

Univerzita Karlova
1. lékařská fakulta

Autoreferát disertační práce



UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta

Animální modely pro *in vivo* testování farmakokinetických a farmakodynamických vlastností vybraných léčiv

PharmDr. Jaroslava Šmardová

2023

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

Obor:

Farmakologie a toxikologie (YFAT19)

Předseda oborové rady:

Prof. MUDr. Ondřej Slanař, Ph.D.

Školící pracoviště:

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

Školitel:

Doc. PharmDr. Martin Šíma, Ph.D.

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

Obsah

Abstrakt	4
Klíčová slova	5
Abstract.....	6
Key words.....	7
1. Úvod	9
2. Hypotézy a cíle práce.....	9
3. Materiál a metodika	10
4. Výsledky.....	13
5. Diskuse	16
6. Závěry	19
7. Použitá literatura.....	21
Seznam publikací.....	21

Abstrakt

Spolehlivě fungující animální modely pro *in vivo* testování léčiv jsou pro preklinický výzkum nepostradatelné. Tato práce popisuje několik potkaních modelů, které byly zavedeny a optimalizovány k testování farmakokinetických a farmakodynamických vlastností vybraných léčivých látek a inovativních lékových formulací.

In vivo model pro sledování vývoje farmakokinetických parametrů léčiv během postnatální ontogeneze byl použit k testování rosuvastatinu, léčiva využívaného v terapii hypercholesterolemie. Byly pozorovány významně nižší hodnoty distribučního objemu a clearance a naopak vyšší expozice rosuvastatinu u potkaních mláďat ve věku odpovídajícímu přibližně dvěma rokům u člověka ve srovnání s mláďaty ve věku odpovídajícímu přibližně dvanáctiletým dětem, u kterých již farmakokinetické parametry rosuvastatinu dosahují úrovně dospělých. Na tomto základě lze tedy odhadovat, že by rosuvastatin v adekvátně redukováných dávkách mohl být podáván dětem s diagnostikovanou familiární hypercholesterolemií již od dvou let věku.

Nejspolehlivějšími modely pro testování biologické dostupnosti léčiv jsou modely využívající tzv. cross-over uspořádání. Za využití modelu s cross-over uspořádáním byly testovány inovativní lékové formulace s rivaroxabanem, abirateron acetátem a kanabidiolem.

Významně vyšších hladin antikoagulačně působící látky rivaroxabanu bylo dosaženo po podání této molekuly ve formě kokystalů s kyselinou šťavelovou oproti běžně dostupné komerční lékové formě.

Podávání abirateron acetátu, proléčiva abirateronu účinného v terapii karcinomu prostaty, ve formě olejových kuliček vedlo k významně vyšší biologické dostupnosti abirateronu ve srovnání s komerčně dostupnou lékovou formou. Navíc se díky této technologii podařilo snížit významný vliv současně podané potravy pozorovaný právě u léčivého přípravku v současnosti dostupného na trhu.

Kanabidiol, přírodní látka s obrovským potenciálem pro léčbu rozmanitých onemocnění, dosahuje velmi nízké biologické dostupnosti po perorálním podání. Z důvodu jeho lipofility se využívají rozmanité olejové roztoky. Ve srovnání se standardním olejovým roztokem bylo dosaženo významně vyšší biologické dostupnosti po podání kanabidiolu ve formě mikroemulze.

Mikroemulze s kanabidiolem byla rovněž testována stran protizánětlivých účinků potenciálně využitelných v léčbě revmatoidní artritidy. Za tímto účelem byl použit potkaní model kolagenem-indukované artritidy. Kanabidiol ve formě mikroemulze prokázal mírné, klinicky, histologicky a laboratorně hodnocené, protizánětlivé účinky.

Klíčová slova

Ontogeneze, biologická dostupnost, revmatoidní artritida, rosuvastatin, rivaroxaban, abirateron acetát, kanabidiol

Abstract

Reliably functional animal models for *in vivo* drug studies are essential for preclinical research. This thesis describes several rat models which were implemented and optimized for the studies on pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of selected medical substances and innovative dosage forms.

An *in vivo* model for the studies on the progression of pharmacokinetic parameters of drugs during postnatal ontogenesis was used for studying of rosuvastatin, a drug used in the treatment of hypercholesterolemia. In comparison with rat pups of age corresponding to approximately twelve-year-old children in whom rosuvastatin pharmacokinetics is similar to adults, significantly lower values of volume of distribution and clearance and significantly higher rosuvastatin exposition were observed in rat pups of age corresponding to approximately two years in humans. Based on these results, it is possible to estimate that rosuvastatin in adequately reduced doses could be administered to children older than two years who suffer from familial hypercholesterolemia.

Cross-over design is considered the most reliable model for studies of drug bioavailability. Innovative drug formulations containing rivaroxaban, abiraterone acetate, and cannabidiol were tested using this model.

Significantly higher exposure of anticoagulant agent rivaroxaban was achieved after its administration in the form of cocrystals with oxalic acid, when compared with a standard commercial dosage form.

