Predicting drug disposition, absorption/elimination/transporter interplay and the role of food on drug absorption. *Adv Drug Deliv Rev*, 2008, 60, 6, 717-733.
- CVIJIC, S., PAROJCIC, J. & LANGGUTH, P. Viscosity-mediated negative food effect on oral absorption of poorly-permeable drugs with an absorption window in the proximal intestine: In vitro experimental simulation and computational verification. *Eur J Pharm Sci*, 2014, 61, 40-53.
- 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.
- DALVIE, D. & DI, L. Aldehyde oxidase and its role as a drug metabolizing enzyme. *Pharmacol Ther*, 2019, 201, 137-180.
- DANESHMEND, T. K. & ROBERTS, C. J. The influence of food on the oral and intravenous pharmacokinetics of a high clearance drug: a study with labetalol. *Br J Clin Pharmacol*, 1982, 14, 1, 73-78.
- DATZ, F. L., CHRISTIAN, P. E., HUTSON, W. R., MOORE, J. G. & MORTON, K. A. Physiological and pharmacological interventions in radionuclide imaging of the tubular gastrointestinal tract. *Semin Nucl Med*, 1991, 21, 140-152.
- 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.
- DEACON, R. M. J. Housing, husbandry and handling of rodents for behavioral experiments. *Nature Protocols*, 2006, 1, 2, 936-946.
- DENG, J., ZHU, X., CHEN, Z., FAN, C. H., KWAN, H. S., WONG, C. H., SHEK, K. Y., ZUO, Z. & LAM, T. N. A Review of Food-Drug Interactions on Oral Drug Absorption. *Drugs*, 2017, 77, 1833-1855.
- 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.
- DOSTERT, P., BENEDETTI, M. S. & POGGESI, I. Review of the pharmacokinetics and metabolism of reboxetine, a selective noradrenaline reuptake inhibitor. *Eur Neuropsychopharmacol*, 1997, 7, 1, suppl 1, S23-S35.
- 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.
- ELBOURNE, D. R., ALTMAN, D. G., HIGGINS, J. P. T., CURTIN, F., WORTHINGTON, H. V. & VAIL, A. Meta-analyses involving cross-over trials: methodological issues. *International Journal of Epidemiology*, 2002, 31, 140-149.
- ELEY, T., LUO, F. R., AGRAWAL, S., SANIL, A., MANNING, J., LI, T., BLACKWOOD-CHIRCHIR, A. & BERTZ, R. Phase I study of the effect of gastric acid pH modulators on the bioavailability of oral dasatinib in healthy subjects. *J Clin Pharmacol*, 2009, 49, 6, 700-709.
- 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
- EMCDDA. 2019. *Drug-related deaths and mortality in Europe* [online]. Lucemburk, 2019 [cit. 16.3.2022] Dostupné z: https://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/11485/20193286_TD0319444ENN_PDF.pdf
- ETTE, E. I. & WILLIAMS, P. J. Population pharmacokinetics I: background, concepts, and models. *Ann Pharmacother*, 2004, 38, 10, 1702-1706.
- FANCHER, R. M., ZHANG, H., SLECZKA, B., DERBIN, G., ROCKAR, R. & MARATHE, P. Development of a canine model to enable the preclinical assessment of pH-dependent absorption of test compounds. *J Pharm Sci*, 2011, 100, 7, 2979-2988.
- 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-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>
- FDA. *Guidance for Industry: Food-Effect Bioavailability and Fed Bioequivalence Studies* [online]. 2002 [cit. 12.4.2022]. Dostupné z: <https://www.fda.gov/files/drugs/published/Food-Effect-Bioavailability-and-Fed-Bioequivalence-Studies.pdf>

- FONSART, J., MENET, M. C., DECLEVES, X., GALONS, H., CRETE, D., DEBRAY, M., SCHERRMANN, J. M. & NOBLE, F. Sprague-Dawley rats display metabolism-mediated sex differences in the acute toxicity of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, ecstasy). *Toxicol Appl Pharmacol*, 2008, 230, 1, 117-125.
- FONTANA, F., FIGUEIREDO, P., MARTINS, J. P. & SANTOS, H. A. Requirements for Animal Experiments: Problems and Challenges. *Small*, 2021, 17, 15.
- GAMBLE, J. T., NAKATSU, K. & MARKS, G. S. Comparison of rat and human cytochrome P450 (CYP) sources of N-alkylprotoporphyrin - IX. Formation after interaction with porphyrinogenic xenobiotics: studies with cDNA-expressed single CYP enzymes. *Xenobiotica*, 2002, 32, 11, 997-1006.
