

**UNIVERZITA KARLOVA
1. LÉKAŘSKÁ FAKULTA**

Studijní program: doktorský - Farmakologie a toxikologie (P0916D350001)

Studijní obor: Farmakologie a toxikologie (0916VD350001)



**UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta**

MUDr. Pavel Ryšánek

Fyziologické a patologické faktory ovlivňující absorpci léčiv

Physiological and pathological factors affecting absorption of drugs

DIZERTAČNÍ PRÁCE

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

Praha, 2023

Prohlášení:

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

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

V Praze, 3. 3. 2023

PAVEL RYŠÁNEK

Podpis:

Identifikační záznam:

RAŠÁNEK, Pavel. *Fyziologické a patologické faktory ovlivňující absorpci léčiv.* [Physiological and pathological factors affecting absorption of drugs]. Praha, 2023. 45 stran, 4 přílohy. Dizertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Farmakologický ústav. Školitel Šíma, Martin.

Abstrakt

Absorpce léčiv z gastrointestinálního traktu po perorálním podání je klíčovým farmakokinetickým procesem spoluurčujícím následnou farmakodynamickou odpověď organismu a terapeutickou účinnost. Tato dizertační práce je věnována studiu faktorů, které tento proces ovlivňují. Zvláštní důraz je kladen na studium lymfatické absorpce, tj. míry vstřebávání účinné látky cestou intestinálního lymfatického systému.

Byla provedena řada *in vivo* studií na laboratorních potkanech. Farmakokinetické studie byly prováděny pomocí pravidelných odběrů krve z cévních katetrů po perorálním podání léčiva. Lymfatická absorpce byla zkoumána na modelu anestetizovaného potkana se zakanylovaným mezenterickým lymfatickým duktem. Testovány byly moderní léky, které byly spolupracujícími chemicko-technologickými pracovišti upraveny do inovativních lékových forem.

Abirateron acetát, lipofilní látka používaná v terapii karcinomu prostaty, se dobře vstřebával z trávicího traktu po podání ve formě olejových kuliček (oil marbles). Touto technologií se též podařilo snížit jinak velmi výrazný pozitivní vliv jídla. Abirateron acetát se nevstřebával ve významné míře cestou intestinálního lymfatického systému.

Lymfatická absorpce cinakalcetu, látky používané k léčbě hyperparatyreózy, byla naopak výrazná. Relativní podíl lymfatické absorpce na celkové systémové biologické dostupnosti byl 20%. To znamená, že jedna pětina látky, která se objevila v systémové cirkulaci, prošla předtím intestinální lymfou.

Biologická dostupnost kanabidiolu, důležitého kanabinoиду a látky registrované k léčbě některých forem dětské epilepsie, byla výrazně zvýšena přípravou mikro- a nanoemulzní lékové formy. Lymfatická absorpce zde hrála výraznou roli. Vstřebávání kanabidiolu probíhalo zhruba 1:1 cestou portálního krevního řečiště a intestinálním lymfatickým systémem.

Nilotinib, moderní tyrozin kinázový inhibitor používaný k terapii chronické myeloidní leukémie, byl podáván v lékové formě založené na enkapsulaci účinné látky do glukonových částic získaných z kvasinkových buněk. To vedlo k mírnému zvýšení biologické dostupnosti. Lymfatická absorpce byla nízká.

Ve studiích shrnutých a komentovaných v této dizertační práci byla podrobně popsána farmakokinetika vybraných moderních léků a lékových forem včetně podílu lymfatické absorpce. Tyto informace budou využity při vývoji účinných látek a lékových forem

s lepšími absorpčními vlastnostmi, případně specificky cílenými do intestinálního lymfatického systému.

Klíčová slova:

Biologická dostupnost, lymfatická absorpce, abirateron acetát, cinakalcet, kanabidiol, nilotinib.

Abstract

Absorption of drugs from the gastrointestinal tract after oral administration is a key pharmacokinetic process co-determining the subsequent pharmacodynamic response of the organism and therapeutic efficacy. This dissertation thesis is devoted to the study of factors that influence this parameter. Special emphasis is placed on the study of lymphatic absorption, i.e. the rate of absorption of the active substance via the intestinal lymphatic system.

A number of *in vivo* studies have been carried out in laboratory rats. Pharmacokinetic studies have been performed by means of regular blood sampling from vascular catheters after oral administration of the drug. Lymphatic absorption was investigated in an anaesthetized mesenteric lymphatic duct cannulated rat model. Modern drugs were tested that were incorporated into innovative dosage forms by collaborating chemical and technological institutions.

Abiraterone acetate, a lipophilic agent used in the therapy of prostate cancer, was well absorbed from the gastrointestinal tract after administration in the form of oil marbles. This technology also succeeded in reducing the otherwise very significant positive food-effect. Abiraterone acetate was not absorbed to any significant extent via the intestinal lymphatic system.

In contrast, lymphatic absorption of cinacalcet, a substance used to treat hyperparathyroidism, was significant. The relative contribution of lymphatic absorption to the total systemic bioavailability was 20%. This means that one fifth of the substance that appeared in the systemic circulation had previously passed through the intestinal lymph.

The bioavailability of cannabidiol, an important cannabinoid and a substance registered for the treatment of some particular forms of childhood epilepsy, was significantly increased by the preparation of micro- and nanoemulsion dosage forms. Lymphatic absorption played a significant role. Absorption of cannabidiol was roughly half and half via the portal bloodstream and the intestinal lymphatic system.

Nilotinib, a modern tyrosine kinase inhibitor used for the treatment of chronic myeloid leukaemia, was administered in a dosage form based on encapsulation of the active substance in glucan particles derived from yeast cells. This led to a slight increase in bioavailability. Lymphatic absorption was low.

The pharmacokinetics of selected modern drugs and dosage forms, including the contribution of lymphatic absorption, have been described in detail in the studies summarized and commented in this thesis. This information will be used in the development of novel active substances and dosage forms with improved absorption properties, possibly specifically targeting the intestinal lymphatic system.

Key words:

Bioavailability, lymphatic absorption, abiraterone acetate, cinacalcet, cannabidiol, nilotinib

Obsah

Abstrakt.....	4
Abstract.....	6
Obsah	8
Seznam zkratek	10
Seznam vlastních publikací	11
Poděkování.....	14
1. Literární úvod	15
1.1. Lymfatická absorpce	15
1.2. Význam lymfatické absorpce	15
1.3. Mechanismus prostupu léků do mezenterické lymfy.....	16
1.4. Faktory ovlivňující lymfatickou absorpci	17
1.4.1. Vliv lipofility účinné látky.....	18
1.4.2. Vliv lékové formy	19
1.4.3. Vliv jídla	20
1.4.4. Vliv animálního modelu	20
1.5. Vliv jídla na vstřebávání abirateron acetátu.....	22
1.6. Podíl lymfatické absorpce na vstřebávání abirateron acetátu a cinakalcetu	22
1.7. Podíl lymfatické absorpce na vstřebávání kanabidiolu.....	23
1.8. Podíl lymfatické absorpce na vstřebávání nilotinibu	24
2. Hypotézy a cíle práce.....	25
3. Metody	26
3.1. Kanylace <i>vena jugularis externa</i>	27
3.2. Měření lymfatické absorpce	28
3.2.1. Kanylace mezenterického lymfatického ductu.....	29
3.2.2. Dávkování a odběry lymfy	30
3.2.3. Parametry lymfatické absorpce a jejich výpočet	31
4. Výsledky	33
4.1. Vliv jídla na vstřebávání abirateron acetátu.....	33
4.2. Podíl lymfatické absorpce na vstřebávání abirateron acetátu a cinakalcetu	33
4.3. Podíl lymfatické absorpce na vstřebávání kanabidiolu.....	35
4.4. Podíl lymfatické absorpce na vstřebávání nilotinibu	36
5. Diskuze	37
5.1. Vliv jídla na vstřebávání abirateron acetátu.....	37
5.2. Podíl lymfatické absorpce na vstřebávání abirateron acetátu a cinakalcetu	37

5.3.	Podíl lymfatické absorpce na vstřebávání kanabidiolu	38
5.4.	Podíl lymfatické absorpce na vstřebávání nilotinibu	39
6.	Závěr	40
7.	Použitá literatura	41
8.	Seznam příloh	45

Seznam zkratek

1. LF UK	První lékařská fakulta Univerzity Karlovy
AUC	Plocha pod křivkou (area under the curve)
C_{\max}	Maximální koncentrace
F	Biologická dostupnost
F_{AL}	Absolutní biologická dostupnost lymfou
F_{AP}	Absolutní biologická dostupnost portální krví
F_{RL}	Relativní biologická dostupnost lymfou
HIV	Virus lidské imunitní nedostatečnosti (human immunodeficiency virus)
LP	Lipoproteiny
MG	Monoglyceridy
RER	Hrubé endoplazmatické retikulum (rough endoplasmic reticulum)
SER	Hladké endoplazmatické retikulum (smooth endoplasmic reticulum)
TG	Triglyceridy
THC	Tetrahydrokanabinol
VŠCHT	Vysoká škola chemicko-technologická v Praze

Seznam vlastních publikací

Sumární IF = 57,208

1. Šalamúnová P, Krejčí T, **Ryšánek P**, Saloň I, Kroupová J, Hubatová-Vacková A, Petřík J, Grus T, Lukáč P, Kozlík P, Křížek T, Dammer O, Beránek J, Šíma M, Slanař O, Štěpánek F. Serum and lymph pharmacokinetics of nilotinib delivered by yeast glucan particles per os. *Int J Pharm.* 2023 Jan 21;634:122627. doi: 10.1016/j.ijpharm.2023.122627. Epub ahead of print. PMID: 36693484. **(IF: 6,510)**
2. Hartinger JM, **Ryšánek P**, Slanař O, Šíma M. Pharmacokinetic principles of dose adjustment of mTOR inhibitors in solid organ transplanted patients. *J Clin Pharm Ther.* 2022 Sep;47(9):1362-1367. doi: 10.1111/jcpt.13753. Epub 2022 Aug 7. PMID: 35934622. **(IF: 2,145)**
3. Hriňová E, Skořepová E, Čerňa I, Královičová J, Kozlík P, Křížek T, Roušarová J, **Ryšánek P**, Šíma M, Slanař O, Šooš M. Explaining dissolution properties of rivaroxaban cocrystals. *Int J Pharm.* 2022 Jun 25;622:121854. doi: 10.1016/j.ijpharm.2022.121854. Epub 2022 May 25. PMID: 35623488. **(IF: 6,510)**
4. Jelínek P, Roušarová J, **Ryšánek P**, Ježková M, Havlůjová T, Pozniak J, Kozlík P, Křížek T, Kučera T, Šíma M, Slanař O, Šooš M. Application of Oil-in-Water Cannabidiol Emulsion for the Treatment of Rheumatoid Arthritis. *Cannabis Cannabinoid Res.* 2022 Nov 4. doi: 10.1089/can.2022.0176. Epub ahead of print. PMID: 36342775. **(IF: 4,786)**
5. 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 Mar 15;14(3):643. doi: 10.3390/pharmaceutics14030643. PMID: 35336017; PMCID: PMC8955109. **(IF: 6.525)**
6. Šíma M, Bobek D, Cihlářová P, **Ryšánek P**, Roušarová J, Beroušek J, Kuchař M, Vymazal T, Slanař O. Factors Affecting the Metabolic Conversion of Ciprofloxacin and Exposure to Its Main Active Metabolites in Critically Ill Patients: Population Pharmacokinetic Analysis of Desethyle Ciprofloxacin. *Pharmaceutics.* 2022 Aug

- 4;14(8):1627. doi: 10.3390/pharmaceutics14081627. PMID: 36015253; PMCID: PMC9413960. (IF: 6.525)
7. **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 Dec;178(23):4663-4674. doi: 10.1111/bph.15644. Epub 2021 Sep 10. PMID: 34365639. (IF: 9,473)
 8. Šíma M, Michaličková D, **Ryšánek P**, Cihlářová P, Kuchař M, Lžičařová D, Beroušek J, Hartinger JM, Vymazal T, Slanař O. No Time Dependence of Ciprofloxacin Pharmacokinetics in Critically Ill Adults: Comparison of Individual and Population Analyses. *Pharmaceutics.* 2021 Jul 27;13(8):1156. doi: 10.3390/pharmaceutics13081156. PMID: 34452118; PMCID: PMC8402031. (IF: 6.525)
 9. Boleslavská T, Rychecký O, Krov M, Žvátora P, Dammer O, Beránek J, Kozlík P, Křížek T, Hořínková J, **Ryšánek P**, Roušarová J, Canová NK, 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 Sep 25;22(6):122. doi: 10.1208/s12248-020-00505-5. PMID: 32978690. (IF: 4,009)
 10. **Ryšánek P**, Grus T, Šíma M, Slanař O. Lymphatic Transport of Drugs after Intestinal Absorption: Impact of Drug Formulation and Physicochemical Properties. *Pharm Res.* 2020 Aug 7;37(9):166. doi: 10.1007/s11095-020-02858-0. PMID: 32770268. (IF: 4,200)
 11. 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. doi: 10.14712/23362936.2019.5. PMID: 31103048.