Administration of abiraterone acetate, prodrug of abiraterone used in the treatment of prostate cancer, in the form of oil marbles led to significantly higher abiraterone bioavailability in comparison with a standard commercial dosage form. Moreover, typical food effect observed after the administration of standard commercial dosage form was reduced when the technology with oil marbles was used.

Oral administration of cannabidiol, a natural substance with a huge potential for the treatment of various diseases, leads to very low bioavailability. Because of cannabidiol lipophilicity, various cannabidiol oil solutions are used. Significantly higher bioavailability was achieved when cannabidiol was administered in the form of microemulsion in comparison with a standard oil solution.

The microemulsion of cannabidiol was also tested on anti-inflammatory effects that could be useful in the treatment of rheumatoid arthritis. A rat model of collagen-induced arthritis was used for this purpose. Clinical, histological, and laboratory evaluation of cannabidiol in the form of microemulsion showed moderate anti-inflammatory effects.

Key words

Ontogeny, bioavailability, rheumatoid arthritis,
rosuvastatin, rivaroxaban, abiraterone acetate, cannabidiol

Seznam zkratek

AU	Arbitrární jednotka (Arbitrary unit)
AUC	Plocha pod křivkou (Area under the curve)
BSEP	Transportér zabezpečující na ATP závislý přenos žlučových kyselin do žluče (Bile salt export pump)
CB	Kanabinoidní (Cannabinoid)
CI	Konfidenční interval (Confidence interval)
CIA	Kolagenem indukovaná artritida (Collagen-induced arthritis)
CL	Clearance
C_{\max}	Maximální plazmatická/sérová koncentrace (Maximum plasma/serum concentration)
DMARDs	Chorobu modifikující antirevmatika (Disease-modifying antirheumatic drugs)
ELISA	Imunochemická metoda s enzymatickou detekcí (Enzyme-linked immunosorbent assay)
MMP-3	Matrixová metaloproteináza 3
MRP2	Protein 2 spojený s mnohočetnou lékovou rezistencí (Multidrug resistance-associated protein 2)
OATP	Polypeptidy transportující organické anionty (Organic anion transporting polypeptide)
T_{\max}	Čas dosažení maximální koncentrace (Time of maximum plasma/serum concentration)
Vd	Distribuční objem (Volume of distribution)
VŠCHT	Vysoká škola chemicko-technologická

1. Úvod

Pro maximální využití terapeutického potenciálu léčiv je důležité znát jejich farmakokinetické i farmakodynamické vlastnosti. Farmakokinetické a farmakodynamické studie jsou proto nezbytnou součástí procesu vývoje nových léčiv, neoddiskutovatelný význam mají ale i v postregistrační fázi. Během svého postgraduálního studia jsem se zabývala vývojem a optimalizací *in vivo* modelů využitelných pro preklinické studie farmakokinetických a farmakodynamických vlastností léčiv. Pomocí těchto modelů jsem pak testovala inovativní formulace vybraných léčiv či možnost podání vybraných léčiv dětem, pro které není aplikace těchto léčiv v současnosti schválena.

2. Hypotézy a cíle práce

Stanovené hypotézy:

1. Proces postnatální ontogeneze, zahrnující vývoj aktivity hepatálních transportérů, bude vést k významným změnám ve farmakokinetických vlastnostech rosuvastatinu.
2. Podání rivaroxabanu ve formě kokrytalů s kyselinou šťavelovou povede ve srovnání s originální lékovou formou k vyšší biologické dostupnosti.
3. Podání abirateron acetátu inkorporovaného do olejových kuliček (oil marbles) povede ve srovnání s originální lékovou formou k vyšší biologické dostupnosti abirateronu a omezení vlivu současně podané potravy.
4. Podání kanabidiolu ve formě mikroemulze povede ve srovnání se standardním olejovým roztokem k vyšší biologické dostupnosti.
5. Kanabidiol ve formě mikroemulze bude vykazovat významné protizánětlivé účinky v léčbě revmatoidní artritidy.

Cílem práce bylo:

1. Za využití rosuvastatinu jako modelové léčivé látky vyvinout a zavést *in vivo* model pro studium farmakokinetických vlastností léčiv a jejich vývoje během postnatální ontogeneze; Příloha 1
2. Za využití rivaroxabanu, abirateron acetátu a kanabidiolu jako modelových léčivých látek optimalizovat *in vivo* model pro porovnání biologické dostupnosti různých technologických formulací a pro testování vlivu současně podané potravy na biologickou dostupnost; Příloha 2, 3, 4
3. Za využití kanabidiolu jako modelové léčivé látky zavést *in vivo* model pro testování účinnosti léčiv potenciálně využitelných v terapii revmatoidní artritidy; Příloha 4

3. Materiál a metodika

Veškeré metody využitě pro získání výsledků této práce jsou *in extenso* popsány v publikovaných článcích, které jsou zahrnuty ve formě příloh. V této kapitole jsou stěžejní metody pouze stručně okomentovány.

