

**UNIVERZITA KARLOVA  
1. LÉKAŘSKÁ FAKULTA**

Studijní program: doktorský - Farmakologie a toxikologie (P0916D350001)

Studijní obor: Farmakologie a toxikologie (YFAT19)



**UNIVERZITA KARLOVA  
1. lékařská fakulta**

**PharmDr. Jaroslava Šmardová**

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

**Animal models for *in vivo* testing of pharmacokinetic and pharmacodynamic  
properties of selected drugs**

**DIZERTAČNÍ PRÁCE**

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

Praha, 2023

**Prohlášení:**

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

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

V Praze, 16. 10. 2023

JAROSLAVA ŠMARDOVÁ

Podpis:

**Identifikační záznam:**

ŠMARDOVÁ, Jaroslava. *Animální modely pro in vivo testování farmakokinetických a farmakodynamických vlastností vybraných léčiv. [Animal models for in vivo testing of pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of selected drugs]*. Praha, 2023. 42 stran, 4 přílohy. Dizertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 1. Lékařská fakulta, Farmakologický ústav. Školitel Šíma, Martin.

## 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 kokrystalů 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

## Obsah

Abstrakt .....	4
Abstract.....	6
Obsah.....	8
Seznam zkratek .....	10
Seznam vlastních publikací .....	11
Poděkování.....	13
1. Literární úvod.....	14
1.1. Postnatální ontogeneze a její vliv na farmakokinetické parametry léčiv .....	14
1.1.1. Vývoj farmakokinetických parametrů rosuvastatinu v procesu postnatální ontogeneze .....	15
1.2. Možnosti zvýšení biologické dostupnosti léčiv .....	16
1.2.1. Zvýšení biologické dostupnosti rivaroxabanu ve formě kokystalů s kyselinou šťavelovou .....	17
1.2.2. Zvýšení biologické dostupnosti abirateronu po podání abirateron acetátu ve formě olejových kuliček .....	18
1.2.3. Zvýšení biologické dostupnosti kanabidiolu ve formě mikroemulze .....	18
1.3. Protizánětlivé účinky kanabidiolu.....	19
1.3.1. Protizánětlivé účinky kanabidiolu ve formě mikroemulze v léčbě kolagenem indukované artritidy.....	19
2. Hypotézy a cíle práce.....	21
3. Metody .....	22
3.1. Opakované versus jednorázové krevní odběry .....	22
3.2. Cross-over uspořádání studií .....	26
3.3. Kolagenem indukovaná artritida.....	26
4. Výsledky .....	28
4.1. Vývoj farmakokinetických parametrů rosuvastatinu v procesu postnatální ontogeneze .....	28
4.2. Zvýšení biologické dostupnosti rivaroxabanu ve formě kokystalů s kyselinou šťavelovou.....	29
4.3. Zvýšení biologické dostupnosti abirateronu po podání abirateron acetátu ve formě olejových kuliček .....	30
4.4. Zvýšení biologické dostupnosti kanabidiolu ve formě mikroemulze .....	31
4.5. Protizánětlivé účinky kanabidiolu ve formě mikroemulze v léčbě kolagenem indukované artritidy.....	31
5. Diskuze .....	33



5.1. Vývoj farmakokinetických parametrů rosuvastatinu v procesu postnatální ontogeneze .....	33
5.2. Zvýšení biologické dostupnosti rivaroxabanu ve formě kokystalů s kyselinou šťavelovou.....	34
5.3. Zvýšení biologické dostupnosti abirateronu po podání abirateron acetátu ve formě olejových kuliček .....	35
5.4. Zvýšení biologické dostupnosti kanabidiolu ve formě mikroemulze .....	35
5.5. Protizánětlivé účinky kanabidiolu ve formě mikroemulze v léčbě kolagenem indukované artritidy.....	36
6. Závěr .....	37
7. Použitá literatura.....	38
8. Seznam příloh.....	42

## 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)
CYP	Cytochrom P450
DMARDs	Chorobu modifikující antirevmatika (Disease-modifying antirheumatic drugs)
ELISA	Imunochemická metoda s enzymatickou detekcí (Enzyme-linked immunosorbent assay)
EU	Evropská unie
IL	Interleukin
MMP-3	Matrixová metaloproteináza 3
MRP2	Protein 2 spojený s mnohočetnou lékovou rezistencí (Multidrug resistance-associated protein 2)
NO	Oxid dusnatý
OATP	Polypeptidy transportující organické anionty (Organic anion transporting polypeptide)
PNA	Postnatální věk (Postnatal age)
$T_{\max}$	Čas dosažení maximální koncentrace (Time of maximum plasma/serum concentration)
TNF- $\alpha$	Tumor nekrotizující faktor $\alpha$
USA	Spojené státy americké (United States of America)
Vd	Distribuční objem (Volume of distribution)
VŠCHT	Vysoká škola chemicko-technologická

## Seznam vlastních publikací

Sumární IF = 37,119

Počet citací dle Web of Science ke dni 16. 10. 2023: 27

H-index: 4

# Sdílené prvoautorství

1. 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. (IF<sub>2022</sub> = 3,7)
2. 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. (IF<sub>2022</sub> = 5,4)
3. 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. (IF<sub>2022</sub> = 5,8)
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. (IF<sub>2022</sub> = 5,4)
5. 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. (IF<sub>2021</sub> = 3,337)
6. 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. (IF<sub>2021</sub> = 9,473)

7. ROUSAROVA, J., SIMA, M. & SLANAR, O. 2021b. Therapeutic Drug Monitoring of Protein Kinase Inhibitors in Breast Cancer Patients. Prague Med Rep, 122, 243-256.
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. (IF<sub>2020</sub> = 4,009)

Abstrakty, postery a přednášky na odborných konferencích:

1. ROUŠAROVÁ, J., HOŘÍNKOVÁ, J., RYŠÁNEK, P., SVĚTLÍK, S., ŠÍMA, M., SLANAŘ, O. 2019. Preclinical pharmacokinetics of 2 new nilotinib prototypes. The Parc symposium.
2. ROUŠAROVÁ, J., KRÁLOVIČOVÁ, J., RYŠÁNEK, P., SALOŇ, I., ŠÍMA, M., SLANAŘ, O., ŠTĚPÁNEK, F. 2020. Nilotinib exposure in rats after dosing with formulations containing nilotinib and glucan particles. The Parc symposium.
3. ROUŠAROVÁ, J., KRÁLOVIČOVÁ, J., RYŠÁNEK, P., NOVÁK, M., ŠÍMA, M., SLANAŘ, O., ŠTĚPÁNEK, F. 2021. Pharmacokinetics modifying properties of floating tablets. The Parc symposium.
4. ROUŠAROVÁ, J. 2021. Rat Model of Collagen-induced Arthritis. The Parc symposium.
5. ROUŠAROVÁ, J., JELÍNEK, P., ŠÍMA, M., SLANAŘ, O., ŠOÓŠ, M. 2021. Cannabidiol in the treatment of collagen-induced arthritis in female wistar rats. The Parc symposium.
6. ROUŠAROVÁ, J. 2022. Report from the internship at the Institut Pasteur de Lille. The Parc symposium.
7. ROUŠAROVÁ, J., ODLOŽILÍKOVÁ, M. N., BARTŮNĚK, A., SLANAŘ, O. 2022. Zanamivir in the form of solution for nebulization. The Parc symposium.
8. ROUŠAROVÁ, J., GOSSET, P. 2022 Lipopolysaccharide-induced pneumonia in mice. The Parc symposium.
9. ŠMARDOVÁ, J. 2023. Animal models for *in vivo* testing of pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of selected drugs. The Parc symposium.