Přednášky na odborných konferencích:

1. **Ryšánek P**, Jelínek P, Roušarová J, Ježková M, Havlůjová T, Pozniak J, Kozlík P, Křížek T, Kučera T, Šíma M, Slanař O, Šoš M. 2022. Lymphatic absorption of cannabidiol: in vivo study in rats. 70. česko-slovenské farmakologické dni
2. **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. 2022

Validity of cycloheximide chylomicron flow blocking method for the evaluation of lymphatic transport of drugs. 70. česko-slovenské farmakologické dni (*Představení vítězné publikace v soutěži ČSEKFT o nejlepší publikaci za rok 2021 v kategorii Experimentální farmakologie*)

3. **Ryšánek P**, Boleslavská T, Rychecký O, Krov M, Žvátora P, Dammer O, Beránek J, Kozlík P, Křížek T, Hořínková J, Roušarová J, Canová NK, Šíma M, Slanař O, Štěpánek F. 2021. Development of novel bioavailability enhancing Oil marbles formulation of abiraterone acetate – in vivo preclinical testing. 8th European Virtual Congress of Pharmacology (EPHAR 2021)
4. **Ryšánek P**, Grus T, Šíma M, Slanař O. 2020. Lymfatická absorpce léčiv: vývoj modelu pro in vivo testování a první zkušenosti. Květinův den 2020
5. **Ryšánek P**, Grus T, Šíma M, Slanař O. 2019 Vývoj modelu pro in-vivo testování lymfatické absorpce na potkanech. 69. česko-slovenské farmakologické dny

Počet citací dle Web of Science ke dni 20. 2. 2022 (s vyloučením autocitací): 21

Poděkování

Na tomto místě bych rád poděkoval svému školiteli doc. PharmDr. Martinu Šímovi, Ph.D. za odborné rady, všestrannou pomoc a vedení. Dále děkuji přednostovi Farmakologického ústavu 1. LF UK a VFN, prof. MUDr. Ondřeji Slanařovi, Ph.D., a všem kolegům za podnětnou spolupráci. Také děkuji všem spoluautorům publikací, bez jejichž kooperace by některé části práce nebylo možné realizovat. Poděkování patří také mé rodině za trpělivost a podporu během studia.

1. Literární úvod

Absorpce léčiv z gastrointestinálního traktu po perorálním podání je důležitým farmakokinetickým procesem, který má v konečném důsledku vliv na účinnost a bezpečnost podávaných aktivních látek. Výrazná intra- a interindividuální variabilita způsobená rozdílnou absorpcí nalačno či po jídle, lékovými interakcemi, silnou závislostí absorpce na pH v gastrointestinálním traktu atp. ohrožuje pacienty nedosažením terapeutické odpovědi nebo naopak předávkováním a rozvojem nežádoucích účinků. Tato dizertační práce se zabývá faktory, které ovlivňují vstřebávání vybraných léků s nízkou a variabilní absorpcí po perorálním podání.

1.1. Lymfatická absorpce

Výrazná část této dizertační práce pojednává o lymfatické absorpci léčiv. Lymfatická absorpce léčiv je vstřebávání účinných látek z gastrointestinálního traktu do mezenterického (intestinálního) lymfatického systému [O'Driscoll, 2002; Porter et al., 2007; Trevaskis et al., 2015]. Jedná se o cestu absorpce, která je paralelní ke klasickému vstřebávání léků ze střeva do systémové cirkulace portálním cévním řečištěm. Léky, které se vstřebají do mezenterické lymfy putují spolu s lymfou drobnými intestinálními lymfatickými cévami, které se sdružují do stále větších kmenů. Cestou projdou několika etážemi mízních uzlin, až dorazí do hrudního mízovodu (*ductus thoracicus*), což je hlavní a největší lymfatická céva v lidském těle. Hrudní mízovod následně ústí do systémového krevního řečiště při soutoku levé *vena subclavia* a *vena jugularis interna*. Veškerá lymfa, která je vytvářena ve střevních kličkách, se tak nakonec dostává do systémového krevního řečiště. Léky zde obsažené však, na rozdíl od léků vstřebaných klasicky do portální krve, neprocházejí játry a nejsou tak vystaveny riziku časného a extenzivního odbourávání. To může mít výrazný efekt na celkovou farmakokinetiku léčiva, zejména na rozsah biologické dostupnosti.

1.2. Význam lymfatické absorpce

Míra lymfatické absorpce zásadním způsobem ovlivňuje farmakokinetické i farmakodynamické vlastnosti léčiv. Jak již bylo zmíněno v předchozím odstavci, látky, které jsou rychle a efektivně metabolizovány v játrech, se průchodem lymfou tomuto metabolismu

vyhnu. U některých léků je tento fenomén dokonce tak výrazný, že veškerá látka, která je po absorpci ve střevě transportována portální krví, je eliminována, a do systémového řečiště doputuje pouze frakce transportována lymfou. Konkrétními příklady takových léků jsou pohlavní hormon testosteron, jeho derivát testosteron undekanoát a další podobný syntetický derivát metylnortestosteron undekanoát [Shackleford et al., 2003; White et al., 2009].

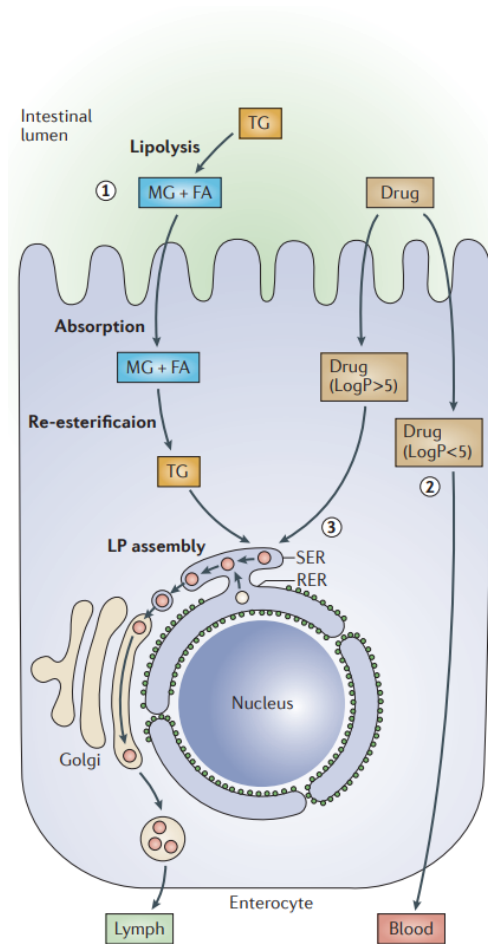
Lymfatická absorpce může zvýšit systémovou biologickou dostupnost léčiva i bez ohledu na míru eliminace při prvním průchodu látky. U několika silně lipofilních léčiv byla popsána zvýšená biologická dostupnost po jídle, která byla ve velké míře zapříčiněna zvýšenou lymfatickou absorpcí. Bylo to tak na příklad u cytostatické perorálně podávané látky venetoklaxu [Choo et al., 2014]. Vliv jídla na lymfatickou absorpci je podrobně diskutován dále v textu.

Vedle farmakokinetických důsledků lymfatické absorpce jsou neméně důležité důsledky farmakodynamické. Lymfatický systém včetně jeho intestinální části obsahuje řadu buněk a tkání imunitního systému, které jsou hlavními cílovými strukturami důležitých lékových skupin, jako jsou na příklad imunopresiva a léky proti infekci HIV. Zvýšená koncentrace těchto léků v lymfě proto může vést ke zvýšení účinnosti, navíc při zachování nízké expozice v krvi. Bohužel existuje zatím jen velmi omezený počet studií, které exaktně korelují lymfatickou absorpci léčiv s jejich farmakodynamickým účinkem [Han et al., 2016; Yoshida et al., 2016]. Potenciál je však podle teoretických předpokladů značný. Léky a lékové formy, které se vstřebávají preferenčně do lymfy, zde dosahují o dva až tři řády vyšších koncentrací než v krevní plazmě.

1.3. Mechanismus prostupu léků do mezenterické lymfy

Podle doposud provedených studií a dostupných dat se zdá, že všechny procesy určující, zda se léčivo bude vstřebávat preferenčně do krve či do lymfy se odehrávají v buňkách střevního epitelu – enterocytech [Trevaskis et al., 2015]. Hydrofilní a slabě lipofilní látky procházejí volně cytolem těchto buněk a na druhém pólu jsou uvolněny do mezibuněčného prostoru, ze kterého difundují do krevních kapilár (**Obr. 1**). Silně lipofilní látky jsou naproti tomu zavzaty do buněčných organel, zejména do hladkého endoplazmatického retikula. Zde probíhá tvorba lipoproteinů specifických pro střevo, tzv. chylomikronů, které sestávají z fosfolipidové membrány, objemově malé, ale funkčně důležité, složky proteinů a z lipofilního jádra tvořeného především triglyceridy, do kterého jsou inkorporovány další silně lipofilní látky včetně léčiv. Chylomikrony jsou následně transportovány systémem Golgiho

aparátu směrem k bazálnímu pólu buňky a secernovány do mezibuněčného prostoru. Jsou příliš velké na to, aby prostoupily stěnu krevních kapilár, a proto vstupují do lymfatických kapilár (tzv. lakteálů), které mají prostupnější cévní stěnu.



Obr. 1: Proces vstřebávání léků do buněk střevní výstelky (enterocytů) a jejich transport do krve či lymfy. Převzato z Trevaskis et al. 2015 [Trevaskis et al., 2015]. TG – triglyceridy, MG – monoglyceridy, SER – hladké endoplazmatické retikulum, RER – hrubé endoplazmatické retikulum, LP – lipoproteiny.

