

6. Georgiev KD, M Radeva-Ilieva, S Stoeva, I Zhelev. Isolation, analysis and in vitro assessment of CYP3A4 inhibition by methylxanthines extracted from Pu-erh and Bancha tea leaves. Sci Rep. **2019** Sep 26;9(1):13941. (IF = 4.011)
7. Georgiev KD, Hvarchanova N, Georgieva M, Kanazirev B. The role of the clinical pharmacist in the prevention of potential drug interactions in geriatric heart failure patients. Int J Clin Pharm. **2019** Oct 8. doi: 10.1007/s11096-019-00918-z. (IF = 1.69)
8. Radeva-Ilieva M, Kirilov B, Georgiev K. Potential Drug-Drug Interactions With Tyrosine Kinase Inhibitors. Annual for Hospital Pharmacy **2019**, 5(1), 60-67.
9. Georgiev KD, Slavov IJ, Iliev IA. In vitro evaluation of combination effects of doxorubicin with methylxanthine fractions isolated from Bancha and Pu-erh teas against breast cancer cells. Int J Basic Clin Pharmacol **2019**; 8:2167-71.
10. Georgiev K, Hvarchanova N, Georgieva M, Kanazirev B. Potential drug interactions in heart failure patients involving cardiac glycosides. Int J Pharm Res **2019**; 11(2), 524-9.
11. Georgiev KD, Slavov IJ, Iliev IA. Synergistic growth inhibitory effects of Lycium barbarum (Goji berry) extract with doxorubicin against human breast cancer cells. J Pharm Pharmacol Res 3 (**2019**): 051-058.

Проектно финансиране на проучванията по тематиката на дисертационния труд

1. Проект по Фонд Наука 2016 г. Проучване на лекарствени взаимодействия на ниво биотрансформация.

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ ВАРНА

„ПРОФ. Д-Р ПАРАСКЕВ СТОЯНОВ“

ФАКУЛТЕТ ПО ФАРМАЦИЯ

КАТЕДРА

„ФАРМАКОЛОГИЯ, ТОКСИКОЛОГИЯ И ФАРМАКОТЕРАПИЯ“

Калоян Добринов Георгиев

“Идентификация, анализ и оценка на фармакокинетични и фармакодинамични лекарствени взаимодействия”

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд за присъждане на научната степен
“ДОКТОР НА НАУКИТЕ” по научна специалност
„Фармакология“

Официални рецензенти:

Чл. кор. проф. д-р Мила Василева Власковска, дмн
Проф. д-р Витан Даков Влахов, дмн
Проф. д-р Мариета Петрова Георгиева, дм

Гр. Варна, 2020 г.

Настоящата дисертация е изработена в Катедра "Фармакология, токсикология и фармакотерапия", а така също и в Катедра "Фармацевтични технологии" на Факултета по Фармация към Медицински университет Варна.

Дисертационния труд съдържа общо 320 страници, онагледен е със 77 фигури и 78 таблици. Използваните литературни източници са 441, от които един на кирилица, а останалите са на латиница.

Публичната защитата на дисертационния труд ще се проведе на 20.03.2020 г. от 10:30 часа в зала 816 на Факултет Фармация към Медицински университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“ – Варна.

Материалите по защитата са публикувани на интернет страницата на Медицински университет „Проф. Д-р Параскев Стоянов“ – Варна.

Списък на публикациите във връзка с дисертационния труд

По-стари публикации, използвани в предишни конкурси, които имат връзка с дисертационния труд:

1. Georgiev K, Zhelev I, Georgieva S. Investigation of the active ingredients of goji berry (*lycium barbarum*). VMF, Vol.2, **2013**, Supplement 3. 229-233.
2. Zhelev I, Georgiev K, Georgieva S. Content and pharmacological effects of polyphenols in different types of tea. VMF, Vol.2, **2013**, Supplement 3. 234-239.
3. Georgiev K., Zhelev I., Georgieva S. Total phenolic compounds and tannins content of bancha green tea (*Camelia sinensis*) depending on extraction conditions. Scripta Scientifica Pharmaceutica, vol. 1, **2014**, pp. 48-51.
4. Georgiev K, Zhelev I. New medicinal plant and their active ingredients in the treatment of cancer. VMF, Vol.3, **2014**, Supplement 4. 257-262.
5. Georgiev K. Evaluation of pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of green tea (*Camellia sinensis*) catechins. VMF, Vol.3, **2014**, Supplement 4. 263-268.
6. Jelev I, Georgiev K, Georgieva S. The impact of decaffeinating process on polyphenolic content in green tea (*Camellia sinensis* L. "Sencha tea"). Management and Education, **2014**, 10 (5):67-70.
7. Georgiev K, Iliev I, Jelev I. Antitumor effects of Pu-erh tea catechins in human cancer cell lines and evaluation of combination effects with oxaliplatin. WJPR **2015**, Volume 4, Issue 6, 438-444.
8. Georgiev K, Iliev I, Jelev I. Evaluation of antitumor effect of methylxanthine fraction isolated from Pu-erh tea. WJPR **2015**, Vol.4, Issue 7, 2236-2242.

Публикации, неизползвани в предишни конкурси:

1. Georgiev K, Radeva M., Balacheva A., Michaylova S., Pajpanova T. Modulation of CYP3A4 by the RGD- and Neurotensin(8-13)-analogues. Proceedings of the 35th European Peptide Symposium Patrick B. Timmons, Chandralal M. Hewage, Michal Lebl (Editors) European Peptide Society & PSP, **2018**. <https://doi.org/10.17952/35EPS.2018.215>
2. Georgiev K, Radeva M., Pajpanova T. Potent inhibition of CYP3A4 by the endomorphin-2 analogues. Proceedings of the 35th European Peptide Symposium Patrick B. Timmons, Chandralal M. Hewage, Michal Lebl (Editors) European Peptide Society & PSP, **2018**. <https://doi.org/10.17952/35EPS.2018.283>
3. Georgiev KD, Slavov IJ, Iliev IA. Antioxidant Activity and Antiproliferative Effects of *Lycium barbarum*'s (Goji berry) Fractions on Breast Cancer Cell Lines. Folia Med (Plovdiv). **2019** Mar 1;61(1):104-112. doi: 10.2478/foimed-2018-0053.
4. Georgiev K, Hvarchanova N, Georgieva M, Kanazirev B. Potential drug-drug interactions in heart failure patients. Int J Pharm Pharm Sci **2019**, 11, 37-41.
5. Georgiev K, Radeva-Ilieva M. In vitro inhibitions of CYP2C9 and CYP3A4 by fractions isolated from Goji berry (*Lycium barbarum*) fruits. Scripta Scientifica Pharmaceutica **2019**, 6(1), 17-21.

- 3.2. За първи път са определени антипролиферативните ефекти *in vitro* на изолираните фракции от *L.barbarum* по отделно и в комбинация върху клетъчни линии от рак на гърдата.
- 3.3. Определени са за първи път комбинационните ефекти *in vitro* на тоталния екстракт от *L.barbarum* и *doxorubicin* върху клетъчни линии от рак на гърдата.
- 3.4. За първи път е определен органопротективният ефект на изолираните фракции от *L.barbarum* върху *doxorubicin*-индуцирани модели на кардио- и нефротоксичност, проявяващ се в подобряване на биохимичните маркери и хистопатологичната находка.
4. За първи път са обработени епикризи на пациенти със сърдечна недостатъчност за двугодишен период (2014-2015) с цел проучване на лекарствени взаимодействия между приеманата стандартна терапия и лекарства с малка терапевтична ширина:
 - 4.1. Установени са най-честите потенциални лекарство-лекарство взаимодействия при пациенти със сърдечна недостатъчност като рисковата група към която спадат и като тежест на реакцията от взаимодействието.
 - 4.2. Установена е позитивна корелация със статистическа значимост между броя на приеманите лекарства (повече от 7) и появата на потенциални лекарствени взаимодействия (повече от 10).
 - 4.3. Отхвърлена е връзка между възрастта и появата на потенциални лекарствени взаимодействия.

Научно-приложни приноси:

1. Изведени са насоки за използване на симулационни модели с цел прогнозиране на фармакокинетично поведение и оценка на фармакокинетични лекарствени взаимодействия при растителни препарати, на база определяне на основен компонент в изолираната фракция.
2. Изведени са насоки за използване на *in silico* генерирани данни за физико-химични и фармакокинетични данни с цел изграждане на симулационни модели и оценка на фармакокинетични лекарствени взаимодействия при новосинтезирани олигопептидни препарати.
3. Направени са препоръки за използване на софтуерни програми за детекция и анализ на лекарствени взаимодействия, както и за необходимостта от включване на клинични фармацевти в мултидисциплинарните екипи при високорискови пациенти и провеждана полифармация с цел намаляване риска от нежелани лекарствени взаимодействия.

СЪДЪРЖАНИЕ

Използвани съкращения.....	4
Глава I. Въведение	5
Глава II. Цел и задачи	7
Цел на изследването	7
Задачи на изследването	7
Глава III. Селекция, изолиране и анализ на растителни екстракти/фракции. Дизайн, синтез и анализ на олигопептиди	9
1. Материали и методи използвани при изолирането и анализа на растителните екстракти/фракции	9
2. Селекция, синтез и анализ на аналози на ендоморфин-2 и RGD	20
Глава IV: Проучване на фармакокинетични лекарствени взаимодействия.....	22
1. Материали и методи.....	22
2. Резултати и дискусия	31
3. Заключение	62
Глава V. Проучване на фармакодинамични лекарствени взаимодействия	63
1. Материали и методи.....	63
2. Резултати и дискусия	69
3. Сравняване на двата метода за оценка на ФД взаимодействия.....	91
4. Заключение	91
Глава VI. Проучване и анализ на фармакокинетични и фармакодинамични лекарствени взаимодействия в клиничната практика	92
1. Методи.....	92
2. Резултати и дискусия	93
3. Роля на клиничния фармацевт в превенцията на потенциални лекарствени взаимодействия	114
4. Оценка на използвания софтуер за детекция на лекарствени взаимодействия в клиничната практика	115
5. Заключение	116
Глава VII. Заключение за мястото на компютърните технологии в идентификацията, анализа и оценката на лекарствените взаимодействия	116
Изводи	Error! Bookmark not defined.
Справка за приносите на дисертационния труд.....	Error! Bookmark not defined.
Списък на публикациите във връзка с дисертационния труд	123

Използвани съкращения

Използвани съкращения на кирилица:

ЕМ-1 и -2 – ендоморфин-1 и ендоморфин-2

ГИТ – гастро-интестинален тракт

МИК – минимална инхибираща концентрация

ПЛЛВ – потенциални лекарство-лекарство взаимодействия

СГ – сърдечни гликозиди

СН – сърдечна недостатъчност

ФБФК – физиологично-базиран фармакокинетичен модел

ФК – фармакокинетика

ФД – фармакодинамика

ХЕБ – хематоенцефална бариера

ЦНС – централна нервна система

Използвани съкращения на латиница:

ADME – абсорбция, разпределение, метаболизъм, екскреция

AUC – площ под кривата

AUC_i – площ под кривата на субстрата в присъствие на инхибитор

AUC₀ – площ под кривата на субстрата при липса на инхибитор

AUCR – съотношение на площите под кривите при наличие на инхибитор и при липса на такъв

B:P – разпределение кръв-плазма

CL – клирънс

C_{max} – максимална плазмена концентрация

CYP – цитохром P450

EMA – европейската агенция за контрол на лекарствата

FDA – агенция за контрол на храните и лекарствата в САЩ

f_m – фракцията от лекарството, която се подлага на метаболизъм

f_u – фракцията от лекарството в плазмата, която не е свързана към плазмени протеини

IC₅₀ – инхибиторна концентрация, която води до 50% инхибиране на ензимна активност или пролиферацията на клетките

K_i – инхибиторна константа (обратима инхибиция)

K_i – инхибиторна константа (необратима инхибиция)

k_{inact} – максималната скорост на ензимна инактивация (време-зависима инхибиция)

MXB – метилксантини изолирани от Банча

МХР – метилксантини изолирани от Пу-ер

МТТ – 3-(4, 5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразол бромид

NYHA – нюйоркска кардиологична асоциация

NOAK – нови не-витамин К орални антикоагуланти

P-gp – P-глюкопротеин

Prodrug – пролекарство

rhCYP – рекомбинантен човешки цитохром P450

t_{1/2} – плазмен полуживот

t_{max} – времето за достигане на максимална плазмена концентрация

Vd – обем на разпределение

UGT – уридин-5-дифосфат глюкуронилтрансфераза

Справка за приносите на дисертационния труд

Оригинални приноси:

1. За първи път са охарактеризирани фармакокинетично и фармакодинамично изолирани метилксантинови фракции от листа на Банча и Пу-ер чайове:
 - 1.1. За първи път са определени основните метилксантинови компоненти в изолираните фракции
 - 1.2. За първи път е определен потенциалът им да инхибират най-честата изоформа на цитохромите – CYP3A4, и е отхвърлен риска от инхибиция на CYP2C9.
 - 1.3. Определен е механизмът на инхибиция и са изчислени константите на инхибиране.
 - 1.4. С помощта на симулатори за първи път е симулирано фармакокинетичното поведение на изолираните фракции и клинични ситуации при едновременна употреба с класически субстрати на CYP3A4 и е определен потенциалът им за лекарствени взаимодействия.
 - 1.5. За първи път е определен *in vitro* антипролиферативният ефект на изолираните метилксантинови фракции от Банча и Пу-ер върху туморни и не-туморни клетъчни линии.
 - 1.6. Определени са за първи път комбинационните ефекти *in vitro* на метилксантиновите фракции изолирани от Банча и Пу-ер и *doxorubicin* върху клетъчни линии от рак на гърдата.
 - 1.7. За първи път е определен органопротективният ефект на изолираните метилксантинови фракции от Банча върху *doxorubicin*-индуцирани модели на кардио- и нефротоксичност, изразяващ се в подобряване на биохимичните маркери и хистопатологичната картина.
2. Добавени са нови фармакокинетични характеристики по отношение на новосинтезираните олигопептиди, аналози на ендоморфин-2 и RGD:
 - 2.1. За първи път е определен потенциалът на ендоморфин-2 и RGD аналозите да инхибират най-честата изоформа на цитохромите – CYP3A4, и е отхвърлен риска от инхибиция на CYP2C9.
 - 2.2. Определен е механизмът на инхибиция и са изчислени константите на инхибиране при ендоморфин-2 аналозите.
 - 2.3. Изготвени са за първи път симулационни фармакокинетични модели на новосинтезираните аналози на ендоморфин-2.
 - 2.4. За първи път са симулирани клинични ситуации с виртуални популации за определяне на техния потенциал за лекарствени взаимодействия.
3. За първи път са охарактеризирани фармакокинетично и фармакодинамично изолирани фракции (полизахаридна, пектин-свободна и тотален екстракт) от *L.barbarum* (Годжи бери):
 - 3.1. За първи път е определен инхибиторният потенциал на полизахаридната и безпектиновата фракция от *L.barbarum* върху CYP2C9 и CYP3A4. С помощта на базисни модели е изчислен риска от лекарствени взаимодействия със субстрати на CYP2C9 и CYP3A4.

заболявания на млечна жлеза, тъй като от една страна засилват неговата противотуморна активност, а от друга страна намаляват неговите дозо-лимитиращи нежелани ефекти (кардио- и нефротоксичност).

Лекарствени взаимодействия при пациенти със сърдечна недостатъчност

1. Пациентите със сърдечна недостатъчност са в напреднала възраст, с множество съпътстващи заболявания и приемат много на брой лекарства (полифармация), което ги прави склонни към увеличен риск от развитие на лекарствени взаимодействия. Лекарите на тези пациенти трябва винаги да бъдат нащрек за потенциални лекарствени взаимодействия и да проверяват всяко ново лекарство за тях.
2. Лекарствата с малка терапевтична ширина, като статини, антикоагуланти, тромболитни антиагреганти, сърдечни гликозиди са отговорни за по-големия брой потенциални лекарствени взаимодействия.
3. Увеличеният брой лекарства положително корелира с увеличаване на потенциалните лекарствени взаимодействия при тези пациенти.
4. Напредналата възраст на тези пациенти не е предпоставка за увеличен брой от потенциални лекарствени взаимодействия.
5. При тези пациенти преобладават фармакокинетичните пред фармакодинамичните лекарствени взаимодействия, което затруднява детектирането и определянето на механизма на реакцията. Използването на подходящ софтуер, като *SimCYP*, може да допренесе за по-голяма яснота и разбиране на тези механизми.
6. За намаляване на риска от потенциални лекарствени взаимодействия трябва да се използва подходящ софтуер за анализиране на предписаната терапия. Друг подходящ вариант би могъл да бъде включването на клиничен фармацевт в мултидисциплинарния екип.

Глава I. Въведение

Идентификацията, анализът и оценката на фармакокинетични и фармакодинамични лекарствени взаимодействия е от изключително важно значение в предклиничния етап при разработката и внедряването на нови лекарства. Всички нови лекарствени молекули – субстрати, инхибитори или индуктори на лекарство-метаболизиращи ензими и/или на лекарство-транспортни протеини, участващи в тяхната диспозиция, трябва да бъдат тествани за оценка на риска им от лекарствени взаимодействия. Тези тествания се извършват най-често *in vitro* и с помощта на модерни симулаторни платформи (*in silico*) се оценява техният риск от лекарствени взаимодействия. Днешните компютърни технологии допринасят за високия квалитет на тези симулаторни програми, които са в състояние да симулират клинично виртуално изследване върху определена популационна група, селектирана по възраст, пол, фенотип, придружаващо заболяване и др. Именно поради това, *in silico* и *in vitro* данните стават все по-важни като подход за идентифициране на вероятни, възможни или малко вероятни лекарствени взаимодействия, и по този начин позволяват по-информирано планиране на действителните клинични проучвания. При получен нисък риск от симулациите, би могло изцяло да се игнорира нуждата от провеждане на такива. Фармакодинамичните лекарствени взаимодействия, най-често се оценяват *in vitro*, и се явяват крайъгълен камък в развитието на комбинираните лекарствени терапии. Селектиране на тези, при които се увеличават терапевтичните ефекти от една страна, а се намаляват нежеланите ефекти от друга страна, са истинско предизвикателство пред фармацевтичната наука.

От друга страна, идентификацията, анализът и оценката на фармакокинетични и фармакодинамични лекарствени взаимодействия има важно значение и в клиничната практика, тъй като множество инфекциозни, сърдечно-съдови, онкологични и други заболявания се лекуват чрез едновременната употреба на голям брой лекарства – полифармация. Полифармацията често води до повишен риск от нежелани реакции, свързани с употребата на лекарства. По-възрастното население е най-засегнато от полифармацията и нейните последици. Основните причинно-следствени фактори зад това са физиологичните промени, свързани със стареенето (намалено бъбречно елиминиране, намалена чернодробна функция, намалена обща телесна маса и др.), високата честота на съпътстващи заболявания – полиморбидността, комуникационни бариери и др. Полифармацията също така води до по-големи разходи за здравеопазване, повишен риск от нежелани лекарствени събития и, не на последно място, тя е в основата на развитието на лекарствени взаимодействия. Освен рисковете, които крие, чрез използване на модерна полифармация в днешно време, се постига значително подобряване на качеството на живот и предотвратяване на усложнения, включително инвалидност и ненужна хоспитализация. Значителен прогрес беше направен в разбирането на лекарствените взаимодействия и използването им успешно в клиничната практика чрез въвеждането на т.нар. фармакокинетични бустери (усилватели) при анти-HIV и анти-Хепатит-С терапията. Именно поради това, балансирането на рисковете и ползите от полифармацията се превръща в предизвикателство пред медицинските специалисти. Изготвяне на стратегии,

чрез които практикуващия здравен работник да постигне успешна полифармация и да избегне неподходяща такава, са в процес на разработване. Внедряване в клиничната практика на клинични фармацевти с опит в лекарствените взаимодействия, както и подобряване на комуникацията между лекар и фармацевт, ще доведат до увеличаване на успеха от използваната терапия и ще намалят риска от нежелани лекарствени реакции за пациентите.

В настоящият дисертационен труд се цели обобщаване на наличната и получената от използване на комбинирани изчислителни и експериментални (*in silico*, *in vitro*, *in vivo* и *in populo*) интегративни фармакометрични модели информация, която да подпомогне развитието и да обогати познанията в областта на лекарствените взаимодействия.

- взаимодействия във високата доза (10 mg) с класически субстрати на CYP3A4, които бяха отхвърлени впоследствие чрез използване на SimCYP софтуера.
3. Проведените симулации със SimCYP софтуера, показаха умерен риск от лекарствени взаимодействия единствено с най-високата симулирана доза на Tyr-Pro-Phe(pF)-Phe-1,2-ethylenediamine – 100 mg, така че ако в бъдеще този олигопептид получи одобрение за приложение в тези дози *per os*, ще бъде необходимо провеждане на клинични изследвания.
 4. Смяната на пътя на приложение – от *per os* в *i.v. bolus* на най-високата доза 100 mg Tyr-Pro-Phe(pF)-Phe-1,2-ethylenediamine доведе до намаляване на риска от умерен на нисък.
 5. При Deoxycholic-Tyr-Pro-Phe(pCl)-Phe-OH аналога, проведените симулации с ADMWORKS DDI софтуера показаха незначителен риск от лекарствени взаимодействия със субстрати на CYP3A4. При SimCYP софтуера, единствено статичния модел с най-високата симулирана доза – 100 mg показва умерен риск. Динамичните модели отхвърлиха риск от лекарствени взаимодействия и в трите симулирани дози – 1, 10 и 100 mg.
 6. Изчислените *in vitro* стойности на IC_{50} и K_i по отношение на CYP3A4 изоензима при RGD-аналозите не показаха риск от лекарствени взаимодействия с CYP3A4 субстрати.

Фармакокинетични и фармакодинамични взаимодействия при изолирани фракции от *L.barbarum* (Годжи беру)

1. Безпектиновата фракция и тоталния воден екстракт от *L.barbarum* показаха висок антиоксидантен потенциал, корелиращ със съдържанието на полифеноли в тях.
2. Безпектиновата фракция от *L.barbarum* показва концентрация-зависим антипролиферативен ефект върху клетъчни линии от рак на гърдата.
3. Този ефект се потенцира от добавянето на полизахаридната фракция, но не се постига синергичен ефект.
4. Безпектиновата фракция от *L.barbarum* води до потентна инхибиция на CYP3A4 и CYP2C9 изоензимите. Полизахаридната фракция показва слаб ефект върху активността на CYP3A4 и CYP2C9 изоензимите в сравнение с безпектиновата фракция, ~20x и ~100x респективно.
5. Базисните модели за прогнозиране на риска от лекарствени взаимодействия не показаха риск при комбиниране на екстракти от *L.barbarum* със субстрати на CYP3A4, но загатнаха за такъв при едновременно използване със субстрати на CYP2C9, при наличие на високо съдържание на полифеноли. От което следва, че пациенти примачи хранителни добавки на база *L.barbarum*, трябва да бъдат с повишено внимание, ако приемат едновременно лекарства субстрати на CYP2C9.
6. Комбинацията от безпектиновата и полизахаридната фракция показва синергични инхибиторни ефекти при едновременно приложение с doxorubicin върху клетъчния растеж на човешки клетки от рак на гърдата.
7. Безпектиновата и полизахаридната фракция, а така също и комбинацията от тях, показаха кардио- и нефропротективна активност върху модели на doxorubicin-индуцирана кардио- и нефротоксичност.
8. Фракциите изолирани от *L.barbarum*, като и комбинацията от тях, биха могли да се комбинират с doxorubicin в лечението на туморни

Изводи

Фармакокинетични и фармакодинамични взаимодействия при метилксантинови фракции, изолирани от Банча и Пу-ер чаени листа

1. Основният компонент в изолираните метилксантинови фракции от Банча и Пу-ер чаени листа е *caffeine* – 88 % и 84 %, респективно.
2. Метилксантиновите фракции, изолирани от Банча и Пу-ер инхибират слабо активността на *CYP3A4* изоензимите, но в по-голяма степен в сравнение с чист *caffeine*, което предполага, че в реализацията на този ефект участват и други компоненти.
3. Изчисленият риск от лекарствени взаимодействия, чрез използване на базисни уравнения за оценка на лекарствени взаимодействия, не загатва за риск от такива при приемане на 100, 250 и 500 mg дози от метилксантини.
4. За разлика от тях, динамичните модели, чрез използване на ФБФК модели и с помощта на софтуерната програма (*ADMEWORKS DDI*), загатнаха за евентуален риск от лекарствени взаимодействия при едновременно прилагане на субстрати на *CYP3A4* и на дози от 500 mg метилксантини. Проведените симулации със същите дози със *SimCYP* симулатора отхвърлиха този риск.
5. Ако на база изолираните фракции метилксантини от Банча и Пу-ер след време се създаде лекарствена форма, може да се предположи, че ще липсва риск от лекарствени взаимодействия със субстрати на *CYP3A4*.
6. Метилксантините, изолирани от Банча и Пу-ер, показаха слабо изразени антипролиферативни ефекти върху клетъчни линии от рак на гърдата.
7. Метилксантините, изолирани от Банча, показаха синергични ефекти при комбиниране с *doxorubicin* върху клетъчни линии от рак на гърдата, докато метилксантините, изолирани от Пу-ер, показаха адитивни/инфраадитивни ефекти с *doxorubicin*.
8. Метилксантините, изолирани от Банча, показаха кардио- и нефропротективен ефект при модели на *doxorubicin*-индуцирана кардио- и нефротоксичност.
9. Метилксантините, изолирани от Банча, биха могли да се комбинират едновременно с *doxorubicin* в лечението на туморни заболявания на млечна жлеза, тъй като от една страна засилват неговата противотуморна активност, а от друга страна намаляват неговите дозопротивителни фактори (кардио- и нефротоксичност).

Фармакокинетични взаимодействия при новосинтезирани аналози на ендоморфин-2 и *RGD*

1. Определеният *in vitro* инхибиторен потенциал (изчислените стойности на IC_{50} и K_i) по отношение на *CYP3A4* изоензима сочи за възможен умерен риск от лекарствени взаимодействия на ендоморфин-2 аналозите – *Tyr-Pro-Phe(pF)-Phe-1,2-ethylenediamine* и *Deoxycholic-Tyr-Pro-Phe(pCl)-Phe-OH*.
2. Изградените фармакокинетични модели и симулации на *Tyr-Pro-Phe(pF)-Phe-1,2-ethylenediamine* в използваните дози 1 mg и 10 mg p.o. с *ADMEWORKS DDI* софтуера загатнаха за опасност от лекарствени

Глава II. Цел и задачи

Цел на изследването

Целта на дисертационния труд е да се проучат, анализират и оценят лекарствени взаимодействия на фармакокинетично и фармакодинамично ниво чрез прилагане на научни, съвременни и световно признати софтуерни платформи (*in silico*):

- Проучване и оценка на фармакокинетични взаимодействия на изолирани растителни фракции и нови синтетични олигопептидни молекули (*in vitro*)
- Проучване и оценка на фармакодинамични взаимодействия (*in vitro*) и определяне на органопротективна активност (*in vivo*) на изолирани растителни фракции
- Детекция и анализ на фармакокинетични и фармакодинамични взаимодействия в клиничната практика (*in populo*)

Задачи на изследването

Въз основа на така формулираните цели, бяха поставени следните задачи:

1. Селекция на растителни фракции и олигопептиди за нуждите на дисертационния труд:
 - a. Изолиране и анализ на фракции с подобни фармакологични характеристики от растителни източници:
 - Изолиране на полизахаридна, безпектинова (полифенолна) фракция и тотален воден екстракт от *Lycium barbarum*
 - Изолиране на метилксантинова и катехинова фракция от листа на Банча и Пу-ер чай
 - b. Дизайн, синтез и анализ на олигопептиди:
 - Дизайн, синтез и анализ на ендоморфин-2 аналози
 - Дизайн, синтез и анализ на *RGD* аналози
2. Определяне на инхибиторния потенциал на получените от задача 1 експериментални растителни фракции и новосинтезирани олигопептиди *in vitro* върху цитохром P450 изоензими – *CYP3A4* и *CYP2C9*.
3. Селектиране на тези, които са показали потенциал за възможни лекарствени взаимодействия и оценка на риска от лекарствени взаимодействия чрез използване на базисни модели.
4. Изготвяне на фармакокинетичен профил на база основен компонент в метилксантиновата фракция и симулиране на възможни фармакокинетични взаимодействия с помощта на симулаторните програми – *ADMEWORKS DDI* и *SimCYP*.
5. Генериране на физико-химични и фармакокинетични данни на новосинтезираните олигопептиди с помощта на *swissADME* и *pkCSM* софтуерите и изготвяне на фармакокинетичен профил с последващо симулиране на възможни фармакокинетични взаимодействия със симулаторните програми – *ADMEWORKS DDI* и *SimCYP*.

6. Определяне на антипролиферативната активност *in vitro* на селектираните растителни фракции върху човешки туморни и не-туморни клетъчни линии.
 7. Определяне на фармакодинамични лекарствени взаимодействия (синергизъм, антагонизъм и адитивност) *in vitro* върху туморни клетъчни линии на селектираните растителни фракции при комбинирането им със стандартни терапевтични лекарства (*doxorubicin*) чрез използване на най-честите методи за оценка на тези взаимодействия – независимост на *Bliss* и *Chou-Talalay* комбинационен индекс.
 8. Определяне на кардио- и нефропротективния ефект на селектираните растителни фракции при модели на *doxorubicin*-индуцирана кардио- и нефротоксичност при плъхове.
 9. Проучване на потенциални фармакокинетични и фармакодинамични лекарствени взаимодействия в клиничната практика при пациенти със сърдечна недостатъчност, с помощта на една от най-често използваните софтуерни програми – *Lexicomp® Drug interaction*, и определяне на рисковите фактори за тях.
 10. Анализ на фармакокинетичните лекарствени взаимодействия при лекарствата с малка терапевтична ширина, детектирани при пациентите със сърдечна недостатъчност, чрез използване на *SimCYP* софтуера.
 11. Заключение за мястото на компютърните технологии в идентификацията, анализа и оценката на лекарствените взаимодействия.
- Може да бъде симулирано фармакокинетично поведение, както и лекарствени взаимодействия, в специфични популации, като например при деца, или при пациенти с органични увреждания – бъбречни или чернодробни, при които има затруднения в провеждането на клинични изследвания.
 - Лекарствата често взаимодействат с повече от една мишена, като много от тези взаимодействия се асоциират със страничните ефекти на използваните лекарства. Благодарения на съвременните софтуери тези лекарствени взаимодействия могат да бъдат прогнозирани с висока точност и да бъдат предотвратени.
 - В клиничната практика, благодарение на съвременните софтуери, за кратко време може да бъде анализирана сложна полифармация за лекарствени взаимодействия и да се направят необходимите препоръки към нея.

от най-надеждните и изчерпателни база данни представлява именно *Lexicomp*. Като всяка база данни, тя има не само предимства, но също така и недостатъци, като някои от тях са представени в таблица 13.

5. Заключение

Честотата на лекарствените взаимодействия при пациенти със СН е висока. Терапията на тези пациенти трябва внимателно да се следи и проверява за възможни лекарствени взаимодействия с помощта на подходящ за целта софтуер. Включването на клиничен фармацевт в мултидисциплинарни екип, като специалист в областта на фармакологията/фармакотерапията и взаимодействията между лекарства, може да допринесе за намаляване на проблемите, свързани с лекарствата, като лекарствени взаимодействия, и да оптимизира лекарствената терапия.