## **Poděkování**

Ráda bych na tomto místě poděkovala svému školiteli doc. PharmDr. Martinovi Šímovi, PhD. nejen za jeho profesionální vedení mého studia, ale i velmi lidský přístup a ochotu. Mé poděkování patří také přednostovi Farmakologického ústavu 1. LF UK a VFN prof. MUDr. Ondřeji Slanařovi, PhD. za to, že mi umožnil působit na tomto ústavu, vedl se mnou odborné konzultace týkající se mé vědecké práce a zprostředkoval mi mnoho zajímavých studijních i pracovních příležitostí. Dále děkuji všem spoluautorům publikací, jejichž spolupráce byla pro realizaci některých částí výzkumu nezbytná. Na závěr děkuji také svému manželovi Dominikovi za jeho velkou podporu během celého studia.

## 1. Literární 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. V této fázi mohou sloužit např. 1/ k hledání výhodnějších formulací s cílem odstranit některé nevýhody již registrovaných lékových forem jako je např. nízká biologická dostupnost účinné látky či negativní vliv potravy na její absorpci, 2/ k testování možností využití již registrovaných léčiv ve specifických populacích, např. pediatrických, pro které jejich použití není dosud schváleno, či 3/ ke zkoumání dalších potenciálních indikací již registrovaných léčiv.

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.

### 1.1. Postnatální ontogeneze a její vliv na farmakokinetické parametry léčiv

V pediatrické populaci dochází k alteraci farmakokinetických vlastností léčiv a oproti dospělým lze očekávat odlišně probíhající procesy absorpce, distribuce, metabolismu i eliminace léčiv (van den Anker et al., 2018).

Důvodem pozmeněné absorpce léčiv může být např. neutrální gastrické pH u novorozenců v prvních dnech života, pomalejší vyprazdňování žaludku u dětí do 6 až 8 měsíců věku či pozvolný vývoj gastrointestinálních transportérů (van den Anker et al., 2018, Allegaert and van den Anker, 2015, Avery et al., 1966).

Pro distribuci léčiv je zásadní obsah vody v organismu. Ten je významně vyšší u novorozenců, asi 70 %, a klesá na cca 60 % během prvních dvou let života (Allegaert et al., 2015). Stejně tomu tak je s objemem extracelulární tekutiny, který je rovněž vyšší u novorozenců a s věkem postupně klesá. Obsah lipidů v organismu v průběhu ontogeneze kolísá, při narození tvoří asi 10 až 15 %, během raného dětství vzrůstá na 20 až 25 % a poté opět postupně klesá na původní hodnoty. Vyšší obsah extracelulární i celkové tělesné tekutiny u takto malých dětí logicky vede k nižším plazmatickým koncentracím léčiv distribuujících se do těchto kompartmentů, a tím pádem k vyšším hodnotám distribučního objemu. Obráceně tomu je u lipofilních látek distribuujících se do tuku. Proces distribuce

může být v pediatrické populaci odlišný také u léčiv vázajících se na plazmatické bílkoviny. Obsah albuminu,  $\alpha$ 1-glykoproteinu či plazmatických globulinů je totiž v dětském věku významně nižší než u dospělých. V dětském věku se také liší permeabilita membrán mající význam zejména u prostupu léčiv do centrálního nervového systému. Postupně narůstá exprese efluxních transportérů jako je např. p-glykoprotein (van den Anker et al., 2018).

Za nejstěžejnější orgán pro proces metabolismu jsou považována játra disponující velkým množstvím různých enzymů fáze I i fáze II, které se během ontogeneze vyvíjí různou rychlostí. Např. v metabolických procesech nejčastěji zastoupený CYP3A4/5, který metabolizuje 50 až 60 % léčiv (van den Anker et al., 2018), maturuje pomalu a aktivity obdobné jako u dospělého jedince dosahuje na konci raného dětství (de Wildt et al., 1999).

Mechanismy stěžejní pro renální exkreci léčiv, tedy glomerulární filtrace, tubulární sekrece a tubulární reabsorpce, rovněž nedosahují stejné účinnosti jako u dospělých. Clearance léčiv podléhajících eliminaci ledvinami je tedy značně redukována. Renálních funkcí normalizovaných na povrch těla na úrovni dospělého jedince bývá dosaženo kolem jednoho roku věku dítěte (Alcorn and McNamara, 2003).

Právě z důvodu dosud neznámo jak pozměněných farmakokinetických procesů v konkrétních ontogenetických fázích, není mnoho léčiv registrováno pro dětské pacienty, přestože by mohli z léčby těmito léčivy profitovat. Vliv postnatální ontogeneze na farmakokinetické parametry léčiv je tedy bezesporu důležitým předmětem výzkumu, kterému je třeba se věnovat.

### **1.1.1. Vývoj farmakokinetických parametrů rosuvastatinu v procesu postnatální ontogeneze**

Rosuvastatin je léčivo redukující syntézu cholesterolu. Patří do skupiny statinů, tedy inhibitorů 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl koenzym A reduktázy, které představují léky první volby nejenom v léčbě familiární hypercholesterolemie (Luirink et al., 2015).

Rosuvastatin je hydrofilní léčivo s distribučním objemem 134 L, a tím pádem významnou distribucí do tkání. Z 90 % je vázán na plazmatické bílkoviny, zejména na albumin. Téměř se nemetabolizuje a je vylučován v nezměněné formě z 28 % renálně a ze 72 % hepatálně (Luvai et al., 2012, Crouse, 2008). V eliminaci rosuvastatinu je zapojena řada aktivních transportérů jako např. MRP2, BSEP či transportéry ze skupiny OATP (Jemnitz et al., 2010, Ho et al., 2006).

Lze předpokládat, že běžné dávky rosuvastatinu určené pro dospělé pacienty by u dětí vedly k rozvoji nežádoucích účinků, především právě z důvodu nedostatečně maturovaných aktivních transportérů. Většina statinů je schválená pro léčbu dětí starších deseti let, rosuvastatin je v tuto chvíli v zemích EU a USA schválen pro děti od šesti let věku (Pang et al., 2020, Braamskamp et al., 2015, Stein et al., 2017). Dosud nejsou k dispozici data popisující účinnost a bezpečnost rosuvastatinu u dětí mladších šesti let, přitom včasné zahájení farmakoterapie je v léčbě familiární hypercholesterolemie klíčové pro snížení rizika komplikací spojených s aterosklerózou.

Pomocí *in vivo* modelu jsme se snažili popsat vývoj farmakokinetických parametrů rosuvastatinu napříč fázemi postnatální ontogeneze u potkana, které odpovídají konkrétním fázím postnatální ontogeneze u dítěte. Získaná data by měla sloužit jako základ pro stanovení optimálních dávek rosuvastatinu potenciálně využitelných v léčbě familiární hypercholesterolemie u pacientů mladších šesti let.

## **1.2. Možnosti zvýšení biologické dostupnosti léčiv**

Biologickou dostupnost léčiv ovlivňuje řada faktorů jako např. rychlost disoluce, efekt prvního průchodu játry nebo tendence využívat efluxní mechanismy. Mezi nejdůležitější faktory určující rozsah biologické dostupnosti však patří rozpustnost léčiva ve vodě a jeho permeabilita. Právě omezená rozpustnost léčiva ve vodě a nízká permeabilita vedou k nízké biologické dostupnosti (Gomez-Orellana, 2005).

Mezi strategie vedoucí k vyšší biologické dostupnosti léčiv lze řadit např. přípravu proléčiv. Proléčivo může mít výhodnější fyzikálně-chemické vlastnosti než původní léčivo a jeho podání tak může vést k vyšší biologické dostupnosti. Častější strategií je však příprava specificky designovaných lékových formulací (Gomez-Orellana, 2005). Biologickou dostupnost léčiv, která jsou omezeně rozpustná ve vodě, lze zvýšit např. vytvořením krystalických, amorfních či lipidových formulací (Gupta et al., 2013).

