Autor pracy: Katarzyna Przejczowska-Pomierny
Promotor pracy: prof. dr hab. Elżbieta Wyska
Tytuł: *„Ocena wpływu sepsy na farmakokinetykę wybranych leków o różnych współczynnikach ekstrakcji wątrobowej u myszy.”*

STRESZCZENIE

Sepsa wciąż stanowi poważny problem terapeutyczny i jest jedną z głównych przyczyn śmierci pacjentów leczonych na oddziałach intensywnej terapii. Jednym z powodów niepowodzeń stosowanego leczenia, mogą być zmiany w farmakokinetyce ordynowanych leków. Wpływ sepsy na dystrybucję, metabolizm czy wydalanie ksenobiotyków nie jest dokładnie poznany. Co więcej, badania dotyczą głównie leków eliminowanych drogą nerkową, a tylko nieliczne ksenobiotyków metabolizowanych przez wątrobę. Niewydolność tego narządu często występuje w sepsie. Dlatego w niniejszej pracy po raz pierwszy zbadano wpływ niewyrównanej sepsy na farmakokinetykę dwóch modelowych leków eliminowanych na drodze metabolizmu wątrobowego: ibuprofenu (leku o niskim) oraz werapamilu (leku o wysokim współczynniku ekstrakcji wątrobowej) z uwzględnieniem ich enancjomerycznej budowy.

Badania przeprowadzono na myszach, samcach rasy CD-1, u których wywołano sepsę procedurą podwiązania i przekłucia brzegu przeciwkrezkowego kątnicy (CLP). Eksperymenty farmakokinetyczne *ex vivo* i *in vivo* prowadzono w 20 godzinie po zabiegu. Racemat ibuprofenu (D=10 mg/kg) lub werapamilu (D=1 mg/kg) podawano drogą dożylną. W odpowiednich punktach czasowych od chwili podania badanych leków zwierzęta poddano dekapitacji w celu pobrania osocza i tkanek do badań. Czas rozpoczęcia badań farmakokinetycznych (20 h) wybrano na podstawie eksperymentów wstępnych. W tym punkcie czasowym zaobserwowano m.in.: znaczny wzrost stężenia amin katecholowych, mediatorów zapalenia oraz markerów dysfunkcji wątroby w osoczu zwierząt, a także spadek szybkości przepływów krwi przez narządy, co cechuje późną i niewyrównaną sepsę. Stężenia enancjomerów ibuprofenu i werapamilu w osoczu oraz wybranych tkankach oznaczono chiralną techniką HPLC z detekcją fluorescencyjną. W oparciu o zebrane dane (tj. stężenia leków w osoczu i tkankach, ułamek leku wolnego, współczynnik podziału krew:osocze, ułamek niezmienionego leku wydalonego z moczem) u zwierząt kontrolnych i z sepsą opracowano modele fizjologiczne (PBPK) dla badanych leków w programie ADAPT 5 (BMSR, USC, USA), które następnie posłużyły do przeprowadzenia symulacji stężeń we krwi i tkankach u ludzi przy zmienionych parametrach farmakokinetycznych, charakterystycznych dla sepsy.

U zwierząt z sepsą zaobserwowano zahamowanie przemiany nieaktywnego farmakologicznie R-(-)- ibuprofenu w jego aktywną optyczną antypodę. Ponadto klirens metaboliczny (CL_{met}) obu enancjomerów tego leku uległ obniżeniu pod wpływem tej choroby, co prowadziło do wzrostu okresu półtrwania ($t_{0,5}$), zwłaszcza nieaktywnego farmakologicznie stereoizomeru. Co więcej, zaobserwowano spadek objętości dystrybucji w stanie stacjonarnym (V_{dss}), pomimo niewielkiego zwiększenia wolnej frakcji w osoczu (f_u) obu enancjomerów. Badania *ex vivo* na izolowanej perfundowanej wątrobie dowiodły jednak, że lek ten szybko i efektywnie ekstrahowany jest przez ten narząd w warunkach stałego przepływu i braku wiązania z białkami osocza. Dlatego klirens wątrobowy (CL_H) tego leku może również wzrosnąć podczas sepsy, gdy dysfunkcja wątroby będzie niewielka, przepływy krwi nie będą obniżone, a jego $f_{u.}$ znacznie podwyższone. Opracowane modele PBPK dla racematu tego leku bardzo dobrze przewidywały stężenia ibuprofenu w osoczu i tkankach myszy kontrolnych oraz z sepsą, a stężenia we krwi ludzi z normalną funkcją wątroby otrzymane w wyniku symulacji, przy użyciu opracowanego modelu PBPK, przebiegały blisko zaczerpniętych z literatury wartości obserwowanych. W efekcie symulacji stężeń ibuprofenu w osoczu i tkankach ludzi w warunkach imitujących różne możliwe sytuacje kliniczne zaobserwowano szybszą eliminację tego leku na skutek wzrostu f_u u ludzi z normalną funkcją wątroby, co podkreśla ważną rolę wiązania z białkami osocza dla farmakokinetyki tego leku. Przeprowadzone symulacje stężeń ibuprofenu u pacjentów z sepsą wskazują na znaczący spadek stężenia tego leku w nerkach, bez większego wpływu na jego profil farmakokinetyczny w osoczu.