- GARATTINI, S. & GRIGNASCHI, G. Animal testing is still the best way to find new treatments for patients. *European Journal of Internal Medicine*, 2017, 39, 32-35.
- GARCIA, M. C., GUZMAN, M. L., HIMELFARB, M. A., LITTERIO, N. J., OLIVERA, M. E. & JIMENEZ-KAIRUZ, A. Preclinical pharmacokinetics of benzimidazole-loaded interpolyelectrolyte complex-based delivery systems. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2018, 122, 281-291.
- 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.
- GERSHKOVICH, P. & HOFFMAN, A. Effect of a high-fat meal on absorption and disposition of lipophilic compounds: the importance of degree of association with triglyceride-rich lipoproteins. *Eur J Pharm Sci*, 2007, 32, 1, 24-32.
- GIDAL, B. E., MALY, M. M., BUDDE, J., LENSMEYER, G. L., PITTERLE, M. E. & JONES, J. C. Effect of a high-protein meal on gabapentin pharmacokinetics. *Epilepsy Res*, 1996, 23, 1, 71-76.
- GONZALEZ, F. J. Role of gene knockout and transgenic mice in the study of xenobiotic metabolism. *Drug Metab Rev*, 2003, 35, 4, 319-335.
- GRASELA, T. H., JR., SCHENTAG, J. J., SEDMAN, A. J., WILTON, J. H., THOMAS, D. J., SCHULTZ, R. W., LEBSACK, M. E. & KINKEL, A. W. Inhibition of enoxacin absorption by antacids or ranitidine. *Antimicrob Agents Chemother*, 1989, 33, 5, 615-617.
- GROBE, N., KUTCHAN, T. M. & ZENK, M. H. Rat CYP2D2, not 2D1, is functionally conserved with human CYP2D6 in endogenous morphine formation. *Febs Letters*, 2012, 586, 13, 1749-1753.
- GU, C. H., RAO, D., GANDHI, R. B., HILDEN, J. & RAGHAVAN, K. Using a novel multicompartiment dissolution system to predict the effect of gastric pH on the oral absorption of weak bases with poor intrinsic solubility. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2005, 94, 1, 199-208.
- GUILLIAMS, T. G. & DRAKE, L. E. Meal-Time Supplementation with Betaine HCl for Functional Hypochlorhydria: What is the Evidence? *Integr Med (Encinitas)*, 2020, 19, 1, 32-36.
- 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.
- GUYONNET, J., ELLIOTT, J. & KALTSATOS, V. A preclinical pharmacokinetic and pharmacodynamic approach to determine a dose of spironolactone for treatment of congestive heart failure in dog. *J Vet Pharmacol Ther*, 2010, 33, 3, 260-267.
- HAJAR, R. Animal testing and medicine. *Heart Views*, 2011, 12, 1, 42.

- HAMMAN, J. H., DEMANA, P. H. & OLIVIER, E. I. Targeting receptors, transporters and site of absorption to improve oral drug delivery. *Drug Target Insights*, 2007, 2, 71-81.
- HAN, E., KIM, E., HONG, H., JEONG, S., KIM, J., IN, S., CHUNG, H. & LEE, S. Evaluation of postmortem redistribution phenomena for commonly encountered drugs. *Forensic Sci Int*, 2012, 219, 1-3, 265-271.
- HASEGAWA, T., EIKI, J. & CHIBA, M. Interindividual variations in metabolism and pharmacokinetics of 3-(6-methylpyridine-3-yl-sulfanyl)-6-(4H-[1,2,4]triazole-3-yl-sulfanyl)-N-(1,3-thiazole-2-yl)-2-pyridine carboxamide, a glucokinase activator, in rats caused by the genetic polymorphism of CYP2D1. *Drug Metab Dispos*, 2014, 42, 9, 1548-1555.
- HILBERG, T., MORLAND, J. & BJORNEBOE, A. Postmortem release of amitriptyline from the lungs; a mechanism of postmortem drug redistribution. *Forensic Sci Int*, 1994, 64, 1, 47-55.
- HIRONAKA, T., ITOKAWA, S., OGAWARA, K., HIGAKI, K. & KIMURA, T. Quantitative evaluation of PEPT1 contribution to oral absorption of cephalexin in rats. *Pharm Res*, 2009, 26, 1, 40-50.