V případě všech předkládaných výsledků byli jako pokusná zvířata zvoleni potkani kmene Wistar. Laboratorní potkani jsou pro *in vivo* experimenty dobře dostupní a na rozdíl od laboratorních myší, u kterých je za účelem našich, zejména farmakokinetických, studií limitující nedostačující objem cirkulující krve (pouze asi 1,46 mL krve u myši o hmotnosti 25 g), laboratorní potkani disponují adekvátním objemem krve (cca 25 mL krve u potkana o hmotnosti 400 g) a také dostatečnou tělesnou velikostí pro pohodlné zavedení cévních vstupů za cílem provádění opakovaných a frekventovaných krevních odběrů (až 20 náběrů o objemu 0,1 až 0,2 mL za 24 hodin) (NC3RS, 2013, update 2022, NC3RS, 2013, update 2021).

Ve většině experimentů byla využita metoda opakovaných krevních odběrů (Příloha 2, 3, 4). Za účelem opakovaných krevních odběrů provádíme kanylací *vena jugularis externa* (Tato metoda byla využita v publikacích v Přílohách 2, 4). Během tohoto zákroku probíhajícího v celkové anestezii navozené ketaminem a xylazinem je do této žíly

zaveden polyuretanový katetr, jehož zakončení je následně vyvedeno na zátylku zvířete tak, aby bylo zamezeno vynětí katetru po probuzení zvířete z anestezie. Po rekonvalescenci trvající přibližně tři dny je zvíře připraveno na provedení vlastního experimentu, v rámci kterého lze pomocí katetru opakovaně odebírat potřebný objem krve v definovaných časových intervalech a po odstředění této krve využít sérum pro požadovanou analýzu, většinou tedy měření plazmatických koncentrací podaného léčiva.

Před zavedením metody kanylace *vena jugularis externa* jsme u potkanů kanylovali *arteria carotis* (Tato metoda byla využita v publikaci v Příloze 3). Tento zákrok probíhal obdobně jako kanylace *vena jugularis externa*, potýkali jsme se však s častějšími trombotickými komplikacemi a jimi zapříčiněnými epileptickými záchvaty či mozkovou ischemií, nebo naopak vykrvácením při nechtěném uvolnění katetru.

Využití kompletních farmakokinetických profilů jednotlivých zvířat, u kterých je možné výše zmíněnými postupy provádět opakované a frekventované odběry, je významně spolehlivější a výsledky jsou méně variabilní než v případě jednorázových odběrů od různých zvířat v různých časových intervalech, kdy je z těchto vzorků sestavovaný sumární farmakokinetický profil, tedy metoda nazývaná jako tzv. sparse sampling.

Metoda sparse sampling však byla využita pro publikaci zabývající se změnami ve farmakokinetice rosuvastatinu v procesu postnatální ontogeneze (Příloha 1). V tomto experimentu nebylo z důvodu velmi omezeného objemu krve u potkaních mláďat věku 1 až 14 dní možné provádět opakované krevní odběry, a proto byl sparse sampling jedinou možnou variantou. U mláďat starších 14 dnů by již opakované krevní odběry možné byly, ale změnu designu probíhajícího experimentu jsme nepovažovali za metodicky správnou. V tomto experimentu tedy byla každé skupině potkanů určitého věku jednorázově odebrána krev myokardiální punkcí v terminální anestezii isofluranem v předem definovaném čase od podání testovaného léčiva. Výsledné sumární farmakokinetické profily pak byly sestaveny z průměrných hodnot plazmatických koncentrací jednotlivých zvířat vždy pouze v jednom časovém bodě.

Jednorázové krevní odběry bez zavedení cévního vstupu byly rovněž prováděny ve farmakodynamickém experimentu za účelem testování účinnosti kanabidiolu ve formě emulze v léčbě revmatoidní artritidy

(Příloha 4). V tomto experimentu bylo zapotřebí stanovit koncentraci zánětlivých markerů před zahájením léčby a po ukončení léčby. Protože celý experiment probíhal několik týdnů, kanylace *vena jugularis externa* či *arteria carotis* tak nebyla vhodnou metodou z důvodu potenciální trombotizace, ale také z důvodu celkové náročnosti pro zvíře, u něhož by se sčítala rizika spojená s kanylací, indukci onemocnění a každodenními procedurami dávkování testovaného léčiva. V tomto případě tedy byla krev jednorázově odebrána z ocasní žíly v den zahájení léčby. V den ukončení léčby pak byla krev odebrána myokardiální punkcí v terminální anestezii isofluranem.

Většina zde komentovaných farmakokinetických studií (Příloha 2, 3, 4) se zabývá porovnáváním referenčních a testovaných léčivých přípravků či formulací s potenciálem vyšší biologické dostupnosti či omezení vlivu jídla na absorpci léčivé látky. Pro tyto účely využíváme tzv. cross-over uspořádání experimentů. To spočívá v podání jedné formulace a stanovení farmakokinetického profilu účinné látky v první periodě experimentu a po dostatečně dlouhé době, vyhrazené pro kompletní eliminaci účinné látky (tzv. wash-out), v podání druhé formulace a stanovení farmakokinetického profilu u stejné skupiny potkanů. U druhé skupiny potkanů se pak formulace podávají v opačném pořadí.