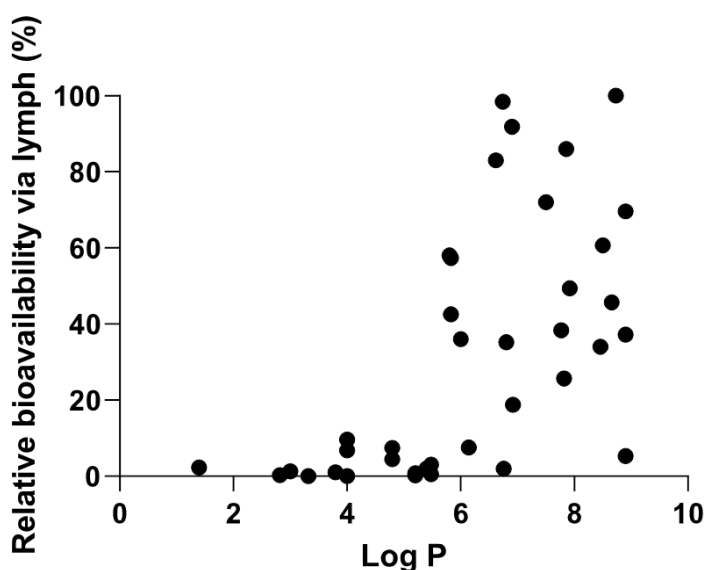
1.4. Faktory ovlivňující lymfatickou absorpci

Farmakokinetika léčiv v lymfě není, na rozdíl od farmakokinetiky v krvi, u většiny látek prozkoumaná. Studium léků, u kterých jsou lymfatické parametry k dispozici, však již bylo možné popsat faktory, které mají na rozsah lymfatické absorpce zásadní vliv [Rysanek et al., 2020].

1.4.1. Vliv lipofility účinné látky

Vůbec nejdůležitějším faktorem určujícím rozsah lymfatické absorpce je rozpustnost účinné látky v tucích. Je již dlouho známo, že silně lipofilní složky výživy jako jsou triglyceridy, cholesterol, vitamin D a podobné jsou ze střeva velkou měrou vstřebávány lymfou vázané v chylomikronech [Blomstrand and Forsgren, 1968; Lee et al., 1968]. Naopak hydrofilní složky výživy jako jsou sacharidy a aminokyseliny jsou vstřebávány přednostně cestou *vena portae* a jejich koncentrace v lymfě jsou nízké [Borgstrom and Laurell, 1953]. Není překvapující, že u léků můžeme vysledovat podobný vztah, tj. silně lipofilní látky jsou vstřebávány lymfou ve značné míře, zatímco hydrofilní nikoliv.

Rozpustnost chemické sloučeniny v tucích lze objektivně popsat pomocí rozdělovacího koeficientu oktanol/voda vyjádřeného na logaritmické škále jako hodnota Log P. Hodnota Log P = 0 znamená, že látka po ustanovení rovnováhy dosáhla v oktanolu stejné koncentrace jako ve vodě. Log P > 0 značí lipofilitu a Log P < 0 naopak hydrofilitu. Stran lymfatické absorpce léčiv bylo již v polovině 80. let pozorováno, že do lymfy se ve významné míře vstřebávají pouze látky s Log P > 5, tj. látky velmi silně lipofilní, které dosahují v oktanolu koncentrací více než 100 000 krát vyšších než ve vodě [Charman and Stella, 1986]. Toto pozorování potvrdila systematická analýza dat všech dostupných měření provedená o mnoho let později na našem pracovišti [Rysanek et al., 2020]. Vztah hodnoty Log P a relativní biologické dostupnosti léčiva lymfou (viz. níže – metody) je znázorněn na **Obr. 2**.

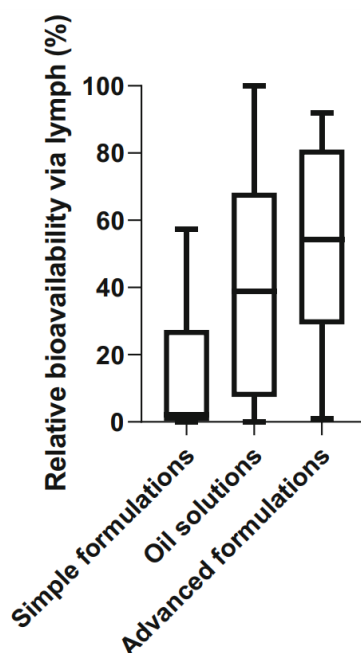


Obr. 2: Vztah míry lymfatické absorpce vyjádřené jako relativní biologická dostupnost lymfou (viz. níže – metody) a hodnoty Log P podávaného léčiva. Data pocházejí z animálních

in vivo studií systematicky analyzovaných v roce 2020 [Rysanek et al., 2020]. Každý bod reprezentuje jednu účinnou látku.

1.4.2. Vliv lékové formy

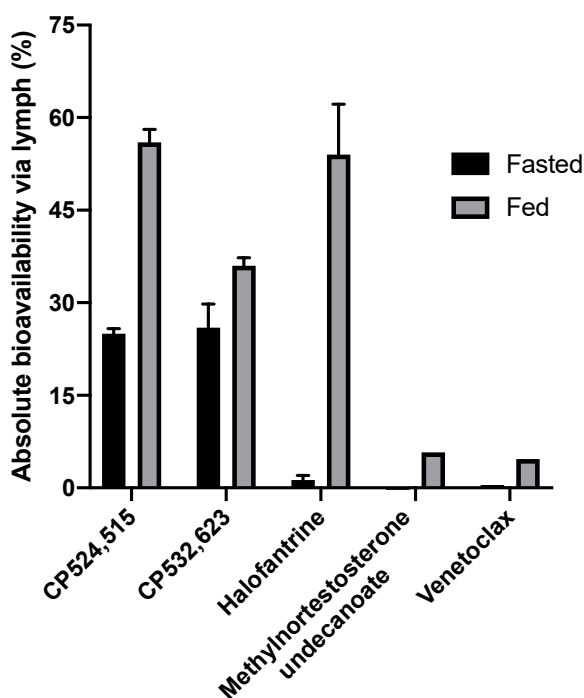
Bylo prokázáno, že míra lymfatické absorpce léčiv koreluje s kvantitou triglyceridů transportovaných v lymfě [Porter et al., 1996]. Pokud jsou triglyceridy součástí lékové formy, vstřebávají se do mezenterické lymfy a podporují lymfatickou absorpci účinné látky. Léky podávané v olejových roztocích či jiných lipidových formulacích proto vykazují vyšší lymfatickou absorpci než léky podávané v obyčejných formulacích bez přítomnosti lipidů. Tento vztah je znázorněn na **Obr. 3**.



Obr. 3: Vliv lékové formy na míru lymfatické absorpce léčiv. Na grafu je znázorněn medián, minimum, maximum a mezikvartilové rozpětí relativní biologické dostupnosti lymfou. Data pocházejí z animálních *in vivo* studií systematicky analyzovaných v roce 2020 [Rysanek et al., 2020]. Jednoduché formulace (*simple formulations*) jsou tablety či vodné roztoky. Jako oleje (*oil solutions*) byly nejčastěji používány slunečnicový, olivový a arašídový olej. Pokročilé lékové formy (*advanced formulations*) zahrnují mikroemulze, nanoemulze, micely, pevné lipidové nanočástice a podobné (vždy obsahují lipidy).

1.4.3. Vliv jídla

Jak již bylo zmíněno, přítomnost lipidů v gastrointestinálním traktu a následně v mezenterické lymfě zvyšuje lymfatickou absorpci léčiv. Podání léků s jídlem, zejména pokud obsahuje hodně tuků, proto podporuje jejich vstřebávání do lymfy. Kvůli metodologické náročnosti existuje jen velmi málo studií exaktně srovnávajících lymfatickou absorpci nalačno a po jídle. Jejich výsledky jsou však přesvědčivé (**Obr. 4**).

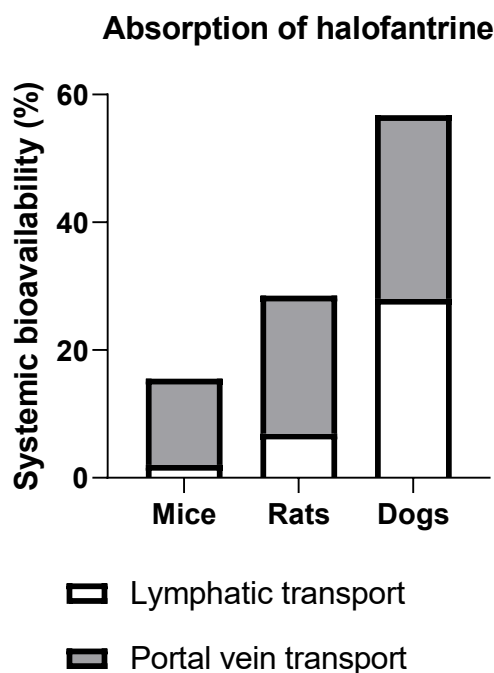


Obr. 4: Lymfatická absorpce několika vybraných léčiv (průměr ± směrodatná odchylka) vyjádřená jako absolutní biologická dostupnost lymfou (viz. dále - metody) při podání nalačno a po jídle s obsahem tuků [Khoo et al., 2001; White et al., 2009; Trevaskis et al., 2010; Choo et al., 2014].

1.4.4. Vliv animálního modelu

Měření lymfatické absorpce léčiv je invazivní a vyžaduje chirurgickou kanylaci lymfatických cest (viz. dále – metody). Z etických důvodů je proto v současnosti prováděno pouze na animálních modelech, nejčastěji na potkanech. Znalost rozdílů v lymfatické absorpci léčiv u jednotlivých druhů zvířat, která jsou používána, je sěžejní pro alespoň přibližnou extrapolaci získaných dat na člověka.

Bylo zjištěno, že lymfatická absorpce léčiv stoupá se stoupající tělesnou hmotností zvířecího druhu [Trevaskis et al., 2013]. Stoupá jak absolutní biologická dostupnost lymfou, tj. procento podaného léku, které se objeví v mezenterické lymfě, tak i relativní podíl na celkové biologické dostupnosti (**Obr. 5**).



***Obr. 5:** Průměrná biologická dostupnost modelové látky halofantrinu po enterálním podání s odlišeným příspěvkem lymfatické absorpce a klasické absorpce cestou portální žíly u různých zvířecích druhů. Data převzata z práce Trevaskis et al. 2013 [Trevaskis et al., 2013].*

Později byla odvozena rovnice, která na základě absolutní biologické dostupnosti lymfou změřené u jednoho zvířecího druhu umožňuje tato data extrapolovat na jiné zvířecí druhy [Trevaskis et al., 2020]:

$$F_{AL} = a M^{0.3}$$

kde F_{AL} je absolutní biologická dostupnost lymfou, a je konstanta a M je tělesná hmotnost zvířecího druhu. Po dosazení příslušných hodnot lze odhadnout, že lymfatická

absorpce léčiva u člověka vyjádřená jako absolutní biologická dostupnost lymfou je zhruba čtyřikrát vyšší než lymfatická absorpce změřená u potkana.

V následujících odstavcích je shrnut literární úvod k článkům, jejichž komentovaný přehled je předmětem této dizertační práce.

1.5. Vliv jídla na vstřebávání abirateron acetátu (příloha 1)

Abirateron acetát je moderní léčivo využívané k terapii karcinomu prostaty rezistentního na kastraci. Je podáván perorálně a patří mezi léky s vůbec nejvyšším popsáním pozitivním vlivem jídla na absorpci. C_{max} a AUC se v klinické studii u zdravých dobrovolníků zvýšily 17krát, respektive 10krát při podání současně s jídlem o vysokém obsahu tuků [Chi et al., 2015]. To vedlo k doporučení podávat lék nalačno, aby se předešlo příliš vysoké expozici. Jako možné mechanismy zvýšení biologické dostupnosti abirateronu po jídle byly diskutovány facilitované rozpouštění silně lipofilního abirateronu ve střevě za přítomnosti lipidů z potravy a podpora rychlé konverze abirateron acetátu na volný abirateron, kterým je následně přesycena gastrointestinální tekutina, což vytváří hnací sílu pro vstřebávání účinné látky do střevní sliznice [Stappaerts et al., 2015; Schultz et al., 2020].