- HUGHES, G. S., HEALD, D. L., BARKER, K. B., PATEL, R. K., SPILLERS, C. R., WATTS, K. C., BATTIS, D. H. & EULER, A. R. The effects of gastric pH and food on the pharmacokinetics of a new oral cephalosporin, cefpodoxime proxetil. *Clin Pharmacol Ther*, 1989, 46, 6, 674-685.
- CHARMAN, W. N., PORTER, C. J. H., MITHANI, S. & DRESSMAN, J. B. Physicochemical and physiological mechanisms for the effects of food on drug absorption: The role of lipids and pH. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1997, 86, 3, 269-282.
- 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.
- CHOWDARY, K. P. R., VEERAIHAH, E. Preclinical pharmacokinetic evaluation of efavirenz solid dispersions in two new modified starches. *J Appl Pharm Sci*, 2013, 3, 89-92.
- IWAKI, M., NIWA, T., NAKAMURA, Y., KAWASE, A. & KOMURA, H. Relative contribution of rat CYP isoforms responsible for stereoselective metabolism of carvedilol. *J Toxicol Sci*, 2018, 43, 1, 59-63.
- IWASAKI, K. & UNO, Y. Cynomolgus monkey CYPs: a comparison with human CYPs. *Xenobiotica*, 2009, 39, 8, 578-581.
- JAISWAL, S., SHARMA, A., SHUKLA, M., VAGHASIYA, K., RANGARAJ, N. & LAL, J. Novel pre-clinical methodologies for pharmacokinetic drug-drug interaction studies: spotlight on "humanized" animal models. *Drug Metab Rev*, 2014, 46, 4, 475-493.
- JANECZKO, R., WAXMAN, D. J., LEBLANC, G. A., MORVILLE, A. & ADESNIK, M. Hormonal-Regulation of Levels of the Messenger-Rna Encoding Hepatic P450 2c (Iic11), a Constitutive Male-Specific Form of Cytochrome-P450. *Molecular Endocrinology*, 1990, 4, 2, 295-303.
- JARURATANASIRIKUL, S. & SRIWIRIYAJAN, S. Effect of omeprazole on the pharmacokinetics of itraconazole. *Eur J Clin Pharmacol*, 1998, 54, 159-161.

- 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.
- KAMATH, A. V., WANG, J., LEE, F. Y. & MARATHE, P. H. Preclinical pharmacokinetics and in vitro metabolism of dasatinib (BMS-354825): a potent oral multi-targeted kinase inhibitor against SRC and BCR-ABL. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2008, 61, 365-376.
- KARP, N. A., SPEAK, A. O., WHITE, J. K., ADAMS, D. J., HRABE DE ANGELIS, M., HERAULT, Y. & MOTT, R. F. Impact of temporal variation on design and analysis of mouse knockout phenotyping studies. *PLoS One*, 2014, 9, 10, e111239.
- KLETZL, H., GIRAUDON, M., DUCRAY, P. S., ABT, M., HAMILTON, M. & LUM, B. L. Effect of gastric pH on erlotinib pharmacokinetics in healthy individuals: omeprazole and ranitidine. *Anticancer Drugs*, 2015, 26, 5, 565-572.
- KOREN, G. & KLEIN, J. Postmortem Redistribution of Morphine in Rats. *Therapeutic Drug Monitoring*, 1992, 14, 6, 461-463.
- KRISHNA, G., MOTON, A., MA, L., MEDLOCK, M. M. & MCLEOD, J. Pharmacokinetics and absorption of posaconazole oral suspension under various gastric conditions in healthy volunteers. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009, 53, 3, 958-966.
- 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.
- LAMPE, J. W., KING, I. B., LI, S., GRATE, M. T., BARALE, K. V., CHEN, C., FENG, Z. & POTTER, J. D. Brassica vegetables increase and apiaceous vegetables decrease cytochrome P450 1A2 activity in humans: changes in caffeine metabolite ratios in response to controlled vegetable diets. *Carcinogenesis*, 2000, 21, 6, 1157-1162.
- LANGHANS, N., RINDI, G., CHIU, M., REHFELD, J. F., ARDMAN, B., BEINBORN, M. & KOPIN, A. S. Abnormal gastric histology and decreased acid production in cholecystokinin-B/gastrin receptor-deficient mice. *Gastroenterology*, 1997, 112, 1, 280-286.
- LIEDHOLM, H. & MELANDER, A. Concomitant food intake can increase the bioavailability of propranolol by transient inhibition of its presystemic primary conjugation. *Clin Pharmacol Ther*, 1986, 40, 1, 29-36.