W przypadku werapamilu, pod wpływem sepsy nastąpiło znaczące obniżenie klirensu całkowitego (CL_T) obu enancjomerów, co istotnie wydłużyło $t_{0,5}$ tego ksenobiotyku u zwierząt. Badania *ex vivo* na izolowanej perfundowanej wątrobie myszy, prowadzone w warunkach stałego przepływu oraz braku wiązania leku z białkami, nie wykazały obniżenia CL_H, co dowodzi, że obserwowany spadek eliminacji werapamilu w warunkach *in vivo* był wynikiem obniżenia szybkości przepływu krwi przez wątrobę oraz zmniejszenia f_u w osoczu na skutek wzrostu wiązania tego leku przez, np. α_1-kwaśną glikoproteinę. Sepsa miała wpływ na dystrybucję werapamilu do tkanek, czego konsekwencją był spadek V_{dss} dla obu enancjomerów. Pomimo wzrostu wydalania niezmienionej formy werapamilu z moczem, zaobserwowano znacznie zwiększoną ekspozycję zwierząt z sepsą na ten lek, czego oznaką była ponad 2-krotnie większa wartość osoczowego i nerkowego pola pod krzywą zależności stężenia leku od czasu (AUC). Opracowane modele PBPK werapamilu jako racematu dobrze przewidywały stężenia zarówno u myszy kontrolnych, jak i chorych oraz ujawniły możliwość występowania metabolizmu tego leku w śledzionie w trakcie sepsy, co może być wynikiem

pobudzenia i napływu do tego narządu makrofagów oraz limfocytów, u których jak wiadomo występuje ekspresja enzymów cytochromu P450. Przeprowadzone symulacje stężeń werapamilu u ludzi ujawniły, że podobnie jak u myszy, sepsa może znacząco zwiększyć ekspozycję chorych na ten lek, prowadząc do ponad 2-krotnego wzrostu wartości osoczowego AUC. Co więcej, w przypadku tej choroby może dojść również do kumulacji tego leku w nerkach.

Podsumowując, niewyrównana sepsa może zmienić farmakokinetykę leków metabolizowanych przez wątrobę, zwłaszcza tych o wysokim współczynniku ekstrakcji wątrobowej, ze względu na znaczne obniżenie szybkości przepływu krwi przez ten narząd. W przypadku leków o niskim współczynniku ekstrakcji wątrobowej największy wpływ na profil stężenie-czas mają zmiany w ułamku wolnego leku. Dawkując leki metabolizowane w wątrobie u pacjentów z sepsą, należy więc wziąć pod uwagę zarówno właściwości farmakokinetyczne samego leku, jak również takie wielkości jak: stężenie osoczowych białek wiążących, wydajności przepływów narządowych oraz wpływ choroby i resuscytacji na całkowitą objętość wody w organizmie. Modyfikacja dawkowania może być niezbędna przy znacznym wzroście ułamka wolnego leku w przypadku ksenobiotyków o niskim współczynniku ekstrakcji wątrobowej oraz obniżeniu przepływów narządowych podczas stosowania leków o wysokim współczynniku ekstrakcji w tym narządzie. Opracowane modele fizjologiczne mogą zostać wykorzystane do przewidywania farmakokinetyki oraz modyfikacji dawkowania leków o podobnych do ibuprofenu czy werapamilu właściwościach farmakokinetycznych stosowanych w sepsie.

SUMMARY

Title: "*Effects of sepsis on the pharmacokinetics of selected drugs with different hepatic extraction ratios in mice.*"

Sepsis is still a serious therapeutic problem and is one of the leading causes of death in patients treated in intensive care units. One of the reasons for the treatment failures may be changes in the pharmacokinetics of the used drugs. The effect of sepsis on the distribution, metabolism or excretion of xenobiotics is not precisely understood. Moreover, the research focuses mainly on drugs eliminated by the kidney, and only a few, on xenobiotics metabolized by the liver, whereas failure of this organ often occurs in sepsis. Therefore, in this study, we

investigated for the first time the influence of decompensated sepsis on the pharmacokinetics of drugs eliminated by hepatic metabolism: ibuprofen – a drug with low and verapamil – a drug with high hepatic extraction ratio, taking into account their enantiomeric structures.

