

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

Autoreferát dizertační práce



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

Fyziologické a patologické faktory ovlivňující absorpci léčiv

MUDr. Pavel Ryšánek

2023

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

**Obor:**

Farmakologie a toxikologie (0916VD350001)

**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.

Dizertační 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
Abstract.....	5
Seznam zkratek.....	6
1. Úvod .....	7
2. Hypotézy a cíle práce.....	7
3. Materiál a metodika .....	8
4. Výsledky.....	13
5. Diskuse .....	15
6. Závěry.....	17
7. Použitá literatura.....	18
8. Seznam publikací.....	19

## Abstrakt

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

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

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

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

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

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

Ve studiích shrnutých a komentovaných v této dizertační práci byla podrobně popsána farmakokinetika vybraných moderních léků a lékových forem včetně podílu lymfatické absorpce. Tyto informace budou využity při vývoji účinných látek a lékových forem s lepšími absorpčními vlastnostmi, případně specificky cílenými do intestinálního lymfatického systému.

### **Klíčová slova:**

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

## **Abstract**

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

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

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

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

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

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

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

### **Key words:**

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

## Seznam zkratek

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

## 1. Úvod

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

## 2. Hypotézy a cíle práce

Stanovené hypotézy:

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

Cílem práce bylo:

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

### **3. Materiál a metodika**

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

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

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

Dalším cílem hned od počátku bylo provádět studie v cross-over uspořádání, tj. podat skupině zvířat v jedné periodě jednu zkoumanou



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

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

Zpočátku byla k zajištění cévního vstupu zvolena arteria carotis. Její kanylace je relativně jednoduchá a možná bez nutnosti používat mikroskop. Vysoký tlak krve v cévě navíc usnadňuje odběry. S využitím této techniky bylo provedeno několik úvodních studií [Boleslavská et al., 2020]. Záhy se však ozřejmilo několik zásadních problémů. Katetr zavedený do tepny zapříčinil často její trombotizaci, což vedlo k rozvoji těžkých epileptických záchvatů či rovnou ke smrti zvířete. Pokud došlo během experimentu k uvolnění katetru, způsobilo to zas závažné krvácení.

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

### *Kanylace vena jugularis externa*

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

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

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

Po identifikaci žíly je nutné ji očistit od okolní vazivové a tukové tkáně a částečně izolovat. Kraniálně je žila podvázána, aby z hlavy již nepřitékala další krev. Kaudálně je podvaz zatím jen připraven pro pozdější fixaci katetru. Žíla je nastřižena zřepředu malými oftalmologickými nůžkami. Do nástřihu je nejprve zavedena kovová cévní sonda pro ozřejmání správného lumen a dostatečnou dilataci nástřihu. Po vytažení sondy je do žíly zaveden vlastní katetr. Je použit měkký polyuretanový katetr o průměru 3 Fr (cca 1 mm) a délce 10 cm.

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

### *Měření lymfatické absorpce*

Součástí většiny publikací komentovaných v této dizertační práci je měření lymfatické absorpce léčiv. To vyžaduje relativně složitý metodologický aparát, který bude popsán v této části textu. Byl zvolen model anestezovaného potkana se zakanylovaným mezenterickým lymfatickým duktem již mnoho let úspěšně používaný jinými týmy ve světě [Trevaskis et al., 2015]. Příprava modelu sestává z kanylace mezenterického lymfatického ductu pro odběr lymfy, kanylace duodena pro dávkování zkoumaného léčiva a kanylace jugulární žíly (viz. výše) pro pravidelné odběry krve.

U potkana je lymfa produkovaná ve střevních kličkách odváděna jedním mohutným lymfatickým kmenem. Jeho kanylací a sběrem veškeré

produkované lymfy je proto možné stanovit celkové množství léčiva vstřebaného lymfatickou cestou za sledovaný časový úsek.

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

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

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

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

Cílem experimentů zkoumajících lymfatickou absorpci je změřit biologickou dostupnost léčiva a přesně určit, jaká její část jde na vrub

transportu cestou mezenterických lymfatických cév a jaká část se transportuje klasicky cestou portální žíly.

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

Absolutní biologická dostupnost portální krví ( $F_{AP}$ ) je procento podané léčivé látky, které se objeví v systémové cirkulaci po průchodu portálním cévním řečištěm. Vypočítá se porovnáním AUC léčivé látky v krvi u potkanů se zakanylovaným mezenterickým duktem, tj. u zvířat, kde je systémová expozice léčiva způsobena pouze příspěvkem portálního cévního řečiště, a AUC léčiva po intravenózním podání u kontrolní skupiny zvířat dle vzorce:

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

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

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

#### 4. Výsledky

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

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

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

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

Mimo měření lymfatické absorpce pro základní referenční přípravek byly tyto parametry stanoveny též pro olejové kuličky (oil marbles) a pro olejový roztok (olivový olej). Tato data nebyla publikována a budou proto uvedena podrobně zde. Formulace olejových kuliček a olivový olej míru lymfatické absorpce nezvýšily. Olivový olej vykázal navíc velmi nízkou celkovou biologickou dostupnost.