Lipidové formulace mohou také zvyšovat absorpci léčiva do lymfy. Právě zacílení vstřebávání léčiva do lymfy může zajistit vyšší biologickou dostupnost. Léčivo je totiž ze střeva vstřebáváno přímo do lymfatických cest a z hrudního mízovodu pak do systémového krevního řečiště, čímž se vyhne prvnímu průchodu játry (Rysanek et al., 2020).



Na biologickou dostupnost léčiv může mít také vliv současně podaná potrava. Pozměněné farmakokinetické vlastnosti ve stavu nalačno oproti stavu po jídle nazýváme jako tzv. food efekt.

V případě pozitivního food efektu vede podání léčiva současně s potravou k významně vyšší biologické dostupnosti oproti biologické dostupnosti po podání nalačno. To je dáno zejména lepší rozpustností ve stavu po jídle u léčiv omezeně rozpustných ve vodě. Z logiky věci vyplývá, že přijmutím strategií vedoucích ke zvýšení rozpustnosti léčiva se zvýší jeho biologická dostupnost ve stavu nalačno, a tím je redukován prostor pro potenciální postprandiální navýšení biologické dostupnosti. Odstranění food efektu tak v podstatě může představovat variantu, jak zvýšit biologickou dostupnost léčiv (Kushwah et al., 2021, Schultz et al., 2020, O'Shea et al., 2019).

### **1.2.1. Zvýšení biologické dostupnosti rivaroxabanu ve formě kokrytalů s kyselinou šťavelovou**

Rivaroxaban je perorálně podávané antikoagulancium přímo inhibující faktor Xa. Poměrně netypická je farmakokinetika rivaroxabanu ve vztahu k jeho dávce. Po podání 10 mg rivaroxabanu je dosaženo biologické dostupnosti 80 až 100 % nezávisle na tom, zda byl podán nalačno či po jídle. Podání 20 mg rivaroxabanu nalačno však vede k biologické dostupnosti pouze 66 % a je tedy lepší tuto dávku podávat s jídlem, se kterým narůstá průměrná hodnota AUC o 39 % (Mueck et al., 2014).

Vědecký tým z VŠCHT vyvinul inovativní formulaci s rivaroxabanem ve formě kokrytalů s kyselinou šťavelovou. Farmaceutické kokrytaly lze popsat jako krystaly složené v určitém stechiometrickém poměru ze dvou a více látek, včetně látky účinné, které jsou mezi sebou spojené nekovalentními chemickými vazbami (Mueck et al., 2014). Příprava kokrytalů ve farmaceutickém průmyslu je volena za účelem úpravy fyzikálně-chemických vlastností léčiv jako je bod tání, jejich reologické vlastnosti nebo rychlost disoluce (Elder et al., 2013, Jirat et al., 2020, Khandavilli et al., 2018, Skorepova et al., 2014, Sladkova et al., 2015). Rivaroxaban je látka omezeně rozpustná ve vodě, což je pravděpodobná příčina nízké biologické dostupnosti po podání nalačno (Takacs-Novak et al., 2013). Právě forma kokrytalů by mohla jeho rozpustnost zvýšit, čímž by se zvýšila biologická dostupnost po podání nalačno, a tím by se redukoval vliv potravy. (Kushwah et al., 2021). Za využití *in vivo* potkaního modelu a cross-over uspořádání studie jsme tuto formulaci testovali.

### **1.2.2. Zvýšení biologické dostupnosti abirateronu po podání abirateron acetátu ve formě olejových kuliček**

Abirateron acetát je proléčivo abirateronu, který inhibuje  $17\alpha$ -hydroxylázu, enzym nezbytný k produkci androgenů, a lze jej tedy využít k terapii metastazujícího karcinomu prostaty rezistentního na kastraci (Rehman and Rosenberg, 2012).

Po podání abirateron acetátu nalačno dosahuje abirateron biologické dostupnosti nižší než 10 %. Při podání s jídlem jeho biologická dostupnost stoupá. Tento nárůst je však velmi variabilní a nepředvídatelný. Podání abirateron acetátu s potravou bohatou na tuky může zvýšit  $C_{max}$  a AUC abirateronu až 17 krát, respektive 10 krát. Z důvodu této variability se tedy originální léčivý přípravek s abirateron acetátem podává ve vysokých dávkách nalačno (Lubberman et al., 2019, Chi et al., 2015, EMA, 2011).

Stejně jako výše uvedený rivaroxaban je abirateron acetát omezeně rozpustný ve vodě. Podařilo-li by se zvýšit jeho rozpustnost, a tím zvýšit jeho biologickou dostupnost v podmínkách nalačno, pak by se redukoval jeho pozitivní food efekt (Schultz et al., 2020).

Vědecký tým z VŠCHT ve snaze zvýšit biologickou dostupnost abirateron acetátu nalačno, a tím snížit vliv současně podané potravy, vyvinul inovativní formulaci, ve které je již rozpuštěný abirateron acetát inkorporován do olejových kapének uzavřených do kuliček se stěnou tvořenou pevnými částicemi, tzv. oil marbles. Za využití potkaního *in vivo* modelu jsme tuto formulaci testovali v cross-over uspořádání, a to jak ve stavu nalačno, tak ve stavu po jídle.

### **1.2.3. Zvýšení biologické dostupnosti kanabidiolu ve formě mikroemulze**

Kanabidiol je přírodní látka vyskytující se v rostlinách rodu *Cannabis sativa*. Na rozdíl od THC, kanabidiol nepůsobí psychoaktivně a svou schopností vázat se na kanabinoidní (CB) receptory skýtá významný terapeutický potenciál pro léčbu rozmanitých onemocnění (An et al., 2020). Kanabidiol je nicméně látka, která je velmi špatně rozpustná ve vodě, a tím pádem látka s velmi nízkou biologickou dostupností po perorálním podání (Perucca and Bialer, 2020). Příčinou nízké biologické dostupnosti je i významný metabolismus kanabidiolu po prvním průchodu játry (Huestis, 2007). Po podání kanabidiolu nalačno je dosaženo biologické dostupnosti pouze 6 %, čtyřikrát vyšší biologické dostupnosti je pak dosaženo po podání s jídlem bohatým na tuky. Problém nízké biologické dostupnosti kanabidiolu lze řešit přípravou speciálních lékových formulací.

Jednou z možností je příprava lékových formulací, které by zacílili absorpci kanabidiolu do lymfy (Perucca and Bialer, 2020).

Tým akademiků z VŠCHT vyvinul speciální mikroemulzi s kanabidiolem cílicí na absorpci do lymfy, a tím ke zvýšení biologické dostupnosti. Za využití potkaního *in vivo* modelu jsme biologickou dostupnost této formulace testovali v cross-over uspořádání a porovnávali se standardním olejovým roztokem.

### **1.3. Protizánětlivé účinky kanabidiolu**

Jak již bylo zmíněno v předchozí kapitole, kanabidiol působí prostřednictvím vazby na CB receptory. Zdá se, že se na tyto receptory váže jako alosterický agonista, což by mohlo vysvětlovat, proč kanabidiol nepůsobí psychoaktivně ve srovnání s THC, které se na CB receptory váže přímo (Lowin et al., 2020).