- 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.
- LIU, L., JIANG, Z., LIU, J., HUANG, X., WANG, T., LIU, J., ZHANG, Y., ZHOU, Z., GUO, J., YANG, L., CHEN, Y. & ZHANG, L. Sex differences in subacute toxicity and hepatic microsomal metabolism of triptolide in rats. *Toxicology*, 2010, 271, 1-2, 57-63.
- 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.
- MANDAL, J. & PARIJA, S. C. Ethics of involving animals in research. *Trop Parasitol*, 2013, 3, 1, 4-6.

- MARCUS, F. I. Pharmacokinetic Interactions between Digoxin and Other Drugs. *Journal of the American College of Cardiology*, 1985, 5, 5, A82-A90.
- MARTIGNONI, M., GROOTHUIS, G. M. M. & DE KANTER, R. Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 2006, 2, 6, 875-894.
- 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.
- MILLS, E. J., CHAN, A. W., WU, P., VAIL, A., GUYATT, G. H. & ALTMAN, D. G. Design, analysis, and presentation of crossover trials. *Trials*, 2009, 10, 27.
- MIYAMOTO, M., IWASAKI, S., CHISAKI, I., NAKAGAWA, S., AMANO, N. & HIRABAYASHI, H. Comparison of predictability for human pharmacokinetics parameters among monkeys, rats, and chimeric mice with humanised liver. *Xenobiotica*, 2017, 47, 12, 1052-1063.
- MOGHIMIPOUR, E., AMERI, A. & HANDALI, S. Absorption-Enhancing Effects of Bile Salts. *Molecules*, 2015, 20, 8, 14451-14473.
- OFORI-ASENSO, R. & AGYEMAN, A. A. Understanding cross over and parallel group studies in drug research. *Precision Medicine*, 2015, 1.
- PARROTT, N., STILLHART, C., LINDENBERG, M., WAGNER, B., KOWALSKI, K., GUERINI, E., DJEBLI, N. & MENESES-LORENTE, G. Physiologically Based Absorption Modelling to Explore the Impact of Food and Gastric pH Changes on the Pharmacokinetics of Entrectinib. *AAPS J*, 2020, 22, 78.
- 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.
- POLENTARUTTI, B., ALBERY, T., DRESSMAN, J. & ABRAHAMSSON, B. Modification of gastric pH in the fasted dog. *J Pharm Pharmacol*, 2010, 62, 4, 462-469.
- POUND, P. & BRACKEN, M. B. Is animal research sufficiently evidence based to be a cornerstone of biomedical research? *Bmj-British Medical Journal*, 2014, 348.
- POUNDER, D. J. & JONES, G. R. Post-mortem drug redistribution--a toxicological nightmare. *Forensic Sci Int*, 1990, 45, 3, 253-263.
- QI, X., AL-GHAZZEWI, F. H. & TESTER, R. F. Dietary Fiber, Gastric Emptying, and Carbohydrate Digestion: A Mini-Review. *Starch-Starke*, 2018, 70, 9-10.
- RACHID, O., RAWAS-QALAJI, M. & SIMONS, K. J. Epinephrine in Anaphylaxis: Preclinical Study of Pharmacokinetics after Sublingual Administration of Taste-Masked Tablets for Potential Pediatric Use. *Pharmaceutics*, 2018, 10, 1.
- 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.
- REIGNER, B., VERWEIJ, J., DIRIX, L., CASSIDY, J., TWELVES, C., ALLMAN, D., WEIDEKAMM, E., ROOS, B., BANKEN, L., UTOH, M. & OSTERWALDER, B. Effect of food on the pharmacokinetics of capecitabine and its metabolites following oral administration in cancer patients. *Clin Cancer Res*, 1998, 4, 4, 941-948.

- 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, 8, 1168-1179.
- ROBERTSON, D. R., HIGGINSON, I., MACKLIN, B. S., RENWICK, A. G., WALLER, D. G. & GEORGE, C. F. The influence of protein containing meals on the pharmacokinetics of levodopa in healthy volunteers. *Br J Clin Pharmacol*, 1991, 31, 4, 413-417.
- RODRIGUES, A. D., FERRERO, J. L., AMANN, M. T., ROTERT, G. A., CEPA, S. P., SURBER, B. W., MACHINIST, J. M., TICH, N. R., SULLIVAN, J. P., GARVEY, D. S., FITZGERALD, M. & ARNERIC, S. P. The in-Vitro Hepatic-Metabolism of Abt-418, a Cholinergic Channel Activator, in Rats, Dogs, Cynomolgus Monkeys, and Humans. *Drug Metabolism and Disposition*, 1994, 22, 5, 788-798.