Глава VII. Заключение за мястото на компютърните технологии в идентификацията, анализа и оценката на лекарствените взаимодействия

Компютърните технологии се прилагат от десетилетия в откриването и проучването на лекарства и набират все по-голяма популярност, използваемост и признание поради значителния прогрес в компютърните методологии, бързия растеж и икономическата достъпност на високотехнологичните изчислителни техники. Компютър-базираното откриване на лекарства (Computer-aided drug discovery, CADD) е ключов компонент на съвременните програми и се използва широко за идентифициране и оптимизиране на биоактивни съединения при разработването на нови лекарства. Физиология-базираното фармакокинетично моделиране и симулация (*PBPK M&S*) става все по-използван метод от биофармацевтичните компании и от ключови учени, за оптимизиране на откриването и развитието на лекарства чрез интегриране на съществуващи знания за достигане до нови познания.

Компютърните технологии допринесоха и за повишаване на качеството при идентифицирането, анализа и оценяването на лекарствените взаимодействия в предклиничния и клиничния етап от развитието на едно лекарство:

- Благодарение на съвременните компютърни технологии и високоразвити софтуерни продукти (богати на информация) в рамките на минути могат да се симулират виртуални клинични ситуации и да се генерират резултати, близки до тези получавани от клинични изследвания, за които са необходими време и големи инвестиции. Същевременно се предоставя възможност да бъдат зададени и намерени отговорите на много въпроси започващи с „какво ако“ (*“what if” questions*).

Собствени резултати*

*номерацията на отделните глави, фигури и таблици е запазена, така както е в дисертацията

Глава III. Селекция, изолиране и анализ на растителни екстракти/фракции. Дизайн, синтез и анализ на олигопептиди.

Основната цел на селекцията на растителни препарати беше да се подберат широко използвани в днешно време растителни дроги, поради полезните терапевтични ефекти, които са демонстрирали, но също така и за които е известно, или се предполага, че могат да влизат в лекарствени взаимодействия. Освен това, бяха поставени и вторични цели, а именно да се изолират определени фракции от селектираните дроги и да се определят техните фармакологично активни съставки. За нуждите на дисертационния труд бяха определени за изолирани три фракции от *L. barbarum* – тотална фракция (съдържащи полифеноли и полизахариди), полизахаридна фракция и безпектинова (полифенолна) фракция, и две фракции от *Camellia sinensis* (Пу-ер и Банча чай) – метилксантинова и катехинова.

По отношение на олигопептидите, целта беше да се селектират, синтезират и анализират аналози на ендоморфин-2 и *RGD*, показали обещаващи ефекти в *in vitro* и *in vivo* изследвания, за да им бъде изграден фармакокинетичен профил и определен техния потенциал за фармакокинетични лекарствени взаимодействия.

1. Материали и методи използвани при изолирането и анализа на растителните екстракти/фракции

1.1. Растителни субстанции

- Плодове от *L. barbarum* (партида №: L05042017) са доставени от *Paula Fruits Ltd* – лицензиран вносител на плодове от годжи за България с гарантиран китайски произход.
- Сухите листа от чай Пу-ер и Банча са закупени от местния пазар с гарантиран произход и фармакогностично охарактеризиране.

1.2. Изолиране на фракции от плодове на *Lycium Barbarum*

Изолираните фракции, фитохимичния анализ и антиоксидантната активност от плодовете на *L. barbarum* са приготвени с любезното съдействие на доц. Петко Денев от Института по Фитохимия към БАН, гр.Пловдив. Схемата на приготвяне на отделните фракции от *L. barbarum*, е показана на фигура 2.



Фигура 2. Обща схема за получаване на отделните фракции от плодовете на годжи (*L. barbarum*)

1.2.1. Получаване на тотален екстракт от *L. barbarum*

200 g изсушени плодове от годжи (*L. barbarum*) се накисват в студена дестилирана вода в продължение на 30 минути и след това се хомогенизират в лабораторен смесител. Получената смес се екстрахира в продължение на 1 час при 60°C и чрез разклащане на термостатна водна баня (NUVE, Турция). След това екстрактът се центрофугира (6 000 g) и супернатанта се обозначава като тотален екстракт.

1.2.2. Приготвяне на неразтворими в алкохол твърди вещества и екстракт без пектин от *L. barbarum*

Екстракцията се провежда в стъклена колба (4 L), поставена в инкубатор, както следва: 500.0 g от нарязаните нарязани и изсушени плодове от годжи се прехвърлят в 3.0 L предварително загрят при 70°C етанол/вода 70:30 (v/v) разтвор (съотношение твърдо-течно: 1:6, w/v). Получената смес се държи за 1 час и 30 минути мин при 70°C при енергично разклащане (на всеки 10 минути). След това полученият материал се оставя да се охладя и се инкубира за една нощ при стайна температура. След това сместа се филтрира през марля, за да се отстранят твърдите частици. Същата процедура се повторя отново с отделения материал, като инкубацията втори път е с продължителност 1 час. След филтруване, неразтворимият остатък се промива с разтвор на етанол/вода 70:30 (v/v) (70°C) (съотношение твърдо-течно: 1:5, w/v). И накрая, твърдата част се инкубира с ацетон (съотношение твърдо-течно: 1:4, w/v) при 30°C в продължение на 1 час. Твърдият материал се филтрира под вакуум и допълнително се изстиска от излишък на разтворител чрез марля. Полученият неразтворим в алкохол остатък се суши под вакуум (40°C, -0.1 mbar) до постоянно тегло. Алкохолно-водния разтвор се концентрира под вакуум до

онкологичната практика, пациентите са в напреднала възраст и получават полифармация. Lopez-Martin C и кол. (2014 г.) демонстрират потенциалната роля на клиничния фармацевт за предотвратяване и управление на взаимодействията между лекарства в онкологичните условия, когато участват активно в промяната и/или прекратяването на лекарствената терапия. Преглед на въздействието на клиничните фармацевти в амбулаторните онкологични практики от Gatwood и кол. (2017 г.), потвърждава ползата от интегрирането на клиничните фармацевти в моделите на здравеопазването. За да се запази обаче високото професионално ниво в клиничната фармация, е необходимо да се осъществи иновация на обучението, за да се отговори на повишените клинични изисквания към професията [Dolovich L et al., 2018].

4. Оценка на използвания софтуер за детекция на лекарствени взаимодействия в клиничната практика

Фармацевтичната професия непрекъснато се развива в подкрепа на другите медицински специалисти, като предоставянето на качествени здравни грижи за пациентите, отчасти чрез намаляване на риска от предотвратими нежелани лекарствени реакции. През 2014 г. Съвместната комисия на практикуващите фармацевти (*Joint Commission of Pharmacy Practitioners, JCPP*) публикуват модел за оказване на грижи за пациентите, изготвен специално за фармацевти [Cooley J & Lee J, 2018].

	Предимства	Недостатъци
Lexicomp	<ul style="list-style-type: none"> > Голяма база данни за лекарствени взаимодействия > Налична информация за лекарства, които не са регистрирани в Съединените щати > Бърз анализ на използваната полифармация > Класифициране на лекарствените взаимодействия по отношение риска и тежестта на взаимодействието > Наличие на информация за най-честите храни и хранителни добавки, които се свързват с риск от лекарствени взаимодействия > Обяснения за механизма на взаимодействието с посочване на литературните източници 	<ul style="list-style-type: none"> > Невъзможност за засичане на лекарствено взаимодействие между препарати от една съща група > Невъзможност за отчитане на лекарствени взаимодействия при различни дозови режими

Таблица 13. Някои предимства и недостатъци на Lexicomp софтуера.

Този модел включва пет стъпки: събиране на данни, оценка, планиране, изпълнение и проследяване. В етапа на оценка, информацията за пациентите, включително информацията за лекарства, отпускани по лекарско предписание и хранителни добавки, се анализира критично за целесъобразност, ефективност и безопасност. Ключова част от тази стъпка е разпознаването и разрешаването по подходящ начин на взаимодействието между използваните лекарства, а така също между лекарства и хранителни добавки. Подходящите действия и управление на взаимодействията по време на тази стъпка се постигат с използването на информационни бази данни за лекарства, като повечето от тях са достъпни онлайн и лесни употреба от фармацевтите. Една

Променливи	Тотален брой пациенти (n=248)		Мултивариантен регресионен анализ	
	Засечени ПЛЛВ ≤ 9	Засечени ПЛЛВ > 10	OR (95% CI)	p-стойност
Години на пациента ≤ 60 > 60	29 165	8 46	1.008 (0.441-2.308)	(P = 0.848)
Брой лекарства ≤ 7 > 7	135 49	2 52	37.84 (9.012-158.896)	(P = <0.001)

Таблица 12. Прогнози, свързани с потенциалните лекарство-лекарство взаимодействия.
OR – коефициент на шансовете; CI – доверителен интервал

Асоциацията на ПЛЛВ и броя на лекарствата се подкрепя от други публикувани проучвания. *Ismail M* и кол. (2013 г.) и *Murtaza G* и кол. (2015 г.) демонстрират значително асоцииране на ПЛЛВ с възрастта, по-дългия престой в болница и увеличени брой предписани лекарства [Ismail M et al., 2013; Murtaza G et al., 2015]. В нашето проучване не наблюдавахме статистически значима връзка между възрастта и появата на ПЛЛВ (повече от 10). Въз основа на резултатите от нашето проучване е необходима повишена бдителност при пациенти, приемащи повече от 7 лекарства и внимателно следене за ПЛЛВ.

3. Роля на клиничния фармацевт в превенцията на потенциални лекарствени взаимодействия

През 2015 г. българското Министерство на здравеопазването издаде наредба, която изисква от болниците с над 400 болнични легла да назначат клинични фармацевти, които да оказват медицински грижи на стационарни пациенти. Подобна политика има за цел да спести до 30% от парите за лечение и да предотврати страничните ефекти на някои лекарства [Bergkvist A et al., 2009; Graabaek T & Kjeldsen LJ, 2013]. Преглеждайки цялата фармакотерапия на пациентите, фармацевтите могат да намалят рецидивите от заболяванията и рехоспитализацията, както и да редуцират продължителността на болничния престой [Ravn-Nielsen LV et al., 2018; Hohl CM et al., 2017]. *Roblek* и кол. (2016 г.) [Roblek et al., 2016] са демонстрирали в рандомизирано, двойно-сляпо, контролирано проучване, че клиничните фармацевти могат да намалят клинично значимите лекарствени взаимодействия при пациенти със сърдечна недостатъчност. Основната крайна точка на изследването са били лекарствени взаимодействия, вторични – повторна хоспитализация или смърт по време на проследяване. Резултатите, представени от авторите, показват значително намаляване на клиничните лекарствени взаимодействия в групата с фармацевтична интервенция спрямо контролната група (8 срещу 18; P = 0.003). По отношение на вторичната крайна точка, 11 срещу 9 (интервенция срещу контрол) пациенти са били хоспитализирани или починали (P = 0.2). Това проучване потвърждава, че интервенцията на клиничните фармацевти може да намали броя на клинично значими лекарствени взаимодействия при пациенти със СН, но по отношение на клиничните крайни точки 6 месеца от изписването, остава да се изясни. Както в случаите на сърдечна недостатъчност, така и в

пълното отстраняване на етанола. Обемът на екстракта се нагласява на два литра с дестилирана вода и се означава като безпектинова фракция.

1.2.3. Получаване на пектинови полизахариди от *L.barbarum*

Алкохол неразтворимата част се екстрахира с dH₂O (1:25, w/v) при 82°C в продължение на 1 час при непрекъснато разбъркване и след това филтрира. Твърдият остатък се екстрахира отново по същия начин с dH₂O и след това се филтрува. Комбинираните филтрати се концентрират във вакуум и се центрофугират (4000 g, 30 min, 15°C). След допълнителна филтрация на получената супернатант през Бюхнерова фуния, той се утаява чрез добавяне два обема студен 96% (v/v) етанол до един общ обем екстракт. След съхранение при 4°C в продължение на 24 часа, коагулираният полизахарид се отделя чрез филтруване, промива се с над 70% (v/v) етанол и накрая с 96% (v/v) етанол. След това утайката се разтваря отново във вода и се лиофилизира (*Christ® Alfa 1-4 LD plus*) до постоянно тегло. Съхранява се в ексикатор до употреба.

1.3. Изолване на фракции от листа на Пу-ер и Банча чай

Изолването на метилксантиновите и катехиновите фракции от Пу-ер и Банча листата са приготвени с любезното съдействие на доц. Илия Славов от Катедра Биология, Сектор Фармацевтична ботаника и фармакогнозия, Факултет по Фармация, гр. Варна.

1.3.1. Изолване на метилксантинови фракции от листа на Пу-ер и Банча чай

Точно претеглени количества от Пу-ер и Банча чаени листа (50 g) се екстрахират под обратен хладник с дестилирана вода (250 mL) в продължение на 60 минути и се филтруват през Бюхнерова фуния. Водните екстракти се подкисляват с 25% сярна киселина (5 mL) и се концентрират до половината от първоначалния обем. След това горещите разтвори се филтруват и екстрахират четири пъти с хлороформ (50 mL) в делителна фуния. Хлороформните екстракти (200 mL) се промиват двукратно с 5% разтвор на натриев хидроксид (50 mL) и два пъти с дестилирана вода (50 mL). След изпаряване на хлороформа се получава смес от метилксантини. Количеството им се изчислява (като процент) от началната растителна субстанция.

1.3.2. Изолване на катехинови фракции от листа на Пу-ер и Банча чай

Точно претеглени количества от Пу-ер и Банча чаени листа (50 g) се екстрахират със 100 mL метанол и се изпаряват във вода баня. Към изсушения екстракт се добавят 50 mL вода, натриев хлорид и фосфорна киселина до pH 3.5. Сместа се екстрахира в делителна фуния с по 50 mL етилацетат четирикратно и обединените етилацетатни екстракти се промиват с вода. След

изпаряване на разтворителя се получава смес от катехини и се изчислява нейния процент от първоначалната растителна субстанция.

1.4. Анализ на получените екстракти/фракции

1.4.1. Анализ на полизахаридна фракция на *L.barbarum*

Съдържанието на анхидроуронова киселина се определя колориметрично от хидроксидифенил [Blumenkrantz & Asboe-Hansen, 1973], използвайки D-GalA като стандарт. Степента на метил-естерификация се определя чрез количествено определяне на метанола след осапунване (0.5 M NaOH, 1 час) на пектиновите проби. Освободеният метанол се определя чрез комбиниран ензимен и колориметричен метод с алкохолна оксидаза и *Purpald*[®] реагент [Anthon & Baret, 2008]. Степента на ацетиране (DA) се анализира чрез метода на хидроксамовата киселина, като се използва β -D-глюкозен пентаацетат като стандарт [McComb & McCready, 1957]. Метод Брадфорд (1976) се използва за анализ на съдържанието на протеин. Данните са представени в таблица 1.

Съдържание	Процент
Тотални уронови к-ни	34.1%
Степен на естерификация	54%
Степен на ацетиране	5.5%
Протеинно съдържание	7.3%

Таблица 1. Основна характеристика на пектиновите полизахариди с междинна степен на естерификация в *L.barbarum*

1.4.2. Анализ на полифенолната фракция

1.4.2.1. Количествено определяне на общи феноли

Общото съдържание на фенолни съединения е определено по метода на Singleton и Rossi (1965), като се използва реагент на *Folin-Ciocalteu*. Като калибрационен стандарт е използвана галова киселина и резултатите са изчислени като средни стойности от три измервания на един и същ екстракт и изразени като еквиваленти на галова киселина (GAE) на 1 L екстракт (таблица 2).

	Тотално фенолно съдържание, mg/L	
	Средна стойност	Стандартно отклонение
Безпектинова (полифенолна) фракция	2600	± 10.413
Тотален воден екстракт	1900	± 13.534

Таблица 2. Тотално фенолно съдържание в изолираните фракции от *L.barbarum* изразено като еквиваленти на галова киселина (GAE) в 1 L екстракт.

1.4.2.2. Количествено определяне на флавоноиди

Съдържанието на флавоноиди в растителните субстанции е определено според 11 ГФР (ГФР XI, 1990) чрез спектрофотометрични методи

	AUCR \pm SD	C _{max} R \pm SD
Едновременно прием		
DE + verapamil/norverapamil	2.61 \pm 0.75	2.58 \pm 0.80
Dabigatran + verapamil/norverapamil	2.34 \pm 0.71	2.39 \pm 0.75
Прием на инхибитора след 2 часа		
DE + verapamil/norverapamil	1.55 \pm 0.28	1.26 \pm 0.32
Dabigatran + verapamil/norverapamil	1.47 \pm 0.26	1.42 \pm 0.31

Таблица 11. Стойности на C_{max}R и AUCR при прием на *dabigatran etexilate* (DE) и *dabigatran* едновременно с *verapamil/norverapamil* или два часа след приема на DE.

Както се вижда от резултатите на проведените симулации, приложението на *verapamil* едновременно с *dabigatran etexilate* води до значително покачване на потенциала за взаимодействие между двете лекарства, изразени със стойностите на AUCR и C_{max}R на пролекарството *dabigatran etexilate* и активния метаболит *dabigatran* в таблица 11. Обратно, приложението на *verapamil* 2 часа след *dabigatran etexilate* намалява риска от взаимодействие, което се потвърждава и от клиничното проучване на *Härter S* и кол. от 2013 г.

Дискусия

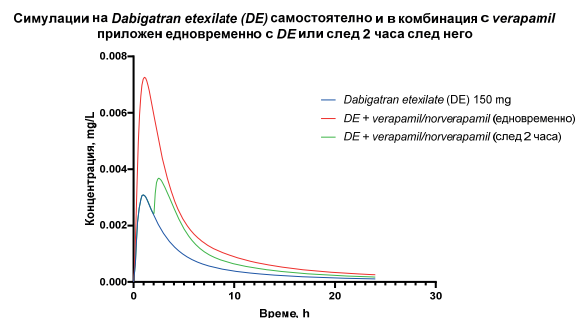
Богатството на данни интегрирани в симулатора *Simcyp* му позволява да засече множество лекарствени взаимодействия свързани с метаболизиращи ензими и/или транспортни протеини и да симулира взаимодействия, които в много случаи се доближават максимално до наблюдаваните такива в клинични изследвания. В горните примери бяха демонстрирани някои от възможностите на софтуера, като например: 1) вземане предвид на възможности за включване на алтернативни пътища на елиминиране при инхибиране на основния елиминационен път на лекарството; 2) определяне на най-чувствителните и най-резистентните на взаимодействия в дадена популация в зависимост от генно- и фенотипните проявления в популацията; 3) възможност за симулиране на лекарствено взаимодействие на основните съединения и техните активни метаболити; 4) възможност за добавяне на няколко инхибитора едновременно в симулациите; 5) възможност за промяна пътя на приложение, на използваната лекарствена форма, а също така промяна в тайминга на назначаване на дозите в денонощието.

2.6. Асоцииране на потенциалните лекарство-лекарство взаимодействия с възрастта и броя на приеманите лекарства

За да бъде проследена връзката на потенциалните лекарство-лекарство взаимодействия с възрастта и броя на приеманите лекарства за 2015 г., беше приложен мултивариантен регресионен анализ. Резултати показаха по-силна връзка между броя на приетите лекарства (повече от 7) и появата на потенциалните лекарство-лекарство взаимодействия (повече от 10) – 37.84 (95% CI 9.012-158.896, P = <0.001). Не бяха установени статистически значими разлики между възрастта и появата на потенциалните лекарство-лекарство взаимодействия (повече от 10) - 1.008 (95% CI 0.441-2.308, P = 0.848). Резултатите са обобщени в Таблица 12.

Симулациите, проведени с *digoxin* 0.5 mg еднократна доза самостоятелно и в комбинация от *verapamil/norverapamil* 240 mg дневно (80 mg/8 h), показаха подобни резултати, докладвани от клиничните проучвания (фигура 10, таблица 10). С цел да се проследи участието на основното съединение (*verapamil*) и неговия метаболит (*norverapamil*) и нивото на взаимодействието (инхибиция на *P-gp* в ГИТ или в черен дроб) бяха проведени симулации с последователно изключване на възможните инхибиции на *P-gp*. Резултатите представени на фигура 10 и таблица 10 показват, че *verapamil* независимо, че е по-слабо potentен, оказва също толкова изразено взаимодействие с *digoxin*, както и неговия метаболит – *norverapamil*. Взаимодействието основно се дължи на инхибицията на *P-gp* в ГИТ, а не толкова на тази в черния дроб – проследено чрез изключване последователно инхибицията в ГИТ и черен дроб. Друг начин за потвърждаване на това е чрез смяна на пътя на приложение. Ако със същата доза *verapamil*, например се симулира *i.v. bolus* приложение (разбира се, интравенозната терапевтична доза на *verapamil* е значително по-малка, но с цел демонстрация на тезата е предприета симулация с тази доза), то взаимодействието е по-слабо проявено (таблица 10).

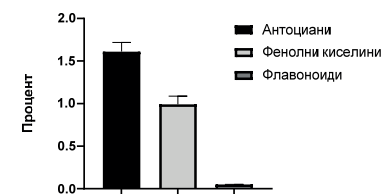
При здрави доброволци е проучвано и взаимодействието на *dabigatran etexilate* в доза 150 mg еднократно дневно с *verapamil*, прилаган в различни дози, различна продължителност, различни лекарствени форми и различно време. Най-малък потенциал на взаимодействие е определен когато *dabigatran etexilate* се прилага 2 часа преди *verapamil* и съответно най-голям такъв, когато *verapamil* се прилага един час преди *dabigatran etexilate* [Härtter S et al., 2013]. Със *Simcyp* софтуера бяха симулирани два случая – приложение на *dabigatran etexilate* 150 mg с *verapamil/norverapamil* 240 mg дневна доза (80 mg/8 h) едновременно и 2 часа след него. *Dabigatran etexilate* е пролекарство, което се превръща под действие на карбоксиестеразите в активен метаболит – *dabigatran*. *Simcyp* софтуера разполагаше също с необходимите физико-химични и фармакокинетични данни за този активен метаболит. Резултатите са обобщени на фигура 11 и таблица 11.



Фигура 11. Симулации на *Dabigatran etexilate* (DE) самостоятелно и в комбинация с *verapamil* приложен едновременно с DE или след 2 часа след него.

при $\lambda=430$ nm посредством създаване на комплекс с *A/C13*. Съдържанието им е изчислено като кверцетин еквивалент и е представено в проценти (Фигура 3).

Процентно съдържание на фенолни съединения в плодове на Годжи



Фигура 3. Количествено съдържание (в %) на фенолни съединения в плодове на Годжи.

1.4.2.3. Количествено определяне на фенолни киселини

Определянето на общите фенолни киселини е извършено в съответствие със 7 Европейска фармакопея [Ph. Eur 7 c, 2011] Анализите са извършени чрез спектрофотометричен метод при $\lambda=505$ nm, а количеството на фенолните киселини е изразено (проценти) в розмаринова киселина еквивалент (Фигура 3).

1.4.2.4. Количествено определяне на антоциани

Определянето на общите антоциани е извършено в съответствие със 7 Европейска фармакопея [Ph. Eur 7 b, 2011]. Анализите са проведени последователно екстракция на растителната субстанция с етанол и бутанол. Измерванията са извършени при $\lambda=545$ nm., като стандарт е използван цианидин хлорид, а количеството на антоцианите е представено в проценти (Фигура 3).

1.4.3. Определяне на антиоксидантната активност на изолираните фракции от *L.barbarum*

За определяне на антиоксидантната активност, бяха използвани два метода, при които може да се изследва по-широк спектър от антиоксидантните свойства на получени екстракти. Методите, които бяха използвани, представляваха най-значимите радикали физиологично – пероксил-радикала чрез метода ORAC и хидроксил-радикала чрез метода HORAC.

- ORAC (*oxygen radical absorbance capacity*, капацитет на абсорбция на кислороден радикал) се измерва съгласно Ou и кол. (2001 г.) с някои модификации, описани от Denev и кол. (2010 г.). Накратко, методът се основава на антиоксидантната активност срещу перокси радикали. AAPH (2,2'-азобис [2-метилпропионамидин] дихидрохлорид) генерира перокси радикали, които разграждат флуоресцеин. Последният се използва като флуоресцентна проба. Антиоксидантната активност се измерва като се изгражда площ под кривата (AUC) при флуоресцентното разпадане в

присъствието на антиоксидант и по отношение на *blank* проба (без добавен антиоксидант). Експресията на антиоксидантната активност е в милимола тролокс еквиваленти на литър екстракт (mM TE/L).

- **HORAC** (Хидрокси радикален антиоксидант капацитет) се провежда, както е описано от Оу и кол. (2002 г.) с някои модификации. Накратко, методът се основава на антиоксидантна активност срещу хидроксилни радикали, генерирани чрез класически трансферен механизъм на водородни атоми (НАТ). По подобен начин, както при анализа **ORAC**, флуоресценцията на флуоресцеина намалява в наличието на разтвор на водороден перексид и Co^{2+} с течение на времето. Антиоксидантната активност се измерва като се постоава площ под кривата (*AUC*) под флуоресцентното разпадане в присъствието на антиоксидант и спрямо празната проба (без добавен антиоксидант). Експресията на антиоксидантната активност е в милимола еквиваленти на галовата киселина на литър екстракт (mM GAE/L). И двата метода са проведени на **FLUOstar OPTIMA** четец (*BMG Labtech*, Германия). Използваната дължина на вълната е 485 nm за възбуждане и 520 nm за емисиите.

	ORAC, mmol TE/L		HORAC, mmol GAE/L	
	Средна стойност	Стандартно отклонение	Средна стойност	Стандартно отклонение
Безпектинова (полифенолна) фракция	90.8	±2.6	15.7	±0.5
Тотален воден екстракт	46.7	±1.3	9.2	±0.4

Таблица 3. Антиоксидантна активност на екстракти от *L. barbarum*

Всяка стойност е средната ± SD на три независими измервания. TE: Тролокс еквиваленти. GAE: Еквиваленти на галова киселина

В първия метод се определя способността за улавяне на радикали чрез трансфер на водородни атоми, а във втория – метал-хелатиращата способност при реакционните условия на *Fenton* [Alam MN et al., 2013]. Резултатите са представени в Таблица 3.

1.4.4. Дискусия

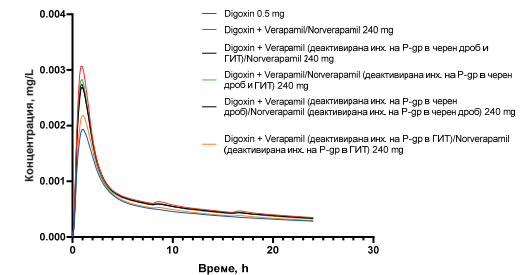
Плодовете от *L. barbarum* се използват широко в традиционната китайска медицина. Проведените множество експериментални и клинични изследвания са доказали, че активността се дължи на високото съдържание на полизахариди (*Lycium barbarum polysaccharide*, *LBP*s). Смята се, че съдържанието на полизахариди в сухите плодове е 5%-8% и молекулно тегло, вариращо от 24 *kDa* до 241 *kDa*. Те се състоят от сложна смес от силно разклонени и само частично охарактеризирани полизахариди и протеоглигани. В повечето случаи гликозидната част представлява около 90%-95% от масата и се състои от арабиноза, глюкоза, галактоза, маноза, рамноза, ксилоза и галактуронова киселина. Биоактивността на полизахаридите често е обратно пропорционална на техните молекулни тегла. Наблюдавани са различни

При прегледа на резултатите, най-чувствителни на взаимодействието (тези с най-високи стойности на *AUCR* > 3), са логично тези с генотип *CYP2C9*1/*1* (бързи метаболизатори) и с най-голямо количество на *CYP2C9* ензими (16 890 713.14-17 832 696.92 pmol). Най-ниска степен на взаимодействие (тези с най-ниски стойности на *AUCR*) се наблюдава при пациенти с генотип *CYP2C9*3/*3* (бавни метаболизатори), при които стойностите на *AUCR* са в диапазона 1.00-1.02 и такива с генотип *CYP2C9*1/*1* с най-ниска експресия на ензима (566 035.71- 913 298.10 pmol) със стойности на *AUCR* 1.05-1.07.

Digoxin и *dabigatran etexilate* се явяват субстрати на ефлуксната помпа *P-gp* (*MDR1/ABCB1*) и са застрашени от лекарствени взаимодействия с лекарства инхибитори на *P-gp*. Бяха симулирани взаимодействия на *digoxin* и *dabigatran etexilate* с *verapamil* (инхибитор на *P-gp*). В *Simcyp* симулатора освен пълни данни за *verapamil*, имаше също така и пълни данни за основния негов метаболит – *norverapamil*, който се явява 3-4 пъти по-мошен инхибитор на *P-gp* [Pauli-Magnus C et al., 2000]. *Lexicomp* определя взаимодействието на *verapamil* с *digoxin* в категория C, докато това с *dabigatran etexilate* в категория D (едно взаимодействие беше засечено за 2014 г.; таблица 2).

В клинични проучвания със здрави доброволци, при използване на дневни дози 240 mg *verapamil*, нивата на *digoxin* са се покачвали със 60-80% [Klein HO et al., 1982].

Симулации на *Digoxin* самостоятелно и при наличие на *Verapamil/Norverapamil*

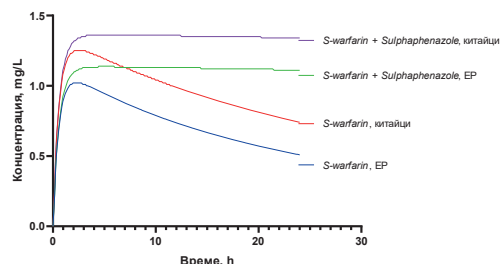


Фигура 10. Симулации на *digoxin* 0.5 mg самостоятелно и в различни комбинации с *verapamil/norverapamil* 240 mg.

	$C_{max}, R \pm SD$	$AUCR \pm SD$
<i>Digoxin</i> + <i>Verapamil/Norverapamil</i> 240 mg p.o. (80 mg/8 h)	1.63±.28	1.32±0.23
<i>Digoxin</i> + <i>Verapamil/Norverapamil</i> 240 mg i.v. bolus (80 mg/8 h)	1.09±0.05	1.06±0.04
<i>Digoxin</i> + <i>Verapamil</i> (деактивирана инх. на P-гр в черен дроб и ГИТ)/ <i>Norverapamil</i> 240 mg	1.25±0.20	1.45±0.24
<i>Digoxin</i> + <i>Verapamil/Norverapamil</i> (деактивирана инх. на P-гр в черен дроб и ГИТ) 240 mg	1.27±0.20	1.51±0.25
<i>Digoxin</i> + <i>Verapamil</i> (деактивирана инх. на P-гр в черен дроб)/ <i>Norverapamil</i> (деактивирана инх. на P-гр в черен дроб) 240 mg	1.25±0.24	1.45±0.20
<i>Digoxin</i> + <i>Verapamil</i> (деактивирана инх. на P-гр в ГИТ)/ <i>Norverapamil</i> (деактивирана инх. на P-гр в ГИТ) 240 mg	1.14±0.07	1.07±0.05

Таблица 10. Стойности на C_{max} и $AUCR$ при едновременен прием на *digoxin* 0.5 mg с различни комбинации на *verapamil/norverapamil* 240 mg

Симулации на *S-warfarin* самостоятелно и в комбинация със *Sulphaphenazole* при европейска раса и китайци

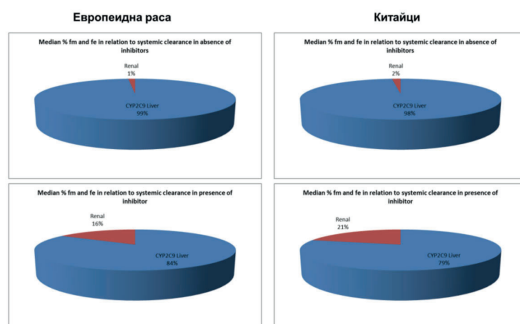


Фигура 8. Симулации на *S-warfarin* самостоятелно и в комбинация със *Sulphaphenazole* при популация европейска раса (EP) и китайци.