CB receptory subtypu 1 jsou lokalizovány zejména v CNS a jejich aktivace ovlivňuje kognici, krátkodobou paměť či motorické funkce. CB receptory subtypu 2 jsou receptory spíše periferní vyskytující se v tkáních imunitního systému (Pertwee, 1997). Prostřednictvím CB2 receptorů je regulována diferenciace B a T buněk a zajišťována rovnováha mezi prozánětlivými Th1 a protizánětlivými Th2 cytokiny. V makrofázích vede stimulace CB2 receptorů k inhibici fagocytózy či k potlačení proliferace a uvolňování řady prozánětlivých faktorů jako je NO, TNF- $\alpha$  nebo IL-12p40. Aktivace CB2 receptorů rovněž potlačuje migraci a diferenciaci neutrofilů, indukuje však migraci NK buněk. Všechny tyto mechanismy naznačují protizánětlivé a imunosupresivní působení dosažitelné agonismem na CB2 receptorech (Ashton and Glass, 2007). Agonistickým působením na tyto receptory, právě třeba kanabidiolem, by mohla být léčena řada zánětlivých onemocnění jako je revmatoidní artritida, ateroskleróza či zánětlivá onemocnění střev (Turcotte et al., 2016).

#### **1.3.1. Protizánětlivé účinky kanabidiolu ve formě mikroemulze v léčbě kolagenem indukované artritidy**

V současnosti využívané postupy léčby revmatoidní artritidy za využití léčiv ze skupiny DMARDs, zejména s nástupem těch biologických, přináší relativně uspokojující výsledky. Nicméně se stále setkáváme s přibližně 20 až 30 % pacientů, kteří jsou vůči této léčbě rezistentní. Tato léčiva jsou navíc poměrně nákladná a často musí být podávána parenterálně, což stran compliance pacientů může představovat významnou překážku (Kerschbaumer et al., 2020). Perorálně podávaný kanabidiol s adekvátní biologickou

dostupností by mohl představovat jednu z možností rozšíření spektra léčiv využívaných pro léčbu revmatoidní artritidy.

V léčbě revmatoidní artritidy by měla mít význam vazba kanabidiolu na kanabinoidní receptory subtypu 2. Jak již bylo zmíněno výše, tyto receptory hrají důležitou roli v imunitních dějích a zánětlivé bolestivé odpovědi. Jejich aktivace vede k supresi imunitních buněk, snižuje produkci prozánětlivých cytokinů, autoprotiláték a matrix-metaloproteináz. Následkem aktivace CB2 receptorů je rovněž potlačována proliferace fibroblastoidních synoviálních buněk (Kaur et al., 2020). V literatuře již bylo popsáno, že kanabidiol u zvířecího CIA modelu zmírňoval příznaky synovitidy a poškození kloubu (Malfait et al., 2000, Trentham et al., 1977).

Mikroemulzi s kanabidiolem zmíněnou v kapitole 1.2.3. jsme na *in vivo* potkaním modelu testovali stran protizánětlivých účinků v léčbě revmatoidní artritidy. Jako prozánětlivý marker, jehož vývoj jsme během léčby sledovali, byla zvolena matrix metaloproteináza 3 (MMP-3). MMP-3 podporuje vaskularizaci tkáně uvnitř kloubu, poškozují chrupavčitou tkáň kloubu a podporuje diferenciaci osteoklastů (Wan et al., 2021).

## 2. Hypotézy a cíle práce

Náplní mého postgraduálního studia byl vývoj a optimalizace metod pro *in vivo* testování farmakokinetických a farmakodynamických vlastností vybraných modelových léčivých látek a jejich různorodých lékových forem či chemických formulací.

Stanoveny byly následující 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. Metody

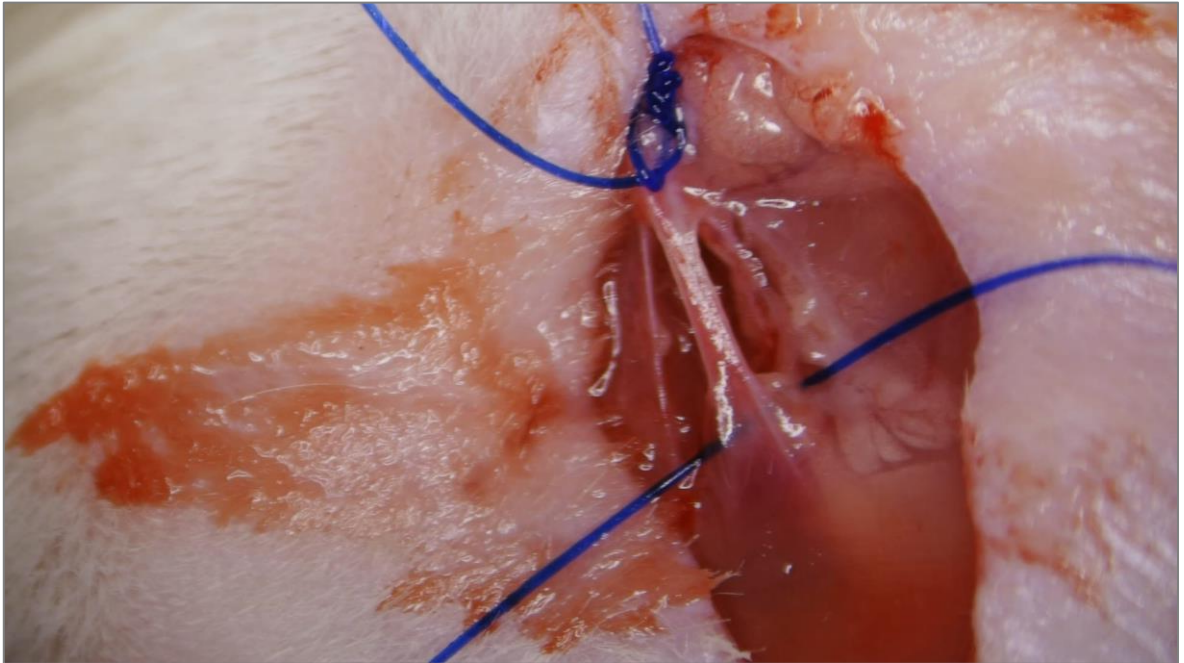
Veškeré metody využití pro získání výsledků této práce jsou *in extenso* popsány v publikovaných článcích, které jsou zahrnuty ve formě příloh. V této kapitole jsou stěžejní metody pouze stručně okomentovány.

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).

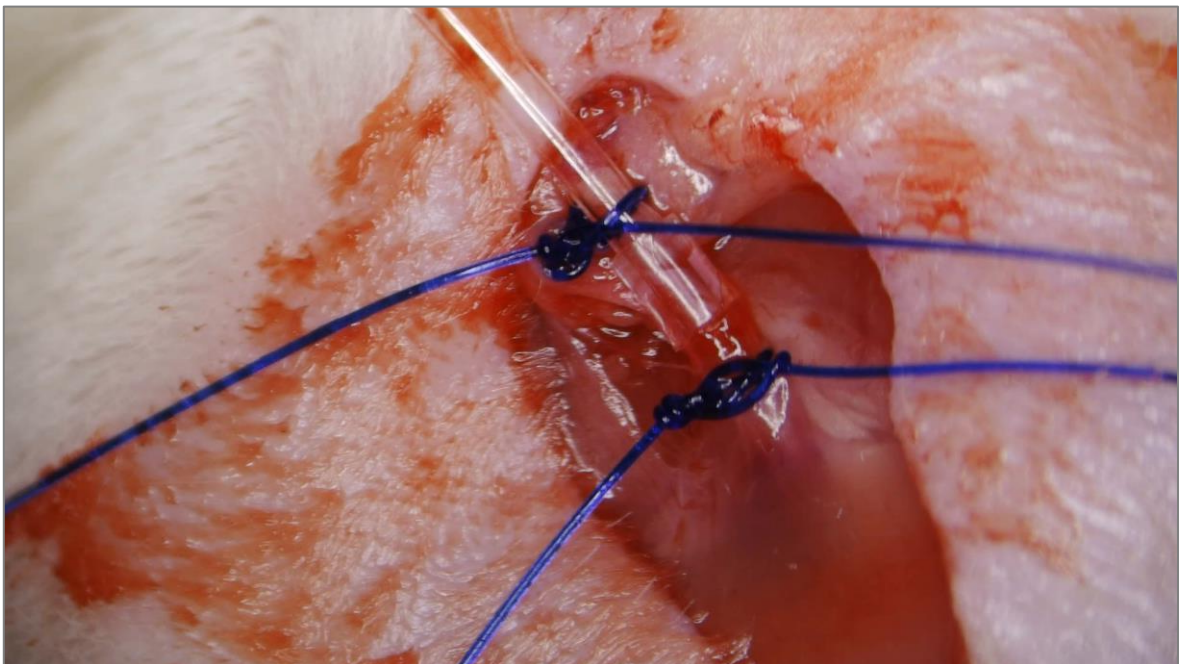
#### 3.1. Opakované versus jednorázové krevní odběry

Ve většině experimentů byla využita metoda opakovaných krevních odběrů (Příloha 2, 3, 4). Za účelem opakovaných krevních odběrů provádíme kanylaci *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 (Obrázky 1 - 3). 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 (Obrázek 4).