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

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

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

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

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

Podání ani jedné formulace nevedlo k signifikantnímu vstřebávání nilotinibu do mezenterické lymfy. Relativní biologická dostupnost lymfou (průměr  $\pm$  směrodatná odchylka) byla  $0,44 \pm 0,06\%$  u reference a  $1,12 \pm$

0,93% u glukanových částic. Poměr expozice (AUC) nilotinibu v lymfě a v krvi byl pouze 1,4 po podání reference a 2,75 po podání glukanových částic.

## 5. Diskuse

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

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

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

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

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

Hlavním důvodem nízké lymfatické absorpce abirateronu je pravděpodobně jeho nedostatečně vysoká lipofilita. Nejsou dostupné

měřené údaje hodnoty Log P, různými početními algoritmy jsou však odhadovány na 4-5. Aby byla látka ve významné míře transportována do lymfy, jsou nutné hodnoty  $> 5$ .

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

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

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

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

Kanabidiol podaný ve formě nanoemulze měl perorální celkovou biologickou dostupnost 45%, což je výrazně více, než bylo doposud



popsáno u obvyklých olejových lékových forem včetně registrovaných léčivých přípravků (~10-20%) [Zgair et al., 2016]. To značí potenciál pro jejich vylepšení tak, že by se mohla podávat nižší dávka při zajištění stejné systémové expozice.

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

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

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

## 6. Závěry

Interpretace výsledků přiložených studií přinesla tyto závěry:

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

## 7. Použitá literatura

- Boleslavská T, Svetlík S, Zvatora P, Bosak J, Dammer O, Beranek J, et al. Preclinical evaluation of new formulation concepts for abiraterone acetate bioavailability enhancement based on the inhibition of pH-induced precipitation. *Eur J Pharm Biopharm.* 2020 Jun;151:81-90.
- Caliph SM, Charman WN, Porter CJ. Effect of short-, medium-, and long-chain fatty acid-based vehicles on the absolute oral bioavailability and intestinal lymphatic transport of halofantrine and assessment of mass balance in lymph-cannulated and non-cannulated rats. *J Pharm Sci.* 2000 Aug;89(8):1073-84.
- Dahan A, Hoffman A. Evaluation of a chylomicron flow blocking approach to investigate the intestinal lymphatic transport of lipophilic drugs. *Eur J Pharm Sci.* 2005 Mar;24(4):381-88.
- Han SF, Hu LJ, Quach T, Simpson JS, Trevaskis NL, Porter CJH. Constitutive Triglyceride Turnover into the Mesenteric Lymph Is Unable to Support Efficient Lymphatic Transport of a Biomimetic Triglyceride Prodrug. *J Pharm Sci.* 2016 Feb;105(2):786-96.
- Charman WNA, Stella VJ. Estimating the Maximal Potential for Intestinal Lymphatic Transport of Lipophilic Drug Molecules. *Int J Pharm.* 1986 Dec;34(1-2):175-78.

- Koziolek M, Alcaro S, Augustijns P, Basit AW, Grimm M, Hens B, et al. The mechanisms of pharmacokinetic food-drug interactions - A perspective from the UNGAP group. *Eur J Pharm Sci.* 2019 Jun 15;134:31-59.
- Kralovicova J, Bartunek A, Hofmann J, Krizek T, Kozlik P, Rousarova J, et al. Pharmacokinetic Variability in Pre-Clinical Studies: Sample Study with Abiraterone in Rats and Implications for Short-Term Comparative Pharmacokinetic Study Designs. *Pharmaceutics.* 2022 Mar 15;14(3).
- Rysanek P, Grus T, Sima M, Slanar O. Lymphatic Transport of Drugs after Intestinal Absorption: Impact of Drug Formulation and Physicochemical Properties. *Pharm Res.* 2020 Aug 7;37(9):166.
- Shackleford DM, Faassen WA, Houwing N, Lass H, Edwards GA, Porter CJ, et al. Contribution of lymphatically transported testosterone undecanoate to the systemic exposure of testosterone after oral administration of two andriol formulations in conscious lymph duct-cannulated dogs. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003 Sep;306(3):925-33.
- Trevaskis NL, Hu L, Caliph SM, Han S, Porter CJ. The mesenteric lymph duct cannulated rat model: application to the assessment of intestinal lymphatic drug transport. *J Vis Exp.* 2015 Mar 6(97).
- Zgair A, Wong JC, Lee JB, Mistry J, Sivak O, Wasan KM, et al. Dietary fats and pharmaceutical lipid excipients increase systemic exposure to orally administered cannabis and cannabis-based medicines. *Am J Transl Res.* 2016;8(8):3448-59.