	AUCR Механистично-статичен модел (5-95%)	AUCR Механистично-динамичен модел ±SD	C _{max} R Механистично- динамичен модел ±SD
<i>Sulphaphenazole</i> , европейска раса	11.66 (7.86-17.45)	1.57±0.57	1.09±0.05
<i>Sulphaphenazole</i> , китайци	11.18 (7.71-16.27)	1.37±0.29	1.07±0.04

Таблица 9. Симулации на едновременна употреба на *S-warfarin* със *sulphaphenazole* при европейска раса и китайци.

От проведените симулации се вижда, че статичния модел показва значително завишени стойности, за разлика от динамичния, който взема предвид увеличената елиминация през бъбреците (Фигура 9). Инхибицията на *CYP2C9* се компенсира с увеличаване екскрецията през бъбреците. При европейската раса тази част е близо 16%, докато при китайската раса близо 21%, което частично може да обясни макар и малките различия наблюдавани в двете популации при симулираното взаимодействие със *sulphaphenazole*.



Фигура 9. Средни стойности на % f_m и f_e на *S-warfarin* самостоятелно и в присъствие на инхибитор (*sulphaphenazole*) при европейската раса и китайци.

ефекти свързани с използването на различни фракции от полизахариди, но акцентът е върху съдържанието на уронова к-на и нейни протеинови конюгати, които са от изключително значение за биологичната активност [Cheng J et al., 2015]. Именно поради това е необходимо да се анализира съдържанието на уронова киселина и протеини в полизахаридните фракции. Получената от нас пектинова фракция бе с високо съдържание на тотални уронови киселини, които достигат до почти 35% и протеиново съдържание от 7,3% (Таблица 1). Най-честата форма на уронова киселина е D-глюкуронова киселина, но D-галактуроновата киселина превалява в пектиновите фракции, където е под формата на полимер – полигалактуронова киселина [Mohnen D, 2008]. Други автори, изолирали полизахаридни фракции от *L.barbarum*, докладват по-ниски нива на уронови к-ни и протеини. Zhang Q и кол. (2015) изолират две полизахаридни фракции с различно съдържание на уронови к-ни и протеини – 16.0% и 23.2% за уронови киселини и 2.1% и 3.1% за протеини, съответно. В зависимост от използваните методи на екстракция и пречистване, полизахаридните молекули може да се променят, като по този начин и крайния състав на фракцията. Това дава основание да се заключи, че получената от нас пектинова (полизахаридна) фракция съдържа значително количество от необходимите активни съставки.

Другите две фракции, безпектиновата и тоталния воден екстракт, бяха богати на фенолни съединения (Таблица 2 и Фигура 2). Други автори също потвърждават високо съдържание на фенолни съединения в плодовете на *L.barbarum*. В посочените проучвания, с увеличаване количеството на полифеноли в екстракта се наблюдава и увеличаване на антиоксидантната активност [Islam T et al., 2017; Benchenouf A et al., 2017; Sun Y et al., 2017]. Именно поради това, двата екстракта бяха подложени на изследване за определяне на антиоксидантния им потенциал. Антиоксидантна активност на двата екстракта корелираше с количеството на полифеноли в тях. Съвсем логично без-пектиновия екстракт, богат на полифенолни съединения, показва по-висока антиоксидантна активност, определена чрез два от най-често използваните антиоксидантни метода (*ORAC* и *HORAC*) (Таблица 3).

1.4.5. HPLC анализ на съдържание на *caffeine*, *theophylline* и *theobromine* в изолираните метилксантинови фракции на Пу-ер и Банча чай

HPLC анализът на метилксантиновата фракция е извършен с любезното съдействие на маг.фарм. Станила Стоева, докторант към Катедра “Фармакология, токсикология и фармакотерапия”, Факултет по Фармация, гр. Варна.

1.4.5.1. Апаратура и аналитични условия

HPLC измерването е извършено на *Thermo Scientific UltiMate 3000* аналитична LC система, оборудвана с променлив UV/VIS детектор (*Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000 VWD-3100* променлив дължина на вълната детектор/VWD). HPLC разделяне беше извършено върху аналитична колона *Thermo Scientific AQUASIL C18* (150 mm x 4.6 mm, 5 μm), защитена от предпазна колона *AQUASIL C18* (10 mm x 4.6 mm, 5 μm) със скорост на потока 0.8 ml/min и UV детектиране при 274 nm. Обемът на инжектиране е 20 μl. Подвижната фаза е смес от двойно дестилирана и филтрирана вода с ацетонитрил (90:10%, v/v) в изократен режим. Колоната се поддържа при 30°C. Анализът на данните е

извършен с помощта на софтуера за хроматографски данни на *Chromeleon*[®] 7.2 на *Thermo Scientific*[®].

1.4.5.2. Стандартни и работни решения

Стандартни изходни разтвори на *caffeine* (1.0 mg/mL крайна концентрация), *theophylline* (1.0 mg/mL крайна концентрация) и *theobromine* (0.5 mg/mL крайна концентрация) се приготвят отделно чрез претегляне на всяка стандартна субстанция и разваряне в гореща двойно дестилирана вода. pH 8 (регулирано с 0.1 M NaOH). Впоследствие, работните разтвори се приготвят чрез серийно разреждане на всеки стандартен основен разтвор, за да се получат концентрации в обхвата от 1.0 - 750.0 µg/mL във вода. Всички налични и работни стандартни разтвори бяха приготвени непосредствено преди анализа.

1.4.5.3. Приготвяне на пробите

Пробата Пу-ер чай се приготвя чрез претегляне на 50,0 mg прахообразна метилксантинова фракция, която се разтваря в гореща двойно дестилирана вода (pH 8) до крайна концентрация от 2,5 mg/mL. Пробата от Банча чай се приготвя чрез претегляне на 50,0 mg прахообразна метилксантинова фракция, която се разтваря в гореща двойно дестилирана вода (pH 8) до крайна концентрация от 1.0 mg/mL. Преди анализа всички проби се филтрират през мембранен филтър *Sartorius RC 0.45 µm*.

1.4.5.4. Калибрационна крива

Изготвят се калибрационни криви за всяко съединение (*caffeine*, *theophylline*, *theobromine*), като се използват работни стандартни разтвори при осем концентрации в диапазона от 1.0 до 750.0 µg/mL. Линейността на връзката между площта на пика и концентрацията се демонстрира чрез коефициент на корелация $R^2 = 0.9995$. Методът *HPLC* е валидиран съгласно Международната конференция по хармонизация (ICH) Q2 (R1) за валидиране на аналитични процедури: текст и методология [ICH. Topic Q2 (R1) Validation of analytical procedures: Text and methodology (CPMP/ICH/381/95), 1995. November 2005]. Концентрациите на *caffeine*, *theophylline*, *theobromine* бяха изчислени от калибрационните криви.

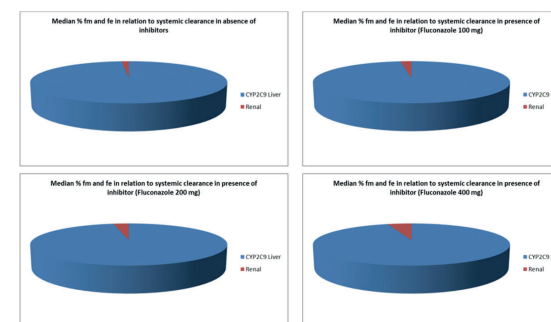
1.4.5.5. Резултати от анализа

Беше разработен бърз и чувствителен *HPLC* метод с *UV*-детекция за количествено определяне на *caffeine*, *theophylline* и *theobromine* в изолирани проби от метилксантини на Пу-ер и Банча. За целите на изследването са използвани различни видове мобилни фази [Bispo MS et al. 2002; Srdjenovic B et al., 2008]. Най-добро разделяне беше получено с 90% H₂O/10% ацетонитрил в изократен режим. Фигура 4 показва хроматограмата на референтните вещества (*caffeine*, *theophylline*, *theobromine*), а Фигура 5 показва хроматограмата на метилксантините от Пу-ер и Банча.

	AUCR Механистично-статичен модел (5-95%)	AUCR Механистично- динамичен модел ±SD	C _{max} R Механистично- динамичен модел ±SD
<i>Fluconazole</i> 100 mg	1.64 (1.41-1.90)	1.49±0.16	1.31±0.09
<i>Fluconazole</i> 200 mg	2.27(1.81-2.77)	1.89±0.33	1.56±0.16
<i>Fluconazole</i> 400 mg	3.50 (2.58-4.40)	2.51±0.65	1.94±0.29

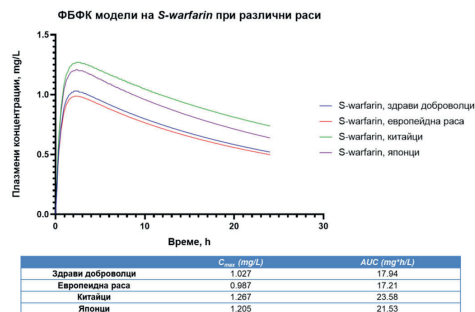
Таблица 8. Симулации на едновременна употреба на *S-warfarin* с *Fluconazole* приложен в дози 100, 200 и 400 mg.

В проведените статични симулации със *Simcyp* софтуера, промените в *AUC* стойностите на *S-warfarin* бяха значително завишени в сравнение с динамичния модел. При динамичния модел стойностите на *AUC* на *S-warfarin* се доближаваха до тези описани в клиничните изследвания със здрави доброволци. Причините за това може би се крият в това, че в динамичния модел се вземат предвид алтернативните пътища, които се активират при настъпилите промени. Например, инхибицията от *fluconazole* на *CYP2C9* увеличава екскрецията през урината на *S-warfarin* и поради това в динамичния модел степента на взаимодействието е по-слабо изразено (Фигура 7). Това е илюстрирано по-добре при инхибицията със *sulphaphenazole* по-долу.



Фигура 7. Средни стойности на %*f_m* и *f_e* на *S-warfarin* самостоятелно и в присъствие на инхибитор (Fluconazole 100, 200 и 400 mg).

Взаимодействието между кумаринови антикоагуанти и сулфонамидни антимиотробни препарати както беше показано по-горе е комплексно и обхваща както фармакокинетични, така и фармакодинамични механизми. В *Lexicomp* софтуера, тези взаимодействия се класифицират в рисковата категория D и спрямо степента на реакцията – тежка. В *Simcyp* софтуера имаше данни за *sulphaphenazole* и именно с него бяха проведени симулации за лекарствени взаимодействия със *S-warfarin*. В днешно време този препарат не се използва в клиничната практика, единствено в *in vitro* постановки като стандарт в инхибицията на *CYP2C9*. По-долу на фигура 8 са представени симулациите на взаимодействието между *S-warfarin* и *sulphaphenazole* при здрави доброволци и китайци и са обобщени в таблица 9.

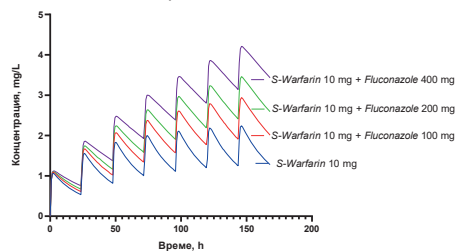


Фигура 5. ФБФК модели при виртуална популация от здрави доброволци, европейска и азиатска раса (китайци и японци).

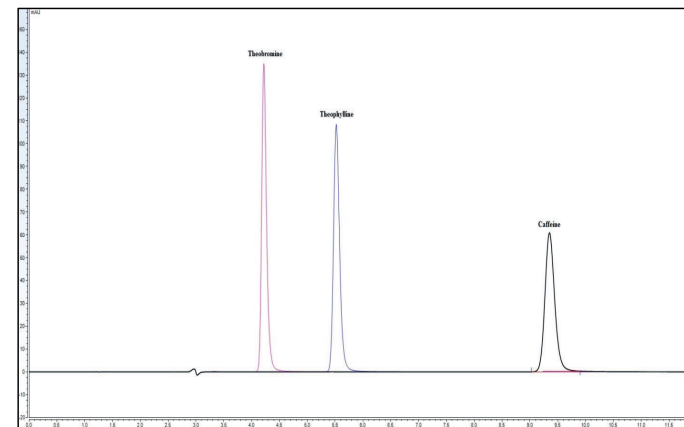
Както се вижда от таблица 3 и симулациите на фигура 2, независимо че при европейската раса съотношението на фенотипа интензивни към слаби метаболити е 0.94 към 0.06, докато при азиатската раса съотношението е 0.99 към 0.01, при последните C_{max} и AUC са малко по-високи. Разликите идват от различията в количеството ензими (CYP2C9) налични в черния дроб, при европейска раса те са 73 pmol/mg протеин за интензивни и 29 pmol/mg протеин за слаби метаболити, при азиатската раса стойностите са 60 pmol/mg протеин и 24 pmol/mg протеин респективно, откъдето идва намаления интензитет на метаболитизъм и различните стойности на CL на S-warfarin при отделните популации ($CL_{NEurC} = 0.24 \pm 0.22$ L/h vs $CL_{Chinese} = 0.17 \pm 0.20$ L/h) [Yang J et al., 2012].

По отношение на наличните CYP2C9 инхибитори, в Simcyp софтуера имаше данни за два такива – fluconazole (антимикотичен азол) и sulphaphenazole (сулфонамид, антибактериален препарат). В клинични изследвания със здрави доброволци е доказано взаимодействието на warfarin и fluconazole. Fluconazole прилаган в дози 100, 200 и 400 mg показва завишаване на AUC на S-warfarin с 35%, 86% и 100% съответно [Neal JM et al., 2003]. Бяха проведени симулации със Simcyp софтуера в продължение на една седмица с гореспоменатите дози, а резултатите са представени на фигура 6 и таблица 8.

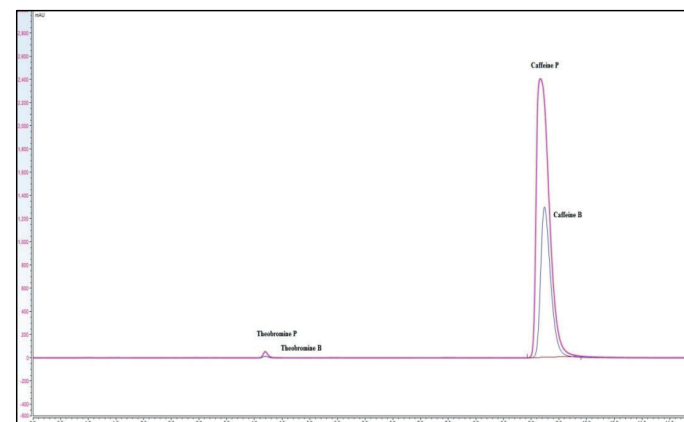
Симулации на S-warfarin самостоятелно и при едновременен прием със силни инхибитори на CYP2C9



Фигура 6. Симулации на S-warfarin самостоятелно и при едновременен прием с Fluconazole в дози 100, 200 и 400 mg в продължение на 7 дни.



Фигура 4. Хроматограма на caffeine, theophylline и theobromine (референтни вещества) в концентрация 10 µg/ml.



Фигура 5. Хроматограма на метилксантините, извлечени от чаените листа на Пу-ер (P) и Банча (B).

Анализът, извършен с HPLC-UV, показва, че и двете фракции съдържат голямо количество caffeine – 84.07% и 88.11%, и много малко количество theobromine – 0.16% и 0.11%, съответно. Пробата от Пу-ер чай съдържа пренебрежимо малко количество theophylline - <0,0001%, докато в пробата Банча чай, theophylline не беше открит. Резултатите са обобщени в таблица 4.

Метилксантини	Концентрация ($\mu\text{g/ml}$) \pm RSD*		Концентрация (%)	
	Пу-ер	Банча	Пу-ер	Банча
Caffeine	525.45 \pm 0.17%	220.28 \pm 0.14%	~ 84.07	~ 88.11
Theophylline	0.0001 \pm 0.098%	–	~ < 0.0001	–
Theobromine	3.88 \pm 0.090%	1.06 \pm 0.078%	~ 0.62	~ 0.42

– под границата за количествено определяне

Таблица 4. Съдържание на *caffeine*, *theophylline* и *theobromine* в метилксантинови фракции, изолирани от чаените листа Пу-ер и Банча. За определяне на концентрациите са използвани шест проби. *RSD – относително стандартно отклонение.

1.4.6. Спектрофотометричен анализ на катехинови фракции изолирани от Банча и Пу-ер листа

1.4.6.1. Количествено определяне на общи водоразтворими полифеноли

Методът е свързан със спектрофотометрично определяне на образуващия се цветен комплекс при взаимодействие на фенолните хидроксилни групи с железни соли в присъствие на натриев карбонат (Ph. Eur. 7 a, 2011). Като стандарт при анализа се използва пирагалол а абсорбцията се измерва при 760 nm. Процентното съдържание на общи водоразтворими полифеноли се изчислява по формула (Фигура 6).

1.4.6.2. Количествено определяне на флавоноиди

Съдържанието на флавоноиди в растителните субстанции е определено според 11 ГФР (ГФР XI, 1990) чрез спектрофотометрични методи при $\lambda=430$ nm посредством създаване на комплекс с $AlCl_3$. Съдържанието им е изчислено като кверцетин еквивалент и е представено в проценти (Фигура 6).

1.4.6.3. Количествено определяне на фенолни киселини

Определянето на общите фенолни киселини е извършено в съответствие със 7 Европейска фармакопея [Ph. Eur 7 c, 2011] Анализите са извършени чрез спектрофотометричен метод при $\lambda=505$ nm, а количеството на фенолните киселини е изразено (проценти) в розмаринова киселина еквивалент (Фигура 6).

1.4.6.4. Количествено определяне на антоциани

Определянето на общите антоциани е извършено в съответствие със 7 Европейска фармакопея [Ph. Eur 7 b, 2011]. Анализите са проведени спектрофотометрично и включват последователна екстракция на растителната субстанция с етанол и бутанол. Измерванията са извършени при $\lambda=545$ nm., като стандарт е използван цианидин хлорид, а количеството на антоцианите е представено в проценти (Фигура 6).

ФХ и ФК параметри	Warfarin	Acenocoumarol
Молекулно тегло	308.3	353.3
pKa/LogP	5.0/2.9	5.0/1.98
Vd (L/kg)	0.08-0.12	0.22-0.52
СПП	>99%	>98%
Плазмени концентрации ($\mu\text{M/L}$)	1.5-8	0.03-0.3
Терминален плазмен полуживот (h)	S-War: 24-33 R-War: 35-58	S-Ac: 1.8 R-Ac: 6.6
Основна изоформа на цитохромите участваща в метаболизма	CYP2C9	CYP2C9
Плазмен клирънс (L/h)	S-War: 0.1-1.0 R-War: 0.07-0.35	S-Ac: 28.5 R-Ac: 1.9

Таблица 6. Физико-химични и фармакокинетични параметри на витамин К-антагонистите *warfarin* и *acenocoumarol*. И двете лекарства имат един хирален център, което определя наличие на два енантиомера, от които S-енантиомера е с около 2 до 5 пъти по-потентен [Ufer M, 2005].

CYP2C9 има множество алелни варианта, като най-честите са CYP2C9*2 и CYP2C9*3. И двата варианта показват намалена активност на ензима и се срещат с висока честота при европейска раса в сравнение с афро-американското и азиатското население [Lee CR et al., 2002]. Лекарства, които претърпяват основно метаболизъм от тази изоформа на цитохромите и притежаващи малка терапевтична ширина, са кумаринови антикоагуланти (*acenocoumarol*, *warfarin*), сулфониурейни препарати (напр. *gliclazide*) и *phenytoin*. Когато пациентът има една от тези две полиморфни форми (CYP2C9*2 или CYP2C9*3), дозите на тези лекарства е необходимо да бъдат редуцирани, тъй като клирънсът на лекарствата е намален и плазмените концентрации ще бъдат завишени. Също така, пациентите с тези полиморфни форми могат да имат неадекватна реакция към лекарствата, когато приемат про-лекарства, които изискват био-активация, медирана от CYP2C9, за да окажат терапевтичен ефект (като *losartan* и *cyclophosphamide*) [Xie HG et al., 2002]. Предимството на *Simcyp* софтуера е, че той има възможност за симулиране на фармакокинетично поведение, отчитайки именно тези фармакогенетични различия в отделните ензимни системи между отделните раси въз основа на натрупаните епидемиологични данни.

CYP2C9 генотип	Здрави доброволци	Европейска раса	Китайци	Японци
*1/*1	0.672	0.672	0.924	0.96
*1/*2	0.186	0.186	0.0024	0
*1/*3	0.111	0.111	0.0712	0.0396
*2/*2	0.011	0.011	0	0
*2/*3	0.017	0.017	0	0
*3/*3	0.003	0.003	0.0024	0.0004

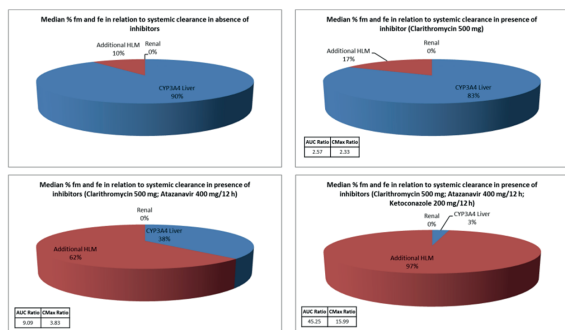
Таблица 7. Фармакогенетични различия в CYP2C9 при различните раси интегрирани в *Simcyp* софтуера.

В таблица 7 са представени данните за фармакогенетичните различия в CYP2C9 налични в *Simcyp* софтуера за отделните популации, а на фигура 5 са проведените симулации.

през последните 14 дни, *AUC* на *atorvastatin* е била приблизително двукратно завишена, а *C_{max}* и *AUC* на *simvastatin* приблизително шест пъти [Hsyu P-H et al., 2001]. В проведените динамични симулации със *Simcyp* софтуера, *AUC* на *simvastatin* беше приблизително шест пъти завишена, като при клиничните изследвания с *nelfinavir*, докато статичните модели показаха повече от 20 пъти завишаване.

Едновременната употреба на макролидни антибиотици (*erythro-* или *clarithromycin*) със статини (*simva-*, *lova-* или *atorvastatin*) води до увеличен риск от хоспитализации вследствие на рабдомиолиза, остра бъбречна недостатъчност или увеличена честота от летален изход [Patel AM et al., 2013]. В клинични изследвания със здрави доброволци, *AUC* на *simvastatin* се покачва приблизително 10 пъти при едновременна употреба с *clarithromycin* [Jacobson TA, 2004]. В проведените виртуални симулации, динамичния модел показва близо три пъти покачване, докато статичния модел показва средно 13 пъти покачване в стойностите на *AUC* на *simvastatin*.

Бяха проведени симулации със *simvastatin* и едновременно приложение на няколко инхибитора на *CYP3A4*. Резултатите са представени на фигура 4.

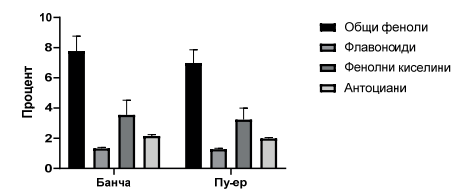


Фигура 4. Симулации на *simvastatin* при едновременен прием на няколко *CYP3A4* инхибитора.

Това което се наблюдава от фигура 4 е, че добавянето на допълнителен инхибитор на *CYP3A4* ензима води до сумиране на активностите на отделните инхибитори по отношение на *CYP3A4*, изразено със стойностите на *C_{max}R* и *AUCR*, и пренасочване на елиминацията на *simvastatin* по алтернативен път (в случая чрез допълнителни чернодробни микросоми).

От групата на кумариновите антикоагуланти, в *Simcyp* софтуера имаше налична информация единствено за *S-warfarin*. В България, основно се използва препаратата *acenocoumarol*. Особенности във фармакокинетиката на двата препарата са показани в таблица 6. Основният път за елиминиране на тези препарати е чрез метаболизъм от *CYP2C9*, като една малка част се елиминират непроменени чрез урината.

Количествено съдържание на полифеноли в изолираните катехинови фракции от листа на Банча и Пу-ер



Фигура 6. Спектрофотометричния анализ на катехиновата фракция изолирана от листа на Банча и Пу-ер.

1.4.6.5. Резултати от спектрофотометричния анализ на катехиновата фракция изолирана от Банча чай

Резултатите от спектрофотометричния анализ на катехиновите фракции изолирани от Банча и Пу-ер чай са представени на фигура 6. Както се вижда от фигурата, двата чая имат приблизително еднакъв количествен състав на биологично активни вещества в изолираните катехинови фракции.

1.4.6.6. Дискусия

Чайовете Пу-ер и Банча набират широка популярност сред хората, консумиращи зелен чай. В изолираните от нас метилксантинови фракции от Пу-ер и Банча, *caffeine* е основният пуринов алкалоид – 84.07% (Пу-ер) и 88.11% (Банча), както се очакваше, с малки разлики в процентното съдържание. Въпреки че на фигура 5 пикът на *caffeine* в Пу-ер е по-висок от този на Банча, това е така, защото е работено с по-големи разреждания. Нашето проучване показва подобни резултати на тези докладвани от *Sanchez JM* (2017), по отношение на съдържанието на *theobromine* и *theophylline*.

Множество проучвания са показали, че потенциалните ползи за здравето на Пу-ер и Банча чайовете се дължат главно на съдържащите се в тях полифенолни съединения [Zhang HM et al., 2012; Horie M et al., 2016]. Като цяло прави впечатление, че двете катехинови фракции от Пу-ер и Банча, независимо от различията в производствения процес, имат незначителни промени в количествения състав на активните съставки. В изолираните катехинови фракции, съдържанието на общи феноли бе 7.78% (Банча) и 6.99% (Пу-ер) (Фигура 6). Другите фенолни съединения – флавоноиди, фенолни киселини и антоциани, също бяха с високо съдържание в изолираните катехинови фракции, което се потвърждава от предходни изследвания на други автори [Cabrera C et al., 2003; Luca VS et al., 2016].

2. Селекция, синтез и анализ на аналози на ендоморфин-2 и RGD

Целта беше да се синтезират, анализират и селектират аналози на ендоморфин-2 и RGD показали обнадеждаващи ефекти в *in vitro* и *in vivo* изследвания, за да може да бъде определен техния потенциал за лекарствени взаимодействия.

2.1. Материали и методи

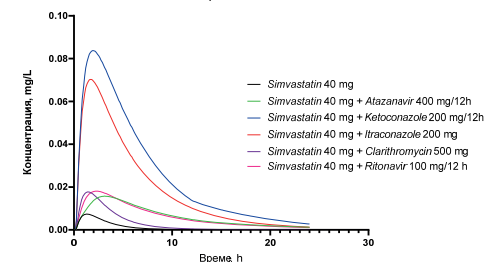
2.1.1. Пептиден синтез и анализ

По-подробен анализ на синтеза и анализа на използваните пептиди може да се получи от дисертационния труд „Дизайн, синтез и фармакологично охарактеризиране на пептидни миметици на Ендоморфин-2, Морфицептин и RGD с аналгетична и противотуморна активност“ за ОНС „Доктор“ на Калоян Георгиев, защитен под ръководството на Доц. Тамара Пайпанова [Георгиев К, 2013]. Тук само ще бъдат споменати основните етапи, без да се влиза в подробности. Пептидите в това изследване са синтезирани чрез ръчни твърдофазни процедури, използвайки техники за Fmoc-защитени аминокиселини на Wang- или MBHA Rink-амидни пептидни смоли съответно. Използва се 20% пиперидин в DMF за премахване на защитата на Fmoc-групи и DIC и HBTU бяха използвани като свързващи агенти. Едновременното отнемане на защитата и разцепването от смолата се осъществява чрез третиране с TFA/TIS/вода (95:2.5:2.5) за 3 h при стайна температура. Суровите пептиди се пречистват чрез препаративна TLC. HPLC анализите бяха извършени върху Agilent Technologies HP 1100 и Dionex, Ultimate® 3000 LC инструменти, използвайки Beckman Ultrasphere® RP C18 (250 × 4.6 mm, 5 µm) колона с подвижна фаза: смес от 0.01 M K₂HPO₄ (pH = 2.5) и ацетонитрил (обемно съотношение = 80:20) за 30 min при скорост на потока 0.5 mL min⁻¹.

2.1.2. Получени аналози на ендоморфин-2

За целите на нашето изследване синтезирахме и използвахме четири аналога на ендоморфин-2, два от които бяха модифицирани на трета позиция - Phe (pF) (1, **Тур-Pro-Phe(pF)-Phe-1,2-етилендиамин**) и конюгирани на четвърта позиция с 1,2-етилендиамин (2, **Тур-Pro-Phe-Phe-1,2-етилендиамин**). Другите две бяха конюгирани на първо място с дезоксихолова киселина и модифицирани на трета позиция - Phe (pF) (3, **дезоксихолиева к-на-Тур-Pro-Phe (pF) -Phe-OH**) и Phe (pCl) (4, **дезоксихолиева к-на-Тур-Pro-Phe (pCl) -Phe-OH**) (Фигура 7). Химичните структури и молекулните маси на новосинтезираните аналози на ендоморфин-2 са представени в приложението.

Симулации на *Simvastatin* самостоятелно и при едновременен прием със силни инхибитори на CYP3A4



Фигура 3. Симулации на *simvastatin* самостоятелно и при едновременен прием със силни инхибитори на CYP3A4 (*clarithromycin*, *ketoconazole*, *itraconazole*, *ritonavir* и *atazanavir*)

	AUCR Механистично-статичен модел (5-95%)	AUCR Механистично-динамичен модел ±SD	C _{max} R Механистично-динамичен модел ±SD
<i>Clarithromycin</i> 500 mg/24 h	13.16 (6.82-27.46)	2.57±0.51	2.33±0.41
<i>Ketoconazole</i> 200 mg/12 h	31.53 (13.64-61.22)	28.42±11.85	14.02±5.90
<i>Ketoconazole</i> 400 mg/24 h	32.81 (14.03-68.96)	34.10± 15.75	15.77±7.08
<i>Itraconazole</i> 200 mg/ 24 h	12.01 (6.52-24.26)	20.63±8.79	11.56±4.47
<i>Atazanavir</i> 400 mg/12 h	31.14 (14.32-65.11)	5.49±3.75	2.28±1.29
<i>Ritonavir</i> 100 mg/ 12 h	20.17 (10.99-39.27)	5.85±3.59	2.67±1.13

Таблица 5. Симулации на едновременна употреба на *simvastatin* с класически инхибитори на CYP3A4.

Съобщени са пет случая на рабдомиолиза при пациенти, приемащи *simvastatin*, която се е развила между 7-ия ден и 4-тата седмица след започване на прием на *ketoconazole* [Itakura H et al., 2003]. Описани са също случаи на рабдомиолиза при пациенти, приемащи *simvastatin* и *itraconazole* [Vlahakos DV et al., 2002]. В двуфазно кръстосано проучване на 10 здрави индивиди, които са получавали *itraconazole* 200 mg дневно или плацебо в продължение на 4 дни, с единична доза от 40 mg *simvastatin* на 4-ия ден, пиковите серумни нива на тоталната *simvastatin* киселина (*simvastatin acid* + *simvastatin lactone*) се увеличават 17 пъти, а AUC се увеличава 19 пъти (p < 0.001) [Neuvonen PJ et al., 1998]. В проведените симулации със *Simcyp*, C_{max} и AUC на *simvastatin* при едновременен прием с *itraconazole* бяха приблизително 12x и 21x повишени respectively.