- RUSSELL, T. L., BERARDI, R. R., BARNETT, J. L., O'SULLIVAN, T. L., WAGNER, J. G. & DRESSMAN, J. B. pH-related changes in the absorption of dipyrindamole in the elderly. *Pharm Res*, 1994, 11, 1, 136-143.
- SAATHOFF, N., LODE, H., NEIDER, K., DEPPERMAN, K. M., BORNER, K. & KOEPPE, P. Pharmacokinetics of cefpodoxime proxetil and interactions with an antacid and an H2 receptor antagonist. *Antimicrob Agents Chemother*, 1992, 36, 4, 796-800.
- SAEIDNIA, S., MANAYI, A. & ABDOLLAHI, M. From in vitro Experiments to in vivo and Clinical Studies; Pros and Cons. *Curr Drug Discov Technol*, 2015, 12, 4, 218-24.
- SAWYER, W. R. & FORNEY, R. B. Postmortem disposition of morphine in rats. *Forensic Sci Int*, 1988, 38, 3-4 259-273.
- SEDGWICK, P. Bias in randomised controlled trials: comparison of crossover group and parallel group designs. *BMJ*, 2015, 351.
- 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.
- SCHILLER, C., FROHLICH, C. P., GIESSMANN, T., SIEGMUND, W., MONNIKES, H., HOSTEN, N. & WEITSCHIES, W. Intestinal fluid volumes and transit of dosage forms as assessed by magnetic resonance imaging. *Aliment Pharmacol Ther*, 2005, 22, 10, 971-979.
- SCHMIDT, L. E. & DALHOFF, K. Food-drug interactions. *Drugs*, 2002, 62, 10, 1481-1502.
- SCHOLLER-GYURE, M., BOFFITO, M., POZNIAK, A. L., LEEMANS, R., KAKUDA, T. N., WOODFALL, B., VYNCKE, V., PEETERS, M., VANDERMEULEN, K. & HOETELMANS, R. M. Effects of different meal compositions and fasted state on the oral bioavailability of etravirine. *Pharmacotherapy*, 2008, 28, 10, 1215-1222.
- SIEBER, C., BEGLINGER, C., JAGER, K. & STALDER, G. A. Intestinal phase of superior mesenteric artery blood flow in man. *Gut*, 1992, 33, 497-501.
- SINGH, S. S. Preclinical pharmacokinetics: an approach towards safer and efficacious drugs. *Curr Drug Metab*, 2006, 7, 2, 165-182.
- SMITH, T. & NICHOLSON, R. A. Review of duloxetine in the management of diabetic peripheral neuropathic pain. *Vasc Health Risk Manag*, 2007, 3, 6, 833-844.

- SUN, H., FRASSETTO, L. & BENET, L. Z. Effects of renal failure on drug transport and metabolism. *Pharmacol Ther*, 2006, 109, 1-2, 1-11.
- TAKAHASHI, N., MIURA, M., NIIOKA, T. & SAWADA, K. Influence of H₂-receptor antagonists and proton pump inhibitors on dasatinib pharmacokinetics in Japanese leukemia patients. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2012, 69, 999-1004.
- TAKEMOTO, S., YAMAOKA, K., NISHIKAWA, M., YANO, Y. & TAKAKURA, Y. Bootstrap method-based estimation of the minimum sample number for obtaining pharmacokinetic parameters in preclinical experiments. *J Pharm Sci*, 2010, 99, 4, 2176-2184.
- TER HEINE, R., FANGGIDAY, J. C., LANKHEET, N. A., BEIJNEN, J. H., VAN DER WESTERLAKEN, M. M., STAAKS, G. H. & MALINGRE, M. M. Erlotinib and pantoprazole: a relevant interaction or not? *Br J Clin Pharmacol*, 2010, 70, 6, 908-911.
- THUMMEL, K. E. & LIN, Y. S. Sources of interindividual variability. *Methods Mol Biol*, 2014, 1113, 363-415.
- TOLMAN, K. G., SANDERS, S. W., BUCHI, K. N., KAROL, M. D., JENNINGS, D. E. & RINGHAM, G. L. The effects of oral doses of lansoprazole and omeprazole on gastric pH. *J Clin Gastroenterol*, 1997, 24, 2, 65-70.