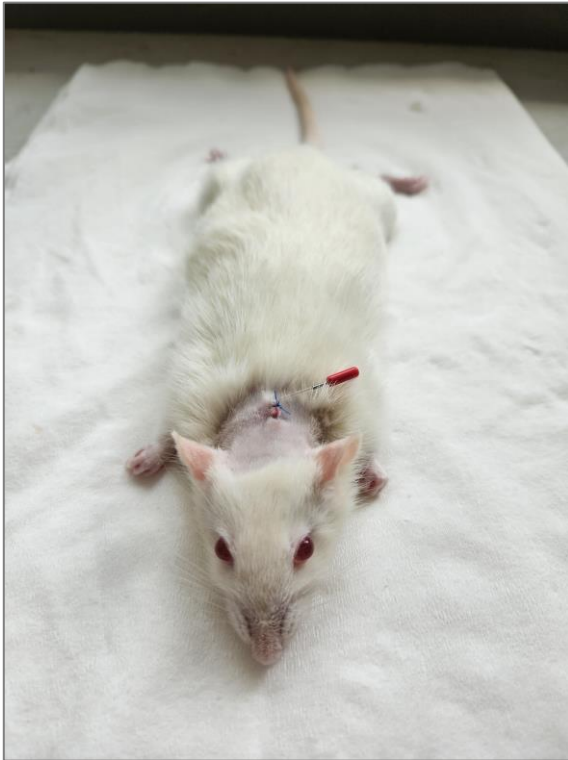
**Obrázek 1:** *Kraniálně podvázaná vena jugularis externa.*



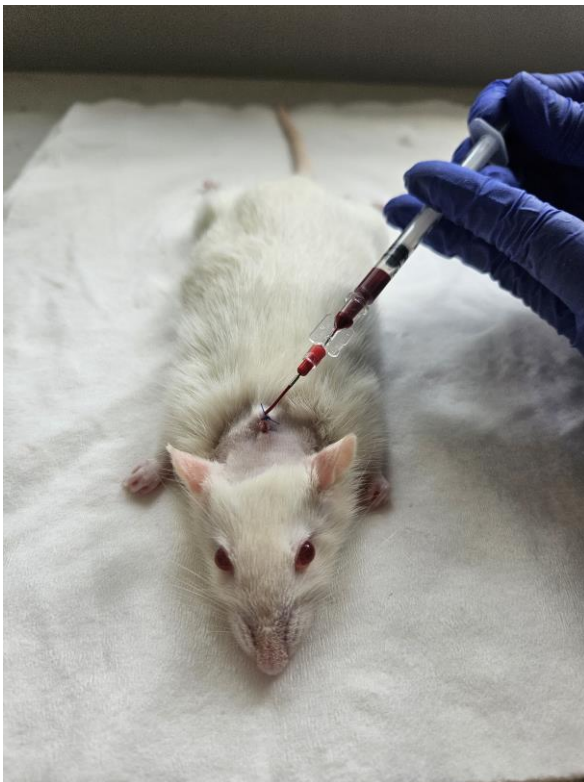
**Obrázek 2:** *Polyuretanový katetr zavedený a upevněný ve vena jugularis externa.*



**Obrázek 3:** Polyuretanový katetr vyvedený na zátylku potkana.



**Obrázek 4:** Odběr krve z polyuretanového katetru zavedeného ve vena jugularis externa vyúsťujícího na zátylku potkana.





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 mikroemulze 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.

### 3.2. Cross-over uspořádání studií

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 popsáný 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).

### 3.3. Kolagenem indukovaná artritida

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 (Tabulka 1, Obrázek 5). Za úspěšné navození CIA je považován zisk minimálně 2 bodů (Hu et al., 2017).

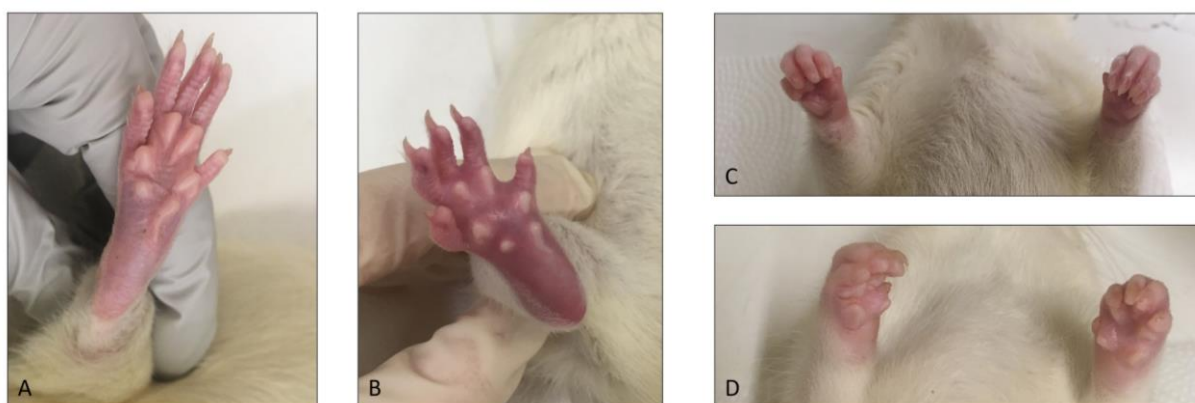
Po několika dnech, kdy bylo dosaženo adekvátního počtu naindukovaných zvířat, bylo možné randomizovat zvířata do definovaných skupin (skupina léčená testovaným přípravkem, pozitivní kontrola, popř. skupina léčená referenčním přípravkem) a zahájit léčbu. Ještě před zahájením léčby jsme provedli náběry 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.

**Tabulka 1:** Skórovací systém pro hodnocení úspěšnosti indukce a závažnosti CIA; převzato z 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.