Протеазните инхибитори, *atazanavir* и *ritonavir*, не са тествани за лекарствени взаимодействия със *simvastatin* в клинични изследвания със здрави доброволци. В повечето клинични изследвания е имало едновременен прием и на други медикаменти или *ritonavir* е използван с друг протеазен инхибитор като бустер, и поради това не може да се заключи каква е причината за взаимодействието [Schmidt GA et al., 2007]. При изследване на 31 здрави доброволци, които са получавали или *atorvastatin* 10 mg дневно, или *simvastatin* 20 mg дневно в продължение на 28 дни, с *nelfinavir* 1250 mg два пъти дневно

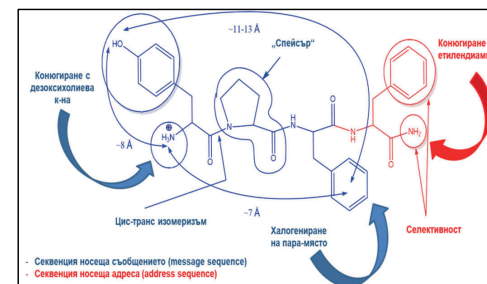
блокери води до повишен риск от брадикардия и сърдечен блок и трябва да се следи внимателно. Механизмът на взаимодействие с повечето бета-блокери е фармакодинамичен характер, но в случая на *carvedilol* се включва и фармакокинетичен компонент. *Carvedilol* е субстрат и инхибитор на *P-gp*. Следователно, той може да повиши плазмените нива и да намали бъбречния клирънс на *digoxin*, като се предполага, че тази реакция е половинно и възрастово зависима [Ratnapalan S et al., 2003; Baris N et al., 2006].

2.5. Симулиране на фармакокинетични лекарствени взаимодействия при лекарствата с малка терапевтична ширина с помощта на SimCYP софтуера

Както може да се види от таблиците 3 и 4, най-честите фармакокинетични механизми отговорни за лекарствените взаимодействия при селектираните лекарства с малка терапевтична ширина включваха – цитохромните изоформи *CYP3A4* и *2C9*, а също така ефлусната помпа – *P-gp*. По-долу с помощта на *Simcyp* софтуера са илюстрирани примери за такива взаимодействия именно с двете цитохромни изоформи отговорни основно за метаболизма на статини и кумаринови антикоагуланти, а също така и с транспортния протеин *P-gp* отговорен за диспозицията на *digoxin* и *dabigatran etexilate*.

Трите статина, които се метаболизират от *CYP3A4*, са *simvastatin*, *lovastatin* и *atorvastatin*. Особеностите при тях са, че *simva-* и *lovastatin* претърпяват интензивен *first-pass* метаболизъм (бионаличност < 5%), докато при *atorvastatin*, той е по-малко изразен (бионаличност ~ 12-14 %) [Schachter M, 2005]. Именно поради това, *simva-* и *lovastatin* са по-уязвими на лекарствени взаимодействия със *CYP3A4* инхибитори.

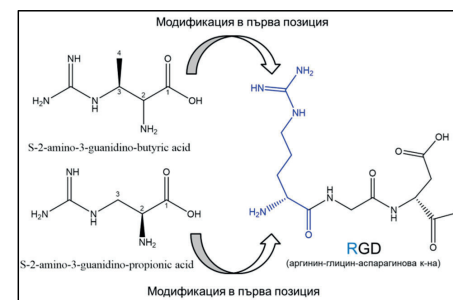
Simcyp софтуера беше предоставен единствено с данни за *simvastatin*, затова и симулациите представени по-долу са именно с него. И трите посочени статини са контраиндицирани (рискова категория X, тежка реакция по *Lexicomp* софтуера) със силни инхибитори на *CYP3A4*, като *clarithromycin*, *ketoconazole*, *itraconazole*, *ritonavir*, *atazanavir* и др., поради риск от мускулна токсичност (вкл. рабдомиолиза). При проведените симулации, основната причина за повишената експозиция на *simvastatin* е за сметка на инхибицията на *first-pass* метаболизма му и повишената бионаличност (напр. $F_g \times F_h$ е приблизително 10x е повишена при симулацията с *ketoconazole*), а не на инхибицията на системния *CL* (~ 2x завишен в същия случай).



Фигура 7. Модификации в химичната структура на ендоморфин-2.

2.1.3. Получени аналози на RGD

Използвахме за нуждите на дисертационния труд два *RGD*-аналога, модифицирани с непротеиногенни аминокиселини – *Agb* (S-2-амино-3-гуанидино-маслена киселина) и *Agp* (S-2-амино-3-гуанидино-пропионова киселина) (2). Двете аминокиселини бяха поставени на мястото на аргинина в първа позиция – *AgbGD* (1) и *AgpGD* (2) (Фигура 8).



Фигура 8. Модификации в структурата на RGD.

2.2. Дискусия

Новосинтезираните от нас ендоморфин-2 аналози, бяха показали в предишни наши изследвания, значителна цитотоксична и антипролиферативна активност срещу туморни клетъчни линии в *in vitro* изследвания [Georgiev K et al., 2014a]. Освен това, те също така проявиха и значителна селективност по отношение на туморните в сравнение с не-туморните клетки. Като производни на ендоморфин-2, тези новосинтезирани аналози, бяха със запазена аналгетична активност, доказана при тествания върху опитни животни [Георгиев К, 2013; Georgiev et al., 2015a]. Именно поради това, беше продължена работата с тези аналози, като този път вниманието беше насочено към фармакокинетичните им особености и по-специално – инхибиране на цитохромни ензими. До този момент не бяха открити литературни данни за подобни ефекти на ендоморфин-1, -2 или техни аналози.

При RGD-аналозите, идеята беше подобна. Беше доказана в *in vitro* и *in vivo* изследвания, противотуморната и аналгетичната активност при аналози на RGD, модифицирани в първа позиция [Георгиев К, 2013; Georgiev et al., 2015b]. Сега целта беше да се оцени техният потенциал за инхибиране на цитохромните ензими и възможността за настъпване на лекарствени взаимодействия при едновременната им употреба с други лекарства. До този момент тези ефекти не са изследвани от други автори.

Глава IV: Проучване на фармакокинетични лекарствени взаимодействия

Основното ниво, където настъпват фармакокинетични лекарствени взаимодействия, е при процеса на биотрансформация (метаболизъм). Поради това с цел проучване на фармакокинетични лекарствени взаимодействия, всички селектираните растителни фракции и олигопептиди от глава III, бяха подложени на *in vitro* скрининг за определяне на възможния потенциал за инхибиране на най-честите изоформи на цитохромите, участващи в метаболизма на лекарствата и които най-често се свързват с предизвикване на лекарствени взаимодействия, а именно CYP3A4 и CYP2C9 [Wienkers LC & Heath TG, 2005]. В дисертационния труд са разгледани единствено тези, които показваха значително повлияване (инхибиране) на ензимите и имаха потенциал да предизвикат възможни лекарствени взаимодействия.

Първоначално, с помощта на базисни прогнозни моделни уравнения беше пресмятан и оценен риска от лекарствени взаимодействия. След това бяха изготвени симулационни фармакокинетични модели, да се определи потенциала за лекарствени взаимодействия чрез използване на динамични модели (ФБФК модели) с класически субстрати на повлияните цитохроми. За изграждането на ФБФК модели бяха използвани две софтуерни симулационни програми – ADMEWORKS DDI® и Symcyp®.

От получените резултатите по различните използвани модели бяха направени заключения за риска от лекарствени взаимодействия на използваните растителни фракции и олигопептиди. Също така, резултатите от двете софтуерни симулационни програми, бяха сравнявани помежду им на база необходими параметри за изграждането на моделите, релевантност и съпоставимост на резултатите.

1. Материали и методи

1.1. Химикали и реактиви

Sulphaphenazole, *ketoconazole*, *dimethylsulfoxide (DMSO)* и *acetone* получени от *Sigma Aldrich (St. Louis, USA)*. Всички използвани реактиви бяха с аналитична степен на чистота.

като по този начин водят до по-големи количества неметаболизирано лекарство, достъпно за абсорбция [Bizjak ED & Mauro VF, 1997]. Научните данни за механизма на взаимодействие между *colchicine* и сърдечни гликозиди са ограничени. Едновременната употреба на *digoxin* и *colchicine* обаче може да повиши плазмените концентрации на двете лекарства. Предполага се, че това е конкурентно инхибиране на Р-гликопротеин (*P-gp*) и промени в разпределението на двете лекарства. Пациентите трябва да бъдат посъветвани да се обърнат към своя лекар, ако имат признаци и симптоми на токсичност на *digoxin* (напр. нередовен пулс, бавно пулс, гадене, анорексия, промени в зрението) или токсичност на *colchicine* (напр. коремна болка, гадене, повръщане, диария, умора, астения, хипорефлексия, парестезия, изтръпване). Има съобщения за някои случаи на мускулна токсичност (например миалгия, рабдомиолиза). Ангиотензин II рецепторният блокер, *telmisartan*, има най-силен ефект в групата на сартани върху *P-gp* и следователно има най-висок риск от взаимодействие с *P-gp* субстрати [Weiss J et al., 2010; Kamiyama E et al., 2010]. В проучването са открити седем пациенти, които са приемали *telmisartan* и *digoxin* едновременно. Препоръките са, да се следи за повишаване на серумните концентрации или токсични ефекти на *digoxin*, когато дозата на *telmisartan* се увеличи, и да се следи за намаляване на неговите серумните концентрации/терапевтичен ефект ако употребата на *telmisartan* бъде преустановена.

Сърдечните гликозиди имат уникален механизъм на действие, който не е доказан при други известни съединения. Той включва инхибиране на натриево-калиевата АТФ-аза (Na/K-ATP) помпа в кардиомиоцитите и едновременно повишаване на парасимпатиковия тон [Ehle M et al., 2011; Ziff OJ & Kotecha D, 2016]. Първо, инхибирането на Na⁺-K⁺-ATP, е свързано с електролитни смущения, които могат да допринесат за ПЛЛВ. Хипокалиемията, хипомагнезията и хиперкалцемиата са свързани с повишена токсичност към сърдечните гликозиди. Всички лекарства, които предизвикват тези електролитни нарушения, ще увеличат риска от лекарствени взаимодействия. Бримковите диуретици намаляват нивата на калий и магнезий и това увеличава риска от сърдечна токсичност (напр. сърдечни аритмии) на сърдечните гликозиди [Raja Rao MP et al., 2013; Wang MT et al., 2010]. Препоръки за едновременна употреба на сърдечен гликозид с бримкови диуретици са внимателно проследяване на нивата на калий и магнезий. Препоръчва се също прилагане на електролитен заместител. Взаимодействията на сърдечни гликозиди с антагонисти на алдостероновите рецептори, калий-съхраняващи диуретици, напр. *spironolacton* са чести при пациенти със сърдечна недостатъчност и е наблюдавано 25% увеличение на плазмените нива на *digoxin* [Waldorff S et al., 1978]. На този етап механизмите на взаимодействие остават неясни, независимо дали става въпрос за фармакокинетичен механизъм или *spironolacton* и/или неговите метаболити компрометират изследванията, използвани за определяне на концентрациите на *digoxin*, и по този начин водят до фалшиво положителни резултати [Dasgupta A & Johnson MJ, 2010; Morris RG et al., 1988]. Вторият механизъм на действие на сърдечните гликозиди включва повишаване на парасимпатиковия тон, забавяне на проводимостта и увеличаване на рефрактерния период на синусовия (SA) и атриовентрикуларния (AV) възел. Взети заедно, те водят до брадикардия. Всички лекарства, споделящи подобни ефекти, ще взаимодействат със сърдечните гликозиди. Комбинацията от *digoxin* или *methylidigoxin* с бета-

След преглед на епикризите на 1956 пациенти, хоспитализирани за двете години 2014/2015 в Кардиологичната клиника в Университетска болница „Св. Марина“, бяха селектирани 92-ма пациента (49-2014; 43-2015), които са били на лечение със сърдечни гликозиди. Работният план е показан на фигура 2.

След селекцията на пациентите приемащи сърдечни гликозиди, бяха оценени техните предписания за ПЛЛВ с *Lexicomp* софтуера. Софтуерът показва само две сериозни лекарствени взаимодействия с *digoxin* в рисковата категория D. Не бяха открити ПЛЛВ, принадлежащи към рисковата категория X. Всички други реакции бяха с умерена тежест и в категория C (226). Някои от тях и възможният им механизъм на взаимодействие са показани в таблица 4.

2.4.1. Дискусия

Фармакокинетичната характеристика на сърдечните гликозиди, което ги прави податливи на лекарствени взаимодействия, е фактът, че те са субстрати на P-гликопротеин (P-gp). Тази ефлуксна помпа е локализирана в ентероцитите, ХЕБ, хепатоцитите и тубуларните клетки и е отговорна за абсорбцията, разпределението и клирънса на лекарствата, включително на сърдечните гликозиди [Tanigawara Y, 2000]. Инхибиторите на P-gp могат да повишат серумната концентрация и риска от неблагоприятни/токсични ефекти на сърдечните гликозиди. В проучването бяха открити две тежки взаимодействия в рисковата категория D, които включваха P-gp и двете бяха с *amiodarone*. Той е мощен инхибитор на P-gp и взаимодействията водят до повишена бионаличност на сърдечните гликозиди [Fenster PE et al., 1985]. Информацията за предписване на двете лекарства предупреждава за възможното лекарствено взаимодействие и препоръките са да се намали дозата на *digoxin* в диапазона от 30% до 50% при едновременна употреба с *amiodarone*. Необходимо е също да се наблюдават тези пациенти за признаци и симптоми на токсичност на *digoxin*.

Функцията на щитовидната жлеза също оказва влияние върху фармакокинетиката и фармакодинамиката на сърдечните гликозиди и трябва да се вземе под внимание състоянието му и неговата промяна с лекарства, действащи на щитовидната жлеза [Bonelli J et al., 1978]. В нашето изследване открихме двама пациенти, получаващи тиреостатици. Взаимодействието е класифицирано в рисковата категория C. Въпреки че данните са стари, препоръките в рецептата на *thiamazole* (*methimazole*) предупреждават, че преминаването от хипертиреоидно към еутиреоидно състояние може да намали клирънса на сърдечните гликозиди и са желателни по-ниски дози. Други открити взаимодействия на сърдечния гликозид на ниво P-gp са тези с макролидни антибиотици, *colchicine* и *telmisartan*. И трите реакции са класифицирани като умерени по степен и в рисковата категория C. Механизмът на взаимодействие на макролидни антибиотици със сърдечни гликозиди е сложен. Те могат да повишат бионаличността и/или да намалят бъбречния клирънс на сърдечните гликозиди чрез инхибиране на P-gp. Този ефект е най-силно изразен при *clarithromycin*, следван от *azithromycin* и *erythromycin* [Hughes J & Crowe A, 2010]. Други предполагаеми механизми включват ликвидиране на чревните бактерии, способни да метаболизират сърдечните гликозиди, като *Eubacterium lentum*,

1.2. Метаболизиращи лекарства ензими

Vivid® CYP450 скринингови китове за CYP2C9 и CYP3A4 са закупени от *Antise®* (България). Всеки кит съдържа P450 реакционен буфер, P450 реагент *BACULOSOMES* (лекарство-метаболизиращи ензими), флуоресцентен субстрат, флуоресцентен стандарт, регенерираща система (333 mM глюкозо-6-фосфат и 30 U/ml глюкозо-6-фосфат дехидрогеназа в 100 mM калиев фосфат, pH 8.0) и NADP⁺ (10 mM NADP⁺ в 100 mM калиев фосфат, pH 8.0).

1.3. Определяне активността на цитохром P450 с комплекти за анализ *Vivid® P450*

Инхибиторните ефекти върху рекомбинантно експресирани човешки P450 ензими бяха определени с помощта на *Vivid® P450* скринингови комплекти – *Vivid® CYP3A4 Green* (*Vivid® DBOMF* субстрат и зелен флуоресцентен стандарт) и *Vivid® CYP2C9 Green* (*Vivid® BOMF* субстрат и зелен флуоресцентен стандарт). Стабилността, устойчивостта, възпроизводимостта и чувствителността на този модел са описани от *Trubetskoy OV* и кол. (2005), *Marks BD* и *Larson B* (2006) и *Cohen LH* и кол. (2003 г.). Анализите бяха проведени чрез използване протокола на производителя (*Invitrogen Corporation, 2005*) [<http://ulab360.com/files/prod/manuals/037/337004.pdf>]. Те бяха извършени в непрозрачни, черни, 96-ямкови плаки (*Costar®, Corning Inc, Corning, NY, USA*) в режим на крайна точка съгласно експерименталните условия, изброени в таблица 1. Всички анализи, освен ако не е посочено друго, са проведени в три екземпляра, а флуоресценцията е измерена на *BioTek Synergy 2®* мултифункционално устройство.

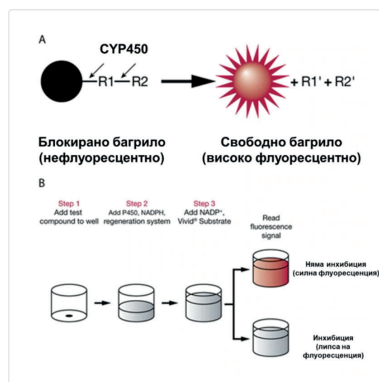
	CYP2C9	CYP3A4
Ензимна концентрация (nM)	10	5
Флуоресцентен субстрат	BOMF	DBOMF
Субстратна концентрация (µM)	2.0	2.0
NADP ⁺ (µM)	10	10
Възбуждение/емисионни дължини на вълната (nm)	485/528	485/528
<small>BOMF = benzylloxy-methyl-fluorescein DBOMF = di(benzylloxymethoxy)fluorescein</small>		

Таблица 1. Концентрация на различните CYPs в инкубата.

1.4. Принцип на използвания *Vivid® CYP450* скрининг тест

Комплектите за скрининг *Vivid® CYP450* са предназначени за оценка на метаболизма и инхибирането на човешки P450 изозими. Комплектите използват *Vivid®* субстрати и CYP450 *BACULOSOMES® Plus Reagents*. Реагентите CYP450 *BACULOSOMES® Plus* са микрозоми, приготвени от клетки на насекоми, експресирани човешки P450 изозим, човешки цитохром P450 редуктаза, а в някои случаи и човешки цитохром b₅. CYP450 *BACULOSOMES® Plus Reagents* предлагат ясно предимство пред човешките чернодробни микрозоми, тъй като се експресира само един ензим CYP450, като по този начин се предотвратява метаболизма от други CYP450. *Vivid®* субстрати са блокирани багрила, които се метаболизират от специфичен ензим CYP450 в продукти, които са силно флуоресцентни във водни разтвори. Фигура 8 схематично изобразява метаболизма на *Vivid®* субстрат във флуоресцентен метаболит. *Vivid®* субстратите имат едно или две потенциални места за метаболизъм

(обозначени със стрелки на фигура 8A) и това окисляване на всяко място освобождава силно флуоресцентния метаболит.



Фигура 8. Vivid® скрининг тест.

A. Субстратът Vivid® флуоресцира, когато се окислява чрез P450 ензимна активност.
B. Протокол от три стъпки се използва за тестване на съединенията за тяхната способност да инхибират P450 активността. Изпитваното съединение се добавя към реакция, съдържаща P450 и субстрата Vivid®, и получената флуоресценция отразява степента на инхибиране на активността на P450.

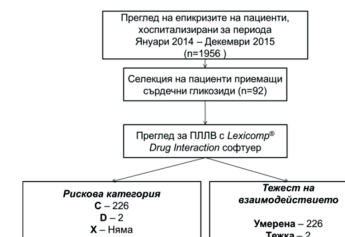
Флуоресцентните метаболити се възбуждат в спектъра на видимата светлина, което свежда до минимум смущения, причинени от фоновата флуоресценция на UV-възбудимите съединения и NADPH. Отличната реакционна кинетика и оптичните свойства на Vivid® субстратите позволяват използването им при концентрации при или под тяхната K_m стойност в реакция с P450 изоензими, при което може да бъдат открити дори слаби инхибитори и позволява работа на стайна температура или при 37°C инкубация. Триетапният скрининг анализ на Vivid® (Фигура 8B) е прост протокол за смесване и замерване (mix-and-read), който не изисква стоп реагент за провеждане на реакцията в кинетичен режим.

1.5. Инхибиторни анализи

1.5.1. Определяне на IC_{50}

Тестваните субстанции – растителни екстракти/фракции и олигопептиди, бяха прилагани в шест концентрации. Всяка ямка съдържаеше 40 µL от растителни екстракти/фракции или съединение (10 µg/mL и 100 µg/mL), разтворител или положителна контрола (10 µM sulphaphenazole за CYP2C9, и 10 µM ketoconazole за CYP3A4), разреден в реакционен буфер, и 50 µL от предварителната смес, съдържаща рекомбинантната CYP изоформа и регенериращата система, разредена в реакционен буфер. Плаките бяха предварително затоплени за 15 минути при 37°C преди предварително отчитане, за да се определи потенциалната фонова флуоресценция на растителни екстракти/фракции и съединения, тъй като някои фитохимикали могат да се държат като флуорогени съединения.

Основният сърдечен гликозид, който се използва днес, е digoxin и неговият прекурсор за по-добра бионаличност – methyl digoxin. И двете лекарства са много добре охарактеризирани фармакологично, включително фармакокинетично и фармакодинамично, и са направени количествени връзки между наблюдаваните ефекти (желани и нежелани) и плазмените концентрации [Iisalo E, 1977; Botelho AFM et al., 2019; Verstuyft C et al., 2003]. Въз основа на тези резултати, сърдечните гликозиди са причислени в групата лекарства с тесен терапевтичен индекс, голям потенциал за сериозни странични ефекти и лекарствени взаимодействия. За да се предотвратят възможните лекарствени взаимодействия, е необходимо да се знае много добре фармакологичните характеристики на сърдечните гликозиди, където са възможните места за взаимодействие, за да се оцени терапевтичния режим и специфичните особености на всеки пациент.



Фигура 2. Работен план

ПЛВ	Тежест/Рисков а категория	Честота	Резултат от взаимодействието	Възможен механизъм на взаимодействието
СГ + Amiodarone	Тежка/D	2 (2.2 %)	↑ серумна концентрация на СГ	Инхибция на Р-гр
СГ + Бета-блоккер	Умерена/C	71 (77 %)	↑ риск от брадикардия	Адитивни ефекти в/у сърдечната честота (ФД)
СГ + I ₁ -агонист (напр. toloxidine)	Умерена/C	4 (4.3 %)	↑ риск от брадикардия	Адитивни ефекти в/у сърдечната честота (ФД)
СГ + Бримков диуретик	Умерена/C	87 (95 %)	↑ нежелани/токсични ефекти на СГ	Индуцирана хипокалиемия от БД, увеличено свързване към Na-K-ATP на СГ
СГ + Spironolactone	Умерена/C	51 (55 %)	↑ серумна концентрация на СГ	Неизвестен
СГ + Telmisartan	Умерена/C	7 (8 %)	↑ серумна концентрация на СГ	Инхибция на Р-гр
СГ + Тереостатици (thiamazole)	Умерена/C	2 (2.2 %)	↑ серумна концентрация на СГ	Неизвестен
СГ + Макролидни антибиотици (напр. azithromycin)	Умерена/C	1 (1 %)	↑ серумна концентрация на СГ	Инхибция на Р-гр
СГ + colchicine	Умерена/C	1 (1 %)	↑ серумна концентрация на colchicine; ↑ риск от рабдомиолиза	Конкуренция за Р-гр?

Таблица 4. Лекарствени взаимодействия, включващи сърдечни гликозиди, резултатите от тях, възможния им механизъм и честота при избраните пациенти със СН. СГ – сърдечни гликозиди; БД – бримков диуретик; ФД – фармакодинамика; Р-гр - Р-гликопротеин

Clopidogrel, перорален инхибитор на тромбоцитния рецептор P_{2Y12} за аденозин 5'-дифосфат (АДФ), често е част от двойната антитромбоцитна терапия (ДАТТ) заедно с *aspirin*. Фармакокинетичната характеристика на *clopidogrel*, която я прави податлива на лекарствени взаимодействия, е биотрансформацията, която претърпява в черния дроб, за да формира активния му метаболит. Образоването на активен метаболит се състои от две стъпки и основният цитохром, който участва, е *CYP2C19* [Kazui M et al., 2010]. Инхибитори на протонната помпа (ИПП), напр. *omeprazole*, *esomeprazole*, *lansoprazole*, *pantoprazole* и *rabeprazole* обикновено се комбинират с ДАТТ за намаляване на честотата на сериозни стомашно-чревни кръвоизливи [Agewall S et al., 2013]. Инхибиторите на протонната помпа могат да инхибират активността на *CYP2C19* и образоването на активния метаболит на *clopidogrel*. Най-високият потенциал за клинично значимо взаимодействие е наблюдаван при *omeprazole* и *esomeprazole*. Той е по-нисък за *lansoprazole* и най-нисък за *pantoprazole* и *rabeprazole* [Norgard NB et al., 2009].

2.3.1. Дискусия

Лекарства с малка терапевтична ширина са лекарства, при които малки разлики в дозата или съответно концентрацията в кръвта могат да доведат до сериозни терапевтични грешки и/или нежелани лекарствени реакции, които са животозастрашаващи или водят до трайна или значителна инвалидност или неработоспособност. Сериозните събития са тези, които са постоянни, необратими, бавно обратими или животозастрашаващи, което вероятно води до хоспитализация, инвалидност или дори смърт. В настоящото изследване, лекарствата с малка терапевтична ширина – статини, антикоагуланти и антитромботични лекарства, обхващаха близо 60 % (46/76 за 2014 г. и 61/102 за 2015 г.) от ПЛЛВ в рисковата категория D и близо 46 % (35/76 за 2014 г.) и 50% (51/102 за 2015 г.) от тежките ПЛЛВ. Тези резултати корелират положително с предишни проучвания в литературата [Sharma S et al., 2014; Mateti U et al., 2011]. Лекарствата с малка терапевтична ширина са уязвими към ПЛЛВ, поради тесния терапевтичен индекс или животозастрашаващите нежелани ефекти, поради което пациентите, лекувани с тях, трябва да бъдат внимателно наблюдавани за признаци на токсичност.

От ПЛЛВ включващи лекарствата с малка терапевтична ширина, повечето са с фармакокинетичен характер – ~ 85 % (за 2014 г.) и ~ 75 % (за 2015 г.), докато фармакодинамични взаимодействия обхващат ~ 15 % (2014 г.) и ~ 25 % (2015 г.). Тези открития от проучването са подобни, като тези проведени от *Vonbach P* и кол. (2007) и *Aparsu R* и кол. (2007), които съобщават за ~ 76% от взаимодействията да са с фармакокинетичен и ~ 22% с фармакодинамичен характер.

2.4. Потенциални лекарство-лекарство взаимодействия със сърдечни гликозиди

Сърдечните гликозиди се получават главно от вълнестия напръстник (*Digitalis lanata*, *Plantaginaceae*). Според последните указания, сърдечните гликозиди са показани при сърдечна недостатъчност с фракция на изтласкване < 35% и предшествващо предсърдно мъждене [Ponikowski P et al., 2016].

След това, реакцията се иницира чрез прибавяне на 10 μ L от подходящия *Vivid*[®] субстрат и $NADP^+$ във всяка ямка и плаката се инкубира в продължение на 30 минути при 37°C. Реакцията се прекратява чрез прибавяне на 10 μ L леденостудена 20% трис (хидроксиметил) аминотетан (*TRIS*) база в *acetonitrile* и ензимната активност се следи чрез измерване на образуването на флуоресцентни метаболити при 485/528 nm дължини на вълната на възбуждане/емисия. Крайната концентрация на органичния разтворител в ямките за анализ не надвишаваше 1%. Количеството на образувания метаболит по отношение на контрола в присъствието и отсъствието на инхибитор се изразява в процент оставаща активност и се изчислява по формулата:

$$\% \text{ инхибция} = 100 - \left(\frac{[\text{Сигнала от ямката (Относителни флуоресцентни единици)} - \text{Бланк}]}{[\text{Сигнал от разтворителя} - \text{Бланк}]} \times 100 \right) \quad \text{Уравнение 28}$$

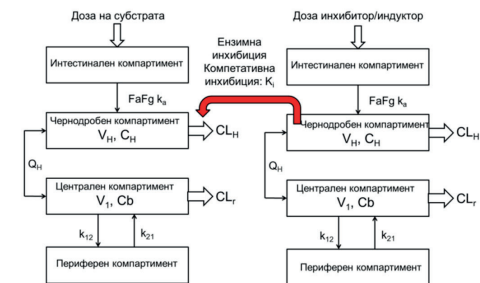
1.5.2. Кинетична време-зависима инхибция

Проведен е кинетичен време-зависим инхибиторен анализ, за да се определи промяната на IC_{50} стойностите във времето. Анализът се провежда, като се използва протокол, адаптиран от *Krippendorff et al.* (2009 г.). Растителните фракции или използваните олигопептиди, положителната контрола и отрицателната контрола бяха предварително затоплени при 37°C с $NADP^+$ и регенерираща система за 15 минути. Реакцията се иницира чрез добавяне на предварително затоплена (37°C) ензимна и субстратна смес. Микроплаката се поставя в четящото устройство за плаки и флуоресценцията се измерва на 5-минутни интервали в продължение на 30 минути.

1.6. Използвани симулаторни системи

1.6.1. ADMEWORKS DDI симулатор

ADMEWORKS DDI[®] симулатор версия 2.4. (*Fudjitsu Kyushu System Limited*) беше използван за оценка на потенциални лекарствени взаимодействия след закупуване на лиценз [24].



Фигура 9. Базичен ФБФК (физиология-базиран фармакокинетичен) механистичен модел.

Платформата предоставя физикохимични и фармакокинетични данни за различни CYP субстрати. Симулациите бяха проведени с помощта на базичен ФБФК механистичен модел фигура 9. Основните физико-химични и фармакокинетични параметри, включени в програмата, необходими за симулирането на лекарствени взаимодействия са предоставени в таблица 2.

Другите необходими параметри за симулацията са данни относно това, дали лекарството се явява субстрат, инхибитор или индуктор на отделните цитохромни ензими. Общо осем изоформи на цитохромни ензими са включени в програмата и те са: CYP1A2, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1 и 3A4. Освен това, има още три празни места, в които може да се нанесат данни за други цитохроми, които не са сред включените.

Обозначение на основните физико-химични и фармакокинетични параметри за провеждане на симулации с ADMEWORKS DDJ® Simulator	Определение
Dosage	Доза/дозов режим
MW	Молекулна маса
LogP	Коефициент на разпределение октанол/вода
F	Бионаличност
FaFg	Фракцията абсорбирана от ГИТ x Интестиналната наличност
Fa	Фракцията абсорбирана от ГИТ
k_a	Абсорбционна скоростна константа
CL_{H, intr} (L/h)	Вътрешен чернодробен клирънс
CL_r (L/h)	Ренален клирънс
Vd (L)	Обем на разпределение
f_{u,p}	Несвързана фракция в плазмата
R_b	Коефициент на разпределение кръв:плазма

Таблица 2. Основните физико-химични и фармакокинетични параметри, включени в програмата, необходими за симулирането на лекарствени взаимодействия.