Cross-over uspořádání je typické pro klinické studie. V preklinických studiích na hlodavcích je hůře proveditelné zejména z důvodu potřeby zajištění kanyly a udržení její průchodnosti po celou dobu experimentu. Pro účely preklinických cross-over studií máme k dispozici již spolehlivý výše popsany model potkana s kanylovanou *vena jugularis externa*. Bylo prokázáno, že na rozdíl od standardně používaného paralelního uspořádání studií na hlodavcích představuje cross-over uspořádání nejenom spolehlivější metodu z důvodu signifikantně nižšího vlivu interindividuální variability na výsledky, ale také metodu využívající méně pokusných zvířat, tedy metodu etičtější (Kralovicova et al., 2022).

Indukce CIA v experimentu, který je součástí publikace v Příloze 4, byla prováděna dle protokolu společnosti Chondrex, která poskytuje reagentia (Freundovo adjuvans a bovinní kolagen) potřebná pro vznik emulze subkutánně aplikované ke kořeni ocasu potkanů ve dvou dávkách – iniciální dávka 0,2 mL a posilovací dávka 0,1 mL po 7 dnech od dávky iniciální.

Jako negativní kontrolu vždy paralelně zařazujeme několik zvířat, kterým je místo této emulze subkutánně aplikován fyziologický roztok.

Úspěšnost indukce a závažnost CIA hodnotíme pomocí skórovacího systému s maximálním možným dosaženým artritickým skóre 16 bodů za všechny 4 končetiny). Za úspěšné navození CIA je považován zisk minimálně 2 bodů (Hu et al., 2017).

Po několika dnech, kdy bylo dosaženo adekvátního počtu naindukovaných zvířat, bylo možné randomizovat zvířata do definovaných skupin (skupina léčená testovaným přípravkem, pozitivní kontrola, popř. skupina léčená referenčním přípravkem) a zahájit léčbu. Ještě před zahájením léčby jsme provedli náběry krve a změřili šířku kotníků za využití posuvného měřítka, stejně tak jako v den ukončení experimentu. V průběhu experimentu jsme jednou za 3 dny monitorovali vývoj artritického skóre u každého zvířete.

Po ukončení experimentu jsme hodnotili účinnost testovaných látek nejenom sestavením křivek průběžně měřeného artritického skóre, ale i odečtením rozdílů v šířce kotníků, v tělesné hmotnosti a v koncentraci prozánětlivých markerů v krvi před zahájením léčby a po jejím ukončení. Po usmrcení byly zvířatům amputovány zadní končetiny, které pak byly histologicky hodnoceny.

4. Výsledky

Podrobné výsledky jsou prezentovány v příložených publikacích. Zde jsou pouze stručně shrnuty.

Potkaní mláďata stará 1, 4, 7, 10, 14, 21, 28, 35 a 42 dní byla rozdělena do tří skupin. Všem potkanům byl podán intraperitoneálně rosuvastatin v dávce 5 mg/kg. U první skupiny proběhlo utracení a náběry krve 0,5 h po podání rosuvastatinu, u druhé skupiny 3 h po podání a u třetí skupiny 5 h po podání. Rozdíly v mediánních plazmatických koncentracích se ve všech třech časových bodech signifikantně lišily mezi různě starými potkany ($P < 0,0001$).

Z mediánních hodnot plazmatických koncentrací ve všech časových bodech byly dále vypočítány farmakokinetické parametry jako

AUC, Vd a CL. Mediánní hodnoty těchto parametrů byly použity pro grafická znázornění, ze kterých je patrný vývoj těchto parametrů se vzrůstajícím věkem potkaních mláďat. Je evidentní, že u mladších potkanů do přibližně dvou týdnů věku, kteří disponují menším distribučním objemem a u nichž ještě nejsou dostatečně vyvinuté eliminační funkce, tzn. hodnoty clearance jsou nižší, byla expozice rosuvastatinu vysoká. Od tohoto věku postupně distribuční objem i clearance rostly, čímž se expozice rosuvastatinu snižovala.

Podání rivaroxabanu ve formě kokystalů s kyselinou šťavelovou vedlo k signifikantně vyšší relativní biologické dostupnosti v porovnání s podáním referenčního komerčně dostupného přípravku Xarelto® obsahující rivaroxaban.

Poměr geometrických průměrů (kokystalová formulace vs. reference) činil 1,98 (90% CI: 1,57 – 2,50) pro Cmax a 2,13 (90% CI: 1,68 – 2,69) pro AUC. Maximální koncentrace rivaroxabanu i jeho AUC byly tedy přibližně dvakrát vyšší než stejné parametry po podání referenčního přípravku a rozdíly dosáhly hladiny statistické významnosti ($P < 0,0001$). Naproti tomu hodnoty Tmax se po podání obou formulací zásadně nelišily ($P = 0,6625$), což naznačuje podobnou rychlost absorpce u obou přípravků za současného zvýšení biologické dostupnosti u kokystalové formulace.