Tým chemiků z pražské VŠCHT vyvinul novou lékovou formu abirateron acetátu založenou na enkapsulaci malých kapének oleje s rozpuštěnou účinnou látkou do kuliček se stěnou tvořenou pevnými částicemi (oil marbles). Tato lipidová léková forma skýtala potenciál snížit či odstranit pozitivní vliv jídla na vstřebávání abirateronu, mimo jiné lepším rozpouštěním účinné látky v přítomných lipidech v porovnání se základní, nelipidickou formou.

1.6. Podíl lymfatické absorpce na vstřebávání abirateron acetátu a cinakalcetu (příloha 2)

Jak již bylo popsáno výše, abirateron acetát je lék, jehož vstřebávání z gastrointestinálního traktu je velmi silně pozitivně ovlivněno jídlem. Zároveň se jedná o látku značně lipofilní. Jeho odhadovaná hodnota Log P se udává v rozmezí 4-5. Oba tyto faktory by mohly být spřaženy s vysokou lymfatickou absorpcí.

Cinakalcet je moderní léčivo, kalcimimetikum, které je používáno k terapii hyperparatyreózy. Je velmi silně lipofilní (Log P 6,5). Po perorálním podání u člověka

vykazuje pozitivní vliv jídla na vstřebávání, i když tento není zdaleka tak významný jako u předešlého abirateron acetátu. Při podání s jídlem se biologická dostupnost cinakalcetu zvyšuje o 50-70% v závislosti na obsahu tuků [Padhi et al., 2007]. Proto se doporučuje pravidelné dávkování s jídlem nebo krátce po něm. Silná lipofilita a pozitivní vliv jídla by opět mohly být spojeny s významnou lymfatickou absorpcí.

1.7. Podíl lymfatické absorpce na vstřebávání kanabidiolu (příloha 3)

Kanabidiol je po tetrahydrokanabinolu (THC) druhým nejzastoupenějším kanabinoidem v konopí. Je registrován jako účinné léčivo pro léčbu některých typů dětské epilepsie (Epidyolex®). Zároveň je součástí hustého extraktu z konopí, který je registrován k terapii spasticity způsobené roztroušenou sklerózou (Sativex®). V posledních letech je to též oblíbená složka různých doplňků stravy.

Kanabidiol, na rozdíl od THC, nevykazuje výrazné psychoaktivní účinky. Má však účinky imunomodulační [Kaur et al., 2020]. Jeho vazba na CB2 receptory snižuje produkci prozánětlivých cytokinů a autoprotilátek, čehož by mohlo být v budoucnu využito k terapii autoimunitních, popřípadě i jiných onemocnění, jejichž patogeneze významnou měrou zahrnuje aktivaci imunitního systému.

Farmakokinetika kanabidiolu po perorálním a intravenózním podání byla zkoumána u laboratorních zvířat i u člověka [Ohlsson et al., 1986; Samara et al., 1988; Izgelov et al., 2020]. V jedné práci byla změřena i koncentrace kanabidiolu v mezenterické lymfě, která byla 250krát vyšší než koncentrace v plazmě [Zgair et al., 2017]. Přesná kvantifikace lymfatické absorpce však zatím provedena nebyla. Při tom se jedná u této konkrétní látky o důležitý údaj s ohledem na její výše zmíněné účinky na imunitní systém. Kanabidiol je silně lipofilní látka (Log P 6,3), což vede k předpokladu, že její lymfatická absorpce bude signifikantní. Navíc, stejně jako u abirateronu a cinakalcetu, je u něj popsán silný pozitivní vliv jídla [Taylor et al., 2019]. Jak AUC, tak C_{max} se u zdravých dobrovolníků při podání po jídle zvýšily zhruba čtyřikrát v porovnání se stavem nalačno.

Tým chemiků z pražské VŠCHT připravil tři formulace kanabidiolu vhodné k otestování – slunečnicový olej (referenční formulace), mikroemulzi a nanoemulzi.

1.8. Podíl lymfatické absorpce na vstřebávání nilotinibu (příloha 4)

Nilotinib je látka ze skupiny tyrozin kinázových inhibitorů registrovaná a používaná v terapii chronické myeloidní leukémie pozitivní na filadelfský chromosom [Zhang et al., 2014]. Nilotinib je velmi špatně rozpustný ve vodě (Log P ~4,5) a vykazuje limitovanou biologickou dostupnost kolem 30%. Jídlo s vysokým obsahem tuků zvyšuje biologickou dostupnost na zhruba dvojnásobek [Tian et al., 2018]. Tyto parametry by mohly látku předurčovat k absorpci lymfatickými cestami.

Tým chemiků z pražské VŠCHT vyvinul novou lékovou formu nilotinibu založenou na enkapsulaci účinné látky do glukonových částic, tj. stromatu získaného z kvasinkových buněk. To zvyšuje rozpustnost enkapsulované látky její amorfizací [Salamunova et al., 2021]. Navíc byla na základě *in vitro* i *in vivo* studií již dříve popsána fagocytóza glukonových částic makrofágy a jejich koncentrace v lymfatických orgánech [Wu et al., 2020]. Nilotinib enkapsulovaný v glukonových částicích by proto mohl být absorbován do mezenterické lymfy hned dvěma mechanismy, a to difúzí na základě svých fyzikálně-chemických vlastností a fagocytózou a transportem v buňkách imunitního systému.

2. Hypotézy a cíle práce

Předmětem postgraduálního studia vedoucího k vypracování této dizertační práce byl vývoj metod pro *in vivo* zkoumání farmakokinetiky látek včetně měření lymfatické absorpce a jejich aplikace při testování moderních účinných látek a nových lékových formulací. Během experimentální práce byly stanoveny a testovány tyto hypotézy:

- 1) Perorální podání abirateron acetátu ve formě olejových kuliček (oil marbles) povede ke zvýšení jeho biologické dostupnosti a snížení vlivu jídla. (příloha 1)
- 2) Abirateron acetát jakožto silně lipofilní látka s výrazným pozitivním vlivem jídla, se bude ve velké míře vstřebávat lymfatickou cestou. (příloha 2)
- 3) Cinakalcet jakožto silně lipofilní látka s výrazným pozitivním vlivem jídla, se bude ve velké míře vstřebávat lymfatickou cestou. (příloha 2)
- 4) Kanabidiol jakožto silně lipofilní látka s výrazným pozitivním vlivem jídla, se bude ve velké míře vstřebávat lymfatickou cestou. (příloha 3)
- 5) Perorální podání nilotinibu enkapsulovaného v glukanových částicích povede ke zvýšení jeho biologické dostupnosti, za které bude alespoň z části odpovídat zvýšení lymfatické absorpce. (příloha 4)

Cílem práce bylo:

- 1) Porovnat biologickou dostupnost abirateronu po podání abirateron acetátu ve formě referenčního přípravku a nové formulace olejových kuliček (oil marbles) nalačno a po jídle. (příloha 1)
- 2) Změřit lymfatickou absorpci abirateronu po podání abirateron acetátu ve formě referenčního přípravku a nové formulace olejových kuliček (oil marbles). (příloha 2)
- 3) Změřit biologickou dostupnost a lymfatickou absorpci cinakalcetu po podání v základním olejovém roztoku. (příloha 2)
- 4) Změřit biologickou dostupnost a lymfatickou absorpci kanabidiolu po podání ve slunečnicovém oleji a ve formě mikroemulze. (příloha 3)
- 5) Změřit biologickou dostupnost a lymfatickou absorpci nilotinibu po podání ve formě referenčního přípravku a ve formě glukanových částic. (příloha 4)

3. Metody

Metody využití k získání diskutovaných výsledků jsou podrobně popsány v příložených publikacích. Zde jsou popsány jen stěžejní *in vivo* postupy použité napříč těmito studiemi.

Studium farmakokinetiky v *in vivo* experimentech na animálních modelech nemělo na Farmakologickém ústavu 1. LF UK dlouhou tradici, a tak bylo nejprve nutné vytvořit robustní metodologický aparát.

Farmakokinetické studie v principu vyžadují opakované odběry krve pro podrobné popsání průběhu koncentrací léčiva v čase. K tomuto účelu bylo třeba zajistit u zvířete cévní vstup, tak aby bylo možné popsat celý farmakokinetický profil u každého zvířete zvlášť a tyto profily potom zprůměrovat a dále statisticky vyhodnocovat. Již na začátku byla zahrnuta myšlenka odebírat od různých zvířat krev v různě dlouhých intervalech a vytvářet potom sumární farmakokinetický profil (metoda tzv. sparse samplingu) pro zřejmou nepřesnost této metody plynoucí z často velmi vysoké interindividuální variability zkoumaných jedinců.

Dalším cílem hned od počátku bylo provádět studie v cross-over uspořádání, tj. podat skupině zvířat v jedné periodě jednu zkoumanou formulaci (typicky referenční přípravek) a v druhé periodě druhou zkoumanou formulaci (typicky testovaný přípravek), zatímco ve druhé skupině zvířat pořadí formulací obrátit. Tím se výrazně sníží vliv interindividuální variability a lze prokázat i daleko menší rozdíly ve farmakokinetice podávaných lékových formulací, než by bylo možné u klasického paralelního uspořádání. Správnost tohoto předpokladu se později potvrdila při testování modelové molekuly abirateron acetátu [Kralovicova et al., 2022].

Jako zvíře využívané pro farmakokinetické pokusy byl vybrán laboratorní potkan (kmen Wistar) pro jeho cenovou a celkovou dostupnost. Je to zvíře dostatečně velké na bezproblémové zavedení cévních vstupů. S výhodou je též značné množství dat publikovaných v literatuře, ke kterým je možno vztahovat výsledky experimentů.

Zpočátku byla k zajištění cévního vstupu zvolena *arteria carotis*. Její kanylace je relativně jednoduchá a možná bez nutnosti používat mikroskop. Vysoký tlak krve v cévě navíc usnadňuje odběry. S využitím této techniky bylo provedeno několik úvodních studií [Boleslavská et al., 2020] + příloha 1. Záhy se však ozřejmilo několik zásadních problémů. Katetr zavedený do tepny zapříčinil často její trombotizaci, což vedlo k rozvoji těžkých

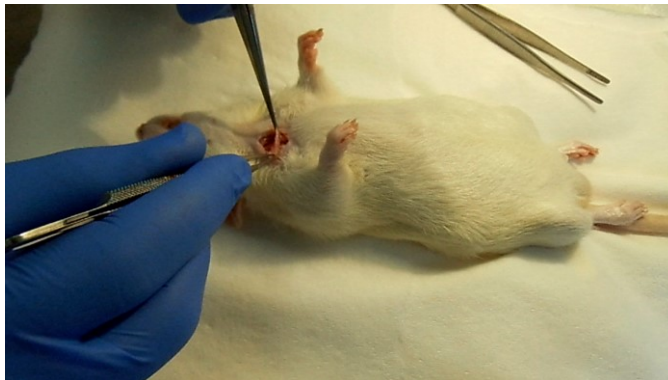
epileptických záchvatů či rovnou ke smrti zvířete. Pokud došlo během experimentu k uvolnění katetru, způsobilo to zas závažné krvácení.

Bylo proto nutné hledat alternativní řešení, kterým se nakonec stala kanylace *vena jugularis externa*. Ta se ukázala jako dobře proveditelná, spolehlivá a daleko bezpečnější. S pomocí této techniky byly provedeny všechny následující studie a je s úspěchem používána dále.