В графата субстрати (ако лекарството се явява субстрат на дадена изоформа), съответно се отбелязва частта (фракцията) от лекарството, която се подлага на метаболизъм от дадената изоформа – f_m (стойностите са от 0-1). В графата инхибитор (ако лекарството се явява инхибитор на дадена изоформа), в зависимост механизма на инхибицията, се нанасят данни за инхибиторната константа – K_i , при компетативно обратимо действащите лекарства (получени при *in vitro* или *in vivo* изследвания) и съответно данни за инхибиторните константи – k_{inact} (максимална инактивационна скоростна константа) и $K_{i,app}$ (привидна дисоциационна константа между инхибитора и ензима), при необратимо механизъм-базирано действащите лекарства. Данните, които се нанасят са със стойности от 0-1 000 000, а мерната единица е микрограм на литър ($\mu\text{g/L}$). В графата индуктор (ако лекарството се явява индуктор на дадена изоформа), се нанасят данни за EC_{50} (половината от максималния индукционен ефект), E_{max} (максималния индукционен коефициент) и коефициента на Хил (γ) на индуцираната изоформа. Стойностите за EC_{50} са в интервала 0-1 000 000, а мерната единица е микрограм на литър ($\mu\text{g/L}$). Стойностите на E_{max} са от 0-1000, а тези за коефициента на Хил варират от 0 до 5. На фигура 9 са показани отделните графи в платформата на ADMEWORKS.

нуждае от внимателно проследяване на протромбиновото време (PT) [Pond SM et al., 1975]. Предполага се, че взаимодействието на *acenocoumarol* със *sulfamethoxazole/trimetoprim* (SMZ/TMP) е по-сложно. Резултатът отново е повишен риск от кървене, като предложените механизми включват изместване от мястото на свързване с плазмените протеини, инхибиране на метаболизма (чрез инхибиране на CYP2C9), но също така засягащи чревната флора, отговорна за синтеза на витамин К. Препоръки за използване на тази комбинация са както намаляване на дозата на кумариновия антикоагулант, така и обучение на пациента за внимателно проследяване на стойностите на INR (международно нормализирано съотношение) [Hale SF & Lesar TS, 2014]. Другите засечени взаимодействия са с препарат от фибратната група – *fenofibrate* и антиаритмичното лекарство – *amiodarone*. Предполагаме механизми на тези взаимодействия включват инхибиране на CYP2C9, основно отговорен за превръщането на (S)-*warfarin* в основния му метаболит, (S)-7-*hydroxywarfarin*. Едновременната употреба на *acenocoumarol* с *fenofibrate* или *amiodarone* може да доведе до двукратно увеличение на стойностите на INR; поради това препоръките са емпирично намаляване с 20% от дозата на кумариновия антикоагулант и внимателното проследяване на INR, за да се проследи дали е необходимо по-голямо намаляване на дозата [Kim KY & Mancano MA, 2003]. Кумариновите антикоагуланти показват увеличен ефект при хипертироидни пациенти в сравнение с хипотиреоидните. Причината за това е по-изразен метаболизъм на витамин К-зависимите фактори на кръвосъсирването при пациенти с повишена функция на щитовидната жлеза. Следователно, при пациенти, получаващи тиреостатици, като *methimazole* и *propylthiouracil*, ефектите на антагонистите на витамин К могат да бъдат компрометирани [Howard-Thompson A et al., 2014]. Съществува необходимост от проследяване на промените в функцията на щитовидната жлеза и необходимостта от адаптиране на дозата на кумариновите антикоагуланти.

Сред новите орални антикоагуланти (НОАК), *dabigatran* беше най-често предписван на селектираните пациенти. *Dabigatran etexilate* е директен тромбин инхибитор и е показан за лечение на предсърдно мъждене, дълбока венозна тромбоза (ДВТ) и/или белодробна емболия (БЕ). Фармакокинетичната характеристика на *dabigatran* е, че той е субстрат на Р-глюкопротеин/ABCB1 и може да влезе във взаимодействия с инхибитори на тази помпа, като напр. *amiodarone*, *verapamil* и *carvedilol*. Лечението на фона на тези ПЛЛВ зависи от предписаната индикация и състоянието на бъбречната функция на пациента. Препоръки са за лечение или профилактика на венозен тромбоемболизъм и креатининов клирънс (КК) < 50 mL/min или при лечение на предсърдно мъждене с КК < 30 mL/min, да се избегва едновременното приложение на *dabigatran etexilate* с *amiodarone*, *verapamil* и *carvedilol* поради риск от кървене [Chang SH et al., 2017]. Други агенти в НОАК групата са директни инхибитори на фактор Ха, като *rivaroxaban* и *apixaban*. Подобно на *dabigatran*, тези препарати са субстрати на P-gp и в допълнение и на CYP3A4. Беше открито едно ПЛЛВ (в категория D), комбинация от *rivaroxaban* с *verapamil* – умерен инхибитор на CYP3A4 и P-gp. Въпреки че в голямо ретроспективно проучване едновременната употреба на *rivaroxaban* с умерени инхибитори на CYP3A4 и P-gp не е повишила значително риска от големи кръвоизливи [Chang SH et al., 2017], препоръките са за предпазливо използване на тези лекарства, особено при пациенти с креатининов клирънс < 80 mL/min.

С не-дихидропиридиновата група от калциеви антагонисти, бяха регистрирани трима пациента приемащи съответно *simvastatin*, *lovastatin* и *atorvastatin* едновременно с *verapamil*. В клинични изследвания проведени със здрави доброволци, средните стойности на покачване на C_{max} и AUC на *simvastatin* при едновременна употреба с *verapamil* са съответно 3x и 2.8x [Chiffolleau A et al., 2003; Jacobson TA, 2004]. Препоръката в листовката на *simvastatin* е, дозата му да не надвишава 10 mg/дневно при едновременна употреба с *verapamil*, поради завишен риск от миопатии.

Друго голямо по тежест взаимодействие и принадлежащо към рисковата категория D, включващо статини, е едновременната употреба с антиподагрозното средство – *colchicine*. Беше засечено само едно такова взаимодействие през 2014 г. Повишен риск от миелотоксични ефекти – миопатия и различна степен на рабдомиолиза се наблюдават при пациенти, приемащи статини с *colchicine* [Tufan A et al., 2006]. Възможните механизми, участващи в това взаимодействие, са комплексни и най-вероятно са както на фармакокинетични, така и на фармакодинамични нива. Фармакокинетичните процеси, при които може да се осъществи това взаимодействие, са цитохромни ензими. *Colchicine* основно инхибира активността на CYP3A4, но също така и на други цитохроми, както и органичния анионен транспортер [Dvorak Z et al., 2003] и по този начин влияе на плазмените нива на статини. Фармакодинамичните механизми показват, че и двете групи лекарства са изложени на висок риск от развитие на миопатии [Valiyil R & Christopher-Stine L, 2010]. Въпреки тези възможни ФК и ФД взаимодействия, едновременното приложение на статини и ниска доза *colchicine* се препоръчва в днешно време при пациенти с коронарна болест за стабилизиране на атеросклеротичната плака, поради инхибиране на неутрофилната функция от *colchicine* [Verma S et al., 2015]. Друга група, в която комбинацията от статини увеличава риска от скелетно-мускулна токсичност, е групата фибрати. Тежестта на реакцията е класифицирана като тежка, докато по отношение на риска тя е в категория С – наблюдение на симптомите на мускулно увреждане и когато се подозира или диагностицира, е необходимо незабавно прекъсване на приема на двете лекарства. Сред фибратите, *fenofibrate* е показал най-малък риск от миопатия и потенциал за взаимодействие с инхибитори на HMG-CoA-редуктазата [Neuvonen PJ et al., 2006] и той е единственият регистриран и използван фибрат в България. Точният механизъм не е напълно известен, но се приема, че участват предимно фармакодинамични компоненти.

Антикоагулантите, и особено групата на антагонистите на витамин К, представляват лекарства с висок риск от лекарствени взаимодействия и изискват повишено внимание. Лекарствените взаимодействия от тази група включват ФК и ФД механизми, като изместване от свързването с плазмени протеини, индукция или инхибиране на цитохром P450 изоензими, промени в статуса на витамин К или принос към увеличаване хеморагичен или тромботичен риск. Шестдесет и шест за 2014 г. и шестдесет и двама пациенти за 2015 г. са лекувани с *асеносоутарол* в проучването. Десет от тях (2014 г.) и петнадесет (2015 г.) показаха ПЛЛВ спадащи в категория D (с голяма и умерена тежест) и бяха избрани за обсъждане. Първият случай е взаимодействие с *allopurinol*, инхибитор на ксантин оксидаза, който се използва при лечението на подагра. При това взаимодействие, *allopurinol* инхибира метаболизма на кумариновите антикоагуланти, и вероятно по този начин увеличава риска от кървене и се



Фигура 10. Основни данни за лекарствата по отношение на това дали са субстрати, инхибитори или индуктори на цитохромните изоензими в софтуера на ADMEWORKS DDI.

1.6.2. SimCYP® симулатор

През 2000 г. Университетът в Шефилд (<http://www.shef.ac.uk>) и няколко фармацевтични компании създават глобален консорциум (<http://www.simcyp.com>) със специфичната цел да създадат автоматизирани платформи за *in vitro-in vivo* екстраполации (*in vitro-in vivo extrapolations; IVIVE*) на виртуални популации. Програмата (*SimCYP®*) включва обширни данни за демография, болестни състояния, анатомични, физиологични, генетични и биохимични променливи, както и въвеждане на информация за *in vitro* метаболизма и транспорта.

Параметър	Мерни единици	In vitro тестова система
Молекулно тегло	g/mol	Физикохимично измерване; рядко се предпочита <i>in silico</i> предсказване
logP		Разпределение октанол/вода
pKa		Физикохимично измерване; рядко се предпочита <i>in silico</i> предсказване
Тип на съединението	База, киселина, неутрауно	Въз основа на химическата структура или pH-зависим тест за разтворимост
pH-зависима разтворимост	µg/ml	Измерва се в буфер с различно pH
Свързване с плазмени протеини	f _u	In vitro в човешка плазма (трябва да се обърне внимание дали съединението се свързва с алфа-кисел глюкопротеин)
Кръв-плазма разпределение	B:P	In vitro в човешка кръв
Привиден пермеабилитет	10 ⁶ cm/s	MDCK, Caco-2
Вътрешен клирънс при микросоми, или S9, или хепатоцити, или rhCYPs	µL/min/mg за микросоми и S9, µL/min/милион клетки за хепатоцити, µL/min/pmol за rhCYP	In vitro анализ, или използване <i>in vivo</i> клирънс, ако е наличен
V _{max} и K _m (ако се изследва за наситена ФК; изследване за метаболитно-медирано лекарствено взаимодействие като жертва)	pmol/min/mg, µmol/L	Същата <i>in vitro</i> система, при която се определя клирънсът
Процентът от ензима (например CYP) отговорен за метаболитно-медирано лекарствено взаимодействие като жертва; проучване на метаболитно-медирано лекарствено взаимодействие като извършител	f _m	In vitro реакционно фенотипизиране
Обратима инхибиция, IC ₅₀	µmol/L	Човешки чернодробни микросоми или подходящи <i>in vitro</i> система
Механизъм-базирана CYP инхибиция, k _{inact} /K _i	h ⁻¹ , µmol/L	Човешки чернодробни микросоми или подходящи <i>in vitro</i> система
CYP индукция, J _{max} , EC ₅₀	µmol/L	Човешки хепатоцити с положителни контроли в 3 донора

Таблица 3. Необходими данни за изграждане на ФБФК модел чрез използване на софтуера Simcyp®

Simcyp[®] симулатор версия 18.1 (*Certara UK Limited*) беше използван за оценка на потенциални лекарствени взаимодействия след получаване на академичен лиценз за ползване на симулатора. Необходимите параметри за изграждане на ФБФК модел на отделните лекарства са представени в таблица 3, както и *in vitro* тестовете необходими за тяхното извличане. Програмата също така разполага с възможност за предсказване на *in vivo* стойности при човек при голяма част от тези параметри (*Prediction toolbox*), които са извлечени от *in vitro* постановките или предсказани на база физико-химичните свойства на съединението.

1.7. Методи, използвани за прогнозиране на фармакокинетичните параметри с използване на ФБФК модели налични в *Simcyp* симулатора.

Simcyp[®] симулаторът може да изгради ФК параметри на съединението чрез използване на прост, минимален ФБФК модел, където всички тъкани освен черния дроб и червата са събрани като едно отделение или по-сложен ФБФК на цялото тяло модел, където са представени всички основни тъканни отделения в тялото (двата модела са представени в приложението, Фигура 3). Допълнителната способност за включване на множество инхибитори или лекарствени метаболити, които също притежават инхибиторни свойства, в динамичния модел позволява по-всеобхватно и механистично прогнозиране на лекарствените взаимодействия. Движението на лекарството между различните тъкани/органи се симулира с помощта на диференциални уравнения. Всяко отделение за органи може да бъде просто статично отделение с пасивна пропускливост или по-механично, където се отчитат променливи като транспортери, метаболизиращи ензими и диференциална пропускливост на лекарството. Индивидуалният клирънс и метаболитните резултати се прогнозира от ФБФК модел, чрез използване на Монте Карло подход за генериране на виртуални образувания с произволно зададени характеристики.

1.7.1. Проучвана популация

Симулаторът разполага с възможност за избор на тестваната популация – общо 19 такива. За симулациите описани в дисертацията беше предпочетено тестване върху виртуална популация от здрави доброволци. Демографските, физиологичните и анатомичните стойности на параметрите са получени от обширни проучвания в литературата и се използват за генериране на всяка изследвана популация с променливост между субектите в популацията. Резултатите бяха оценени по отношение на основните фармакокинетични параметри – C_{max} , t_{max} и AUC .

1.7.2. Предсказване на фармакокинетиката

1.7.2.1. Абсорбция

Доставянето на лекарства от различни начини на приложение и различни дозови форми може да се симулира от *Simcyp* и съответно да се използва за прогнозиране на абсорбцията и разпределението на лекарствата.

amlodipine. Препоръките в лекарствената информация за двете лекарства са, че дозата на *simvastatin*, използвана в комбинация с *amlodipine*, не трябва да надвишава 20 mg. Възможният механизъм на това взаимодействие не е напълно известен, но се приема, че става въпрос за конкуренция за ензима CYP3A4, тъй като и двата препарата са субстрати на този ензим. Друг често предписван статин, също субстрат на CYP3A4, *atorvastatin*, не показва риск от взаимодействие с *amlodipine*. В допълнение, двете лекарства са включени в комбинирана дозова форма за по-добро придържане и спазване на терапевтичния план от пациента (*Caduet*[®] *amlodipine/atorvastatin*).

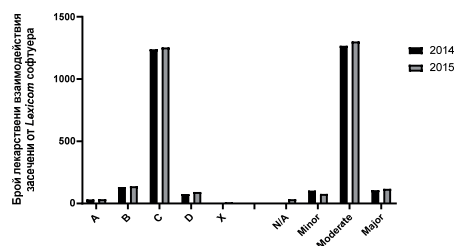
Потенциални лекарство-лекарство взаимодействия	Тежест/Рискова категория	Честота за 2014 г.	Честота за 2015 г.	Възможен механизъм на взаимодействието
НМГ-СоАредуктазни инхибитори (статици)				
<i>Simvastatin</i> + 1,4-DHP-CCB	Major/D	14 (5.9%)	6 (2.4%)	CYP3A4
Статин + <i>Colchicin</i>	Major/D	1 (0.4%)	-	CYP3A4/OAT/PD
Статин + <i>Fenofibrate</i>	Major/C	12 (5%)	9 (3.6%)	PD
<i>Rosuvastatin</i> + <i>Amiodarone</i>	Major/B	-	3 (1.2%)	CYP2C9
Статин + <i>Verapamil</i>	Major/D	-	3 (1.2%)	CYP3A4
Антикоагуланти (кумарини)				
<i>Acenocoumarol</i> + <i>Allopurinol</i>	Moderate/D	4 (1.7%)	2 (0.8%)	CYP2C9
<i>Acenocoumarol</i> + <i>SMZ/TMP</i>	Major/D	1 (0.4%)	-	CYP2C9, PPB/PD
<i>Acenocoumarol</i> + <i>Fenofibrate</i>	Major/D	1 (0.4%)	4 (1.6%)	CYP2C9
<i>Acenocoumarol</i> + <i>Amiodarone</i>	Major/D	2 (0.8%)	4 (1.6%)	CYP2C9
<i>Acenocoumarol</i> + <i>Тиреоостатик</i>	Moderate/D	2 (0.8%)	2 (0.8%)	PD
<i>Acenocoumarol</i> + НСПВЛ	Moderate/D	-	3 (1.2%)	N/A
Нови не-витамин К орални антикоагуланти (НОАС)				
<i>Apixaban</i> + <i>Aspirin</i>	Major/D	-	2 (0.8%)	PD
<i>Apixaban</i> + <i>Clopidogrel</i>	Major/D	-	2 (0.8%)	PD?
<i>Dabigatran</i> + <i>Amiodarone</i>	Major/D	1 (0.4%)	2 (0.8%)	P-gp
<i>Dabigatran</i> + <i>Verapamil</i>	Major/D	1 (0.4%)	-	P-gp
<i>Dabigatran</i> + <i>Carvedilol</i>	Major/D	1 (0.4%)	4 (1.6%)	P-gp
<i>Dabigatran</i> + <i>Aspirin</i>	Major/D	-	2 (0.8%)	PD
<i>Dabigatran</i> + <i>Fluconazole</i>	Major/C	-	1 (0.4%)	CYP3A4?, P-gp?
<i>Rivaroxaban</i> + <i>Verapamil</i>	Major/D	1 (0.4%)	-	CYP3A4, P-gp
Антитромботични лекарства				
<i>Clopidogrel</i> + <i>PPI</i>	Moderate/D	17 (7.1%)	24 (9.7%)	CYP2C19
<i>Clopidogrel</i> + <i>Aspirin</i>	Moderate/C	12 (5%)	10 (4%)	PD?
<i>Ticagrelor</i> + <i>Aspirin</i>	Major/D	-	1 (0.4%)	PD?

Таблица 3. Потенциални лекарство-лекарство взаимодействия при пациенти със СН (засечени от *Lexicomp*), свързани с едновременно предписани лекарства с малка терапевтична ширина. Калкулираните проценти са на база селектираните пациенти в изследването.

OAT – органичен анионен транспортер; PD – фармакодинамика; PPB – свързване с плазмените протеини; P-gp – P-гликопротеин; PPI – инхибитори на протонната помпа; 1,4-DHP-CCB – 1,4-дихидропиридинови калциев антагонист; SMZ/TMP – сулфаметоксазол/триметоприм; НСПВЛ – нестероидно противовъзпалително лекарство.

Едно възможно обяснение за различния риск за двата субстрата на CYP3A4 от групата на статините е, че *simvastatin* претърпява значителен *first-pass* метаболизъм в ентероцитите на стомашно-чревния тракт, докато *atorvastatin* претърпява по-слабо изразен такъв. Взаимодействията на *simvastatin* с модулатори на CYP3A4 са по-изразени в сравнение с тези на *atorvastatin* и затова *atorvastatin* изглежда по-безопасен за едновременна употреба с 1,4-дихидропиридинови калциеви антагонисти [Zhou YT et al., 2014].

Класифициране на потенциалните лекарство-лекарство взаимодействия спрямо степента на риск (вляво) и тежестта на реакцията (вдясно)



Фигура 1. Засечени потенциални лекарство-лекарство взаимодействия при селектираните пациенти със СН от 2014 г и 2015 г.

По отношение на броя засечени потенциални лекарство-лекарство взаимодействия, през двете години (2014, 2015) те показват незначителни разлики, като средния брой на потенциални лекарство-лекарство взаимодействия на един пациент е сравнително постоянен и е > 6 (6.2 ± 3.89 за 2014 и 6.28 ± 4.72 за 2015). Още един рисков фактор показващ необходимост от повишена бдителност при тези пациенти. Получените резултати показаха два пъти повече потенциални лекарство-лекарство взаимодействия от изследвания на други колеги [Straubhaar B et al., 2006], и са подобни на тези, докладвани от Roblek и кол. [Roblek T et al., 2014].

По отношение на рисковата категория, най-много взаимодействия бяха категоризирани в рисковата категория С, а по отношение на тежестта на взаимодействието – умерена тежест на взаимодействие. Тези резултати се припокриваха с други докладвани до този момент.

2.3. Анализ и оценка на взаимодействията на лекарствата с малка терапевтична ширина при пациенти със СН.

В Таблица 3 са представени най-често срещаните потенциални лекарство-лекарство взаимодействия при пациентите от 2014 г. и 2015 г. със СН, асоциирани с едновременно приложение на лекарства с малка терапевтична ширина. По-долу са описани някои от тях с предполагаемите механизми на взаимодействие и препоръчителните указания за действие.

Инхибиторите на 3-хидрокси-3-метилглутарил-коензим А (HMG-CoA) редуктазата, групата на статините, показват много сложни ADME свойства, които включват участие на транспортери на поглъщане (напр. OATP1B1), биотрансформация чрез цитохромни ензими (напр. CYP3A4 и др.) и ефлуksни помпи (напр. MDR1). Всички тези процеси са уязвими и предразполагат към лекарствени взаимодействия. Засечени са 14 (2014 г.) и 6 (2015 г.) взаимодействия на статин в комбинация с антагонисти на калциевия канал от 1,4-дихидропиридиновата група. Предписаният статин в комбинацията е simvastatin, а от 1,4-дихидропиридините, антагонисти на калциевите канали –

Прогнозирането на пероралното въвеждане може да бъде направено, като се използва модел на абсорбция от първи ред, модел на компартиментен абсорбиционен транзит (CAT) или модел на напреднал дисолюшън, абсорбция и метаболитизъм (ADAM).

Бионаличността (F) на перорално приложени твърди лекарствени форми включва освобождаване на лекарството от лекарствената форма, разтваряне в биологичните течности, преминаване през чревната стена и преминаване през черния дроб, преди да достигне системната циркулация. Следователно трябва да се вземат предвид следните три параметъра: частта от дозата, която влиза в стената на червата (f_a), фракцията, която избягва метаболизма в стената на червата и навлиза в порталната вена (F_G), и фракцията, която навлиза в черния дроб и избягва метаболизма (F_H). Общата бионаличност е продукт на тези три компонента (т.е. $F = f_a \times F_G \times F_H$).

Когато се използва модел на абсорбция от първи ред, могат да се използват клинично наблюдавани сойности за скоростната константа на абсорбция от първи ред (k_a) и абсорбирана фракция (f_a). Алтернативно, тези параметри могат да бъдат предвидени от оценка за *in vivo* пропускливост, P_{eff} , и радиуса на тънките черва (R) [Yu LX & Amidon GL, 1998], чрез използване на следните уравнения:

$$k_a = \frac{2 \times P_{eff,man}}{R} \quad \text{Уравнение 29}$$

$$f_a = 1 - (1 + 0.54P_{eff,man})^{-7} \quad \text{Уравнение 30}$$

Фракцията от лекарството, която избягва първо преминава метаболизма и навлиза в порталната вена (F_G), се влияе от наличието на ензими и транспортери в червата [Pang KS, 2003]. F_G може да се оцени с помощта на следното уравнение:

$$F_G = \frac{Q_{gut}}{Q_{gut} + f_{u,gut} \times CL_{u,g,int}} \quad \text{Уравнение 31}$$

,където Q_{gut} е параметър на кръвния поток, $f_{u,gut}$ е несвързаната фракция на лекарството в червата и $CL_{u,g,int}$ представлява вътрешния клирънс на червата.

Фракцията, избягваща метаболизма на първо преминаване в черния дроб (F_H), може да бъде изчислена с помощта на следното уравнение:

$$F_H = \frac{Q_H}{Q_H + f_{u,B} \times CL_{u,int,H}} \quad \text{Уравнение 32}$$

,където Q_H (чернодробен кръвен поток), $f_{u,B}$ (фракцията на несвързаното с лекарството в кръвта) и $CL_{u,int,H}$ (вътрешен метаболитен клирънс).

1.7.2.2. Разпределение

Разпределението на лекарствата може да бъде описано чрез въвеждането на стационарен обем на разпределение (V_{ss}) стойности или чрез използване на минимален или пълен (14 органа) ФБК модел. Фактори като тъканни обеми и плазма:тъкани коефициенти разпределение на тъканите се

вземат предвид при прогнозиране на обема на разпределение на лекарството. Следното уравнение се използва за прогнозиране на V_{ss} при използване на минималния ФБФК модел:

$$V_{ss} = (\sum V_t \times P_{t:p}) + (V_e \times E:P) + V_p \quad \text{Уравнение 33}$$

, където V е фракционният обем на тялото (L/kg) на тъкан (t), еритроцит (e) или плазма (p), $E:P$ е съотношението между еритроцитите и плазмата и $P_{t:p}$ е коефициентът на разпределение за не-адипозни и адипозни компоненти [Sawada Y et al., 1984].

1.7.2.3. Елиминиране

Метаболитното елиминиране на лекарствата е дефинирано в много ФБФК модели, като се използват входни данни за вътрешния клирънс (CL_{int}). Това се мащабира въз основа на специфичното изобилие от ензими (напр. CYPs), коефициент на мащабиране в зависимост от това коя система се използва (напр. микрозоми (микросомален протеин за грам черен дроб, MPPGL), хепатоцити и т.н.) и размер на органа (обикновено черен дроб, но може да бъде бъбрек), за да се получи вътрешния клирънс за целия орган:

$$CL_{int} = \left[\sum_{j=1}^n (CL_{intj} \times CYP_j \text{ наличие}) \right] \times MPPGL \times \text{тегло на черен дроб}$$

Уравнение 34

След това целият вътрешен клирънс на органа се мащабира с помощта на подходящ модел, обикновено „well stirred“ модел, включващ данни за несвързаната фракция на лекарството в кръвта (f_{uB}), стойностите на вътрешния клирънс на органа (CL_{int}) от всички ензимни пътища и кръвния поток на органа (Q_H).

$$CL_H = \frac{Q_H \times f_{uB} \times CL_{int}}{Q_H + (f_{uB} \times CL_{int})} \quad \text{Уравнение 35}$$

Общият метаболичен клирънс във всеки орган се добавя към бъбречните, жлъчните и всички допълнителни стойности на системния клирънс, за да се получи цялостното елиминиране на лекарството.

1.8. Използвани софтуери за предвиждане на физико-химични и фармакокинетични свойства

Два софтуера бяха използвани за предвиждане на физикохимични и фармакокинетични свойства на новосинтезираните олигопептиди, свободно достъпни в интернет пространството – swissADME (наличен на <http://www.swissadme.ch/>) и pkCSM (<http://structure.bioc.cam.ac.uk/pkcsm>).

Причината за това е напредналата възраст, сложни лекарствени схеми (полифармация) и в допълнение – променената фармакокинетика при тези пациенти поради нарушен чернодробен и бъбречен кръвен поток, което води до промяна в процесите на елиминиране на лекарствата [Faulx MD & Francis GS, 2008].

Сравняване на демографските характеристики от двете години, не показва чувствителни разлики. В проучването, 85% от селектираните пациенти са в напреднала възраст (средна възраст > 70 години). Обхватът на предписаните лекарства е между три и четиринадесет, като 92% от тях са приемали повече от пет лекарства. Средно, един пациент е приемал > 7 лекарства. В допълнение, > 35% от пациентите са имали хронично бъбречно заболяване, а > 10% от пациентите са били с хронична бъбречна недостатъчност, друг допринасящ фактор за повишения риск от потенциални лекарство-лекарство взаимодействия. Описаните от нас демографски особености се препокриваха приблизително с публикувани по-рано данни. *Straubhaar* и кол. съобщават за 79 години средна възраст и средно 8 лекарства на пациент при изписване на пациенти със СН след хоспитализация [Straubhaar B et al., 2006]. Всичко това дава основание тези пациенти да бъдат определени като високорискови по отношение на опасни лекарство-лекарство взаимодействия и необходимост от по-голяма бдителност при тяхното лечение.

2.2. Идентификация на потенциални лекарство-лекарство взаимодействия чрез използване на Lexicomp софтуера

Общият брой на потенциални лекарство-лекарство взаимодействия засечени при пациентите от 2014 г. е **1484**, или приблизително 6.2 (\pm 3.89 SD) потенциални лекарство-лекарство взаимодействия на един човек. Най-често срещаните лекарствени взаимодействия по отношение на оценката на риска са в група C – 1239, което изисква внимателно наблюдение на пациентите. В рисковите категории D и X са засечени съответно 76 (5.12%) и 2 (0.13%) потенциални лекарство-лекарство взаимодействия (Фигура 1). Софтуерът също така класифицира лекарствените взаимодействия въз основа на тежестта на взаимодействието като тежки, умерени, незначителни и не са класифицирани. Основавайки се на тази класификация, основните взаимодействия са в умерена група – 1239, докато тежките потенциални лекарство-лекарство взаимодействия са наблюдавани при 108 пациенти.

Общият брой на потенциални лекарство-лекарство взаимодействия засечени при пациентите от **2015 г** е **1532**, или приблизително 6.28 (\pm 4.72 SD) потенциални лекарство-лекарство взаимодействия на един човек. Най-честите лекарствени взаимодействия по отношение на оценката на риска са в група C – 1254 (81.85%), изискващи внимателно наблюдение на пациентите. В рисковите категории D и X съответно 93 (6.07%) и 9 (0.59%). По отношение на тежестта на реакцията, основните взаимодействия са в умерена група – 1302, докато тежките потенциални лекарство-лекарство взаимодействия са наблюдавани при 118 пациенти.

Средната възраст беше 70.34 (\pm 10.31 SD). Предписаните лекарства на човек варираха между четири и тринадесет, като средната стойност при изписване от болницата беше средно по 7.27 лекарства (\pm 1.84 SD) на пациент. По отношение на стадия на заболяването, по-голямата част от пациентите бяха в трети стадия на сърдечна недостатъчност (според NYHA) – 222 (92.9%). Всички пациенти бяха с хипертония, а другите съпътстващи заболявания включваха предсърдно мъждене (41%), захарен диабет (41%) и анемия (40.6%). Намалена бъбречна функция (eGFR < 60 mL/min/m²) е установена при 87 (36.1%), докато бъбречна недостатъчност (eGFR < 30 mL/min/m²) – при 23 (9.5%) от пациентите.

Характеристика на пациентите	Брой, Честота (%) 2014 г. (n=239)	Брой, Честота (%) 2015 г. (n=248)
Пол		
Мъже	104 (43.5 %)	131 (52.8 %)
Жени	135 (56.5 %)	117 (47.2 %)
Години		
< 40	2 (0.8%)	4 (1.6%)
41-60	38 (15.9 %)	33 (13.3%)
> 60	199 (83.3 %)	211 (85%)
Средна възраст	70.34 (\pm 10.31 SD)	72.35 (\pm 10.16 SD)
Средна възраст мъже	69.58 (\pm 10.66 SD)	71.51 (\pm 10.06 SD)
Средна възраст жени	70.93 (\pm 10.04 SD)	73.29 (\pm 10.24 SD)
Брой изписани лекарства		
< 5	11 (4.6%)	20 (8.06%)
5-7	129 (54%)	127 (51.2%)
> 7	99 (41.4%)	101 (41%)
Диапазон	4-13	3-14
Средно	7.27	7.12 (\pm 2.07 SD)
Стадии на СН (NYHA)		
2	15 (6.28 %)	24 (9.7%)
3	222 (92.9 %)	218 (87.9%)
4	2 (0.8%)	6 (2.4%)
Основни съпътстващи заболявания		
Хипертония	239 (100 %)	247 (99.6%)
Предсърдно мъждене	99 (41 %)	127 (51.2%)
Диабет	98 (41 %)	99 (39.9%)
Анемия	97 (40.6 %)	101 (40.7%)
Бъбречна функция		
eGFR < 60mL/min/m ²	87 (36.1%)	75 (30.2%)
eGFR < 30mL/min/m ²	23 (9.5%)	19 (7.8%)

Таблица 2. Демографска характеристика на селектираните пациенти със СН за 2014 г. и 2015 г.