Podáním abirateron acetátu ve formě olejových kuliček (oil marbles) potkanům bylo dosaženo signifikantně vyšší relativní biologické dostupnosti abirateronu v porovnání s referenčním komerčně dostupným léčivým přípravkem Zytiga® ($P = 0,0258$ pro Cmax, $P = 0,0138$ pro AUC). Poměr geometrických průměrů (oil marbles vs. reference) činil 3,98 (90% CI: 2,14 – 7,40) pro Cmax a 2,67 (90% CI: 1,66 – 4,32) pro AUC. Maximální plazmatické koncentrace abirateronu po podání abirateron acetátu ve formě oil marbles tedy byly téměř čtyřikrát vyšší než v případě podání referenčního přípravku. Plocha pod křivkou pak dosahovala přibližně dva a půl krát vyšších hodnot. Po podání oil marbles byl pozorován kratší Tmax (medián 168 min u oil marbles vs 244 min u reference), statisticky významný rozdíl mezi hodnotami Tmax u oil marbles v porovnání s referenčním přípravkem však nebyl prokázán ($P = 0,1094$), což značí podobnou rychlost absorpce u obou formulací, při současně vyšší biologické dostupnosti u formulace oil marbles.

Známý fenomén vlivu potravy abirateron acetátu byl pozorován u referenčního přípravku, byl-li podán potkanům ve stavu nalačno a v cross-over uspořádání pak ve stavu po jídle. Poměr geometrických průměrů (podání po jídle vs. podání nalačno) činil 2,39 (90% CI: 1,31 – 4,34) pro C_{max} a 2,02 (90% CI: 0,87 – 4,69) pro AUC. Významně vyšší biologická dostupnost referenčního přípravku ve stavu po jídle byla prokázána na základě hodnot C_{max} , které byly statisticky signifikantně vyšší ve stavu po jídle než ve stavu nalačno ($P = 0,0302$). Hodnoty AUC se signifikantně nelišily ($P = 0,0631$), stejně tak jako hodnoty T_{max} ($P = 0,5625$). Inkorporaci abirateron acetátu do olejových kuliček se však podařilo food efekt eliminovat, poměr geometrických průměrů (podání po jídle vs. podání nalačno) byl totiž téměř roven hodnotě 1, jak pro C_{max} s hodnotou 1,04 (90% CI: 0,58 – 1,85), tak pro AUC s hodnotou 1,05 (90% CI: 0,76 – 1,45). Nebylo tedy dosaženo statisticky významného rozdílu v relativní biologické dostupnosti abirateronu po podání abirateron acetátu ve formě olejových kuliček, což bylo naším cílem ($P = 0,4378$ pro C_{max} , $P = 0,4717$ pro AUC). Byl zde však pozorován proloužený T_{max} ve stavu po jídle (medián 152 min ve stavu po jídle vs 125 min ve stavu nalačno), což by mohlo poukazovat na pomalejší absorpci abirateronu z formulace oil marbles podaného po jídle, statisticky významný rozdíl však nebyl prokázán ($P = 0,6250$).

Po podání kanabidiolu ve formě mikroemulze bylo dosaženo statisticky významně vyšší relativní biologické dostupnosti v porovnání s kanabidiolem ve formě olejového roztoku ($P < 0,0001$ pro C_{max} , $P = 0,0033$ pro AUC). Poměr geometrických průměrů (mikroemulze vs. olejový roztok) činil 3,24 (90% CI: 1,81 – 5,81) pro C_{max} a 2,10 (90% CI: 1,24 – 3,55) pro AUC. Maximální koncentrace a AUC kanabidiolu tedy dosahovaly přibližně třikrát vyšších, respektive dvakrát vyšších hodnot, byli kanabidiol podán ve formě mikroemulze. Z mediánních hodnot T_{max} (4,05 h u olejového roztoku vs. 2,54 h u mikroemulze) může být patrný trend rychlejší absorpce u kanabidiolu ve formě mikroemulze, rozdíl mezi těmito hodnotami však zůstal těsně pod hranicí statistické signifikance ($P = 0,0598$).

Byl monitorován průběžný vývoj artritického skóre u skupiny potkanů s CIA léčené kanabidiolem, u skupiny potkanů s CIA, kterým bylo

podáváno placebo (pozitivní kontrola) a u skupiny potkanů, kterým nebyla indukována CIA, ale bylo jim rovněž podáváno placebo (negativní kontrola). Přestože od zahájení léčby bylo možné pozorovat trend nižšího artritického skóre u potkanů léčených mikroemulzí s kanabidiolem oproti potkanům ze skupiny pozitivní kontroly, statisticky významného rozdílu v artritickém skóre mezi těmito dvěma skupinami bylo dosaženo až od 21. dne ($P < 0,05$).

V den ukončení léčby byl pak patrný trend příznivějších hodnot šířek kotníků a koncentrací MMP-3 jako sledovaného zánětlivého markeru mezi potkany s CIA léčenými kanabidiolem oproti potkanům s CIA, kterým bylo podáváno placebo. Hladiny statistické významnosti však dosaženo nebylo ($P = 0,0649$ pro šířku kotníků a $P = 0,0931$ pro koncentraci MMP-3).