Skóre na jedné končetině	Popis
0	Standardní podoba všech kloubů
1	Otok a zarudnutí na jednom kloubu
2	Otok a zarudnutí na více než jednom kloubu
3	Otok celé končetiny
4	Deformita kloubu, ankylóza, nehybnost



**Obrázek 5:** A: skóre 0 na zadní končetině; B: skóre 4 na zadní končetině; C: skóre 0 + 0 na předních končetinách; D: skóre 4 + 4 na předních končetinách

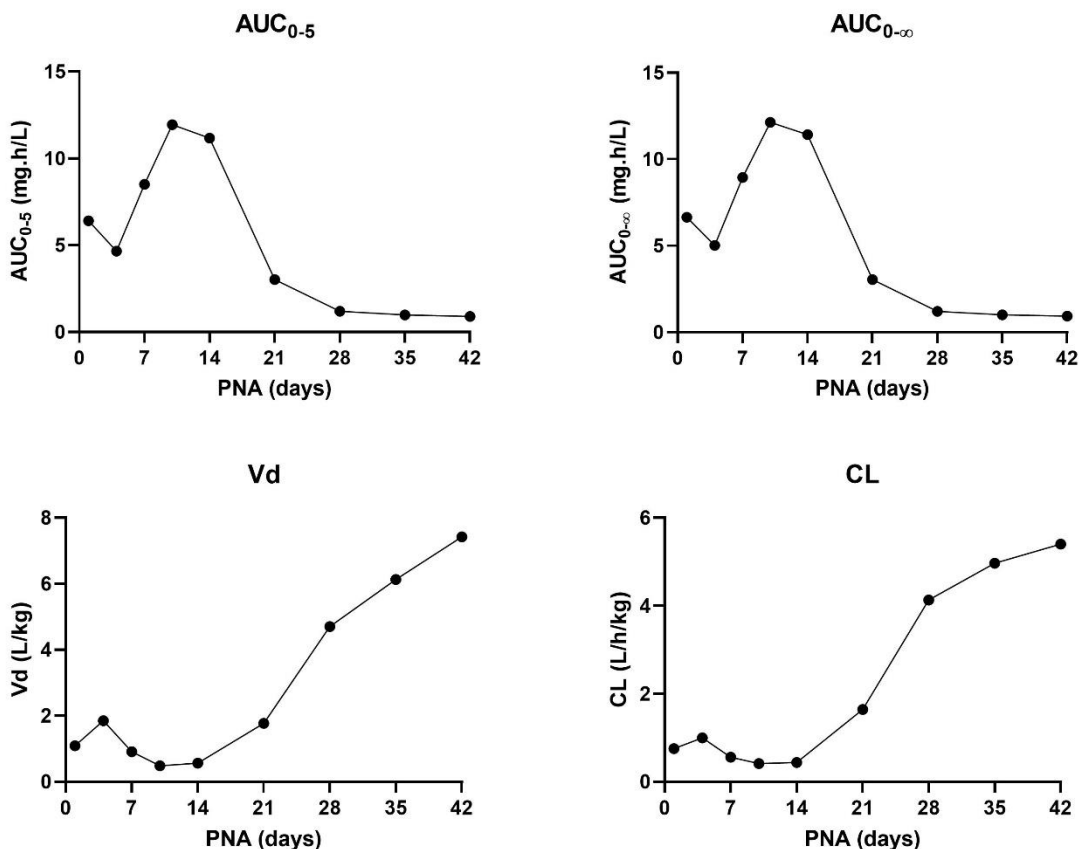
## 4. Výsledky

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

### 4.1. Vývoj farmakokinetických parametrů rosuvastatinu v procesu postnatální ontogeneze

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 (Obrázek 6). 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.



**Obrázek 6:** Vývoj farmakokinetických parametrů rosuvastatinu v procesu postnatální ontogeneze u potkanů za použití mediánních vypočtených hodnot; PNA: postnatal age, AUC<sub>0-5</sub>: area under the curve from zero to 5 hours, AUC<sub>0-∞</sub>: area under the curve from zero to infinity, CL: apparent clearance, Vd: apparent volume of distribution

#### 4.2. Zvýšení biologické dostupnosti rivaroxabanu ve formě kokryystalů s kyselinou šťavelovou

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

Poměr geometrických průměrů (kokryystalová formulace vs. reference) činil 1,98 (90% CI: 1,57 – 2,50) pro C<sub>max</sub> 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 T<sub>max</sub> 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.

#### **4.3. Zvýšení biologické dostupnosti abirateronu po podání abirateron acetátu ve formě olejových kuliček**

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  $C_{max}$ ,  $P = 0,0138$  pro AUC). Poměr geometrických průměrů (oil marbles vs. reference) činil 3,98 (90% CI: 2,14 – 7,40) pro  $C_{max}$  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  $T_{max}$  (medián 168 min u oil marbles vs 244 min u reference), statisticky významný rozdíl mezi hodnotami  $T_{max}$  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  $T_{max}$  ( $P = 0,5625$ ). Inkorporací 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 prolongovaný  $T_{max}$  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 ( $P = 0,6250$ ).

#### **4.4. Zvýšení biologické dostupnosti kanabidiolu ve formě mikroemulze**

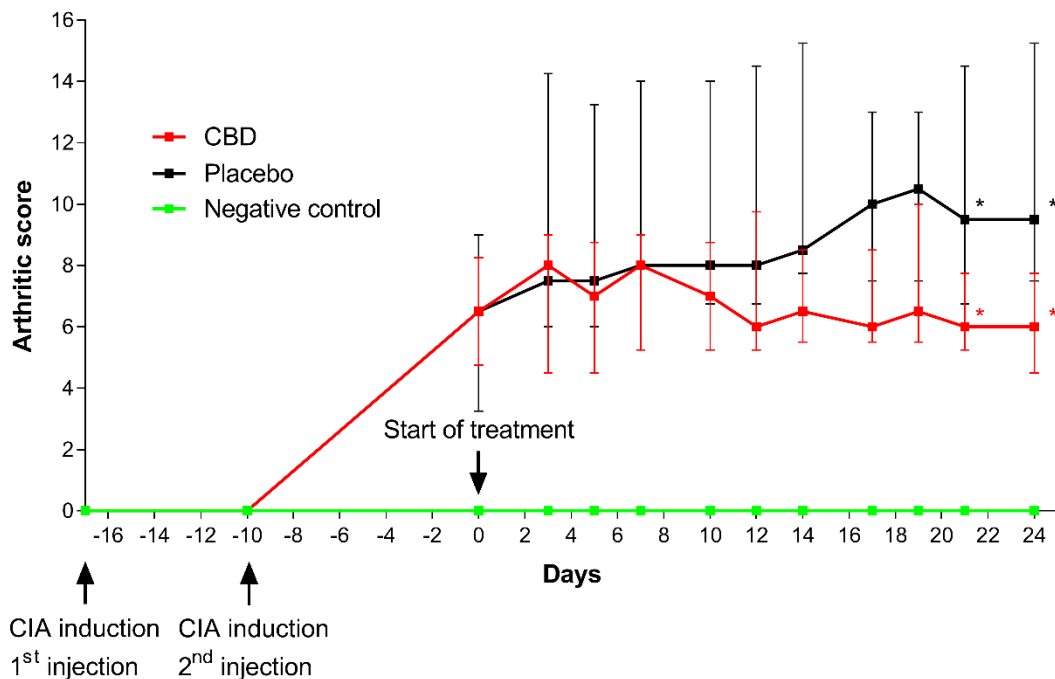
Po podání kanabidiolu ve formě mikroemulze bylo dosaženo statisticky významně vyšší relativní biologické dostupnosti v porovnání s kanabidiolem ve formě olejového roztoku ( $P < 0,0001$  pro  $C_{max}$ ,  $P = 0,0033$  pro AUC). Poměr geometrických průměrů (mikroemulze vs. olejový roztok) činil 3,24 (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, byl-li kanabidiol podán ve formě mikroemulze. Z mediáních 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 ( $P = 0,0598$ ).

#### **4.5. Protizánětlivé účinky kanabidiolu ve formě mikroemulze v léčbě kolagenem indukované artritidy**

Obrázek 7 ukazuje 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 (Tabulka 2). 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 ( $P = 0,37$ ).