Демографските характеристики на селектираните пациенти за 2015 г. показват почти идентично разпределение по показателите дискуитрани по-горе за 2014 г. По отношение на пола, мъже vs жени, 1.12:1. Според възрастта по-голямата част от пациентите са в групата на възрастните хора (> 60) – 211 (85%), а броят на тези над 80 години е 59 (23.8%). Средната възраст е 72.35 години (\pm 10.16 SD). По отношение на стадия на заболяването, по-голямата част от пациентите са в трети стадия на СН (NYHA) – 218 (87.9%). Почти всички пациенти са с хипертония, други съпътстващи заболявания включват предсърдно мъждене (51.2%), анемия (40.7%), захарен диабет (39.9%) и ХОББ (10.5%). Намалена бъбречна функция (eGFR < 60 mL/min/m²) е установена при 75 (30.2%), докато бъбречната недостатъчност (eGFR < 30 mL/min/m²) – при 19 (7.8%) от пациентите.

Пациентите със сърдечно-съдови заболявания, особено тези със СН, са по-предразположени към потенциални лекарство-лекарство взаимодействия.

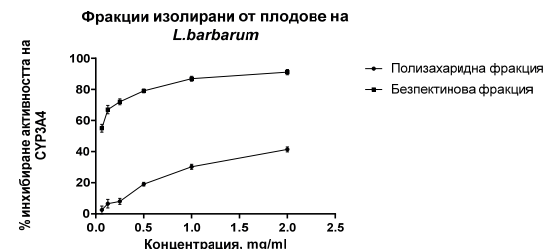
1.9. Статистическа обработка на резултатите

За да се изградят графиките и да се изчисли IC_{50} с 95% доверителен интервал, беше използвана четири-параметрична логистична крива (4PL), генерирана от GraphPad Prism версия 8.0.1 (GraphPad Software, USA). Другите резултати бяха изразени като процент или средни стойности \pm стандартно отклонение (средно \pm SD). Разликите между групите бяха анализирани с помощта на параметричните тестове ANOVA и Student's t-test. За всяка различна концентрация бяха използвани шест повторения и стойност на $p < 0.05$ беше считана за статистически значителна разлика. Програмите използвани за статистическата обработка – Excel 2010 (Microsoft Office, USA) и GraphPad Prism версия 8.0.1 (GraphPad Software, USA).

2. Резултати и дискусия

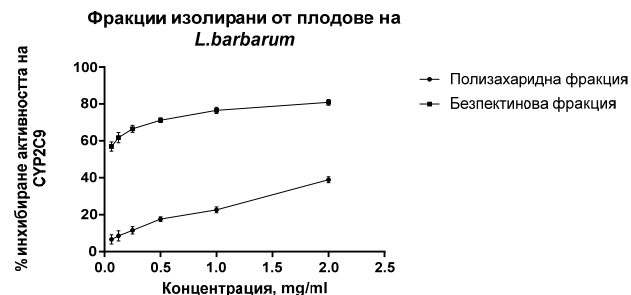
2.1. Определяне на инхибиторния потенциал на фракции изолирани от L.barbarum върху CYP3A4 и CYP2C9

Двете изолирани фракции от L.barbarum – безпектиновата (полифенолна) и полизахаридната фракция, бяха тествани за инхибираща способност върху CYP3A4 и CYP2C9 изоензимите.



Фигура 11. Инхибиране на изоензима CYP3A4 от полизахаридна и безпектинова (полифенолна) фракция, изолирани от плодовете на L.barbarum.

За да се оцени инхибирането на CYP3A4, полизахаридните и полифенолните фракции от L. barbarum бяха приложени в следните концентрации – 2 mg/mL, 1 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,25 mg/mL, 0,125 mg/mL и 0,0625 mg/mL. Резултатите са показани на фигура 11.



Фигура 12. Инхибиране на изоензима CYP2C9 от полизахаридна и безпектинова (полифенолна) фракция, изолирани от плодовете на *L. barbarum*.

Полизахаридната фракция не показва изразен инхибиращ ефект върху изоензима CYP3A4. В най-високата използвана концентрация, 2 mg/mL, 40% от активността на изоензима се инхибира. Безпектиновата фракция показва мощно инхибиране на CYP3A4. Най-високата използвана концентрация, 2 mg/mL, водеше до инхибиране на 90% от активността на изоензима.

Фракциите, изолирани от *L. barbarum*, също бяха тествани за инхибиране на CYP2C9 изоензима, по същия начин и със същите концентрации. Резултатите за CYP2C9 бяха подобни като стойности на тези при CYP3A4 (Фигура 12). Полизахаридната фракция не води до изразено инхибиране на активността на ензима, докато полифенолната фракция значително инхибира ензимната активност.

Изолирани фракции от <i>L. barbarum</i>	IC ₅₀ стойности (95% CI) върху CYP3A4	IC ₅₀ стойности (95% CI) върху CYP2C9
Полизахаридна фракция	2.244 mg/mL (1.593 to 3.161 mg/mL)	4.094 mg/mL (2.723 to 6.158 mg/mL)
Безпектинова (полифенолна) фракция	0.119 mg/mL (0.086 to 0.166 mg/mL)	0.048 mg/ml (0.036 to 0.063 mg/mL)

Таблица 4. IC₅₀ стойности с 95% доверителен интервал на фракциите, изолирани от *L. barbarum* върху активността на изоензимите CYP3A4 и CYP2C9. IC – инхибиторна концентрация; CI – интервал на конфиденциалност

За да се определят приблизително стойностите на IC₅₀, с 95% доверителен интервал (CI) на отделните фракции при инхибицията на изоензимите CYP3A4 и CYP2C9, те бяха екстраполирани с помощта на логаритмичен регресионен анализ. Получените резултати са обобщени в таблица 4. Както се вижда от таблицата, полифенолната фракция е значително по-мощна от полизахаридната по отношение инхибирането на CYP3A4 и CYP2C9 – ~20 пъти и 85 пъти, респективно.

1.2. Анализ на потенциални лекарство-лекарство взаимодействия

За целите на дисертационния труд беше използван следния софтуер за анализ на потенциални лекарство-лекарство взаимодействия – *Lexicomp® Drug Interactions* (Wolters Kluwer, Hudson, OH) [наличен на: <http://www.upToDate.com>], след закупуване на едногодишен лиценз. Софтуерът класифицира лекарствата в следните групи:

- Според степента на риска потенциалните лекарство-лекарство взаимодействия се класифицират в следните категории: категория **A** (липса на известни взаимодействия), **B** (без необходимост от предприемане на някакво действие), **C** (необходимост от мониторинг на терапията), **D** (необходимост от преразглеждане на терапията и по възможност предприемане на модификации в нея) и **X** (избягване на дадената комбинация).
- Според тежестта на взаимодействието, потенциалните лекарство-лекарство взаимодействия се класифицират като: тежки, умерени, незначителни и липса на класифициране в предните групи.

Като референтна база данни беше използвано световнопризнатото издание – *Stockley's Drug Interactions*, 9-то издание (2010 г.). С близо 4 200 монографии, включени в това издание, то представлява доста изчерпателен източник в областта на лекарствените взаимодействия. Почти всички в редакционния екип са фармацевти, което е важно съображение в такъв референтен текст.

За провеждане на фармакокинетичните симулации е използван *Simcyp®* софтуер (Version 19, Release 1). Принципите на работа на софтуера са описани подробно в предните глави. Всички симулации, ако не е упоменато друго, са проведени при виртуална популация от здрави доброволци, на възраст от 20 до 50 години, като 50% са жени. Броят на изследванията са 10 с по 10 субекта или общо 100 проведени изследвания.

1.3. Анализ на данните

Данните са представени като числа (n) и проценти (%), а резултатите като средни стойности ± стандартно отклонение (SD). Беше проведен мултивариантен логистичен регресионен анализ (*odds ratio* – оценка на шансовете), за да се определи връзката между поевата на потенциални лекарствени взаимодействия с увеличаване на възрастта (≤ 60 и > 60) и броя на предписаните лекарства (≤ 7 и > 7). За статистическата обработка на данните бяха използвани два софтуера – *Excel 2016* и *SigmaPlot 11.0*. p<0.05 беше избрано като ниво на статистическа значимост.

2. Резултати и дискусия

2.1. Демографска характеристика на пациентите

Демографските характеристики на селектираните пациенти за 2014 г. показват разпределение по пол, мъже спрямо жени 1:1.3. Според възрастта по-голямата част от пациентите са в групата на възрастните (> 60) – 199 (83.3%).

клетки от рак на гърда, а от друга страна показваха потенциал за намаляване на основните лимитиращи фактори в използването на *doxorubicin*, а именно кардио- и нефротоксичността, в животински модели (*in vivo*) при плъхове.

Глава VI. Проучване и анализ на фармакокинетични и фармакодинамични лекарствени взаимодействия в клиничната практика

Идентификацията, анализа и оценката на лекарствените взаимодействия в клиничната практика е от съществено значение за изхода от лечението, тъй като от една страна може да се стигне до загуба на терапевтичния ефект, а от друга страна до развитие на токсични ефекти, които да намалят къмплайнса и адхеренса към предписаната терапия. За оценка на потенциално опасни лекарствени взаимодействия, приложение намират няколко електронни бази данни.

Целта беше да се селектира популация от пациенти с висок риск от лекарствени взаимодействия – възрастни пациенти, полиморбидни, а така също получаващи високорискови лекарства – лекарства с малка терапевтична ширина, и да се оценят потенциалните лекарствени взаимодействия, които могат да настъпят при тези пациенти с помощта на една от най-често използваната електронна база данни за лекарствени взаимодействия – *Lexicomp® Drug Interactions*.

1. Методи

1.1. Дизайн на изследването

Медицинската документация за двугодишен период (януари 2014 – декември 2015 г.) от Клиниката по кардиология към Университетската болница „Св.Марина“ беше проучена ретроспективно за потенциални лекарство-лекарство взаимодействия. Общо бяха прегледани епикризите на 1956 пациента (985 за 2014 г. и 971 за 2015 г.). Селекцията на пациентите беше въз основа на следните критерии: 1) диагноза СН в 2-4 клас по NYHA; 2) получаване на стандартно лечение (например АСЕ-инхибитори или АТ₁-блокери и/или бета-блокери и/или диуретици и/или алдостеронови антагонисти и/или нитрати и/или *ivabradine*); 3) едновременна употреба на медикаменти с риск от потенциални лекарство-лекарство взаимодействия поради комплексни фармакологични свойства и животозастрашаващи неблагоприятни ефекти като статини, антикоагуланти (*acenocoumarol* или *NOACs*) и антитромботични лекарства (*clopidogrel* или *ticagrelor*).

Въз основа на заложените критерии, за изследването са селектирани общо 487 пациента (239 за 2014 г. и 248 за 2015 г.).

2.1.1. Определяне на потенциала за лекарствени взаимодействия на фракции от *L.barbarum* чрез използване на базисни прогнозни модели

Резултатите от *in vitro* тестовете показаха, че екстрактите от *L.barbarum* имат инхибиторни ефекти върху активността на изследваните цитохромни ензими – *CYP3A4* и *CYP2C9*. Нещо повече, полифенолната фракция има по-изразен ефект от полизахаридната фракция (таблица 4). Тези резултати се потвърждават и от други автори. *Liu R* и кол. (2016) изследват *in vitro* сокове, водни и етанолни екстракти от *L.barbarum* върху основните ензими участващи във фаза I на метаболизма и доказват значително инхибиране. Те също така установяват, че механизмът на инхибиране е по-скоро конкурентен, отколкото необратим (механизъм-базиран). В нашето изследване проведеният кинетичен модел демонстрира изместване на кривите надясно, което предполага изключване на необратимото (механизъм-базирано) инхибиране като евентуален механизъм.

Има също така няколко публикувани проучвания, които доказват значението на възможните взаимодействия на *L.barbarum* в клинични условия [Zhang J et al., 2015; Rivera CA et al., 2012; Leung H et al., 2008]. И трите цитирани проучвания описват взаимодействията между *L.barbarum* и *warfarin*. *Warfarin* е от групата на оралните антикоагуланти, с тесен терапевтичен индекс и неговият по-активен енантиомер, *S-warfarin*, се метаболизира предимно от *CYP2C9* [Yamazaki H & Shimada T, 1997]. И в трите случая пациентите са консумирали напитки, които са на базата на *L.barbarum* – вино, сок или билков чай, и са ги приемали едновременно с *warfarin*. Отчетени са повишени стойности на *INR* (Interantional normalized ratio). Те стигнали до заключението, че взаимодействието е свързано с инхибиране на метаболизма на *warfarin* и препоръчват предпазливост при консумация на напитки, съдържащи *L.barbarum* едновременно с *warfarin*.

Не бяха открити в литературата описани клинични взаимодействия на екстракти от *L.barbarum* с лекарства субстрати на *CYP3A4*. При *L.barbarum* не бяха определени основните компоненти в отделните фракции и на този етап беше немислимо съставянето на симулационни модели за оценка на лекарствени взаимодействия. Именно поради това, бяха използвани базисните прогнозни модели за оценка на риска от взаимодействия (уравнения 13 и 14), преобразувани за перорално приложими лекарства (в случая растителни фракции), за оценка на инхибицията на интестиналните *CYP3A4* и *CYP2C9* изоформи:

$$R_1 = \frac{AUC_i}{AUC_0} = 1 + \frac{[I_g]}{K_i} \quad \text{Уравнение 36}$$

Както бе споменато по-горе, механизмът на инхибицията е конкурентен, обратим, и според кинетичното уравнение на Михаелис-Ментен, K_i би била $IC_{50}/2$, или в нашия случай $K_{i,cyp3a4} = 2.244/2 = 1.122 \text{ mg/mL}$ и $0.119/2 = 0.0595 \text{ mg/mL}$ и $K_{i,cyp2c9} = 4.094/2 = 2.047 \text{ mg/mL}$ и $0.048/2 = 0.024 \text{ mg/mL}$ за полизахаридната и пектин-свободната фракция респективно.

Поради липса на точния химичен състав в двете използвани фракции и също така каква част от тях би се абсорбирала, за да достигне до черния дроб и да взаимодейства със цитохромите, се правят възможно най-лошите

предположения. Максималната концентрация в интестиналният лумен след орална доза ($[I_g]$) се изчислява по следния начин:

$$[I_g] = \frac{\text{Пероралната доза}}{250 \text{ ml}} \quad \text{Уравнение 37}$$

В горната формула се приема, че 250 ml е обемът, в който се разтваря цялата доза и това разтваряне е моментално. Освен това се предполага, че цялата доза става достъпна за чревните ензими. Всичко това осигурява висока стойност на $[I_g]$.

Другите предположения, които бяха направени са, че с една стандартна перорална доза от *L. barbarum* (15 g) биха могли да се екстрахират около 0.75-1.2 g полизахариди (5-8% от сухата маса) [Cheng J et al., 2015] и около 0.005-0.05 g полифеноли [Islam T et al., 2017]. Резултатите са обобщени в таблица 5.

Изолирани фракции от <i>L. barbarum</i>	I_g , mg/mL	K_i , mg/mL		R_i	
		CYP3A4	CYP2C9	CYP3A4	CYP2C9
Полизахаридна фракция 750 mg	3.0	1.1	2.1	3.73	2.43
Полизахаридна фракция 1200 mg	4.8	1.1	2.1	5.36	3.29
Безпектинова (полифенолна) фракция 5 mg	0.02	0.06	0.02	1.34	2.0
Безпектинова (полифенолна) фракция 50 mg	0.2	0.06	0.02	4.33	11

Таблица 5. Предполагаеми концентрации на отделните фракции в ГИТ, изчислените стойности на K_i върху отделните цитохромни изоформи и изчислените R_i стойности на отделните фракции изолирани от *L. barbarum*.

Базисните прогнозни модели приемат, че лекарството „жертва“ напълно се елиминира по засегнатия път. Игнорирането на други пътища на елиминиране, които могат да не бъдат засегнати от лекарството „извършител“, представлява най-лошият сценарий. Въпреки, че се очаква този основен модел да доведе до голям брой фалшиви положителни резултати, неговата простота и консервативен подход го правят ценен при първоначален скрининг за лекарства „извършители“.

Според ръководствата на FDA (алгоритъмът е посочен на фигура 7) и EMA, ако изчислената стойност на R за инхибитор е по-малка от 1.1, може да се заключи, че оценяваното лекарство не е „извършител“ на лекарствени взаимодействия. Съответно, FDA не изискват допълнителни проучвания. По същия начин, ако изчислената стойност на R за индуктор е по-голяма от 0.9, съгласно указанията на FDA, лекарството може да бъде маркирано като неиндуктор въз основа на *in vitro* данните. Ако тези критерии не са изпълнени ($R_{1, \text{обратим инхибитор}}$ и $R_{2, \text{време-зависим инхибитор}} > 1.1$ или $R_{3, \text{индуктор}} < 0.9$), са необходими допълнителни действия, включително изчисляване на съотношението AUC с отчитане на паралелни пътища на елиминиране на „пострадалото“ лекарство. Поради по-високите концентрации на „извършители“ в тънките черва, пределните стойности са различни. Например, когато $[I_g]$ се изчислява с помощта на уравнение 29, граничната стойност за R е 11, вместо 1.1.

Изчислените стойности в ГИТ на R_i в случая с полизахаридната фракция са 3.73 и 2.43 (при доза 750 mg) и 5.36 и 3.29 (при доза 1200 mg), а във втория случай с безпектиновата (полифенолна) фракция в доза 5 mg бяха 1.34 и 2.0 при CYP3A4 и CYP2C9 респективно. Според приетите указания от ръководствата, както бе посочено по-горе, стойности на R_i по-големи от 11 сочат за риск от лекарствени взаимодействия. В случая получените резултати

ще повлияят най-честите нежелани лекарствени реакции от употребата на антрациклини, в частност *doxorubicin*, беше предприето тестване за органна протекция при опитни животни – плъхове. Резултатите показаха, че отделните фракции на *L. barbarum* (Годжи бери) проектират срещу органното увреждане индуцирано от *doxorubicin*, като намаляват биохимичните маркери за органна токсичност, а също така подобряват и хистологичните находки. Отново, най-изразени такива ефекти бяха отчетени при безпектиновата фракция, богата на полифеноли, и комбинацията с полизахариди. Тъй като при безпектиновата фракция, антиоксидантната активност беше най-силно проявена, може да се предположи, че ефекта се дължи именно на нея. Тези теории се подкрепят и от други автори, публикували в тази област [Xin YF et al., 2007; Xin YF et al., 2012]. Комбинацията от двете фракции, съдържаща едновременно полифеноли и полизахариди, показва най-изразена биологична активност в *in vitro* и *in vivo* използваните методики. Теорията тук, която се поддържа се осланя на факта, че полизахаридите подпомагат и допринасят за действието на полифенолните компоненти в екстракта [Wu T et al., 2018; Xu Y et al., 2015].

3. Сравняване на двата метода за оценка на фармакодинамични взаимодействия

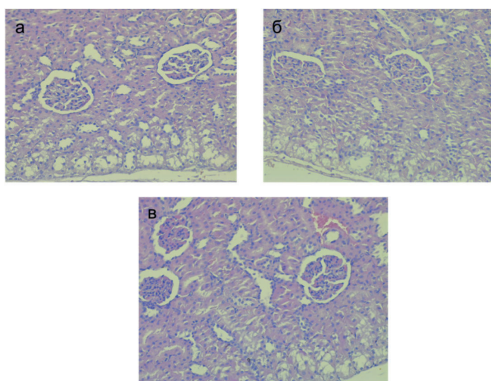
Фармакодинамичните взаимодействия *in vitro* бяха оценявани с помощта на най-често използваните методи – независимостта на Bliss и уравнението на Chou-Talalay. И при двата използвани метода, получените резултати показаха добра корелация ($r = 0.764559$) и нямаше статистическа разлика между тях ($p = 0.637$). Следователно, и двата метода могат да бъдат използвани за първоначална оценка на фармакодинамичните взаимодействия. Някои предимства и недостатъци на двата метода са представени в таблица 16.

Метод за оценка на ФД взаимодействия	Предимства	Недостатъци
Независимост на Bliss	<ul style="list-style-type: none"> Лесно изчисляване на комбинационните ефекти с обикновен калкулатор Не е необходимо изграждане на доза-ефект криви на отделните лекарства 	<ul style="list-style-type: none"> Разглежда ефекти, които не са свързани помежду Необходимост от програма за представяне на резултатите
Метод на Chou-Talalay, базиран на Адитивността на Лоеве и интегриран в CompuSyn софтуера	<ul style="list-style-type: none"> Лесен за работа интерфейс Представяне нагледно на резултатите – графично и таблично 	<ul style="list-style-type: none"> Академичната версия на софтуера е пригодена за по-ниски версии на Windows Необходимост от изграждане на доза-ефект зависимости на двете лекарства в комбинацията

Таблица 16. Сравнителна характеристика на двата използвани метода за оценка на фармакодинамични взаимодействия *in vitro*.

4. Заключение

Фракциите изолирани от *L. barbarum* (Годжи бери) и метилксантиновите фракции изолирани от Пу-ер и Банча показаха обнадеждаващи резултати по отношение на комбинативният им потенциал с конвенционални химиотерапевтични агенти, като *doxorubicin*. От една страна бяха доказани *in vitro* синергични ефекти с *doxorubicin* при едновременното им приложение върху



Фигура 22. Фотомикрографии на бъбречната кора на плъх, претретирани с отделните фракции на *L. barbarum* – безпектинова фракция (а), полизахаридна фракция (б) и комбинация безпектинова/полизахаридна фракция (в); Н&Е × 400.

И тук при бъбречните хистологични разрези се виждат значително по-малко увреждания в сравнение с групите третирани само с *doxorubicin*. Налични са малкостепенни увреждания в кортикалната област, но значително по-слабо изразени в сравнение с модела.

2.4.3. Дискусия

Антрациклиновите антибиотици са сред най-мощните и най-често използваните химиотерапевтични средства. Кардиотоксичността и нефротоксичността обаче са сред основните лимитиращи фактори за широката им употреба [Carvalho C et al., 2009]. Точните механизми, участващи в индуцирана от *doxorubicin* кардио- и нефротоксичност все още не са напълно изяснени. Има две основни теории: 1) образуване на желязо-свързани свободни радикали и формиране на метаболит *doxorubicinol* и 2) предизвикване на митохондриална дисфункция с последвало активиране на апоптозни и некротични процеси [Octavia Y et al., 2012; Zhou S et al., 2001]. Едни от най-силните данни в подкрепа на хипотезата за желязото е, че желязния хелатор, *dexrazoxane*, протектира срещу индуцирана от *doxorubicin* токсичност *in vivo* [Swain SM et al., 1997]. Подробности относно митохондриалната дисфункция и точните механизми свързани с нея, могат да се открият в ревютата на Gorini S и кол. (2018) и Varga ZV и кол. (2015).

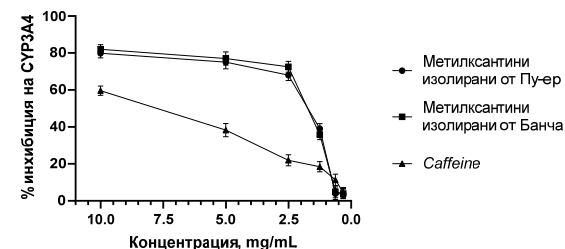
Резултатите от *in vitro* изследванията сочеха за възможно комбиниране на екстракти от *L. barbarum* (Годжи бери) с *doxorubicin* в лечението на рак на гърдата, което би било полезно от терапевтична гледна точка. Много често обаче засилване на терапевтичната активност е съпроводено с увеличена честота на нежелани лекарствени реакции [Awada Z et al., 2019] или обратното, доказването на намаляване на страничните ефекти (в случая – органнотективната активност) корелира с намаляване на терапевтичната активност. С цел да се проследи, дали фракциите на *L. barbarum* (Годжи бери)

показаха, че липсва риск от лекарствени взаимодействия при употреба на отделни фракции на *L. barbarum* със субстрати на *CYP3A4* и *CYP2C9* в ентероцитите при едновременен прием с тях. Бяха изчислени и стойности на R_1 при доза 50 mg на полифенолите, които сочеха че липсва риск със субстрати на *CYP3A4*, но има евентуален риск със субстрати на *CYP2C9* – $R_1 = 11$ (Таблица 5).

Ако подобни концентрации успеят да се постигнат в кръвта и да достигнат до чернодробните ензими, което като цяло е малко вероятно, тогава риска от лекарствени взаимодействия би бил висок.

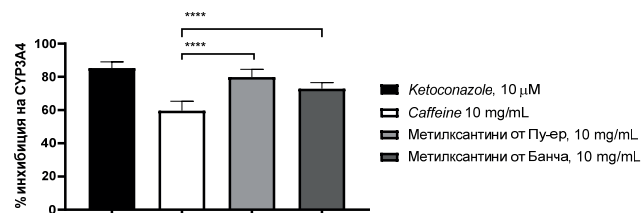
2.2. Определяне на инхибиторния потенциал на метилксантиновите фракции изолирани от Пу-ер и Банча върху активността на *CYP3A4* и *CYP2C9*

Ефектът на метилксантините и *caffeine* върху ензимната активност на рекомбинантните човешки *CYP3A4* и *CYP2C9* изоензими беше анализиран *in vitro* с помощта на *Vivia*[®] китове. Най-високата концентрация на метилксантините, която беше използвана бе 10 mg/ml и чрез двойно разреждане до най-ниската концентрация 0.3125 mg/ml. След получаване на резултатите от *HPLC* анализите, беше изчислено, че най-високата концентрация на *caffeine* във фракциите е 8.4 mg/ml и 8.8 mg/ml съответно в Пу-ер и Банча.



Фигура 13. Концентрация-зависимо инхибиране на *CYP3A4* от метилксантиновите фракции изолирани от Пу-ер и Банча.

За да се оцени ефекта на *caffeine* във фракциите, използвахме чист *caffeine* за сравнение в най-висока концентрация от 10 mg/mL и също чрез двойно разреждане, достигайки до най-ниската концентрация 0.3125 mg/mL. Фракциите метилксантини показаха незначителни инхибиторни ефекти върху *CYP2C9* изоензима (резултатите не са показани), докато върху *CYP3A4* се наблюдаваше концентрация-зависимо инхибиране на активността (фиг. 13).



Фигура 14. Процент на инхибиране на CYP3A4 от веществата и фракциите, използвани при най-високата концентрация на изследването. ANOVA тест беше проведен за определяне на значимите разлики между групите. **** p < 0.0001

За положителна контрола в изследването е използван *ketoconazole* в концентрация 10 µM, за който е известно, че при тази концентрация предизвиква 90% инхибиране на CYP3A4 (фиг. 14).

Метилксантинови фракции и чист кофеин	IC ₅₀ стойности с 95% интервал на конфиденциалност (CI) върху CYP3A4
Метилксантини изолирани от Пу-ер	1,28 mg/mL (CI 0,93 - 1,76 mg/mL)
Метилксантини изолирани от Банча	1,35 mg/mL (CI 1,11-1,63 mg/mL)
Чист Кофеин	3,78 mg/mL (CI 1,59-8,99 mg/mL)

Таблица 6. Изчислени IC₅₀ стойности с 95% интервал на конфиденциалност (CI) на метилксантинови фракции, изолирани от листата *Пу-ер* и *Банча* и чист кофеин.

След анализ на резултатите, бяха изчислени IC₅₀ стойности за всяка фракция с 95% доверителен интервал (CI). Стойностите на IC₅₀ за фракцията, изолирана от Пу-ер, бяха 1.283 mg/mL (CI 0.9336 до 1.762 mg/mL) и за фракцията, изолирана от Банча – 1.351 mg/mL (CI 1.119-1.631 mg/mL) (таблица 6).

Както може да се види от графиките, фракциите на метилксантините в концентрации от 10 mg/ml, изолирани от *Пу-ер* и *Банча* чаени листа инхибират съответно 79% и 72% от активността на CYP3A4. Техният ефект е близък до този на положителната контрола – *ketoconazole*. Статистическото сравнение на техния ефект с този на чистия *caffeine* показва значителни разлики (p < 0.0001) и ни дава основание да заключим, че ефекта не се дължи изцяло на съдържащия се *caffeine*, но и други компоненти във фракциите най-вероятно допринасят за него.

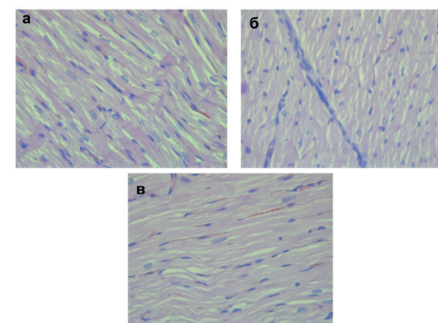
При разглеждането на литературата, публикувана през последните няколко години, често се споменава за инхибиращият ефект на катехините, съдържащи се в зеления чай, върху човешките цитохромни ензими. *Misaka S* и кол. публикуват през 2013 г. изследване, в което проучват активността на екстракта от зелен чай (*GTE*) и епигалокатехин-3 галат (*EGCG*) върху различни цитохромни ензими, включително CYP3A4, използвайки човешки черен дроб и чревни микросоми. Те установяват IC₅₀ стойности на *GTE* за CYP3A (в ентероцитите) – 18.4 µg/ml и за CYP3A (в черния дроб) – 13.8 µg/ml, докато тези на *EGCG* са 31.1 (CYP3A, ентероцити) и 23.3 µM (CYP3A, черен дроб). *Sato H* и кол. (2016) изследват инхибиторния потенциал на осем катехини от зелен чай върху CYP3A4 и други цитохроми в човешки чернодробни микросоми. Най-

Резултатите от таблиците 13 и 14 и Фигурите 23 и 24 показват, че отделните фракции на *L.barbarum* (Годжи бери) успяват да намалят нивата на биохимичните показатели за сърдечно- и бъбречнотъканно увреждане при едновременна употреба с *doxorubicin*. Безпектиновата, богата на полифеноли фракция и комбинацията показва най-изразени ефекти върху тези показатели. Полизахаридната фракция успя частично да намали някои от тях.

Промени в сърдечния маркер тропонин I (*cTnI*) не бяха засечени, нивата му при контролите, третираните групи с отделните фракции на *L.barbarum* и модела не бяха завишени (стойности < 0.20 ng/mL).

2.4.2. Ефекти върху хистопатологичните показатели за кардио- и нефротоксичност

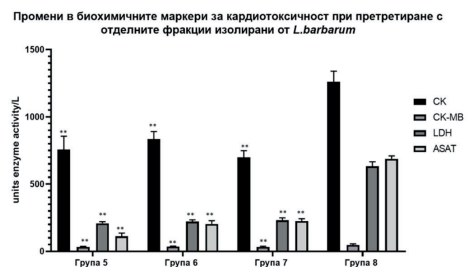
Изследването на оцветени с *H&E* надлъжни срези от контролната група (група 1) и тази, третирана само с *doxorubicin* (група 8) са показани на Фигура 14а и 14б, съответно. На Фигура 25 са показани единствено групите претретирани с отделните фракции на *L.barbarum*.



Фигура 25. Фотомикрографии на мускулни срези на леви камери на плъх, претретирани с отделните фракции на *L.barbarum* – безпектинова фракция (а), полизахаридна фракция (б) и комбинация безпектинова/полизахаридна фракция (в); H&E × 400.

Отделните фракции на *L.barbarum* (Годжи бери) значително намаляват степента на кардиотоксичност, както се вижда от направените хистологичните снимки. При безпектиновата (полифенолна) фракция (Фигура 25а) и комбинацията (безпектинова/полизахаридна фракция) (Фигура 25в) хистологичния анализ показва структура подобна на тази при контролите. При полизахаридната фракция се наблюдаваха фибротични изменения (Фигура 25б), но липсваха миофибриларни разкъсвания.