3.1. Kanylace *vena jugularis externa*

U potkana je *vena jugularis externa* dominantní žilou na krku, která je zodpovědná za drenáž většiny krve z oblasti hlavy a krku, na rozdíl od člověka, kde tuto úlohu plní hlouběji uložená *vena jugularis interna*. *Vena jugularis externa* probíhá u potkana v podkoží na přední straně krku a je díky tomu dobře chirurgicky přístupná.

Po oholení a dezinfekci operačního pole je proveden řez dlouhý cca 1 cm na pravé straně krku vzdálený cca 1 cm od střední čáry. Subkutánní tkáň je preparována tupě a separována do stran (**Obr. 6**).

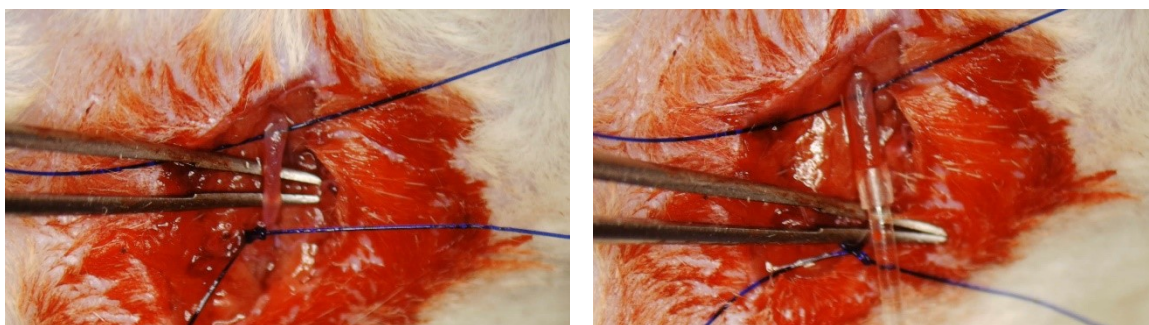


Obr. 6: Operační přístup k pravostranné *vena jugularis externa*.

V podkoží je žíla identifikována jako tmavě fialový pruh probíhající kraniokaudálně. Při dobré náplni má průměr o něco přesahující 1 mm. Ve svém průběhu se postupně rozšiřuje a největší šířky dosahuje kaudálně v místě, kde přebíhá přes klavikulu a zanořuje se do hrudníku. Identifikace je možná při dobrých anatomických poměrech makroskopicky, jindy je nutné užít mikroskop.

Po identifikaci žíly je nutné ji očistit od okolní vazivové a tukové tkáně a částečně izolovat (**Obr. 7**). Kraniálně je žíla podvázána, aby z hlavy již nepřitékala další krev. Kaudálně je

podvaz zatím jen připraven pro pozdější fixaci katetru. Žíla je nastřižena zepředu malými oftalmologickými nůžkami. Do nástřihu je nejprve zavedena kovová cévní sonda pro ozřejmění správného lumen a dostatečnou dilataci nástřihu. Po vytažení sondy je do žíly zaveden vlastní katetr. Je použit měkký polyuretanový katetr o průměru 3 Fr (cca 1 mm) a délce 10 cm.



Obr. 7: Izolovaná vena jugularis externa bez (vlevo) a s již zavedeným katetrem (vpravo). Hlava zvířete je na obrázcích dole.

Po úspěšné kanylaci je katetr tunelizován podkožím kolem krku až na zátylek tak, aby si jej zvíře po probuzení z anestezie nemohlo odstranit **Obr. 8**. Po úspěšné operaci a dvou- až třídní rekonvalescenci jsou zvířata připravena na experiment.

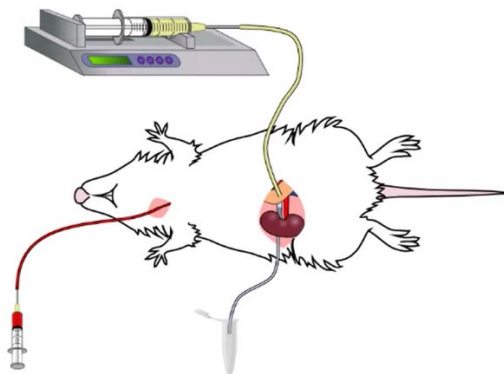


Obr. 8: Jugulární katetr tunelizovaný na zátylek.

3.2. Měření lymfatické absorpce

Součástí většiny publikací komentovaných v této dizertační práci je měření lymfatické absorpce léčiv. To vyžaduje relativně složitý metodologický aparát, který bude popsán v této části textu. Byl zvolen model anestetizovaného potkana se zakanylovaným mezenterickým

lymfatickým duktem již mnoho let úspěšně používaný jinými týmy ve světě [Trevaskis et al., 2015]. Příprava modelu sestává z kanylace mezenterického lymfatického ductu pro odběr lymfy, kanylace duodena pro dávkování zkoumaného léčiva a kanylace jugulární žíly (viz. výše) pro pravidelné odběry krve (**Obr. 9**).



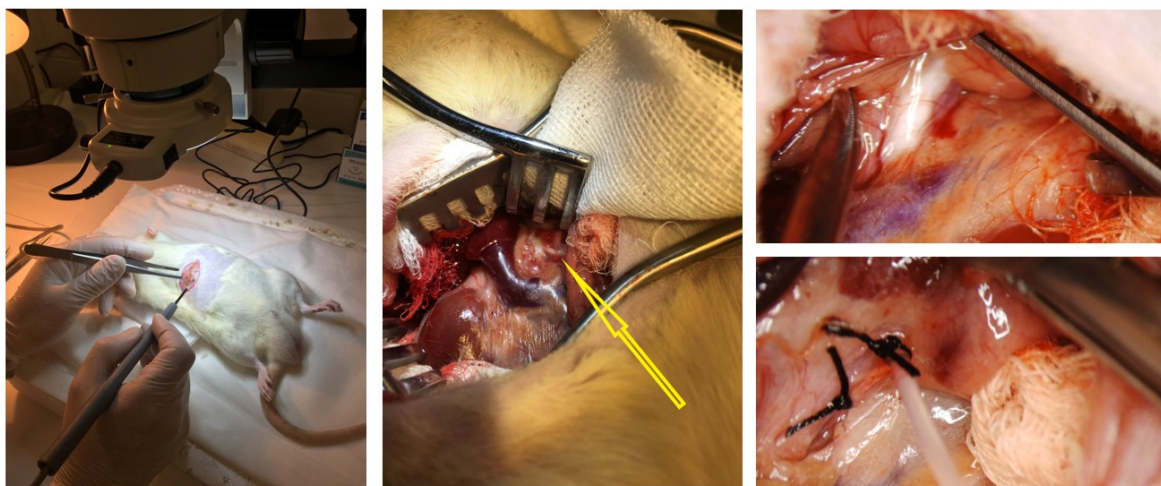
Obr. 9: Schéma modelu trojitě kanylovaného anestezovaného potkana pro měření lymfatické absorpce [Trevaskis et al., 2015].

3.2.1. Kanylace mezenterického lymfatického ductu

U potkana je lymfa produkovaná ve střevních kličkách odváděna jedním mohutným lymfatickým kmenem. Jeho kanylací a sběrem veškeré produkované lymfy je proto možné stanovit celkové množství léčiva vstřebeného lymfatickou cestou za sledovaný časový úsek.

Mezenterická lymfa je za lačného stavu průhledná a lymfatické cévy v mezenteriu jsou prakticky nerozeznatelné od okolní tkáně. Před plánovanou operací (30-60 min) je proto vhodné zvířeti podat perorálně dávku oleje (0,5 – 1 ml). Obsah nově vytvořených chylomikronů zbarví lymfu do mléčně bílé barvy a proces kanylace se výrazně usnadní.

K mezenterickému ductu přistupujeme cestou příčné laparotomie pod pravým žeberním obloukem (**Obr. 10**). Po odtažení střevních kliček směrem vlevo jej lze nalézt mediálně od dolní duté žíly. Duktus nastříháme jemnými oftalmologickými nůžkami, podobně jako bylo popsáno u jugulární žíly, a vsuneme polyetylenový katetr o zevním průměru cca 1 mm. Duktus má velmi jemnou stěnu, která se snadno protrhne. Proto je nutné postupovat velmi opatrně a kanylace ductu je celkově výrazně obtížnější než kanylace jugulární žíly.

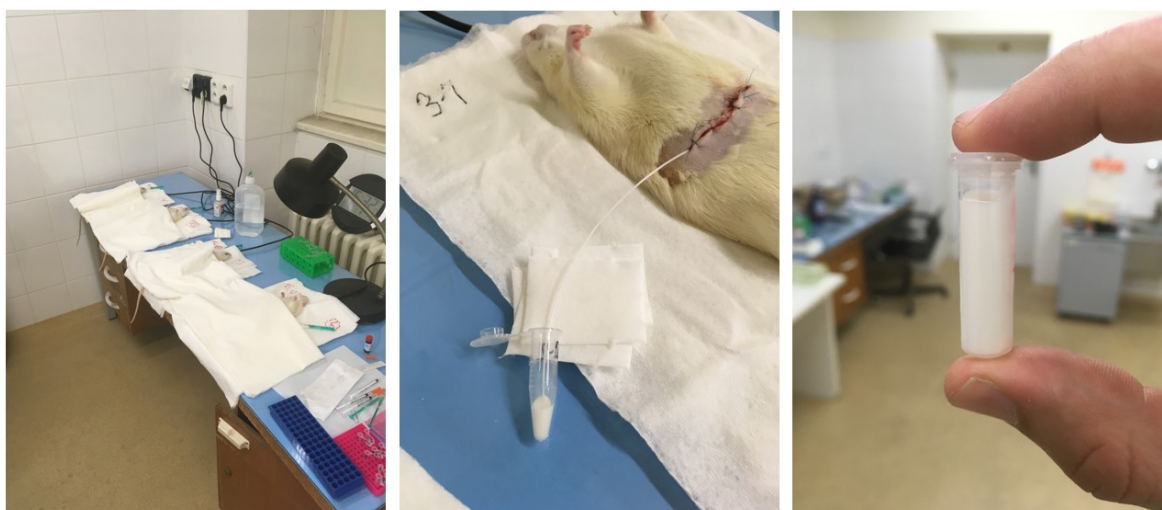


Obr. 10: Kanylace mezenterického lymfatického ductu. **Vlevo** - Operační přístup příčnou laparotomií pod pravým žeberním obloukem. **Uprostřed** - Mezenterický duct (označen šipkou) naplněný bílou lymfou po předchozím perorálním podání olejového roztoku. **Vpravo** – Mezenterický duct pod mikroskopem bez (nahore) a s již zavedeným katetrem (dole).

Po úspěšném zavedení katetru jej v místě fixujeme veterinárním tkáňovým lepidlem. To se osvědčilo mnohem lépe než fixace stehy, protože těmi se ductus často dodatečně poranil a celková úspěšnost operativy byla výrazně nižší. Katetr je vyveden pravým okrajem operační rány. Před zašitím břišní stěny je ještě zaveden duodenální katetr stejných parametrů jako lymfatický katetr pro pozdější dávkování studované lékové formulace. Na konec operace je kanylována *vena jugularis externa* pro odběry krve postupem popsáným výše, pouze bez nutnosti tunelizovat katetr na zátylek.

3.2.2. Dávkování a odběry lymfy

Po dokončení operace potkan zůstává v anestezii. Duodenálním katetrem je podána léková formulace, a v ten okamžik začíná sběr lymfy do připravené zkumavky (**Obr. 11**). Léková formulace je podávána pomalu během cca 30 min, tak aby nedošlo k přetížení gastrointestinálního traktu objemem. Potkan leží na vyhřívané podložce a je pod příkrývkou, aby byl zajištěn tepelný komfort. Po dokončení dávkování lékové formulace je na duodenální katetr napojen perfusor a potkan je kontinuálně enterálně hydratován fyziologickým roztokem rychlostí 3 ml/h. Odběrová zkumavka je měněna každou hodinu a ve stejný čas je též odebírána krev z jugulární žíly. Standardní délka odběrů je osm hodin po nadávkování.