V rámci histologického hodnocení byla pozorována statisticky významně nižší falangeální osteoklastická aktivita u skupiny léčené kanabidiolem v porovnání s pozitivní kontrolou ($P = 0,04$). Rozdíl ve falangeálním strukturálním histopatologickém poškození mezi těmito dvěma skupinami však statistické významnosti nedosáhl ($P = 0,37$).

5. Diskuse

Na tomto místě jsou stručně komentovány a diskutovány stěžejní výsledky generované v rámci zahrnutých studií. Detailní diskuze jsou pak k nalezení v jednotlivých příložených publikacích.

V našem experimentu jsme pozorovali významný nárůst v hodnotách CL a Vd rosuvastatinu od druhého až třetího týdne života potkaních mláďat. Nárůst těchto farmakokinetických parametrů se odrážel v hodnotách AUC rosuvastatinu, které byly zpočátku vyšší, a právě v období věku dvou až tří týdnů začaly výrazně klesat.

Tyto výsledky odpovídají literárním údajům o ontogenezi transportních proteinů podílejících se na hepatobiliární exkreci rosuvastatinu jako jsou MRP2, BSEP a skupina OATP transportérů. U potkanů je aktivity MRP2 a BSEP na úrovni dospělých jedinců dosaženo

přibližně 12 dnů po narození. Aktivita OATP transportérů je podobná aktivitě transportérů dospělých přibližně 29 dnů po narození (Gao et al., 2004).

Dle literatury jsou farmakokinetické vlastnosti rosuvastatinu úrovně dospělého člověka pozorovány od 12 let věku. Věku 12 let člověka je ekvivalentní věk 32 dní potkana (Macpherson et al., 2016, EMA, 2021). Naše data ukázala velmi podobné hodnoty AUC u potkanů věku 35 a 42 dní (1,01 a 0,93 mg.h/L), tedy u potkanů, u nichž by na základě výše popsané teorie měla farmakokinetika rosuvastatinu odpovídat dospělým jedincům. Hodnotě AUC u potkanů starých 42 dní jsme tedy přiřadili 100 %, což nám následně umožnilo procentuálně vyjádřit navýšení hodnot AUC u potkanů každého sledovaného věku a vztáhnout tuto hodnotu k odpovídající ontogenetické fázi a postnatálnímu věku člověka.

Z výsledků je patrná 5 krát až 13 krát vyšší expozice rosuvastatinu u mlád'at mladších 21 dní v porovnání s hodnotami mlád'at starších než 32 dní, u kterých farmakokinetika odpovídá farmakokinetice dospělých jedinců. Od 28. dne věku jsme pak pozorovali už jen mírný nárůst v expozici rosuvastatinu.

Naše výsledky ukázaly rostoucí expozici rosuvastatinu u potkanů do věku ekvivalentnímu dvěma rokům u člověka. U potkanů ve věku odpovídajícímu dvěma rokům u lidí jsme pozorovali pouze mírně zvýšenou expozici. Lze tedy odhadovat, že v indikaci familiární hypercholesterolemie, pro kterou je léčba rosuvastatinem schválená od šesti let věku, by za přiměřené redukce dávky bylo rosuvastatin možné použít už u dětí od dvou let.

Rivaroxaban ve formě kokystalů s kyselinou šťavelovou připravený za cílem zvýšení jeho rozpustnosti ve vodě vedl jednoznačně k vyšší biologické dostupnosti ve srovnání s originálním léčivým přípravkem. Vyšší biologická dostupnost byla dána přítomností dobře rozpustné kyseliny šťavelové. Rivaroxaban v kokrystalech s kyselinou šťavelovou se přeměňoval na rivaroxaban dihydrát a právě forma dihydrátu pak zvyšovala rozpustnost, a tím pádem i biologickou dostupnost rivaroxabanu. Na základě faktu, že bylo dosaženo vyšší biologické dostupnosti ve stavu nalačno, lze usuzovat, že byl paralelně redukován i vliv současně podané potravy.

Inkorporace abirateron acetátu do olejových kuliček vedla u potkanů k vyšší biologické dostupnosti a redukci vlivu současně podané potravy. Ve vodě velmi obtížně rozpustný abirateron acetát byl v případě této lékové formy již rozpuštěn v drobných olejových kapénkách, což vedlo k lepším disolučním vlastnostem ve střevě. Ze stejného důvodu byl odstraněn i food efekt pozorovaný u originálního léčivého přípravku. Zlepšením disolučních vlastností se podařilo zvýšit biologickou dostupnost abirateronu ve stavu nalačno, čímž se minimalizoval prostor pro variabilitu biologické dostupnosti ve stavu po jídle, kdy přítomné tuky zvyšují potenciál vstřebávání abirateronu.