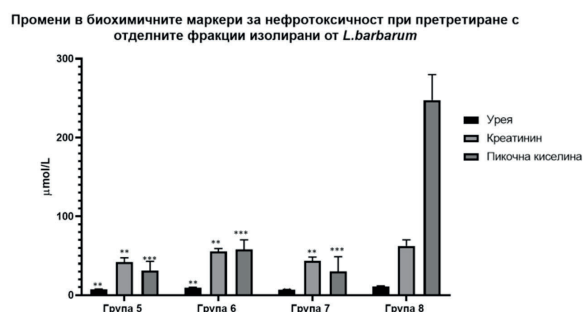
Контролната група и модела на нефротоксичност с *doxorubicin* са показани на Фигура 15а и 15б. На Фигура 26 са показани единствено групите, претретирани с отделните фракции на *L.barbarum*.



Фигура 23. Промени в биохимичните маркери за кардиотоксичност при претретиране с безпектинова (полифенолна) фракция (група 5), полизахаридна фракция (група 6) и комбинация (група 7) сравнени с модела *doxorubicin* (група 8). Стойностите са представени като средна±SD. ANOVA one way test е проведен за сравнение между групите. ** $p < 0.01$ в сравнение с модела.

Групи	Серумни нива на урея (BUN) $\mu\text{mol/L}$	Серумни нива на креатинин $\mu\text{mol/L}$	Серумни нива на пикочна к-на $\mu\text{mol/L}$
Група 1 – контрола	6.3±0.8	37.71±3.6	32.7±2.6
Група 2 – 2 mg/kg (p.o.) безпектинова фракция	6.43±1.1	38.54±6.5	30.56±5.4
Група 3 – 2 mg/kg (p.o.) полизахаридна фракция	6.23±1.3	41.34±4.6	29.9±7.7
Група 4 – 2 mg/kg (p.o.) комбинация	6.21±1.8	44.43±3.6	28.9±5.7
Група 5 – 2 mg/kg (p.o.) безпектинова фракция + Дохо 20 mg/kg (i.p.)	7.25±0.65	41.98±3.6	31.38±2.7
Група 6 – 2 mg/kg (p.o.) полизахаридна фракция + Дохо 15 mg/kg (i.p.)	9.45±0.64	55.44±2.87	57.93±3.3
Група 7 – 2 mg/kg (p.o.) комбинация + Дохо 20 mg/kg (i.p.)	6.78±0.5	43.56±4.87	30.34±2.5
Група 8 – Дохо 20 mg/kg (i.p.)	11.11±0.8	62.45±5.6	247.41±25.4

Таблица 15. Ефекти на отделните фракции на *L. barbarum* (LB) приложени в доза 2 mg/kg върху серумните нива на урея, креатинин и пикочна к-на при *doxorubicin*-индуцирана нефротоксичност (20 mg/kg).



Фигура 24. Промени в биохимичните маркери за нефротоксичност при претретиране с безпектинова (полифенолна) фракция (група 5), полизахаридна фракция (група 6) и комбинация безпектинова/полизахаридна фракция (група 7) сравнени с модела *doxorubicin* (група 8). Стойностите са представени като средна±SD. ANOVA one-way test е проведен за сравнение между групите. ** $p < 0.01$ и *** $p < 0.001$ в сравнение с модела.

мощен инхибиторен ефект се съобщава при епигалокатехин-3-галат (*EGCG*) и галокатехин-3-галат (*GCG*) със стойности на IC_{50} 23,7 и 40,8 μM съответно. В нашето проучване фракциите на метилксантини, изолирани от Пу-ер и Банча, показваха възможна инхибиторна активност върху *CYP3A4* с IC_{50} стойности от 1.28 mg/ml и 1.35 mg/ml. Досега не бяха открити проучвания в литературата, които да докладват за възможно инхибиране на активността на цитохром *CYP3A4* от метилксантинови фракции. В сравнение с катехините и техните IC_{50} стойности, разгледани по-горе, ефектът на метилксантините е значително по-слаб. Като цяло беше прието, че изолираната метилксантинова фракция съдържа и други съставки и наблюдавания инхибиторен ефект върху *CYP3A4* изоензима отчасти се дължи на взаимното потенциране на отделните компоненти. При едно проучване, проведено от *Donovan JL* и кол. (2004), които са използвали безкофеинов екстракт от зелен чай при здрави доброволци, описват липса на инхибиторен ефект върху *CYP3A4* и *CYP2D6* изоензимите.

Поради всички тези въпросителни около участието на метилксантиновите фракции в развитието на лекарствени взаимодействия при употребата на зелен чай, те бяха селектирани за оценка на техния риск от лекарствени взаимодействия чрез прилагане на най-често използваните методи.

2.2.1. Определяне на потенциала за лекарствени взаимодействия на метилксантини изолирани от Пу-ер и Банча чрез използване на базисни прогнозни модели

Беше използван класическия базисен модел за предсказване на лекарствени взаимодействия (Уравнения 13 и 14). Този модел често се предпочита за прогнозиране на лекарствени взаимодействия с растителни продукти [Awortwe C et al., 2014]. Чрез използване на уравнения 28 и 29, изчислените стойности на R_1 по отношение на интестиналните *CYP3A4* изоензими с максималната доза 500 mg от метилксантини не показва риск от взаимодействия – $R_1 = 4.125$ (Таблица 7).

Изолирани метилксантинови фракции	Ig, mg/mL	K_i , mg/mL <i>CYP3A4</i>	$R_{1, \text{гит } CYP3A4}$
МХ Пу-ер			
Доза 100 mg	0.4	0.64	1.625
Доза 250 mg	1		2.562
Доза 500 mg	2		4.125
МХ Банча			
Доза 100 mg	0.4	0.68	1.588
Доза 250 mg	1		2.47
Доза 500 mg	2		3.941

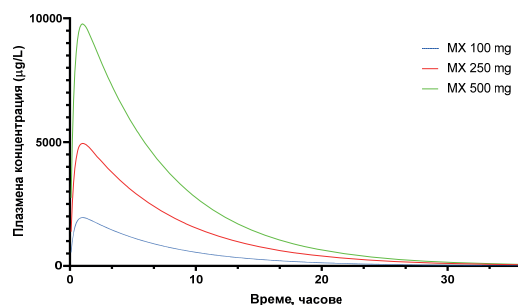
Таблица 7. Изчислени стойности на $R_{1, \text{гит } CYP3A4}$ при употреба на различни дози метилксантини изолирани от Пу-ер и Банча.

Според ръководството на *FDA* (както бе посочено по-горе), ако изчислената стойност на R за инхибитор е по-малка от 1.1 (изчислена по уравнение 13 от дисертацията) и 11 (изчислена по уравнение 28), може да се заключи, че оценяваното лекарство не е „извършител“ на лекарство-лекарство взаимодействия.

И тук, както при фракциите от *L.barbarum*, ако предположим, че изчислените концентрации в ГИТ се постигнат и в кръвта и достигнат до чернодробните ензими, то тогава риска от лекарствени взаимодействия би бил висок. За разлика обаче от фракциите на *L.barbarum*, при метилксантиновите фракции беше определен основния компонент – *caffeine*, на база на който би могло да се симулира фармакокинетично поведение и да се определи чрез динамични модели потенциалния риск от лекарствени взаимодействия.

2.2.2. Изграждане на ФБФК модел на метилксантинови фракции чрез използване на ADMEWORKS DDI софтуер

Предсказването на фармакокинетично поведение на екстракти от природни продукти представлява изключително предизвикателство пред науката, поради богатия състав на биологично активни вещества, съдържащи се обикновено в тях и различаващи се по отношение на физикохимични и фармакологични свойства. Именно поради това, при изготвянето на подобни фармакокинетични модели се правят множество предположения, на база определения количествен състав в изолирания екстракт и в повечето случаи се разиграват няколко сценария, които биха се доближили в най-голяма степен до правдоподобното поведение в биологична среда.



Фигура 15. Фармакокинетични симулации (ФБФК модел) на самостоятелно приложение на метилксантини (базирани на данни за *caffeine*) при различни дозови режими проведени с помощта на ADMEWORKS DDI софтуера.

За изготвяне на фармакокинетичното поведение на изолираните от нас метилксантинови фракции, ние се ръководихме от това, че основния доказан от нас компонент в тях беше *caffeine* – 84.07% и 88.11% в Пу-ер и Банча, респективно (таблица 4, глава III) и беше използвана наличната информация за физикохимичните и фармакокинетичните свойства на *caffeine* в ADMEWORKS DDI софтуера (Приложение, Таблица 1). Беше стимулирано поведение при различни перорални дозови режими – 100, 250 и 500 mg, приети еднократно. Получените данни концентрация-време от симулациите са представени на фигура 15.

Кривите концентрация-време за фармакокинетичното поведение на метилксантини са всъщност криви базирани на данни за *caffeine*. Симулирането с различни дози показва логични пропорционални промени в стойностите на C_{max} и AUC , докато тези на t_{max} са едни същи (таблица 8).

докладвани от множество други автори [Guestini F et al., 2017; Wakharde AA et al., 2018].

2.4. Кардио- и нефропротективни ефекти на фракции изолирани от *L.barbarum* при модели на *doxorubicin*-индуцирана кардио- и нефротоксичност при плъхове

По подобен начин, както описания по-горе експериментален дизайн с метилксантините, беше проведено изследването с отделните фракции на *L.barbarum* – безпектинова фракция, полизахаридна фракция и комбинацията от тях. Дозите, които бяха използвани при трите фракции бяха 2 mg/kg – определена спрямо налични полифеноли, полизахариди и полифеноли/полизахариди (смесени в съотношение 1:1) респективно.

2.4.1. Ефекти върху биохимичните показатели за кардио- и нефротоксичност

Резултатите от измерените биохимични показатели са представени в таблици 14 и 15 и фигури 23 и 24.

Групи	Креатин киназа (CK) U/L	Креатин киназа МБ-фракция (CK-MB) U/L	Лактат дехидрогеназа (LDH) U/L	Аспартат аминотрансфераза (ASAT) U/L
Група 1 – контрола	324±14	22.3±1.6	209.63±19.6	89.87±9.87
Група 2 – 2 mg/kg (p.o.) безпектинова фракция	302.5±103.4	23.32±3.2	199.98±22.6	92.42±22.9
Група 3 – 2 mg/kg (p.o.) полизахаридна фракция	334.75±56.5	22.9±4.8	194.43±17.5	81.65±19.7
Група 4 – 2 mg/kg (p.o.) комбинация	318.85±49.9	21.4±1.3	184.32±11.5	79.65±12.8
Група 5 – 2 mg/kg (p.o.) безпектинова фракция + Дохо 20 mg/kg (i.p.)	457.5±98.4	31.98±5.5	209±11.7	112.5±22.9
Група 6 – 2 mg/kg (p.o.) полизахаридна фракция + Дохо 20 mg/kg (i.p.)	534.75±56.5	35.87±3.8	222±12.3	204±23.8
Група 7 – 2 mg/kg (p.o.) комбинация + Дохо 20 mg/kg (i.p.)	418.85±49.9	33.33±4.9	231±18.6	225±17.5
Група 8 – Дохо 15 mg/kg (i.p.)	1260±80.1	47.8±7.8	633.11±32.4	687.23±22.35

Таблица 14. Ефекти на отделните фракции на *L.barbarum* приложени в доза 2 mg/kg върху активностите на ензимите CK, CK-MB, LDH и ASAT при *doxorubicin*-индуцирана кардиотоксичност (20 mg/kg). Стойностите са представени като средни ± стандартно отклонение (mean±SD).

фракция на плодовете на *Lycium barbarum* показва дозо-зависимо инхибиране на растежа на трите клетъчни линии, по-изразена при туморните – *MCF-7* и *MDA-MB-231*, със селективност съответно 1.79 и 1.35. Полизахаридната фракция не показва активност върху трите използвани клетъчни линии. Единствено върху *MCF-7* клетките беше наблюдавано приблизително 50% инхибиране на пролиферацията при най-високата използвана концентрация – 1000 µg/mL. Беше тествано, дали комбинацията на безпектиновата (полифенолна) и полизахаридната фракция, ще покаже синергични ефекти върху *MCF-7* клетките. Както е показано в резултатите, изчислените стойности на комбинацията значително надвишават тези на тяхното самостоятелно приложение. Резултатите показват липса на класически синергичен ефект, но трябва да се отбележи, че се наблюдава известно усилване на ефекта. Това дава основание да се предположи, че полизахаридната фракция допринася за действието на безпектиновата (полифенолна) фракция, което се демонстрира с намаляване на *IC₅₀* стойността с около 20%.

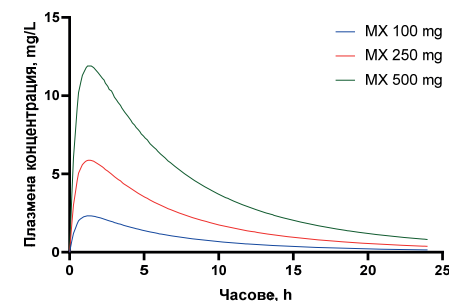
За оценка на комбинационните ефекти с *doxorubicin*, беше селектирана именно комбинацията между безпектиновата и полизахаридната фракция в съотношение 1:1. При използване на комбинацията *doxorubicin* (0.02-0.6 µM) с фиксирани 100 µg/mL полизахариди/полифеноли от *L.barbarum*, се наблюдават синергични ефекти при ниски концентрации (0.02-0.075 µM) и адитивни ефекти с повишаването на концентрациите на *doxorubicin* върху *MCF-7* клетъчната линия. Изчислените комбинационни индекси (*CI*) със софтуера *CalcuSyn*[®] показаха резултати, които се припокриват значително с използвания фракционен анализ. Открива се само една разлика, като най-високата концентрация на *doxorubicin* (0.6 µM) със 100 µg/mL полизахариди/полифеноли от *L.barbarum* се оценява по-скоро като антагонистична, отколкото като адитивна. Освен това следва също да се отбележи, че стойността на *IC₅₀* при еднократна употреба на *doxorubicin* (0,07 µM) и в комбинацията не се променя (0.069 µM). Тройно негативните клетки от рак на гърдата, *MDA-MB-231*, са обект на интензивни изследвания, тъй като този вид рак е един от най-агресивните от всички видове рак на гърдата. За разлика от третирането на *MCF-7* клетките, където използваните концентрации на *doxorubicin* са в *IC₅₀* диапазон, в случая с *MDA-MB-231* клетките те са под него. В тези използвани концентрации, *doxorubicin* (0.02-0.075 µM) и 120 µg/mL полизахариди/полифеноли от *L.barbarum* показват предимно антагонистични ефекти, докато при високи концентрации *doxorubicin* (0.15-0.6 µM) наблюдаваните комбинирани ефекти са силно синергични. Изчисленият комбинационен индекс показва същите резултати – антагонистични при ниски концентрации и синергични ефекти във високи концентрации *doxorubicin*. Беше повишена концентрацията на полизахариди/полифеноли от *L.barbarum* до 140 µg/mL, за да се проследи дали ще има промяна. И двата метода, използвани за оценка на комбинирания ефекти несъмнено показаха синергични ефекти при всички използвани концентрации на *doxorubicin*. Освен това, добавянето на 120 или 140 µg/mL *LBE* води до десетократно намаляване на *IC₅₀* стойностите на *doxorubicin* върху клетъчната линия *MDA-MB-231* – съответно 0,09369 µM и 0,07231 µM. Получените резултати сочат, че дори незначителни промени в използваната концентрация на *LBE* може да доведе до значителни разлики в комбинационния потенциал с *doxorubicin*. Подобни синергични ефекти на конвенционални противотуморни лекарства, като *doxorubicin*, с природни продукти са

Доза	<i>C_{max}</i> (mg/L)	<i>T_{max}</i> (h)	<i>AUC</i> (mg/L.h)
<i>MX 100 mg</i>	1.98	1.09	16.83
<i>MX 250 mg</i>	4.96	1.09	42.09
<i>MX 500 mg</i>	9.92	1.09	84.18

Таблица 8. Стойности на *C_{max}*, *t_{max}* и *AUC* при проведени симулации с *ADMEWORKS DDI* софтуера при различни дози метилксантини (*MX*).

2.2.3. Изграждане на ФБФК модел на метилксантинови фракции чрез използване на *SimCYP* софтуер

На база приетите предположения, че поведението би било подобно на това при *caffeine*, беше симулирано фармакокинетично поведение и чрез *SimCYP*[®] софтуера използвайки наличните в него данни за *caffeine* (Приложение, Таблица 2). Симулациите бяха проведени върху виртуална популация от здрави индивиди, във възрастова граница от 20 до 50 години, като беше заложено половината да бъдат от женски пол. Бяха проведени 10 опита с по десет субекта, или общо 100 анализирани проби. Дозите, използвани в симулациите, отново бяха 100, 250 и 500 mg приети перорално, еднократно. Проследяване на промените в плазмените концентрации беше заложено за интервал от 24 часа. Получените графики и стойности на *C_{max}*, *t_{max}* и *AUC* при различните дозови режими и техните стандартни отклонения (*SD*) са представени на фигура 16 и таблица 9.



Фигура 16. Фармакокинетични симулации (ФБФК модел) на самостоятелно приложение на метилксантини при различни дозови режими с помощта на *SimCYP* симулатора.

Доза	<i>C_{max}</i> (mg/L)±SD	<i>T_{max}</i> (h)±SD	<i>AUC</i> (mg/L.h)±SD
<i>MX 100 mg</i>	2.33±0.67*	1.36±0.38	18.68±10.3*
<i>MX 250 mg</i>	5.88±1.7**	1.36±0.39	47.89±26.5**
<i>MX 500 mg</i>	11.92±3.46***	1.36±0.4	99.7±55.2***

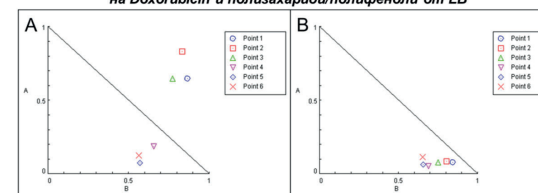
Таблица 9. Стойности на *C_{max}*, *t_{max}* и *AUC* със стандартни отклонения при проведени симулации с *SimCYP* софтуера при различни дози метилксантини (*MX*). Проведен *Student's t-test* за сравняване на стойностите получени с *ADMEWORKS DDI* и тези на *SimCYP* за *C_{max}* и *AUC*. **p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001.

Данните използвани от двата софтуера показваха някои различия във физико-химичните и фармакокинетичните стойности на *caffeine*. Сравняване на стойностите на C_{max} и AUC генерирани от двата софтуера, също показва статистически значими различия (таблица 9).

Прогнозиране на фармакокинетично поведение при растителни екстракти и фракции представлява голямо предизвикателство, поради това, че те съдържат смес от съединения, с различни фармакологични характеристики [Alolga RN et al., 2015; Di L., 2015]. При растителните препарати от изключително значение е определянето на точния състав или основните компоненти, съдържащи се в екстракта или фракцията. Определяне на основните компоненти в растителните продукти и техните фармакокинетични отношения играе централна роля за по-рационалната употреба на такива билкови продукти. Тези данни помагат да се обясни терапевтичната, токсикологичната и клиничната стойност на билковите лекарства [Mehta P et al., 2015]. Много често обаче в тоталните растителни екстракти се съдържат компоненти от различни химични групи, притежаващи различни физико-химични отношения и също така и различна биологична активност. Такъв е и примерът с екстракти добивани от зелен чай (*Camelia sinensis L.*) и различните чайове получавани в зависимост от процеса на преработване на суровината [Zhang L et al., 2019]. Съдържащите се в екстрактите на зелен чай катехини (като (-)-epicatechin (EC), (-)-epicatechin gallate (ECG), EGC, and (-)-epigallocatechin gallate (EGCG)), метилксантини (като *caffeine*, *theophylline*), аминокиселини (като *L-theanine*) и много други определят различни физико-химични и фармакологични свойства. Именно поради това, беше предприето селектиране на отделни фракции, съдържащи вещества с подобни фармакологични характеристики, с цел минимизиране на фоновите ефекти наблюдавани от други вещества налични в тях и правилно интерпретиране на получените резултати. Като основен компонент в отделните метилксантинови фракции беше доказан *caffeine* и въз основа на него изградихме предполагаемото фармакокинетично поведение на фракцията. И двата използвани софтуера разполагаха с данни за физико-химичните свойства и фармакокинетично поведение на *caffeine*, така че ги използвахме като шаблон за метилксантините, като единствено добавихме стойностите на инхибиторната константа, K_i , по отношение на *CYP3A4*, която изчислихме *in vitro*.

И двата използвани софтуера, *ADMEWORKS DDI* и *SimCYP*, успяха да генерират концентрация-време криви чрез използване на ФБФК модел при метилксантини (*caffeine*), имитиращи максимално фармакокинетичното поведение *in vivo* при хора, като подобни резултати са описани и от други автори [Ginsberg G et al., 2004]. Установените статистически разлики между получените стойности на C_{max} и AUC от двата софтуера (таблица 9) могат да бъдат обяснени с различните моделни структури на софтуерите, които ползват и диференциалните уравнения към тях. При изграждане на фармакокинетичния профил на *ADMEWORKS DDI* софтуера се ползва минимален ФБФК модел съставен от 4 компартимент: компартимент на тънките черва, чернодробен компартимент, централен и периферен компартимент. Графичният вид и уравненията към него са представени в приложението (фигура 3). От друга страна *SimCYP* софтуерът има възможност да генерира фармакокинетичен профил чрез използване освен на минимален, но така също и на пълен ФБФК, съставен от 14 органични компартимент. Той се отличава с висока степен на комплицираност, но също така позволява максимално имитиране на фармакокинетичното поведение на лекарството в организма. Също така

Изоболограми генерирани от CalcuSyn® софтуера при комбинирането на Doxorubicin и полизахариди/полифеноли от LB



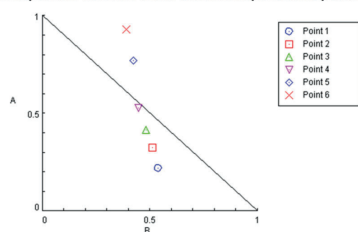
Фигура 22. Изоболограма генерирана от CalcuSyn® софтуера при комбинирането на doxorubicin (0.15-0.6 µM) и полизахариди/полифеноли от *L. barbarum* 120 µg/mL (A) 140 µg/mL (B) върху MDA-MB-231 клетки.

2.3.1. Дискусия

Многобройни експериментални проучвания са доказали широкото фармакологично приложение на плодовете на *L. barbarum* [Jin M et al., 2013]. Повечето от тях са на мнение, че активността се дължи на високото съдържание на полизахариди (*Lycium barbarum*-полизахариди, LBPs, съдържащи се в почти 10% от сухите плодове). Наблюдавани са различни ефекти, свързани с използването на различни фракции на полизахариди, но фокуса е върху съдържанието на галактуроновите съединения, които са от изключително значение за биологичната активност [Cheng J et al., 2014]. При изолираните от нас полизахаридни фракции, съдържанието на обща уронова киселина е почти 35% (Таблица 1, глава III), което показва значително количество от необходимите активни съставки. Другите фракции – безпектиновата и общия воден екстракт, са богати на полифеноли, което допринася за биологичната активност на плодовете на *Lycium barbarum* (Таблица 2, глава III). Изследванията за антиоксидантна активност показва значителна корелация в съдържанието на полифенолите и наблюдавания ефект. Пектин-свободната фракция (богата на полифеноли) показва най-висока антиоксидантна активност, определена чрез два от най-често използваните антиоксидантни методи (Таблица 2, глава III).

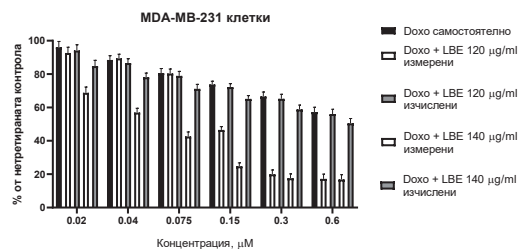
Li G и кол. (2009) докладват, че водните екстракти на *Lycium barbarum* инхибират пролиферацията на MCF-7 клетките чрез модулиране на метаболитните пътища на естрадиола. Те показват повишаване на образуването на антимиотогенен 2-OHE1 (2-хидроксиестрон) и/или ускоряване на превръщането на промитогенния 16α-OHE1 (16α-хидроксиестрон) в неговия инертен проксимален метаболит E3 (естриол). Telang N и кол. (2014) също правят подобни заключения относно ефектите върху клетъчната линия MCF-7. В тяхното проучване, сравняват водните екстракти от кора и плодове на *Lycium barbarum* и доказват по-изразени ефекти на екстракта от кората. И в двете цитирани проучвания се използват общи водни екстракти. С цел да се определи, кои от веществата, съдържащи се в общия екстракт, са отговорни за наблюдаваните ефекти върху туморните клетки, бяха приложени отделните фракции от *L. barbarum*. Бяха използвани три клетъчни линии от гърда – MCF-10A (нетуморогенна епителна клетъчна линия), MCF-7 (клетъчна линия на рак на гърдата, естроген, прогестеронови рецептори +/+ , HER2-) и MDA-MB- 231 (клетъчна линия от рак на гърдата, тройно отрицателна). Безпектиновата

Изоболограма генерирана от CalcuSyn® софтуера при комбинирането на Doxorubicin и полизахариди/полифеноли от LB



Фигура 20. Изоболограма генерирана от CalcuSyn® софтуера при комбинирането на doxorubicin (0.15-0.6 μM) и полизахариди/полифеноли от *L.barbarum* 100 μg/mL върху MCF-7 клетки.

Върху клетъчната линия, MDA-MB-231, бяха отчетени значителни синергични ефекти от комбинацията. Резултатите са представени на фигура 22. Отново с помощта на софтуера CalcuSyn®, беше пресметнат комбинационния индекс и генерирана изоболограма на взаимодействието. Резултатите са представени в таблица 13 и на фигура 21.



Фигура 21. MDA-MB-231 клетки, третираны с doxorubicin самостоятелно (0.02-0.6 μM) и в комбинация с фиксирани концентрации 120 и 140 μg/mL полизахариди и полифеноли (1:1) от *L.barbarum*.

Концентрация на doxorubicin (μM)	LBE концентрация (μg/ml)	CI	LBE концентрация (μg/ml)	CI
0.02	120.0	1.51415	140.0	0.92343
0.04	120.0	1.66865	140.0	0.89044
0.075	120.0	1.42208	140.0	0.82990
0.15	120.0	0.84412	140.0	0.74387
0.3	120.0	0.64732	140.0	0.72160
0.6	120.0	0.69030	140.0	0.76843

Таблица 13. Изчислен комбиниран индекс (CI) след третиране на MDA-MB-231 клетки с комбинация от doxorubicin (0.02-0.6 μM) + фиксирани концентрации полизахариди и полифеноли (1:1) от *L.barbarum* (120 и 140 μg/mL).

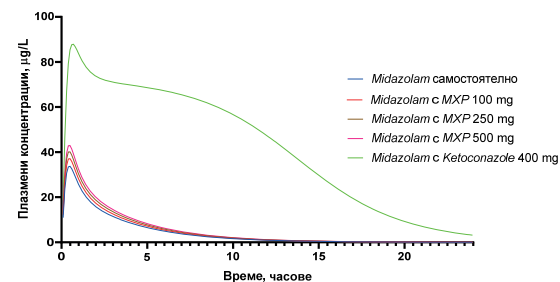
софтуерът позволява отчитане на възрастовите, половите и генетичните особености на дадена популация, като по този начин може да представи с висока точност промените в плазмените концентрации. Верифицирането на модела и постоянното му обновяване с новопостъпилата информация от предклинични и клинични изследвания, определят водещото място на SimCYP симулатора в процесите на откриване и развитие на нови лекарства [Sager JE et al., 2015; Jamei M et al., 2013].

2.2.4. Симулиране на лекарствени взаимодействия на метилксантини изолирани от Пу-ер със субстрати на CYP3A4 чрез използване на ADMEWORKS DDI софтуера

Най-често използваният, високочувствителен субстрат на CYP3A4 за илюстриране на възможни лекарствени взаимодействия, както в *in vitro*, така и в *in vivo* изследвания, е препаратът от групата на бензодиазепините – midazolam [de Wit D et al., 2014]. Именно поради това, той беше предпочетен в проведените симулации. Данните за midazolam налични в ADMEWORKS DDI софтуера са представени в таблица 3 (Приложението). За провеждане на симулациите бяха направени някои предположения. Първо, беше прието, че механизма на инхибиране на CYP3A4 от метилксаниновите фракции е обратим и че като цяло се осъществява по конкурентен механизъм. Във време-зависимия кинетичния анализ, не беше наблюдавано значително намаляване на стойностите на IC_{50} (Фигури 1 и 2 в Приложението). Според кинетичното уравнение на Михаелис-Ментен, K_i (инхибиторната константа) би била $IC_{50}/2$, или в нашия случай $K_i = 1.28/2 = 0.64$ mg/mL. Второ, тъй като caffeine е основният компонент във фракцията, бяха използвани неговите данни за общата информация, необходима за симулацията, и бяха добавени само стойностите на K_i за инхибиране на CYP3A4.

Беше симулирано еднократно перорално приложение на 7.5 mg midazolam при едновременен перорален прием на 100, 250 и 500 mg метилксантини. За положителен контрол беше използван ketoconazole 400 mg, перорално, еднократна доза. Резултатите са показани на фигура 17, а промените в съотношенията на C_{max} и AUC са представяни в таблица 10.

Симулации на Midazolam 7.5 mg еднократна доза самостоятелно и при едновременно приложение с различни дози метилксантини от Пу-ер (MXP) и ketoconazole



Фигура 17. Симулация на midazolam самостоятелно (7.5 mg единична доза) и при едновременен прилагане на единични дози 100, 250 и 500 mg метилксантини, изолирани от Пу-ер (MXP). Използван е ketoconazole 400 mg за положителна контрола.

Различни дози метилксантини изолирани от Пу-ер и ketoconazole	C_{max} съотношение midazolam с инхибитор/midazolam без инхибитор	AUCR midazolam с инхибитор/midazolam без инхибитор
MXP 100 mg	1.103	1.099
MXP 250 mg	1.194	1.187
MXP 500 mg	1.276	1.27
Ketoconazole 400 mg	2.618	11.438

Таблица 10. Промени в съотношенията на C_{max} и AUC, когато midazolam (7,5 mg/единична доза) се използва едновременно с различни дози метилксантини от Пу-ер (100, 250 и 500 mg) и ketoconazole (200 mg) с помощта на ADMEWORKS DDI софтуера.

Симулациите на едновременно приложение на различни дози метилксантини от Пу-ер (MXP) с midazolam води до лека промяна в кривата концентрация-време на последния, докато едновременното приложение с ketoconazole, използван за положителен контрол, причинява значителни промени (Фигура 17).

Според доклада на конференцията на Европейската федерация за фармацевтичните науки (обсъден в началото на главата) и на които се базират изградените гайдлайни на FDA и EMA (фигура 7), стойностите на $AUCR \geq 2$ показват висок риск от взаимодействия между лекарства (drug-drug interactions, DDI), стойностите на $AUCR \leq 1.25$ са свързани с ниски рискове, а стойностите на $AUCR$ между 1.25 и 2 показват умерен риск [Tucker GT et al., 2001]. Следователно, в нашия случай след симулиране на взаимодействие с ADMEWORKS DDI симулатора, рискът от клинично значими взаимодействия между растителни продукти на база метилксантини и лекарства (herb fraction-drug interactions, HfDI) е незначителен при използване на ниски дози метилксантини (100 и 250 mg) и умерен при най-високата симулирана доза (500 mg). За потвърждение на метода е използвана стандартна симулация с клинично потвърдено взаимодействие между midazolam и ketoconazole, което се подкрепя от други публикации [Zhao P et al., 2009; Han B et al., 2013].