Obr. 11: Pooperační péče a sběr mezenterické lymfy. **Vlevo** – potkani leží na vyhřívaných podložkách a pod příkrývkami, aby se zabránilo podchlazení při pokračující anestezii. **Uprostřed** – veškerá produkovaná mezenterická lymfa odtéká do připravené zkumavky, která je pravidelně měněna. **Vpravo** – Vzorek mezenterické lymfy, který je stále zbarven do bíla po perorálním podání olejového roztoku před zahájením operace. Produkce lymfy ve střevech u potkana je cca 1 ml/h.

3.2.3. Parametry lymfatické absorpce a jejich výpočet

Cílem experimentů zkoumajících lymfatickou absorpci je změřit biologickou dostupnost léčiva a přesně určit, jaká její část jde na vrub transportu cestou mezenterických lymfatických cév a jaká část se transportuje klasicky cestou portální žíly.

V literatuře zatím není užívána jednotná terminologie pro označení parametrů lymfatické absorpce, a tak byl určitý systém vytvořen v naší přehledové práci z roku 2020 [Rysanek et al., 2020]. **Absolutní biologická dostupnost lymfou (F_{AL})** je procento léčivé látky, které se po podání objeví v mezenterické lymfě. Vypočítá se vynásobením koncentrace léčiva stanovené v mezenterické lymfě a objemu lymfy, která je vyprodukována (resp. nasbírána při odběrech).

Absolutní biologická dostupnost portální krvi (F_{AP}) je procento podané léčivé látky, které se objeví v systémové cirkulaci po průchodu portálním cévním řečištěm. Vypočítá se porovnáním AUC léčivé látky v krvi u potkanů se zakanylovaným mezenterickým duktem, tj. u zvířat, kde je systémová expozice léčiva způsobena pouze příspěvkem portálního

cévního řečiště, a AUC léčiva po intravenózním podání u kontrolní skupiny zvířat dle vzorce:

$$F_{AP} = AUC_{ENT} \times D_{IV} / AUC_{IV} \times D_{ENT}$$

kde AUC_{ENT} je AUC po enterálním podání léčiva v dávce D_{ENT} u potkanů se zakanylovaným mezenterickým duktem. AUC_{IV} a D_{IV} jsou analogické veličiny u kontrolní skupiny potkanů dávkovaných intravenózně. **Celková absolutní biologická dostupnost (F)** se vypočítá prostým součtem $F = F_{AL} + F_{AP}$.

Nejhodnotnější informaci o tom, do jaké míry má určitá látka tendenci vstřebávat se lymfatickou cestou, poskytuje parametr **relativní biologická dostupnost lymfou (FRL)**. Je to relativní podíl lymfatické absorpce na celkové biologické dostupnosti léčiva. Vypočítá se dle vzorce $F_{RL} = F_{AL} / F$.

4. Výsledky

Výsledky jsou podrobně popsány v příložených publikacích. Zde je uveden jejich souhrn a jsou přidány některé nepublikované dílčí výsledky a analýzy.

4.1. Vliv jídla na vstřebávání abirateron acetátu (příloha 1)

Abirateron acetát podaný potkanům ve formě olejových kuliček (oil marbles – test) prokázal výrazně vyšší biologickou dostupnost než látka podaná v klasické formě (rozdrcené tablety naplněné do želatinových kapslí – reference). Poměr geometrických průměrů (test vs. reference, 90% konfidenční interval) byl 2,67 (1,66-4,32) pro AUC a 3,98 (2,14-7,40) pro C_{max} . AUC volné molekuly abirateronu se tudíž zvýšilo více než dvaapůlkrát a C_{max} dokonce skoro čtyřikrát.

Podání abirateron acetátu ve formě olejových kuliček též odstranilo jinak patrný pozitivní vliv jídla na vstřebávání abirateronu. Poměr geometrických průměrů (po jídle vs. nalačno, 90% konfidenční interval) po podání reference byl 2,02 (0,87-4,70) pro AUC a 2,39 (1,31-4,34) pro C_{max} . Rozdíl AUC tudíž nedosáhl statistické významnosti z důvodu relativně vysoké míry variability, zatímco rozdíl v C_{max} byl signifikantní. Poměr hodnot AUC a C_{max} po jídle a nalačno po podání testu byl takřka totožný: 1,05 (0,76-1,45), respektive 1,04 (0,58-1,85).

4.2. Podíl lymfatické absorpce na vstřebávání abirateron acetátu a cinakalcetu (příloha 2)

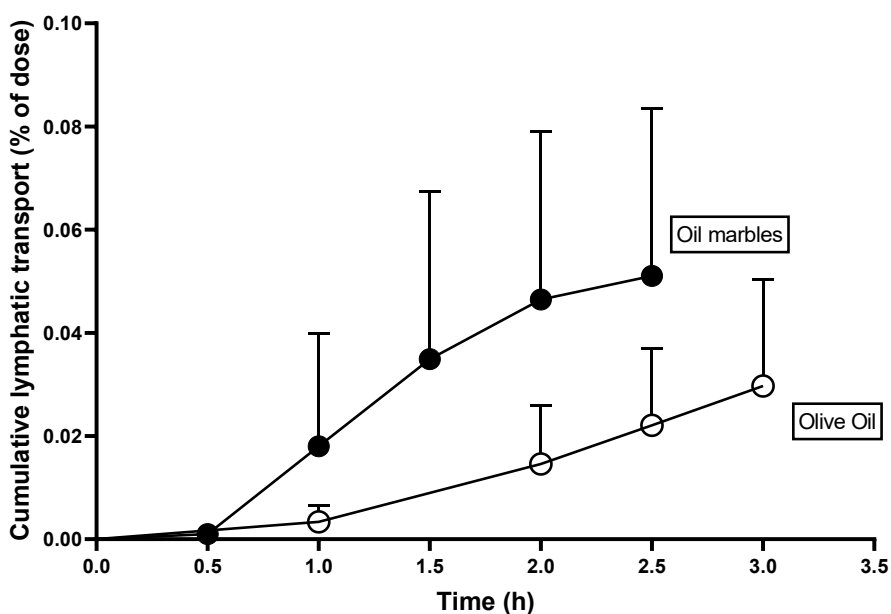
Biologická dostupnost (průměr \pm směrodatná odchylka) abirateronu po podání abirateron acetátu ve formě rozdrcených tablet naplněných do želatinových kapslí byla $21,1 \pm 22,0\%$. Byla tudíž spíše nízká a vykazovala velkou míru variability. Lymfatická absorpce zde hrála jen velmi malou roli. Absolutní biologická dostupnost lymfou byla $0,15 \pm 0,11\%$ a relativní $2,0 \pm 2,1\%$.

Mimo měření lymfatické absorpce pro základní referenční přípravek byly tyto parametry stanoveny též pro olejové kuličky (oil marbles) a pro olejový roztok (olivový olej). Tato data nebyla publikována a budou proto uvedena podrobně zde. Parametry lymfatické absorpce abirateronu po podání abirateron acetátu ve formě olejových kuliček a

v olivovém oleji jsou uvedeny v **Tab. 1**. Kumulativní lymfatický transport abirateronu je prezentován na **Obr. 12**. Formulace olejových kuliček a olivový olej míru lymfatické absorpce nezvýšily. Olivový olej vykázal navíc velmi nízkou celkovou biologickou dostupnost.

Tab. 1: Parametry lymfatické absorpce (průměr ± směrodatná odchylka) abirateronu po podání abirateron acetátu ve formě olejových kuliček ($n=3$, měřený úsek 2,5h) a ve formě olivového oleje ($n=5$, měřený úsek 3h).

	F (%)	F _{AL} (%)	F _{RL} (%)
Olejové kuličky	4,60 ± 0,63	0,05 ± 0,03	1,15 ± 0,72
Olivový olej	0,55 ± 0,16	0,03 ± 0,01	4,87 ± 2,02



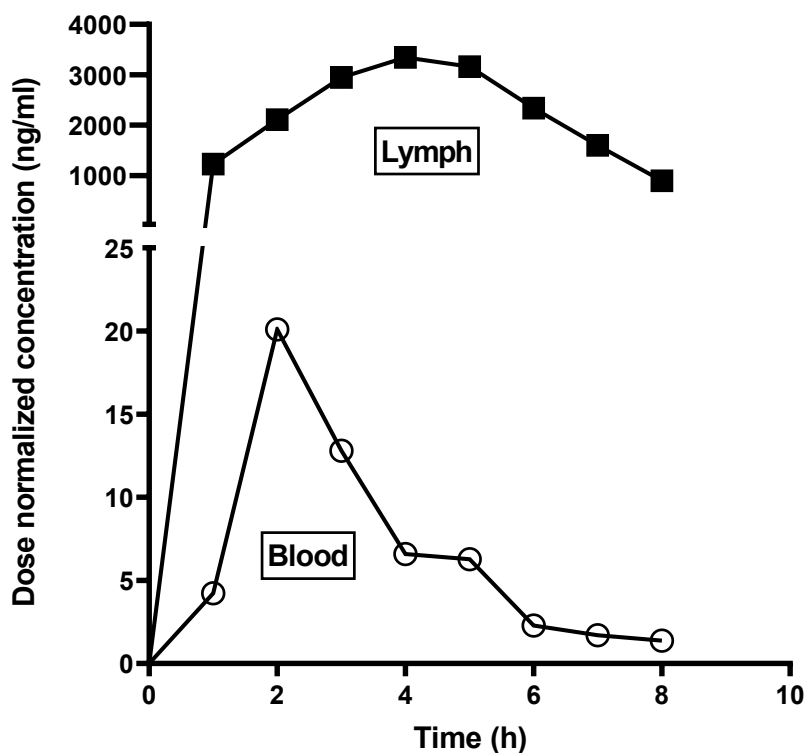
Obr. 12: Kumulativní lymfatický transport (průměr ± směrodatná odchylka) abirateronu po podání abirateron acetátu ve formě olejových kuliček ($n=3$, plná kolečka) a ve formě olivového oleje ($n=5$, prázdná kolečka).

Celková biologická dostupnost (průměr směrodatná ± odchylka) cinacalcetu, druhé látky zkoumané v této studii, za osm hodin odběrů byla pouze $3,7 \pm 1,6\%$. Lymfatická absorpce na ní ale měla zásadní podíl. Absolutní biologická dostupnost lymfou byla $0,71 \pm 0,35\%$ a relativní biologická dostupnost lymfou byla $21,0 \pm 8,4\%$. Z toho plyne, že zhruba

jedna pětina systémově dostupného cinacalcetu prošla mezenterickým lymfatickým systémem.

4.3. Podíl lymfatické absorpce na vstřebávání kanabidiolu (příloha 3)

Lymfatická absorpce kanabidiolu byla vysoká. Kanabidiol dosahoval v lymfě koncentrací o dva až tři řády vyšších než v krvi (**Obr. 13**). Průměrný (\pm směrodatná odchylka) poměr AUC v lymfě a krvi byl 927 ± 320 pro slunečnicový olej a 945 ± 762 pro mikroemulzi. Relativní biologická dostupnost lymfou (průměr \pm směrodatná odchylka) byla $55,3 \pm 8,5\%$ u slunečnicového oleje a $39,2 \pm 27,1\%$ u mikroemulze. Tyto hodnoty se od sebe nelišily signifikantně.