Na příkladu abirateron acetátu se formulace olejových kuliček jeví jako využitelná i u dalších lipofilních molekul s omezenou rozpustností ve vodě a tím způsobenou nízkou biologickou dostupností. Nemalý potenciál má tato technologie také v případě lipofilních molekul s pozitivním food efektem zapříčiněným jejich zvýšenou absorpcí s tuky přijatými potravou.

Z důvodu nízké rozpustnosti kanabidiolu ve vodě a také významného metabolismu této látky při prvním průchodu játry byl připraven kanabidiol ve formě mikroemulze. Tuto mikroemulzi tvořily dispergované, lecithinem stabilizované olejové kapičky, disperzním prostředím pak byla voda. Právě přítomnost lipidických excipientů měla zacílit absorpci kanabidiolu do lymfy. Součástí přiložené publikace bylo i přímé stanovení lymfatické absorpce kanabidiolu v modelu potkana s kanylovaným hrudním mízovodem. Zavedení tohoto modelu a jeho následná aplikace ve farmakokinetických studiích bylo hlavní náplní postgraduálního studia jiného studenta, tato dizertační práce tedy není věnována této problematice a výsledky této části jsou uvedeny pouze zde v diskuzi. Lymfatická absorpce kanabidiolu se skutečně ukázala jako vysoká. Bylo dosaženo dva až třikrát vyšších koncentrací kanabidiolu v lymfě než v plazmě, nebyl však pozorován rozdíl ve vstřebávání do lymfy mezi kanabidiolem ve formě olejového roztoku a ve formě testované mikroemulze. Přesto bylo po podání kanabidiolu ve formě mikroemulze dosaženo vyšší biologické dostupnosti. Vyšší biologická dostupnost tedy pravděpodobně nebyla způsobena lymfatickou absorpcí, ale přítomností

olejových kapiček, díky kterým se kanabidiol lépe vstřebával do intestinální sliznice.

Léčba CIA mikroemulzí obsahující kanabidiol vedla v porovnání s placebem k signifikantně méně závažným klinickým symptomům tohoto onemocnění a signifikantně nižší osteoklastické aktivitě ve falangeální oblasti zadních končetin. Nesignifikantní hodnoty, ale příznivé trendy naznačující alespoň částečnou účinnost kanabidiolu v léčbě CIA, byly pozorovány měřením hladiny MMP-3 v krvi a měřením šířky kotníků zvířat na začátku léčby a po jejím ukončení. Statisticky nesignifikantní rozdíly ve vývoji hladin MMP-3 mezi léčenými a neléčenými potkany byly pravděpodobně způsobeny nerovnoměrným rozdělením jednotlivých potkanů do skupin na začátku léčby (368,22 % AU u léčených vs. 154,76 % AU u neléčených zvířat). Potkani byli randomizováni na základě artritického skóre, plazmatické koncentrace MMP-3 byly pomocí ELISA metody měřeny až po ukončení experimentu, při randomizaci tak nemohl být na hladiny MMP-3 brán zřetel. Účinnost kanabidiolu nebyla vůbec patrná z histopatologického hodnocení poškození falangeálních kloubů. Příčinou mohlo být ireverzibilní poškození těchto kloubů ještě před zahájením léčby.

Kanabidiol použitý v monoterapii neprokázal významné terapeutické účinky v léčbě revmatoidní artritidy, přesto byla mírná účinnost pozorována. Lze tedy uvažovat o využití kanabidiolu jako adjuvantního léčiva v kombinaci s běžnými léčivy schválenými pro léčbu tohoto omezení. Využití kanabidiolu v takovéto kombinaci by mohlo umožnit podávat nižší dávky DMARDs, čímž by se při současném zachování jejich účinnosti mohly redukovat nežádoucí účinky vyvolávané touto skupinou léků.

6. Závěry

Výsledky studií předkládaných v rámci této dizertační práce lze uzavřít následovně:

1. V průběhu postnatální ontogeneze docházelo k významným změnám ve farmakokinetických vlastnostech rosuvastatinu.

Na základě získaných výsledků a mezidruhové extrapolace lze odhadnout, že rosuvastatin by v adekvátně redukováných dávkách mohl být podáván dětem s familiární hypercholesterolémií již od dvou let věku.

2. Podání rivaroxabanu ve formě kokrystalů s kyselinou šťavelovou vedlo ve srovnání s originální lékovou formou k vyšší biologické dostupnosti.
3. Podání abirateron acetátu inkorporovaného do olejových kuliček (oil marbles) vedlo ve srovnání s originální lékovou formou k vyšší biologické dostupnosti a omezení vlivu současně podané potravy.
4. Podání kanabidiolu ve formě mikroemulze vedlo ve srovnání se standardním olejovým roztokem k vyšší biologické dostupnosti.
5. Kanabidiol ve formě mikroemulze vykazoval v experimentálním modelu revmatoidní artritidy mírné protizánětlivé účinky.