**Obrázek 7:** Vývoj artritického skóre u potkanů s kolagenem-indukovanou artritidou léčených kanabidiolem či placebem a u potkanů sloužících jako negativní kontrola. Hodnoty jsou vyjádřeny jako mediány; \* $P < 0,05$ ; CIA: kolagenem-indukovaná artritida (collagen-induced arthritis)

**Tabulka 1:** Průměrná šířka kotníků na obou zadních končetinách potkanů a průměrná hladina MMP-3 v plazmě v den zahájení a ukončení léčby

	Průměrná šířka kotníků (mm ± SD)				Průměrná plazmatická koncentrace MMP-3 (% of AU ± SD)	
	Levý kotník	Pravý kotník	Levý kotník	Pravý kotník	Den 0	Den 24
	Den 0		Den 24			
<b>Negativní kontrola</b>	5,44 ± 0,05	5,31 ± 0,43	5,70 ± 0,20	5,77 ± 0,22	1,00 ± 0,27	1,00 ± 1,30
<b>CBD</b>	7,77 ± 1,40	8,60 ± 0,60	7,88 ± 0,93	8,27 ± 0,22	368,22 ± 435,36	20,23 ± 18,69
<b>Placebo</b>	7,14 ± 1,51	7,80 ± 1,28	8,57 ± 0,20	8,55 ± 0,37	154,76 ± 220,46	27,88 ± 12,27



## 5. Diskuze

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.

### 5.1. Vývoj farmakokinetických parametrů rosuvastatinu v procesu postnatální ontogeneze

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 aktivita 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 (Tabulka 3).

Z výsledků je patrná 5 krát až 13 krát vyšší expozice rosuvastatinu u mláďat mladších 21 dní v porovnání s hodnotami mláďat 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.

**Tabulka 3:** Hodnoty AUC rosuvastatinu u potkanů různého postnatálního věku relativně vztažené k ontogenetickým fázím a ekvivalentnímu postnatálnímu věku člověka;  $AUC_{0-\infty}$ : area under the curve from zero to infinity; Ontogenetické fáze a věk člověka a jim odpovídající věk potkana převzaty z PICUT, C. A., DIXON, D., SIMONS, M. L., STUMP, D. G., PARKER, G. A. & REMICK, A. K. 2015. Postnatal ovary development in the rat: morphologic study and correlation of morphology to neuroendocrine parameters. *Toxicol Pathol*, 43, 343-53.)

Ontogenetická fáze	Postnatální věk člověka	Postnatální věk potkana	$AUC_{0-\infty}$
Novorozenecké období	0-28 dní	0-7 dní	540-962 %
Kojenecké až batolecí období	1-23 měsíců	8-20 dní	1228-1304 %
Batolecí období až starší školní věk	2-12 let	21-32 dní	109-328 %
Adolescent	> 12 let	> 32 dní	100 %

## 5.2. Zvýšení biologické dostupnosti rivaroxabanu ve formě kokrytalů s kyselinou šťavelovou

Rivaroxaban ve formě kokrytalů 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.

### **5.3. Zvýšení biologické dostupnosti abirateronu po podání abirateron acetátu ve formě olejových kuliček**

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.

### **5.4. Zvýšení biologické dostupnosti kanabidiolu ve formě mikroemulze**

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.

### **5.5. Protizánětlivé účinky kanabidiolu ve formě mikroemulze v léčbě kolagenem indukované artritidy**

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 onemocnění. 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. Závěr

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 mezidruhově 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 kokystalů 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

Následující literární zdroje byly využity za účelem sepsání literárního úvodu a komentářů k této dizertační práci. Veškeré literární zdroje, ze kterých bylo čerpáno při tvorbě předkládaných publikací, jsou součástí konkrétních příloh.

- ALCORN, J. & MCNAMARA, P. J. 2003. Pharmacokinetics in the newborn. *Adv Drug Deliv Rev*, 55, 667-86.
- ALLEGAERT, K., COSSEY, V. & VAN DEN ANKER, J. N. 2015. Dosing Guidelines of Aminoglycosides in Neonates: A Balance Between Physiology and Feasibility. *Curr Pharm Des*, 21, 5699-704.
- ALLEGAERT, K. & VAN DEN ANKER, J. 2015. Neonatal drug therapy: The first frontier of therapeutics for children. *Clin Pharmacol Ther*, 98, 288-97.
- AN, D., PEIGNEUR, S., HENDRICKX, L. A. & TYTGAT, J. 2020. Targeting Cannabinoid Receptors: Current Status and Prospects of Natural Products. *Int J Mol Sci*, 21.
- ASHTON, J. C. & GLASS, M. 2007. The cannabinoid CB2 receptor as a target for inflammation-dependent neurodegeneration. *Curr Neuropharmacol*, 5, 73-80.
- AVERY, G. B., RANDOLPH, J. G. & WEAVER, T. 1966. Gastric acidity in the first day of life. *Pediatrics*, 37, 1005-7.
- BRAAMSKAMP, M., LANGSLET, G., MCCRINDLE, B. W., CASSIMAN, D., FRANCIS, G. A., GAGNE, C., GAUDET, D., MORRISON, K. M., WIEGMAN, A., TURNER, T., KUSTERS, D. M., MILLER, E., RAICHLEN, J. S., WISSMAR, J., MARTIN, P. D., STEIN, E. A. & KASTELEIN, J. J. P. 2015. Efficacy and safety of rosuvastatin therapy in children and adolescents with familial hypercholesterolemia: Results from the CHARON study. *J Clin Lipidol*, 9, 741-750.
- CROUSE, J. R., 3RD 2008. An evaluation of rosuvastatin: pharmacokinetics, clinical efficacy and tolerability. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 4, 287-304.
- DE WILDT, S. N., KEARNS, G. L., LEEDER, J. S. & VAN DEN ANKER, J. N. 1999. Cytochrome P450 3A: ontogeny and drug disposition. *Clin Pharmacokinet*, 37, 485-505.
- ELDER, D. P., HOLM, R. & DIEGO, H. L. 2013. Use of pharmaceutical salts and cocrystals to address the issue of poor solubility. *Int J Pharm*, 453, 88-100.
- EMA 2011. Zytiga, EMA/CHMP/542871, Assessment report for Zytiga (European Medicines Agency).
- 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.
- GOMEZ-ORELLANA, I. 2005. Strategies to improve oral drug bioavailability. *Expert Opin Drug Deliv*, 2, 419-33.
- GUPTA, S., KESARLA, R. & OMRI, A. 2013. Formulation strategies to improve the bioavailability of poorly absorbed drugs with special emphasis on self-emulsifying systems. *ISRN Pharm*, 2013, 848043.
- HO, R. H., TIRONA, R. G., LEAKE, B. F., GLAESER, H., LEE, W., LEMKE, C. J., WANG, Y. & KIM, R. B. 2006. Drug and bile acid transporters in rosuvastatin hepatic uptake: function, expression, and pharmacogenetics. *Gastroenterology*, 130, 1793-806.