Obr. 13: Srovnání průměrných koncentrací kanabidiolu v mezenterické lymfě a v krvi po podání mikroemulze anestetizovaným potkanům se zakanylovaným mezenterickým duktem ($n=3$). Koncentrace jsou normalizovány na dávku 1 mg/kg. Po podání slunečnicového oleje ($n=3$) byly koncentrace v lymfě obdobné, profil v krvi byl plošší bez vrcholu u 2h – není ukázáno z důvodu celkové přehlednosti.

Celková biologická dostupnost kanabidiolu po podání mikroemulze neuspaným potkanům byla zhruba dvojnásobná oproti slunečnicovému oleji [geometrický průměr (90% konfidenční interval) AUC 153 (142-163) vs. 67 (46-97) ng*h/ml]. S ohledem na to, že relativní biologická dostupnost lymfou se u formulací nelišila signifikantně, lze tento rozdíl přičíst vyšší absorpci kanabidiolu z mikroemulze standardní cestou přímo do krve.

Ještě vyšší celková biologická dostupnost byla pozorována po podání nanoemulze. Geometrický průměr (90% konfidenční interval) AUC byl 254 (228-284) ng*h/ml. Porovnáním s AUC po intravenózním podání v cross-over provedení byla biologická dostupnost vyčíslena na 44,5%.

4.4. Podíl lymfatické absorpce na vstřebávání nilotinibu (příloha 4)

Podání nilotinibu ve formě glukonových částic vedlo k jistému zvýšení jeho biologické dostupnosti oproti referenci (rozdrcené tablety naplněné do želatinových kapslí), i když tento rozdíl nedosáhl statistické významnosti. AUC [geometrický průměr (90% konfidenční interval)] se zvýšilo ze 765 (398-1472) na 1455 (1067-1982) ng*h/ml. C_{max} se zvýšilo ze 78 (38-159) na 137 (103-182) ng/ml. Celková biologická dostupnost (průměr \pm směrodatná odchylka) reference byla pomocí porovnání perorálního a intravenózního podání v cross-over uspořádání stanovena na $35,9 \pm 12,2\%$.

Podání ani jedné formulace nevedlo k signifikantnímu vstřebávání nilotinibu do mezenterické lymfy. Relativní biologická dostupnost lymfou (průměr \pm směrodatná odchylka) byla $0,44 \pm 0,06\%$ u reference a $1,12 \pm 0,93\%$ u glukonových částic. Poměr expozice (AUC) nilotinibu v lymfě a v krvi byl pouze 1,4 po podání reference a 2,75 po podání glukonových částic.

5. Diskuze

Výsledky studií komentovaných v této dizertační práci jsou podrobně diskutovány v příložených publikacích.

5.1. Vliv jídla na vstřebávání abirateron acetátu (příloha 1)

Podání abirateron acetátu ve formě olejových kuliček (oil marbles) výrazně zvýšilo biologickou dostupnost abirateronu. Je to zapříčiněno pravděpodobně zlepšenou disolucí účinné látky ve střevě tím, že již v samotné lékové formě je rozptýlena v malých kapičkách oleje. Léková forma navíc obsahuje surfaktanty, které po uvolnění obsahu kuliček do střeva podporují vznik malých micelárních částic a zastávají tak podobnou úlohu jako žlučové kyseliny [Koziolek et al., 2019]. Lymfatická absorpce se procesu zvýšení biologické dostupnosti neúčastní, protože je u této účinné látky obecně velmi nízká (viz. příloha 2).

Odstranění pozitivního efektu jídla na vstřebávání abirateronu lze vysvětlit stejným mechanismem jako zvýšení jeho biologické dostupnosti. Disperze molekul účinné látky v kapičkách oleje zvyšuje biologickou dostupnost nalačno, čímž se snižuje potenciál pro její další navýšení při přítomnosti tuků dodaných s jídlem.

Zavedení abirateron acetátu do lékové formy olejových kuliček se ukázalo jako vhodná a účinná metoda pro zlepšení absorpční kinetiky abirateronu. Je tedy možné uvažovat o dalším rozvoji této technologie a případné implementaci i u jiných silně lipofilních látek.

5.2. Podíl lymfatické absorpce na vstřebávání abirateron acetátu a cinakalcetu (příloha 2)

Lymfatická absorpce abirateronu je nízká, což bylo prokázáno otestováním hned tří rozdílných lékových formulací. Za tento fakt jsou pravděpodobně zodpovědné vlastnosti samotné účinné látky, nikoli vlastnosti lékových formulací, protože ty byly navzájem velmi odlišné a zahrnovaly různorodou škálu pomocných látek a technologických postupů výroby. Olejové kuličky a olivový olej navíc obsahovaly značné množství lipidů včetně triglyceridů, které lymfatickou absorpci podporují.

Hlavním důvodem nízké lymfatické absorpce abirateronu je pravděpodobně jeho nedostatečně vysoká lipofilita. Nejsou dostupné měřené údaje hodnoty Log P, různými

početními algoritmy jsou však odhadovány na 4-5. Aby byla látka ve významné míře transportována do lymfy, jsou nutné hodnoty > 5 (viz. výše).

Naopak lymfatická absorpce cinakalcetu byla vysoká. Relativní biologická dostupnost lymfou $\sim 20\%$ u potkanů značí pravděpodobně ještě o něco vyšší hodnoty u člověka. Lymfatická absorpce cinakalcetu proto hraje nezanedbatelnou roli při jeho transportu ze střeva do systémové cirkulace a je nejspíše i alespoň z části zodpovědná za významný pozitivní vliv tučného jídla na jeho vstřebávání.

5.3. Podíl lymfatické absorpce na vstřebávání kanabidiolu (příloha 3)

Lymfatická absorpce kanabidiolu se dle očekávání ukázala jako velmi vysoká. Zhruba 50% látky, která se objeví v systémové cirkulaci, předtím prochází mezenterickým lymfatickým systémem. Přitom nebyl významný rozdíl mezi podáním ve slunečnicovém oleji a ve formě mikroemulze. To je dáno pravděpodobně tím, že obě lékové formulace obsahují triglyceridy, které lymfatickou absorpci podporují.

Relativní biologická dostupnost lymfou kolem 50% odpovídá hodnotám pozorovaným u lipofilních látek s vůbec nejvyšším podílem lymfatické absorpce, jako jsou antimalarikum halofantrin (Log P 8,9; $F_{RL} \sim 70\%$) a vitamin D (Log P 7,5; $F_{RL} \sim 72\%$) [Caliph et al., 2000; Dahan and Hoffman, 2005]. Vyšší podíl lymfatické absorpce ($\sim 100\%$) byl popsán pouze u látek, které jsou při prvním průchodu extenzivně metabolizovány v játrech, a jejich frakce vstřebaná cestou portální krve se proto nemůže na celkové biologické dostupnosti vůbec projevit (např. testosteron undekanoát, viz. výše) [Shackleford et al., 2003].

Mikroemulze měla vyšší celkovou biologickou dostupnost než slunečnicový olej. To lze vysvětlit lepší disperzí drobných kapének mikroemulze ve střevním lumen a jejich rychlejší a efektivnější absorpcí do střevní sliznice. Následné zvýšení celkové biologické dostupnosti bylo dáno především klasickým, nelymfatickým transportem. Důvodem je pravděpodobně omezená kapacita syntézy chylomikronů a produkce mezenterické lymfy (ca 1 ml/h), a naopak vysoká transportní kapacita portální krve. Odhaduje se, že průtok krve střevem u potkana je zhruba 500 ml/h [Charman and Stella, 1986].

Kanabidiol podaný ve formě nanoemulze měl perorální celkovou biologickou dostupnost 45%, což je výrazně více, než bylo doposud popsáno u obyčejných olejových lékových forem včetně registrovaných léčivých přípravků ($\sim 10-20\%$) [Zgair et al., 2016]. To značí potenciál pro jejich vylepšení tak, že by se mohla podávat nižší dávka při zajištění stejné systémové expozice.

5.4. Podíl lymfatické absorpce na vstřebávání nilotinibu (příloha 4)

Lymfatická absorpce nehraje při vstřebávání nilotinibu podstatnou roli. Byla nízká jak po podání referenční formulace, tak po podání glukonových částic. Stejně jako u abirateron acetátu je za to pravděpodobně zodpovědná nedostatečná lipofilita účinné látky ($\text{Log } P \sim 4,9$). Fagocytózu glukonových částic buňkami imunitního systému a následný transport do lymfy nebylo možné v našem experimentu potvrdit ani vyvrátit. Pokud k ní ale docházelo, měla tato cesta absorpce velmi nízkou kapacitu, která nevedla k významnému ovlivnění parametrů lymfatické absorpce. Glukonové částice proto přes určitá teoretická očekávání lymfatickou absorpci nezvyšují. Mají ale i tak určitý pozitivní vliv na zvýšení celkové biologické dostupnosti, pravděpodobně zlepšenou disolucí účinné látky.

Na základě výsledků této studie i studií předešlých včetně systematické rešeršní práce se zdá, že jedinou spolehlivou technikou, jak docílit významné lymfatické absorpce je zakomponování silně lipofilní látky ($\text{Log } P > 5$) do lékové formy obsahující lipidy. U látek méně lipofilních ($\text{Log } P < 5$) je pak nutné syntetizovat proléčivo, kde je na účinnou látku kovalentní vazbou připojen lipofilní zbytek tak, aby výsledná molekula měla hodnotu $\text{Log } P > 5$ [Han et al., 2016]. Žádná jiná spolehlivá metoda doposud popsána nebyla.

Toto zjištění vedlo k lepšímu zacílení dalšího vědeckého směřování našeho výzkumného týmu. Hlavním úkolem je nyní ve spolupráci s chemicko-technologickými pracovišti design nových léků a lékových forem zvyšujících lymfatickou absorpci včetně zajímavé oblasti syntézy lipofilních proléčiv.

6. Závěr

Interpretace výsledků přiložených studií přinesla tyto závěry:

- 1) Perorální podání abirateron acetátu ve formě olejových kuliček (oil marbles) vede ke zvýšení jeho biologické dostupnosti a snížení vlivu jídla. (příloha 1)
- 2) Abirateron acetát přes svou silnou lipofilitu není po perorálním podání výrazně vstřebáván lymfatickou cestou. (příloha 2)
- 3) Cinakalcet jakožto silně lipofilní látka s výrazným pozitivním vlivem jídla, je po perorálním podání ve významné míře vstřebáván lymfatickou cestou. (příloha 2)
- 4) Kanabidiol jakožto silně lipofilní látka s výrazným pozitivním vlivem jídla, je po perorálním podání ve významné míře vstřebáván lymfatickou cestou. (příloha 3)
- 5) Perorální podání nilotinibu enkapsulovaného v glukanových částicích vede k mírnému zvýšení jeho biologické dostupnosti. Lymfatická absorpce se však na tomto procesu významnou měrou nepodílí. (příloha 4)

7. Použitá literatura

Nejedná se o kompletní přehled použité literatury. Zde jsou uvedeny literární zdroje citované v průvodním komentáři této dizertační práce. Všechny práce použité při přípravě publikací jsou citované v přílohách.