The study was carried out on male CD-1 mice in which sepsis was induced by the cecal ligation and puncture (CLP) procedure. *Ex vivo* and *in vivo* pharmacokinetic experiments were conducted 20 hours after surgery. Racemic ibuprofen (D = 10 mg / kg) or verapamil (D = 1 mg / kg) were given intravenously. At appropriate time points from the moment of administration of the study drugs, the animals were exsanguinated by decapitation to collect blood and tissues for testing. The starting time of pharmacokinetic studies (20 h) was selected on the basis of preliminary experiments. At this point of time, a significant increase in levels of catecholamines and pro-inflammatory cytokines as well as markers of liver dysfunction were observed in animal plasma together with a decrease in the rate of blood flows through the organs, that are features characterizing late and decompensated sepsis. Concentrations of ibuprofen and verapamil enantiomers in plasma and selected tissues were determined by a chiral HPLC technique with fluorescent detection. Based on the data collected (i.e. plasma and tissue drug concentrations, free drug fraction (f_u), blood-to-plasma partition ratio, drug fraction excreted unchanged in the urine) in control and CLP mice, physiologically-based pharmacokinetic (PBPK) models were developed for the drugs under investigation in the ADAPT 5 program (BMSR, USC, USA), which were then used to simulate racemic ibuprofen and verapamil concentrations in blood and tissues in humans with altered pharmacokinetic parameters in the manner characteristic for sepsis.

In septic animals a decrease in the inversion of pharmacologically inactive R-(-)- ibuprofen into its active optical antipode was observed. Moreover, the metabolic clearance (CL_{met}) of both enantiomers of this drug was lowered due to sepsis, leading to the prolongation of the elimination half-life ($t_{0.5}$), especially, of the pharmacologically inactive stereoisomer. In addition, a decrease in volume of distribution at steady-state (V_{dss}) was observed, despite a slight increase of f_u. However, *ex vivo* studies on an isolated perfused liver have shown that ibuprofen is quickly and efficiently extracted by the liver under conditions of a constant flow and a lack of plasma protein binding. Therefore, the hepatic clearance (CL_H) of this drug may also increase during sepsis, when the liver dysfunction is minor, blood flow is not reduced and its f_u significantly elevated. The developed PBPK models for the racemate of ibuprofen very well predicted the concentrations of this drug in plasma and tissues of control and sepsis mice. Moreover, the concentrations in plasma of humans with normal liver function, obtained as a result of simulations using the developed PBPK model, were close to the observed

values taken from the literature. As a result of simulation of ibuprofen concentrations in human plasma and tissues under conditions imitating various possible clinical scenarios, a faster elimination of this drug was observed due to an increase in f_u in humans with normal liver function, which highlights the important role of plasma protein binding for the pharmacokinetics of this drug. Simulations of ibuprofen concentrations in humans with decompensated sepsis indicate a significant decrease in the concentration of this drug in the kidneys, without much impact on its pharmacokinetic profile in plasma.

In the case of verapamil, the total clearance (CL_T) of both enantiomers was significantly lower in mice with sepsis in comparison to controls leading to the prolonged $t_{0.5}$ in these animals. *Ex vivo* studies on an isolated perfused liver, conducted under conditions of a constant flow and a lack of binding of the drug to proteins, did not show a decrease of CL_H, which proves that the observed reduction in elimination of this drug *in vivo* was the result of a decreased blood flow through the liver and lowered f_u in plasma due to an increase in binding of this drug by, e.g. alpha-*1*-acid *glycoprotein*. Sepsis had an impact on the distribution of verapamil to tissues, resulting in a decrease in V_{dss} for both enantiomers. Despite the increase in urinary excretion of unchanged form of verapamil, sepsis led to a significant increase in drug exposure of septic mice, raising the value of plasma and renal area under the curve (AUC) by more than 2 times. The developed PBPK models of racemic verapamil well predicted the concentrations in both control and CLP mice and revealed the possibility of verapamil metabolism in the spleen during sepsis, which may be the result of stimulation and inflow into this organ of macrophages and lymphocytes in which the expression of cytochrome P450 enzymes have been demonstrated. Simulations of verapamil concentrations in humans revealed that, as in mice, sepsis may significantly increase the exposure of patients to this drug, leading to a more than 2-fold increase in plasma AUC. Moreover, in the case of sepsis, an accumulation of this drug in the kidneys may be observed.

In conclusion, the decompensated sepsis can alter the pharmacokinetics of liver-metabolized drugs, especially those with a high hepatic extraction ratio, due to a significant reduction in the rate of blood flow through this organ. For drugs with a low liver extraction ratio, the greatest impact on the concentration-time profile have changes in f_u of the drug. Therefore, when liver metabolized drugs are administered to patients with sepsis, it is necessary to take into account both the pharmacokinetic properties of the drug itself, as well as, such factors as: the concentration of plasma binding proteins, the organ flow efficiency, and the effect of disease and resuscitation on the total body water volume. Dosage modification may be necessary when a significant increase in a fraction of the free drug is observed

for xenobiotics with a low hepatic extraction ratio and a decrease in liver flow when using drugs with a high extraction ratio in this organ. The developed PBPK models may be used to predict the pharmacokinetics and modify the dosage of drugs used in sepsis with similar, as ibuprofen or verapamil, pharmacokinetic properties.