- 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.
- HUESTIS, M. A. 2007. Human cannabinoid pharmacokinetics. *Chem Biodivers*, 4, 1770-804.
- CHI, K. N., SPRATLIN, J., KOLLMANNNSBERGER, C., NORTH, S., PANKRAS, C., GONZALEZ, M., BERNARD, A., STIELTJES, H., PENG, L. X., JIAO, J., ACHARYA, M., KHEOH, T., GRIFFIN, T. W., YU, M. K., CHIEN, C. & TRAN, N. P. 2015. Food Effects on Abiraterone Pharmacokinetics in Healthy Subjects and Patients With Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *Journal of Clinical Pharmacology*, 55, 1406-1414.
- JEMNITZ, K., VERES, Z., TUGYI, R. & VERECZKEY, L. 2010. Biliary efflux transporters involved in the clearance of rosuvastatin in sandwich culture of primary rat hepatocytes. *Toxicol In Vitro*, 24, 605-10.
- JIRAT, J., ZVONICEK, V., BABOR, M., RIDVAN, L., SKOREPOVA, E., DUSEK, M. & SOOS, M. 2020. Formation of the First Non-Isostructural Cocrystal of Apremilast Explained. *Crystal Growth & Design*, 20, 5785-5795.
- KAUR, I., BEHL, T., BUNGAU, S., ZENGIN, G., KUMAR, A., EL-ESAWI, M. A., KHULLAR, G., VENKATACHALAM, T. & ARORA, S. 2020. The endocannabinoid signaling pathway as an emerging target in pharmacotherapy, earmarking mitigation of destructive events in rheumatoid arthritis. *Life Sci*, 257, 118109.
- KERSCHBAUMER, A., SEPRIANO, A., SMOLEN, J. S., VAN DER HEIJDE, D., DOUGADOS, M., VAN VOLLENHOVEN, R., MCINNES, I. B., BIJLSMA, J. W. J., BURMESTER, G. R., DE WIT, M., FALZON, L. & LANDEWE, R. 2020. Efficacy of pharmacological treatment in rheumatoid arthritis: a systematic literature research informing the 2019 update of the EULAR recommendations for management of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 79, 744-759.
- KHANDAVILLI, U. B. R., SKOREPOVA, E., SINHA, A. S., BHOGALA, B. R., MAGUIRE, N. M., MAGUIRE, A. R. & LAWRENCE, S. E. 2018. Cocrystals and a Salt of the Bioactive Flavonoid: Naringenin. *Crystal Growth & Design*, 18, 4571-4577.
- 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.
- KUSHWAH, V., ARORA, S., TAMAS KATONA, M., MODHAVE, D., FROHLICH, E. & PAUDEL, A. 2021. On Absorption Modeling and Food Effect Prediction of Rivaroxaban, a BCS II Drug Orally Administered as an Immediate-Release Tablet. *Pharmaceutics*, 13.
- LOWIN, T., TINGTING, R., ZURMAHR, J., CLASSEN, T., SCHNEIDER, M. & PONGRATZ, G. 2020. Cannabidiol (CBD): a killer for inflammatory rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Cell Death Dis*, 11, 714.
- LUBBERMAN, F. J. E., BENOIST, G. E., GERRITSEN, W., BURGER, D. M., MEHRA, N., HAMBERG, P., VAN OORT, I. & VAN ERP, N. P. 2019. A prospective phase I multicentre randomized cross-over pharmacokinetic study to determine the effect of food on abiraterone pharmacokinetics. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 84, 1179-1185.

- LUIRINK, I. K., HUTTEN, B. A. & WIEGMAN, A. 2015. Optimizing Treatment of Familial Hypercholesterolemia in Children and Adolescents. *Curr Cardiol Rep*, 17, 629.
- LUVAI, A., MBAGAYA, W., HALL, A. S. & BARTH, J. H. 2012. Rosuvastatin: a review of the pharmacology and clinical effectiveness in cardiovascular disease. *Clin Med Insights Cardiol*, 6, 17-33.
- 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.
- MALFAIT, A. M., GALLILY, R., SUMARIWALLA, P. F., MALIK, A. S., ANDREAKOS, E., MECHOULAM, R. & FELDMANN, M. 2000. The nonpsychoactive cannabis constituent cannabidiol is an oral anti-arthritic therapeutic in murine collagen-induced arthritis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 9561-9566.
- MUECK, W., STAMPFUSS, J., KUBITZA, D. & BECKA, M. 2014. Clinical pharmacokinetic and pharmacodynamic profile of rivaroxaban. *Clin Pharmacokinet*, 53, 1-16.
- 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].
- O'SHEA, J. P., HOLM, R., O'DRISCOLL, C. M. & GRIFFIN, B. T. 2019. Food for thought: formulating away the food effect - a PEARRL review. *J Pharm Pharmacol*, 71, 510-535.
- PANG, J., CHAN, D. C. & WATTS, G. F. 2020. The Knowns and Unknowns of Contemporary Statin Therapy for Familial Hypercholesterolemia. *Curr Atheroscler Rep*, 22, 64.
- PERTWEE, R. G. 1997. Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Pharmacol Ther*, 74, 129-80.
- PERUCCA, E. & BIALER, M. 2020. Critical Aspects Affecting Cannabidiol Oral Bioavailability and Metabolic Elimination, and Related Clinical Implications. *CNS Drugs*, 34, 795-800.
- PICUT, C. A., DIXON, D., SIMONS, M. L., STUMP, D. G., PARKER, G. A. & REMICK, A. K. 2015. Postnatal ovary development in the rat: morphologic study and correlation of morphology to neuroendocrine parameters. *Toxicol Pathol*, 43, 343-53.
- REHMAN, Y. & ROSENBERG, J. E. 2012. Abiraterone acetate: oral androgen biosynthesis inhibitor for treatment of castration-resistant prostate cancer. *Drug Design Development and Therapy*, 6, 13-18.
- RYSANEK, P., GRUS, T., SIMA, M. & SLANAR, O. 2020. Lymphatic Transport of Drugs after Intestinal Absorption: Impact of Drug Formulation and Physicochemical Properties. *Pharm Res*, 37, 166.
- SCHULTZ, H. B., MEOLA, T. R., THOMAS, N. & PRESTIDGE, C. A. 2020. Oral formulation strategies to improve the bioavailability and mitigate the food effect of abiraterone acetate. *Int J Pharm*, 577, 119069.



- SKOREPOVA, E., HUSAK, M., CEJKA, J., ZAMOSTNY, P. & KRATOCHVIL, B. 2014. Increasing dissolution of trospium chloride by co-crystallization with urea. *Journal of Crystal Growth*, 399, 19-26.
- SLADKOVA, V., SKALICKA, T., SKOREPOVA, E., CEJKA, J., EIGNER, V. & KRATOCHVIL, B. 2015. Systematic solvate screening of trospium chloride: discovering hydrates of a long-established pharmaceutical. *Crystengcomm*, 17, 4712-4721.
- STEIN, E. A., DANN, E. J., WIEGMAN, A., SKOVBY, F., GAUDET, D., SOKAL, E., CHARNG, M. J., MOHAMED, M., LUIRINK, I., RAICHLIN, J. S., SUNDEN, M., CARLSSON, S. C., RAAL, F. J. & KASTELEIN, J. J. P. 2017. Efficacy of Rosuvastatin in Children With Homozygous Familial Hypercholesterolemia and Association With Underlying Genetic Mutations. *J Am Coll Cardiol*, 70, 1162-1170.
- TAKACS-NOVAK, K., SZOKE, V., VOLGYI, G., HORVATH, P., AMBRUS, R. & SZABO-REVESZ, P. 2013. Biorelevant solubility of poorly soluble drugs: Rivaroxaban, furosemide, papaverine and niflumic acid. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 83, 279-285.
- TRENTHAM, D. E., TOWNES, A. S. & KANG, A. H. 1977. Autoimmunity to Type-2 Collagen - Experimental-Model of Arthritis. *Journal of Experimental Medicine*, 146, 857-868.
- TURCOTTE, C., BLANCHET, M. R., LAVIOLETTE, M. & FLAMAND, N. 2016. The CB(2) receptor and its role as a regulator of inflammation. *Cell Mol Life Sci*, 73, 4449-4470.
- VAN DEN ANKER, J., REED, M. D., ALLEGAERT, K. & KEARNS, G. L. 2018. Developmental Changes in Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. *J Clin Pharmacol*, 58 Suppl 10, S10-S25.
- WAN, J., ZHANG, G., LI, X., QIU, X., OUYANG, J., DAI, J. & MIN, S. 2021. Matrix Metalloproteinase 3: A Promoting and Destabilizing Factor in the Pathogenesis of Disease and Cell Differentiation. *Front Physiol*, 12, 663978.

## 8. Seznam příloh

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 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*.