7. Použitá literatura

- EMA 2021. Assessment report: EMA/301931/2014.
- GAO, B., ST PIERRE, M. V., STIEGER, B. & MEIER, P. J. 2004. Differential expression of bile salt and organic anion transporters in developing rat liver. *J Hepatol*, 41, 201-8.
- HU, Y. P., YANG, Y. & LUO, B. 2017. Evaluation of destruction in a collagen-induced arthritis rat model: Bony spur formation. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 14, 2563-2567.
- KRALOVICOVA, J., BARTUNEK, A., HOFMANN, J., KRIZEK, T., KOZLIK, P., ROUSAROVA, J., RYSANEK, P., SIMA, M. & SLANAR, O. 2022. Pharmacokinetic Variability in Pre-Clinical Studies: Sample Study with Abiraterone in Rats and Implications for Short-Term Comparative Pharmacokinetic Study Designs. *Pharmaceutics*, 14.
- MACPHERSON, M., HAMREN, B., BRAAMSKAMP, M. J., KASTELEIN, J. J., LUNDSTROM, T. & MARTIN, P. D. 2016. Population pharmacokinetics of rosuvastatin in pediatric patients with heterozygous familial hypercholesterolemia. *Eur J Clin Pharmacol*, 72, 19-27.
- NC3RS. 2013, update 2021. *Blood sampling: Mouse* [Online]. National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research. Available: <https://www.nc3rs.org.uk/3rs-resources/blood-sampling/blood-sampling-mouse> [Accessed].
- NC3RS. 2013, update 2022. *Blood sampling: Rat* [Online]. National Centre for Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research. Available: <https://www.nc3rs.org.uk/3rs-resources/blood-sampling/blood-sampling-rat> [Accessed].

Seznam publikací

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

a) s IF

- **ROUSAROVA, J.**, SIMA, M., KOZLIK, P., KRIZEK, T. & SLANAR, O. 2021a. Changes in Rosuvastatin Pharmacokinetics During Postnatal Ontogenesis in Rats. *J Pharm Pharm Sci*, 25, 1-8. (IF2021 = 3,337)
- HRINOVA, E., SKOREPOVA, E., CERNA, I., KRALOVICOVA, J., KOZLIK, P., KRIZEK, T., **ROUSAROVA, J.**, RYSANEK, P.,

SIMA, M., SLANAR, O. & SOOS, M. 2022. Explaining dissolution properties of rivaroxaban cocrystals. *Int J Pharm*, 622, 121854. (IF2022 = 5,8)

- BOLESLAVSKA, T., RYCHECKY, O., KROV, M., ZVATORA, P., DAMMER, O., BERANEK, J., KOZLIK, P., KRIZEK, T., HORINKOVA, J., RYSANEK, P., **ROUSAROVA, J.**, CANOVA, N. K., SIMA, M., SLANAR, O. & STEPANEK, F. 2020. Bioavailability Enhancement and Food Effect Elimination of Abiraterone Acetate by Encapsulation in Surfactant-Enriched Oil Marbles. *AAPS J*, 22, 122. (IF2020 = 4,009)
- JELINEK, P. #, **ROUSAROVA, J.** #, RYSANEK, P., JEZKOVA, M., HAVLUJOVA, T., POZNIAK, J., KOZLIK, P., KRIZEK, T., KUCERA, T., SIMA, M., SLANAR, O. & SOOS, M. 2022. Application of Oil-in-Water Cannabidiol Emulsion for the Treatment of Rheumatoid Arthritis. *Cannabis Cannabinoid Res.* (IF2022 = 3,7)

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

a) s IF

- SIMA, M., BOBEK, D., CIHLAROVA, P., RYSANEK, P., **ROUSAROVA, J.**, BEROUSEK, J., KUCHAR, M., VYMAZAL, T. & SLANAR, O. 2022. Factors Affecting the Metabolic Conversion of Ciprofloxacin and Exposure to Its Main Active Metabolites in Critically Ill Patients: Population Pharmacokinetic Analysis of Desethylene Ciprofloxacin. *Pharmaceutics*, 14. (IF2022 = 5,4)
- KRALOVICOVA, J., BARTUNEK, A., HOFMANN, J., KRIZEK, T., KOZLIK, P., **ROUSAROVA, J.**, RYSANEK, P., SIMA, M. & SLANAR, O. 2022. Pharmacokinetic Variability in Pre-Clinical Studies: Sample Study with Abiraterone in Rats and Implications for Short-Term Comparative Pharmacokinetic Study Designs. *Pharmaceutics*, 14. (IF2022 = 5,4)
- RYSANEK, P., GRUS, T., LUKAC, P., KOZLIK, P., KRIZEK, T., POZNIAK, J., **ROUSAROVA, J.**, KRALOVICOVA, J., KUTINOVA CANOVA, N., BOLESLAVSKA, T., BOSAK, J.,

STEPANEK, F., SIMA, M. & SLANAR, O. 2021. Validity of cycloheximide chylomicron flow blocking method for the evaluation of lymphatic transport of drugs. *Br J Pharmacol*, 178, 4663-4674. (IF2021 = 9,473)

b) bez IF

- **ROUSAROVA, J.**, SIMA, M. & SLANAR, O. 2021b. Therapeutic Drug Monitoring of Protein Kinase Inhibitors in Breast Cancer Patients. *Prague Med Rep*, 122, 243-256.