- Blomstrand R, Forsgren L. Vitamin K1-3H in man. Its intestinal absorption and transport in the thoracic duct lymph. *Int Z Vitaminforsch.* 1968;38(1):45-64.
- Boleslavská T, Svetlík S, Zvatora P, Bosak J, Dammer O, Beranek J, et al. Preclinical evaluation of new formulation concepts for abiraterone acetate bioavailability enhancement based on the inhibition of pH-induced precipitation. *Eur J Pharm Biopharm.* 2020 Jun;151:81-90.
- Borgstrom B, Laurell CB. Studies on Lymph and Lymph-Proteins during Absorption of Fat and Saline by Rats. *Acta Physiol Scand.* 1953;29(2-3):264-80.
- Caliph SM, Charman WN, Porter CJ. Effect of short-, medium-, and long-chain fatty acid-based vehicles on the absolute oral bioavailability and intestinal lymphatic transport of halofantrine and assessment of mass balance in lymph-cannulated and non-cannulated rats. *J Pharm Sci.* 2000 Aug;89(8):1073-84.
- 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 Mar;24(4):381-88.
- Han SF, Hu LJ, Gracia, Quach T, Simpson JS, Edwards GA, et al. Lymphatic Transport and Lymphocyte Targeting of a Triglyceride Mimetic Prodrug Is Enhanced in a Large Animal Model: Studies in Greyhound Dogs. *Mol Pharmaceut.* 2016 Oct;13(10):3351-61.
- Han SF, Hu LJ, Quach T, Simpson JS, Trevaskis NL, Porter CJH. Constitutive Triglyceride Turnover into the Mesenteric Lymph Is Unable to Support Efficient Lymphatic Transport of a Biomimetic Triglyceride Prodrug. *J Pharm Sci.* 2016 Feb;105(2):786-96.
- Charman WNA, Stella VJ. Estimating the Maximal Potential for Intestinal Lymphatic Transport of Lipophilic Drug Molecules. *Int J Pharm.* 1986 Dec;34(1-2):175-78.

- Chi KN, Spratlin J, Kollmannsberger C, North S, Pankras C, Gonzalez M, et al. Food effects on abiraterone pharmacokinetics in healthy subjects and patients with metastatic castration-resistant prostate cancer. *J Clin Pharmacol*. 2015 Dec;55(12):1406-14.
- Choo EF, Boggs J, Zhu CQ, Lubach JW, Catron ND, Jenkins G, et al. The Role of Lymphatic Transport on the Systemic Bioavailability of the Bcl-2 Protein Family Inhibitors Navitoclax (ABT-263) and ABT-199. *Drug Metab Dispos*. 2014 Feb;42(2):207-12.
- Izgelov D, Shmoeli E, Domb AJ, Hoffman A. The effect of medium chain and long chain triglycerides incorporated in selfnano emulsifying drug delivery systems on oral absorption of cannabinoids in rats. *Int J Pharm*. 2020 Apr 30;580.
- Kaur I, Behl T, Bungau S, Zengin G, Kumar A, El-Esawi MA, et al. The endocannabinoid signaling pathway as an emerging target in pharmacotherapy, earmarking mitigation of destructive events in rheumatoid arthritis. *Life Sci*. 2020 Sep 15;257.
- Khoo SM, Edwards GA, Porter CJH, Charman WN. A conscious dog model for assessing the absorption, enterocyte-based metabolism, and intestinal lymphatic transport of halofantrine. *J Pharm Sci*. 2001 Oct;90(10):1599-607.
- Koziolok M, Alcaro S, Augustijns P, Basit AW, Grimm M, Hens B, et al. The mechanisms of pharmacokinetic food-drug interactions - A perspective from the UNGAP group. *Eur J Pharm Sci*. 2019 Jun 15;134:31-59.
- Kralovicova J, Bartunek A, Hofmann J, Krizek T, Kozlik P, Rousarova J, et al. Pharmacokinetic Variability in Pre-Clinical Studies: Sample Study with Abiraterone in Rats and Implications for Short-Term Comparative Pharmacokinetic Study Designs. *Pharmaceutics*. 2022 Mar 15;14(3).
- Lee DS, Hashim SA, Vanitall.Tb. Effect of Long Chain Triglyceride on Chylous Transport of Medium Chain Fatty Acids. *Am J Physiol*. 1968;214(2):294-&.
- O'Driscoll CM. Lipid-based formulations for intestinal lymphatic delivery. *Eur J Pharm Sci*. 2002 Jun;15(5):405-15.
- Ohlsson A, Lindgren JE, Andersson S, Agurell S, Gillespie H, Hollister LE. Single-Dose Kinetics of Deuterium-Labeled Cannabidiol in Man after Smoking and Intravenous Administration. *Biomed Environ Mass*. 1986 Feb;13(2):77-83.
- Padhi D, Salfi M, Harris RZ. The pharmacokinetics of cinacalcet are unaffected following consumption of high- and low-fat meals. *Am J Ther*. 2007 May-Jun;14(3):235-40.
- Porter CJH, Charman SA, Humberstone AJ, Charman WN. Lymphatic transport of halofantrine in the conscious rat when administered as either the free base or the

- hydrochloride salt: Effect of lipid class and lipid vehicle dispersion. *J Pharm Sci.* 1996 Apr;85(4):357-61.
- Porter CJH, Trevaskis NL, Charman WN. Lipids and lipid-based formulations: optimizing the oral delivery of lipophilic drugs. *Nat Rev Drug Discov.* 2007 Mar;6(3):231-48.
- Rysanek P, Grus T, Sima M, Slanar O. Lymphatic Transport of Drugs after Intestinal Absorption: Impact of Drug Formulation and Physicochemical Properties. *Pharm Res.* 2020 Aug 7;37(9):166.
- Salamunova P, Salon I, Ruphuy G, Kroupova J, Balouch M, Hanus J, et al. Evaluation of beta-glucan particles as dual-function carriers for poorly soluble drugs. *Eur J Pharm Biopharm.* 2021 Nov;168:15-25.
- Samara E, Bialer M, Mechoulam R. Pharmacokinetics of Cannabidiol in Dogs. *Drug Metab Dispos.* 1988 May-Jun;16(3):469-72.
- Shackleford DM, Faassen WA, Houwing N, Lass H, Edwards GA, Porter CJ, et al. Contribution of lymphatically transported testosterone undecanoate to the systemic exposure of testosterone after oral administration of two andriol formulations in conscious lymph duct-cannulated dogs. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003 Sep;306(3):925-33.
- Schultz HB, Meola TR, Thomas N, Prestidge CA. Oral formulation strategies to improve the bioavailability and mitigate the food effect of abiraterone acetate. *International Journal of Pharmaceutics.* 2020 Mar 15;577.
- Stappaerts J, Geboers S, Snoeys J, Brouwers J, Tack J, Annaert P, et al. Rapid conversion of the ester prodrug abiraterone acetate results in intestinal supersaturation and enhanced absorption of abiraterone: in vitro, rat in situ and human in vivo studies. *Eur J Pharm Biopharm.* 2015 Feb;90:1-7.
- Taylor L, Gidal B, Blakey G, Tayo B, Morrison G. A Phase I, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Single Ascending Dose, Multiple Dose, and Food Effect Trial of the Safety, Tolerability and Pharmacokinetics of Highly Purified Cannabidiol in Healthy Subjects (vol 32, pg 1053, 2018). *Cns Drugs.* 2019 Apr;33(4):397-97.
- Tian X, Zhang H, Heimbach T, He H, Buchbinder A, Aghoghovbia M, et al. Clinical Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Overview of Nilotinib, a Selective Tyrosine Kinase Inhibitor. *J Clin Pharmacol.* 2018 Dec;58(12):1533-40.
- Trevaskis NL, Caliph SM, Nguyen G, Tso P, Charman WN, Porter CJH. A Mouse Model to Evaluate the Impact of Species, Sex, and Lipid Load on Lymphatic Drug Transport. *Pharm Res-Dordr.* 2013 Dec;30(12):3254-70.

- Trevaskis NL, Hu L, Caliph SM, Han S, Porter CJ. The mesenteric lymph duct cannulated rat model: application to the assessment of intestinal lymphatic drug transport. *J Vis Exp*. 2015 Mar 6(97).
- Trevaskis NL, Kaminskas LM, Porter CJH. From sewer to saviour - targeting the lymphatic system to promote drug exposure and activity. *Nat Rev Drug Discov*. 2015 Nov;14(11):781-803.
- Trevaskis NL, Lee G, Escott A, Phang KL, Hong J, Cao E, et al. Intestinal Lymph Flow, and Lipid and Drug Transport Scale Allometrically From Pre-clinical Species to Humans. *Front Physiol*. 2020;11:458.
- Trevaskis NL, McEvoy CL, McIntosh MP, Edwards GA, Shanker RM, Charman WN, et al. The Role of the Intestinal Lymphatics in the Absorption of Two Highly Lipophilic Cholesterol Ester Transfer Protein Inhibitors (CP524,515 and CP532,623). *Pharm Res-Dordr*. 2010 May;27(5):878-93.
- White KL, Nguyen G, Charman WN, Edwards GA, Faassen WA, Porter CJH. Lymphatic Transport of Methylnortestosterone Undecanoate (MU) and the Bioavailability of Methylnortestosterone Are Highly Sensitive to the Mass of Coadministered Lipid after Oral Administration of MU. *J Pharmacol Exp Ther*. 2009 Nov;331(2):700-09.
- Wu Y, Jin QF, Chen YH, Li HL, Deng C, Sun ZX, et al. Bioinspired beta-glucan microcapsules deliver FK506 to lymph nodes for treatment of cardiac allograft acute rejection. *Biomater Sci-Uk*. 2020 Oct 7;8(19):5282-92.
- Yoshida T, Nakanishi K, Yoshioka T, Tsutsui Y, Maeda A, Kondo H, et al. Oral tacrolimus oil formulations for enhanced lymphatic delivery and efficient inhibition of T-cell's interleukin-2 production. *Eur J Pharm Biopharm*. 2016 Mar;100:58-65.
- Zgair A, Lee JB, Wong JCM, Tahal DA, Aram J, Di Virgiliol D, et al. Oral administration of cannabis with lipids leads to high levels of cannabinoids in the intestinal lymphatic system and prominent immunomodulation. *Sci Rep-Uk*. 2017 Nov 6;7.
- Zgair A, Wong JC, Lee JB, Mistry J, Sivak O, Wasan KM, et al. Dietary fats and pharmaceutical lipid excipients increase systemic exposure to orally administered cannabis and cannabis-based medicines. *Am J Transl Res*. 2016;8(8):3448-59.
- Zhang HL, Gu LB, Liu T, Chiang KY, Zhou MX. Inhibition of MDM2 by Nilotinib Contributes to Cytotoxicity in Both Philadelphia-Positive and Negative Acute Lymphoblastic Leukemia. *Plos One*. 2014 Jun 26;9(6).

8. Seznam příloh

- 1) Boleslavská T, Rychecký O, Krov M, Žvátora P, Dammer O, Beránek J, Kozlík P, Křížek T, Hořínková J, Ryšánek P, Roušarová J, Canová NK, 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 Sep 25;22(6):122. doi: 10.1208/s12248-020-00505-5. PMID: 32978690.
- 2) 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 Dec;178(23):4663-4674. doi: 10.1111/bph.15644. Epub 2021 Sep 10. PMID: 34365639.
- 3) Jelínek P, Roušarová J, Ryšánek P, Ježková M, Havlůjová T, Pozniak J, Kozlík P, Křížek T, Kučera T, Šíma M, Slanař O, Šoóš M. Application of Oil-in-Water Cannabidiol Emulsion for the Treatment of Rheumatoid Arthritis. *Cannabis Cannabinoid Res.* 2022 Nov 4. doi: 10.1089/can.2022.0176. Epub ahead of print. PMID: 36342775.
- 4) Šalamúnová P, Krejčí T, Ryšánek P, Saloň I, Kroupová J, Hubatová-Vacková A, Petřík J, Grus T, Lukáč P, Kozlík P, Křížek T, Dammer O, Beránek J, Šíma M, Slanař O, Štěpánek F. Serum and lymph pharmacokinetics of nilotinib delivered by yeast glucan particles per os. *Int J Pharm.* 2023 Mar 5;634:122627. doi: 10.1016/j.ijpharm.2023.122627. Epub 2023 Jan 21. PMID: 36693484.