## 8. Seznam publikací

Publikace, které jsou podkladem disertace:

- Boleslavská T, Rychecký O, Krov M, Žvátora P, Dammer O, Beránek J, Kozlík P, Křížek T, Hořínková J, **Ryšánek P**, Roušarová J, Canová NK, Šíma M, Slanař O, Štěpánek F. Bioavailability Enhancement and Food Effect Elimination of Abiraterone Acetate by Encapsulation in Surfactant-Enriched Oil Marbles. *AAPS J.* 2020 Sep 25;22(6):122. doi: 10.1208/s12248-020-00505-5. PMID: 32978690. (IF: 4,009)
- **Ryšánek P**, Grus T, Lukáč P, Kozlík P, Křížek T, Pozniak J, Roušarová J, Královičová J, Kutinová Canová N, Boleslavská T, Bosák J, Štěpánek

F, Šíma M, Slanař O. Validity of cycloheximide chylomicron flow blocking method for the evaluation of lymphatic transport of drugs. *Br J Pharmacol.* 2021 Dec;178(23):4663-4674. doi: 10.1111/bph.15644. Epub 2021 Sep 10. PMID: 34365639. (IF: 9,473)

- Jelínek P, Roušarová J, **Ryšánek P**, Ježková M, Havlůjová T, Pozniak J, Kozlík P, Křížek T, Kučera T, Šíma M, Slanař O, Šoš M. Application of Oil-in-Water Cannabidiol Emulsion for the Treatment of Rheumatoid Arthritis. *Cannabis Cannabinoid Res.* 2022 Nov 4. doi: 10.1089/can.2022.0176. Epub ahead of print. PMID: 36342775. (IF: 4,786)
- Šalamúnová P, Krejčí T, **Ryšánek P**, Saloň I, Kroupová J, Hubatová-Vacková A, Petřík J, Grus T, Lukáč P, Kozlík P, Křížek T, Dammer O, Beránek J, Šíma M, Slanař O, Štěpánek F. Serum and lymph pharmacokinetics of nilotinib delivered by yeast glucan particles per os. *Int J Pharm.* 2023 Jan 21;634:122627. doi: 10.1016/j.ijpharm.2023.122627. Epub ahead of print. PMID: 36693484. (IF: 6,510)

#### Ostatní publikace:

- Hartinger JM, **Ryšánek P**, Slanař O, Šíma M. Pharmacokinetic principles of dose adjustment of mTOR inhibitors in solid organ transplanted patients. *J Clin Pharm Ther.* 2022 Sep;47(9):1362-1367. doi: 10.1111/jcpt.13753. Epub 2022 Aug 7. PMID: 35934622. (IF: 2,145)
- Hriňová E, Skořepová E, Čerňa I, Královičová J, Kozlík P, Křížek T, Roušarová J, **Ryšánek P**, Šíma M, Slanař O, Šoš M. Explaining dissolution properties of rivaroxaban cocrystals. *Int J Pharm.* 2022 Jun 25;622:121854. doi: 10.1016/j.ijpharm.2022.121854. Epub 2022 May 25. PMID: 35623488. (IF: 6,510)
- Královičová J, Bartůněk A, Hofmann J, Křížek T, Kozlík P, Roušarová J, **Ryšánek P**, Šíma M, Slanař O. Pharmacokinetic Variability in Pre-Clinical Studies: Sample Study with Abiraterone in Rats and Implications for Short-Term Comparative Pharmacokinetic Study

Designs. *Pharmaceutics*. 2022 Mar 15;14(3):643. doi: 10.3390/pharmaceutics14030643. PMID: 35336017; PMCID: PMC8955109. (IF: 6.525)

- Šíma M, Bobek D, Cihlářová P, **Ryšánek P**, Roušarová J, Beroušek J, Kuchař M, Vymazal T, Slanař O. Factors Affecting the Metabolic Conversion of Ciprofloxacin and Exposure to Its Main Active Metabolites in Critically Ill Patients: Population Pharmacokinetic Analysis of Desethylene Ciprofloxacin. *Pharmaceutics*. 2022 Aug 4;14(8):1627. doi: 10.3390/pharmaceutics14081627. PMID: 36015253; PMCID: PMC9413960. (IF: 6.525)
- Šíma M, Michaličková D, **Ryšánek P**, Cihlářová P, Kuchař M, Lžičarová D, Beroušek J, Hartinger JM, Vymazal T, Slanař O. No Time Dependence of Ciprofloxacin Pharmacokinetics in Critically Ill Adults: Comparison of Individual and Population Analyses. *Pharmaceutics*. 2021 Jul 27;13(8):1156. doi: 10.3390/pharmaceutics13081156. PMID: 34452118; PMCID: PMC8402031. (IF: 6.525)
- **Ryšánek P**, Grus T, Šíma M, Slanař O. Lymphatic Transport of Drugs after Intestinal Absorption: Impact of Drug Formulation and Physicochemical Properties. *Pharm Res*. 2020 Aug 7;37(9):166. doi: 10.1007/s11095-020-02858-0. PMID: 32770268. (IF: 4,200)
- Šíma M, Kutinová-Canová N, **Ryšánek P**, Hořínková J, Moškořová D, Slanař O. Gastric pH in Rats: Key Determinant for Preclinical Evaluation of pH-dependent Oral Drug Absorption. *Prague Med Rep*. 2019;120(1):5-9. doi: 10.14712/23362936.2019.5. PMID: 31103048.