- TOMLINSON, E. S., MAGGS, J. L., PARK, B. K. & BACK, D. J. Dexamethasone metabolism in vitro: Species differences. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 1997, 62, 4, 345-352.
- UMEHARA, K., KUDO, S. & ODOMI, M. Involvement of CYP2D1 in the metabolism of carteolol by male rat liver microsomes. *Xenobiotica*, 1997, 27, 11, 1121-1129.
- VALIC, M. S., HALIM, M., SCHIMMER, P. & ZHENG, G. Guidelines for the experimental design of pharmacokinetic studies with nanomaterials in preclinical animal models. *J Control Release*, 2020, 323, 83-101.
- WALKER, D. K., ACKLAND, M. J., JAMES, G. C., MUIRHEAD, G. J., RANCE, D. J., WASTALL, P. & WRIGHT, P. A. Pharmacokinetics and metabolism of sildenafil in mouse, rat, rabbit, dog and man. *Xenobiotica*, 1999, 29, 3, 297-310.
- 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.
- WATANABE, J., OKABE, H., ICHIHASHI, T., MIZOJIRI, K., YAMADA, H. & YAMAMOTO, R. Gastric-Emptying Rate Constants after Oral-Administration of Drug Solution to Mice, Rats, and Rabbits. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 1977, 25, 9, 2147-2155.
- XIANG, H., MCSURDY-FREED, J., MOORTHY, G. S., HUGGER, E., BAMBAL, R., HAN, C., FERRER, S., GARGALLO, D. & DAVIS, C. B. Preclinical drug metabolism and pharmacokinetic evaluation of GW844520, a novel anti-malarial mitochondrial electron transport inhibitor. *J Pharm Sci*, 2006, 95, 12, 2657-2672.
- YAGO, M. R., FRYMOYER, A., BENET, L. Z., SMELICK, G. S., FRASSETTO, L. A., DING, X., DEAN, B., SALPHATI, L., BUDHA, N., JIN, J. Y., DRESSER, M. J. & WARE, J. A. The use of betaine HCl to enhance dasatinib absorption in healthy volunteers with rabeprazole-induced hypochlorhydria. *AAPS J*, 2014, 16, 6, 1358-1365.
- YAGO, M. R., FRYMOYER, A. R., SMELICK, G. S., FRASSETTO, L. A., BUDHA, N. R., DRESSER, M. J., WARE, J. A. & BENET, L. Z. Gastric reacidification with betaine HCl in healthy volunteers with rabeprazole-induced hypochlorhydria. *Mol Pharm*, 2013, 10, 11, 4032-4037.
- YAREMA, M. C. & BECKER, C. E. Key concepts in postmortem drug redistribution. *Clin Toxicol (Phila)*, 2005, 43, 4, 235-241.

- 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.
- YEAP, Y. Y., TREVASKIS, N. L., QUACH, T., TSO, P., CHARMAN, W. N. & PORTER, C. J. Intestinal bile secretion promotes drug absorption from lipid colloidal phases via induction of supersaturation. *Mol Pharm*, 2013, 10, 5, 1874-1889.
- ZHONG, W. Z., ZHAN, J., KANG, P. & YAMAZAKI, S. Gender specific drug metabolism of PF-02341066 in rats--role of sulfoconjugation. *Curr Drug Metab*, 2010, 11, 4, 296-306.
- 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.
- ZHOU, R., MOENCH, P., HERAN, C., LU, X., MATHIAS, N., FARIA, T. N., WALL, D. A., HUSSAIN, M. A., SMITH, R. L. & SUN, D. pH-dependent dissolution in vitro and absorption in vivo of weakly basic drugs: development of a canine model. *Pharm Res*, 2005, 22, 2, 188-192.

8. Seznam příloh

1. KRÁLOVIČOVÁ, J., BARTŮNĚK, A., HOFMANN, J., KŘÍŽEK, 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.
2. BOLESLAVSKÁ, T., RYCHECKÝ, O., KROV, M., ŽVÁTORA, P., DAMMER, O., BERÁNEK, J., KOZLÍK, P., KŘÍŽEK, 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.
3. RYŠÁNEK, P., GRUS, T., LUKÁČ, P., KOZLÍK, P., KŘÍŽEK, 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.
4. 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.
5. HOŘÍNKOVÁ, J., KOZLÍK, P., KŘÍŽEK, T., MICHALIČKOVÁ, D., ŠÍMA, M., SLANAŘ, O. Post-mortem redistribution of alprazolam in rats. *Prague Med. Rep.*, 2020, 121, 4, 244-253.