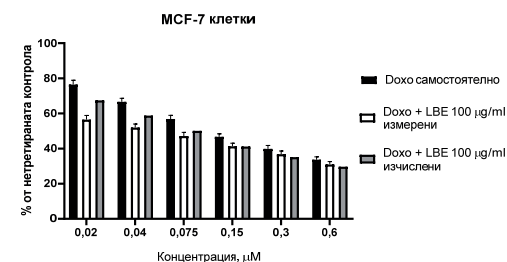
2.2.5. Симулиране на лекарствени взаимодействия на метилксантини изолирани от Пу-ер със субстрати на CYP3A4 чрез използване на SimCYP софтуера

По подобен начин на проведените симулации с ADMEWORKS DDI® софтуера, бяха проведени такива и с SimCYP® софтуера. Същите предположения бяха направени за механизма на метилксантините по отношение инхибицията на CYP3A4 и отново бяха използвани ФК параметри на caffeine, които са интегрирани в програмата. Симулациите отново бяха проведени върху виртуална популация от здрави индивиди, във възрастова граница от 20 до 50 години, като беше заложено половината да бъдат от женски пол. Бяха проведени 10 опита с по десет субекта, или общо 100 анализирани проби.

Освен това, бяха проведени симулации по двата налични модела в софтуера – статичен и динамичен. Резултатите са обобщени в таблица 11, а на фигура 18 са показани промените в съотношенията на AUC (AUCR) при двата използвани метода с най-високата симулирана доза метилксантини – 500 mg.

клетките и стойността на инхибиторната концентрация 50 в комбинацията намалява до $47.02 \mu\text{g/mL} \pm 2.64$ (SD).

За да се определи дали едновременното приложение на безпектинова и полизахаридна фракция от *L. barbarum* (LBE) може да сенсibiliзира MCF-7 и MDA-MB-231 клетъчните линии към действието на конвенционални противотуморни лекарства, бяха определени следните комбинации: Doxorubicin в концентрационен диапазон от 0.02 до 0.6 μM , самостоятелно и в комбинация с фиксирани 100, 120 или 140 $\mu\text{g/mL}$ LBE концентрации, за 72 часа. Към разтвора на полифенолната фракция беше прибавено еквивалентно количество полизахариди, като съотношението в крайния разтвор беше 1:1, полифеноли към полизахариди. Клетъчната пролиферация беше оценявана чрез MTT-тест. Резултатите от третирането на MCF-7 клетките показаха, че клетъчната жизнеспособност е много по-ниска при комбинираното лечение (doxo + LBE), отколкото с doxorubicin самостоятелно. Изчислените и измерени комбинирани ефекти, използвайки метода на Bliss, сочеха за синергични ефекти в ниските концентрации на doxorubicin с LBE и преминаващи в адитивни в по-високите. Резултатите са представени на фигура 19.



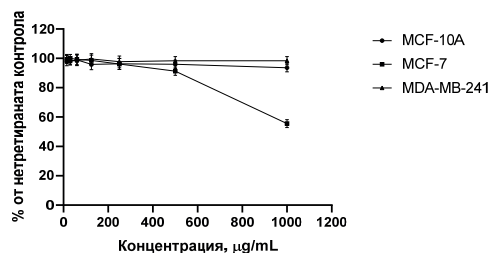
Фигура 19. MCF-7 клетки, третирани с doxorubicin самостоятелно (0.02-0.6 μM) и в комбинация с фиксирана концентрация 100 $\mu\text{g/mL}$ полизахариди и полифеноли (1:1) от *L. barbarum*.

С помощта на софтуера CalcuSyn®, беше пресметнат комбинационния индекс и генерирана изоболограма на взаимодействието. Резултатите са представени в таблица 12 и на фигура 20.

Концентрации на doxorubicin (μM)	LBE концентрации ($\mu\text{g/mL}$)	CI
0.02	100.0	0.75862
0.04	100.0	0.83698
0.075	100.0	0.89938
0.15	100.0	0.97530
0.3	100.0	1.19463
0.6	100.0	1.32293

Таблица 12. Изчислен комбинационен индекс (CI) след третиране на MCF-7 клетки с комбинация doxorubicin (0.02-0.6 μM) + фиксирана концентрация 100 $\mu\text{g/mL}$ полизахариди и полифеноли (1:1) от *L. barbarum*.

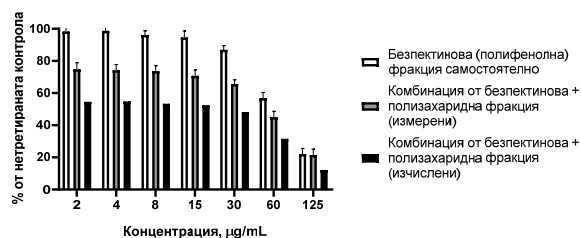
Антипролиферативни ефекти на полизахаридната фракция изолирана от *Lycium barbarum*
MTT-тест след 72 часа



Фигура 17. Антипролиферативни ефекти на полизахаридна фракция, изолирана от плодовете на *Lycium barbarum*, върху нормалните (*MCF-10A*) и туморните (*MCF-7* и *MDA-MB-231*) клетъчни линии. Измерването е извършено чрез MTT-тест след 72 h инкубация.

За да се изследва дали комбинацията от двете фракции (безпектинова и полизахаридна) ще има синергичен ефект върху хормон-позитивната туморна линия от рак на млечната жлеза – *MCF-7*, полизахаридната фракция беше приложена във фиксирана концентрация от 1000 µg/mL, при която беше наблюдавано 50% инхибиране на пролиферацията на *MCF-7* клетките, а безпектиновата фракция в концентрационен диапазон от 2-125 µg/mL.

Антипролиферативни ефекти на безпектинова + полизахаридна фракция изолирани от *Lycium barbarum* върху *MCF-7* клетки
MTT-тест след 72 часа

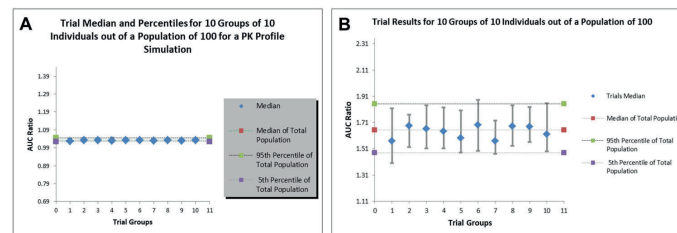


Фигура 18. Инхибиране на растежа на *MCF-7* клетъчна линия при използване на комбинация от безпектинова (полифенолна) фракция с полизахаридна фракция, изолирани от *Lycium barbarum*. Измерването е извършено чрез MTT-тест след 72 часа инкубация.

Комбинацията от полифеноли и полизахариди не доведе до синергичен ефект, както се очакваше, а напротив, наблюдаваните ефекти, пресметнати по метода на независимостта на *Bliss*, са по-скоро антагонистични (Фигура 18). Въпреки това, беше отчетено, че добавянето на полизахариди към безпектиновата фракция повишава активността на последната върху *MCF-7*

Различни дози метилксантини изолирани от Пу-ер и <i>ketoconazole</i>	C_{max} съотношение <i>midazolam</i> с инхибитор/ <i>midazolam</i> без инхибитор Динамичен модел	<i>AUCR midazolam</i> с инхибитор/ <i>midazolam</i> без инхибитор Динамичен модел	<i>AUCR midazolam</i> с инхибитор/ <i>midazolam</i> без инхибитор Статичен модел
<i>MXP</i> 100 mg	1.0	1.0	1.14
<i>MXP</i> 250 mg	1.01	1.01	1.34
<i>MXP</i> 500 mg	1.02±0.01	1.03±0.01	1.65±0.12
<i>Ketoconazole</i> 200 mg	3.36±1.08	9.73±3.80	17.14±6.94

Таблица 11. Промени в съотношенията C_{max} и *AUCR* (*AUC* съотношение), когато *midazolam* (7,5 mg/единична доза) се използва едновременно с различни дози метилксантини (MX 100, 250 и 500 mg) и *ketoconazole* (200 mg/24 h) с помощта на *SimCYP* софтуера.



Фигура 18. Промените в *AUCR* при използване на най-високата доза метилксантини (500 mg) по двата метода заложили в *SimCYP* симулатора - динамичен (A) и статичен (B).

Статичните пресмятания на *AUCR* при симулиране с дози 250 mg и 500 mg загатват за възможни взаимодействия между метилксантини и субстрати на *CYP3A4*. Причините за това са, че при тях се разглеждат най-лошите възможни сценарии при използването на две лекарства – вземат се най-високите концентрации, които се постигат, без да се отчетат динамичните промени в тях [Sangana R et al., 2018; Perdaens N et al., 2010]. Поради това, в много от случаите се стига до надценяване на възможен риск от лекарствени взаимодействия. В този случай, използването на статичния модел показва умерен риск от възможни взаимодействия на метилксантини използвани, в дози 250 и 500 mg едновременно с лекарства субстрати на *CYP3A4*.

От друга страна, проведените динамични симулации при едновременно прилагане на различните дози метилксантини от Пу-ер с *midazolam* не показват промяна в кривата концентрация-време. Също така, изчислените стойности на съотношенията C_{max} и *AUC* (*AUCR*) са без промяна дори при най-високите използвани дози. За верифицирането на този модел, както и на останалите проведени със *SimCYP* софтуера, е избрана симулация с *ketoconazole* 200 mg [Tsunoda et al., 1999] и е използвана същата платформа (*workspace*), налична в софтуера, при провеждане на симулациите.

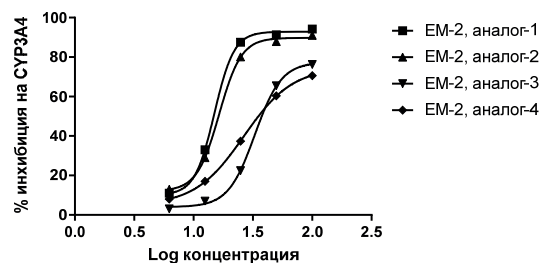
В заключение може да се обобщи, че проучванията *in vitro* загатнаха, че метилксантините в зеления чай, в случая изолирани от Пу-ер и Банча, могат да повлияят активността на човешките *CYP3A4* изоензими. Модулацията на *CYPs* е добре документирана за зеления чай и неговата катехинова фракция (по-подробно е разгледана по-горе). Въпреки това, малко се знае за участието на метилксантини, които може би също са важен фактор и най-вероятно допринасят за биологичната активност на зеления чай. Едновременното приложение на зелен чай, под формата на хранителна добавка или чай, и

лекарства, метаболизиращи се предимно от CYP3A4, трябва да става с повишено внимание и мониториране за евентуален риск от взаимодействия.

С помощта на използваните два симулатора, беше оценен незначителен риск от потенциални взаимодействия на растителен продукт, в случая изолирани метилксантинови фракции, и лекарство. ADMEWORKS DDI софтуера загатна за възможен риск при използване на високи дози метилксантини (500 mg), който беше съответно потвърден с използване на статичния модел и отхвърлен при провеждане на динамичните симулации със SimCYP софтуера. Въпреки това, потенциалът за взаимодействие на метилксантиновите фракции и техният принос към наблюдаваните ефекти при употребата на зелен чай изискват допълнително проучване *in vivo*, което да потвърди или отхвърли тези съмнения.

2.3. Определяне на инхибиторния потенциал на аналози на ендоморфин-2 и RGD върху CYP3A4 и CYP2C9 изоензимите

Четири селектирани аналози на ендоморфин-2 (1. *Tyr-Pro-Phe(pF)-Phe-1,2-ethylenediamine*; 2. *Tyr-Pro-Phe-Phe-1,2-ethylenediamine*; 3. *Deoxycholic-Tyr-Pro-Phe(pF)-Phe-OH*; 4. *Deoxycholic-Tyr-Pro-Phe(pCl)-Phe-OH*) бяха тествани за възможна CYP3A4 и CYP2C9 инхибиция. Те бяха приложени в най-високата концентрация от 100 μM и чрез двойно разреждане до най-ниската концентрация от 6,25 μM . При четирите аналога беше наблюдавана, концентрация-зависима инхибиция в активността на CYP3A4 ензима, докато тази на CYP2C9 не беше засегната. Резултатите са показани на фигура 19.

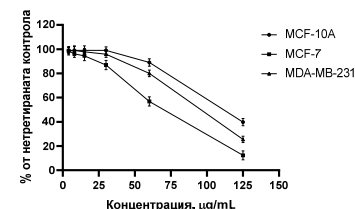


Фигура 19. Ихибиране на CYP3A4 от аналозите на ендоморфин-2.

Аналог-1: *Tyr-Pro-Phe(pF)-Phe-1,2-ethylenediamine*
 Аналог-2: *Tyr-Pro-Phe-Phe-1,2-ethylenediamine*
 Аналог-3: *Deoxycholic-Tyr-Pro-Phe(pF)-Phe-OH*
 Аналог-4: *Deoxycholic-Tyr-Pro-Phe(pCl)-Phe-OH*

Първите два аналога на ендоморфин-2, конюгирани с етилендиаминовите опашки, показаха два пъти по-изразена активност по отношение инхибицията на ензима. Другите два аналога, конюгирани в първа позиция с дезоксихолиева к-на, показаха по-слабо изразена активност. Като стандарт за положителна контрола върху активността на ензима беше

Антипролиферативни ефекти на безпектиновата (полифенолна) фракция изолирана от *Lycium barbarum* MTT-тест след 72 часа



Фигура 16. Инхибиране на растежа при третиране с безпектиновата (полифенолна) фракция от *Lycium barbarum* върху нормални (MCF-10A) и туморни (MCF-7 и MDA-MB-231) клетъчни линии от рак на гърдата. Измерването е извършено чрез MTT-анализ след 72 часа инкубация.

Намаляването на клетъчната жизнеспособност с 50% беше изчислена и обозначена като IC_{50} . Всички стойности на IC_{50} са представени в таблица 11.

Клетъчна линия	IC_{50} стойности ($\mu\text{g/mL}$) \pm стандартно отклонение (SD) MTT-тест след 24 h	IC_{50} стойности ($\mu\text{g/mL}$) \pm стандартно отклонение (SD) MTT-тест след 72 h
MCF-10A	254.3 \pm 38.9	108.3 \pm 2.24
MCF-7	159.9 \pm 33.5	60.51 \pm 2.42
MDA-MB-231	209.88 \pm 44.4	79.93 \pm 4.12

Таблица 11. IC_{50} стойности, получени след 24 h и 72 h експозиция с безпектиновата (полифенолна) фракция от *Lycium barbarum* върху нормални (MCF-10) и туморни (MCF-7 и MDA-MB-231) клетъчни линии от рак на гърдата.

Всичките три типа клетки показаха концентрация- и време-зависимо инхибиране на растежа и сравнителна чувствителност към наличието на полифенолни съединения. По-чувствителни към действието на безпектиновата (полифенолната) фракция се показаха двете туморни клетъчни линии – MCF-7 и MDA-MB-231, с IC_{50} стойности (72 h), по-малки от 100 $\mu\text{g/mL}$ – 60.51 и 79.93 $\mu\text{g/mL}$ съответно. Не-туморната епителна клетъчна линия на гърдата MCF-10A беше по-малко чувствителна, със стойност на IC_{50} (72 час) – 108.3 $\mu\text{g/mL}$.

Самостоятелното приложение на полизахаридната фракция от *Lycium barbarum* показва незначителен ефект върху пролиферацията на клетъчните линии MDA-MB-231 и MCF-10A. Върху клетъчната линия, с положителни хормонални рецептори – MCF-7, само най-високата използвана концентрация от фракцията – 1000 $\mu\text{g/mL}$, показва 50% инхибиране на пролиферацията (Фигура 17).

кардиотоксичност при гризачи. Освен това, дозата използвана в тези изследвания е 15-30 mg/kg и 30 mg/kg, респективно. В нашите изследвания, дозите са значително по-ниски и ако преизчислим съдържанието на кофеин в най-високата доза използвана в изследването, на база HPLC анализ на фракцията, то тогава дозата на *caffeine* би била приблизително 4.4 mg/kg. Също така трябва да се отбележи, че в тази фракция се съдържат и други вещества, които на този етап не са доказани, но се предполага, че също участват в реализацията на биологичната активност. Данни в литературата бяха открити за екстракти от кафе или зелен чай, които оказват кардиопротективна активност, но авторите основно я отдават на съдържащите се в тях катехинови и полифенолни компоненти [Khan G et al., 2014; O'Keefe JH et al., 2018].

Относно нефропротекцията, свързана с употребата на метилксантини, в литературата бяха открити повече данни, които да я подкрепят [Potier M et al., 1997; Benoehr P et al., 2005]. В първия посочен литературен източник, метилксантиновите деривати (*caffeine*, *theophylline*, *pentoxifylline*) показват протективен ефект върху индуцираната от *cyclosporine A* гломерулна контракция в изолирани гломерули и култивирани мезангиални клетки от плъхове. Във втория случай е използван *theophylline* в рандомизирано, единично заслепено, плацебо контролирано проучване при хора за нефропротекция при *cisplatin*-базирана химиотерапия. Авторите заключават, че профилактичното приложение на *theophylline* може да предпази бъбречната функция при *cisplatin*-базирана химиотерапия по отношение на гломеруларната филтрационна скорост (*GRF*). Други клинични проучвания обаче показват, че *theophylline* няма такъв нефропротективен ефект [Mousavi SS et al., 2014]. В нашето изследване, по-ниските приложени дози (1 mg/kg) от метилксантиновата фракция, изолирана от Банча, водеха до понижаване в биохимичните маркери, но без статистически значими разлики в сравнение с контролните групи ($p > 0.05$). За разлика от тях, по-високата използвана доза – 5 mg/kg, статистически значимо ($p < 0.05$) понижаваше споменатите биохимични маркери и беше подкрепена от хистологичните изследвания.

2.3. Оценка на комбинационните ефекти на фракции изолирани от *Lucium barbarum* (годжи бери) с *doxorubicin* върху туморни клетъчни линии от рак на гърда

Първоначално бяха изследвани ефектите на безпектиновата (полифенолна) фракция от плодове на *Lucium barbarum* самостоятелно върху туморните *MDA-MB-231* и *MCF-7* и нетуморните *MCF-10A* клетки на гърдата. Клетките бяха експонирани за 24 и 72 часа със среда, съдържаща екстракти в концентрация от 2 до 125 µg/mL (Фигура 8). За оценка на противотуморните ефекти беше приложен *MTT*-тест, който оценява клетъчната жизнеспособност на базата на превръщането на багрилото от живи клетки, под действие на митохондриални ензими, от жълти във виолетови кристали.

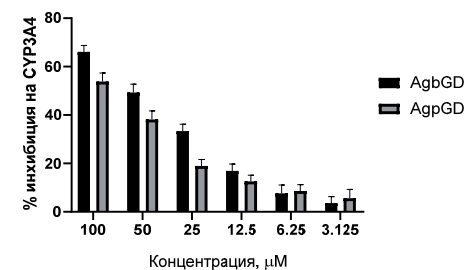
използван *ketoconazole*, в концентрация от 10 µM, при която се потиска с близо 90% активността на ензима.

След обработка на данните, бяха изчислени IC_{50} стойностите на четирите използвани аналога, които са представени в таблица 12. Поради наблюдаваната значителна инхибиция на *CYP3A4*, и четирите аналога на ендоморфин-2 бяха селектирани за по-нататъчни проучвания за евентуални лекарствени взаимодействия с лекарства субстрати на *CYP3A4*.

Ендоморфин-2 аналози	IC_{50} стойности с 95% интервал на конфиденциалност
<i>Tyr-Pro-Phe(pF)-Phe-1,2-ethylenediamine</i>	15.00 µM (9.89-22.73) $p < 0.05$
<i>Tyr-Pro-Phe-Phe-1,2-ethylenediamine</i>	16.42 µM (10.28-26.25) $p < 0.05$
<i>Deoxycholic-Tyr-Pro-Phe(pF)-Phe-OH</i>	31.37 µM (20.02-54.07) $p < 0.05$
<i>Deoxycholic-Tyr-Pro-Phe(pCl)-Phe-OH</i>	29.04 µM (21.33-32.96) $p < 0.05$

Таблица 12. IC_{50} стойности на ендоморфин-2 аналози с 95% интервал на конфиденциалност

Подобен скрининг беше проведен и с аналозите на *RGD*, модифицирани в първа позиция, *Agb* (*S-2-amino-3-guanidino-butyric acid*) (**1, AgbGD**) and *Agp* (*S-2-amino-3-guanidino-propionic acid*) (**2, AgpGD**). Беше използван същия концентрационен диапазон – от 100 µM до 6,25 µM. За разлика от ендоморфиновите аналози, *RGD* аналозите не показаха значително повлияване както на *CYP3A4*, така и на *CYP2C9*. Единствено, когато бяха приложени в най-голямата използвана концентрация – 100 µM, беше наблюдавана над 50% инхибиция на *CYP3A4* активността. Резултатите са показани на фигура 20.



Фигура 20. Инхибиране активността на *CYP3A4* от аналози на *RGD*.

Двата аналога на *RGD* показаха слаба инхибираща активност върху *CYP3A4* ензима и поради това не бяха предвидени за по-нататъчните симулации.

Пептидите представляват уникален клас фармацевтични съединения, молекулно разпределени между клас малки молекули и този на протеините, но биохимично и терапевтично различаващи се от тях. Олигопептидите се доближават до класа малки молекули в по-голяма степен, в сравнение с полипептидите, и показват предимства пред тях, като: 1) нисък разход на средства; 2) ниска молекулярна маса; 3) по-висока бионаличност (възможност за перорално приложение); 4) лесни модификации в аминокиселинния състав с

цел увеличаване на плазмения полуживот; 4) определяне на количествена връзка „структура – ефект“. Протеините/полипептидите се елиминират главно чрез неспецифична катаболна деградация, осъществявана от повсеместното присъствие на протеази и пептидази в тялото след вътреклетъчното поглъщане. Възможността за модулиране на цитохромни ензими е неприсъща за тях. Трябва обаче да се вземе предвид, че някои от протеините/полипептидите могат да повлияят таргети, напр. цитокини, които вторично да доведат до модулиране на цитохромната функция [Georgiev K & Georgieva M, 2015]. Доближаването на олигопептидите до класа на малките молекули определя освен множеството положителни страни, но също така и възможността за модулиране на цитохромни ензими, свойство което е присъщо за малките молекули и способността им да влизат в лекарство-лекарство взаимодействия.

Именно поради това, получените от нас олигопептидни съединения бяха тествани за възможна инхибиция върху цитохромните ензими. Най-мощна инхибиция на *CYP3A4* беше отчетена при използването на два от ендоморфините-2 аналози – тези конюгирани с етилендиаминовите опашки. Модификацията на трета позиция с пара-флуорен атом не промени значително активността върху ензима. Други два аналога, конюгирани с дезоксихолиева киселина и модифицирани в трета позиция с пара-флуорен и пара-хлорен атом, показаха също значителна инхибиция по отношение на *CYP3A4*.

В повечето случаи, по време на първоначалния скрининг *in vitro* за *CYP*-инхибиция, се използва следния гайдлайн базиран на $3 \mu\text{M}$ концентрация на тестваната субстанция и определените стойности на IC_{50} [Crespi CL et al., 1997]:

- < 15 % инхибиция при $3 \mu\text{M}$ или $IC_{50} > 10 \mu\text{M}$ – ниска степен на *CYP* инхибиция
- 15-50 % инхибиция при $3 \mu\text{M}$ или $3 \mu\text{M} < IC_{50} < 10 \mu\text{M}$ – умерена степен на *CYP* инхибиция
- > 50 % инхибиция при $3 \mu\text{M}$ или $IC_{50} < 3 \mu\text{M}$ – висока степен на *CYP* инхибиция

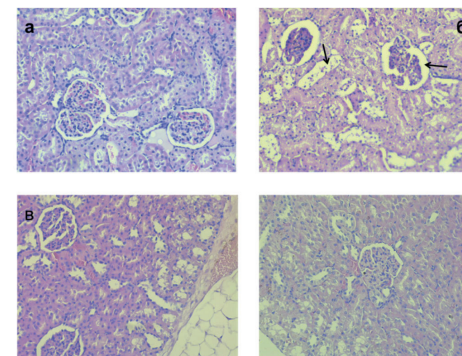
Въз основа на този гайдлайн – тестваните аналози на ендоморфин-2 имат ниска степен на инхибиране на *CYP3A4*. Други групи обаче са по-консервативни и използват по-строги гайдлайни, според които:

- $IC_{50} > 100 \mu\text{M}$ – ниска степен на *CYP* инхибиция
- $10 \mu\text{M} < IC_{50} < 100 \mu\text{M}$ – умерена степен на *CYP* инхибиция
- $IC_{50} < 10 \mu\text{M}$ – висока степен на *CYP* инхибиция

Според тези критерии, и четирите тествани аналога на ендоморфин-2 показват умерен риск по отношение инхибицията на *CYP3A4*.

До този момент не бяха открити данни в литературата, които да са доказали инхибираща способност на ендоморфини (ендоморфин-1 и -2) или техни аналози върху цитохромни ензими. Самата дезоксихолиева киселина (*DCA*) се явява субстрат на *CYP3A4*, който я превръща в 1β -hydroxy-*DCA* и 3 -dehydro-*DCA* [Chen J et al., 2014]. Също така за нея има данни, че може да индуцира ензима [Schuetz EG et al., 2001]. По отношение на възможна инхибиция, не бяха открити данни.

Хистологичното изследване на бъбречната тъкан при плъховете от контролна група показва нормална архитектура на бъбречните гломерули и тубули (Фигура 15а).



Фигура 15. Фотомикрографии на бъбречната кора, оцветени H&E $\times 400$. а) Контрола (група 1), б) *doxorubicin* 20 mg/kg i.p. третираната група (група 6); в, г) претретираните с метилксантини в доза 5 mg/kg (група 4) и 1 mg/kg (група 5) респективно.

Групата, третирана единствено с *doxorubicin* в кумулативна доза 20 mg/kg (Фигура 15б) показва значителни гломеруларни и тубуларни нарушения. Беше наблюдаван тотален колапс на гломерулите с некротични промени в тубулните епителни клетки.

Претретираните групи с метилксантини изолирани от Банча (5 mg/kg и 1 mg/kg) (Фигура 15в и 15г) показаха значителна устойчивост към увреждащите ефекти на *doxorubicin*. Уврежданията бяха предимно в кортикалната област. При използваната по-голяма доза от метилксантини имаше съществено намаляване на морфологичните промени, причинени от експозицията на *doxorubicin*.

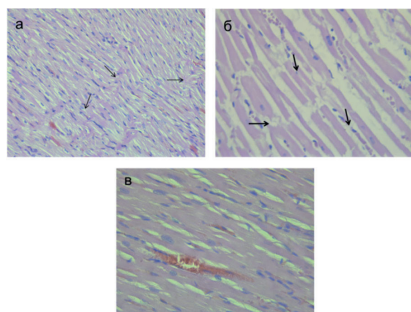
2.2.4. Дискусия

В литературата не бяха открити докладвани данни за кардиопротективна активност на селектирана фракция от метилксантини или отделните компоненти. Дори напротив, бяха открити данни, които сочат за увеличаване на кардиотоксичността при употреба на основния компонент в метилксантиновата фракция – *caffeine* [Dunnick JK et al., 2007; Howden R et al., 2005]. Причините за това най-вероятно се дължат на механизма на действие на метилксантините свързан с блокадата на аденозинови рецептори. Аденозин се освобождава вследствие на исхемия и оказва протектиращ ефект върху сърцето действайки върху два субтипа аденозинови рецептори – A_1 и A_3 [Carr CS et al., 1997]. В допълнение на това, *caffeine* стимулира рионодинови рецептори (RyR) и води до увеличаване нивата на вътреклетъчния калций, който от своя страна допринася за деполяризацията и контрактилитета на кардиомиоцитите [Luo D et al., 2001]. В цитираните източници – Dunnick JK и кол.(2007) и Howden R и кол.(2005), *caffeine* е бил използван едновременно с *ephedrin* за индуциране на

показатели ($p < 0.001$, резултатите от сравняването не са показани на фигурите) в сравнение с контролите (получаващи единствено физиологичен р-р), сочещи за увреждане на сърдечната и бъбречната тъкан. Метилксантините, изолирани от Банча, не доведоха до статистически промени в тези показатели при приложението им самостоятелно, в сравнение с контролите ($p = 0.573$, резултатите от сравняването не са показани на фигурите), но показаха дозозависимо понижаване при едновременната употреба с *doxorubicin*. Това сочи за намаляване увреждането на сърдечната ($p < 0.05$ при СК, СК-МВ и АСАТ; $p < 0.01$ при LDH) и бъбречната ($p < 0.01$ при пикочна к-на; $p < 0.05$ при креатинин и BUN) тъкан при дадения комбиниран режим. Промени в сърдечния маркер тропонин I (сТпI) не бяха засечени, нивата му при контролите, третираните групи и модела не бяха завишени. При електролитните нива на натрий, калий и хлор също не бяха отчетени статистически промени.

2.2.3. Ефекти върху хистопатологичните показатели за кардио- и нефротоксичност

Изследването на оцветени с хематоксилин-еозин (H&E) надлъжни срези на контролната група (група 1) показва нормална хистологична структура на камерния миокард (Фигура 14а) – разклонени и напречно-набраздени мускулни влакна с централни овални ядра.



Фигура 14. Фотомикрографии на мускулни секции на леви камери на плъх, оцветени с H&E x 400. а) контрола; б) група, третирана само с *doxorubicin* 15 mg/kg (група 6); в) група, претретирана с метилксантини 5 mg/kg (група 4).

За разлика от тях, третираните само с *doxorubicin* плъхове (група 6), показват значителни хистологични промени (Фигура 14б) – наблюдават се миофибрилни разкъсвания, миоцитна дезорганизация, избледняване на цитоплазмата и формиране на пикнотични ядра.

От друга страна, претретирането с метилксантини 5 mg/kg (Фигура 14в) води до почти нормална миокардна структура с много ограничена мононуклеарна инфилтрация на интерстициума и видимо намаляване на количеството на колагеновите влакна между сърдечните миоцити в сравнение с групата на *doxorubicin*.

Модифицираните в първа позиция аналози на *RGD* не показаха значителна инхибция върху *CYP3A4* изоензима. За тях също не бяха открити литературни данни за възможни взаимодействия с цитохромни ензими.

2.3.1. Изграждане на ФБФК модел на ендоморфин-2 аналози и симулиране на лекарствени взаимодействия с помощта на ADMEWORKS DDI софтуера

Тъй като ендоморфин-2 аналозите са новосинтезирани и все още няма натрупани литературни данни за техните фармакокинетични свойства имаше нужда от подходящ софтуер(и), който/които да генерира(т) такива въз основа на тяхната химична структура (т.нар. *ADME*-генератори). *ADMEWORKS DDI*[®] софтуерът не бе предоставен с такъв модем, който да може да изпълнява такава функция. Ето защо, за предвиждане на необходимите физико-химични и някои фармакокинетични параметри бяха използвани два безплатни софтуера налични в интернет пространството – *swissADME* и *pkCSM*. Тъй като и двата софтуера прогнозира дали въведените молекули се явяват субстрати или инхибитори на най-честите цитохромни изоформи, те бяха също така използвани да потвърдят или отхвърлят наблюдаваните ефекти върху *CYP2C9* и *CYP3A4* изоензимите.

Софтуерът *swissADME* (наличен на <http://www.swissadme.ch/>), разработен от Швейцарския институт по биоинформатика, успява да генерира прогнозни модели за физикохимични и фармакокинетични свойства, а така също и пригодността на молекулата за лекарство и перорално приложение, като използва вградени методи, сред които *BOILED-Egg* (мозъчен или интестинален метод за оценка на пермеабилитета), *iLOGP* (косвен *LogP* метод) и *Bioavailability Radar* (радарни диаграми за бионаличност) [Daina A et al., 2017; Daina A & Zoete V, 2016]. В таблиците 13, 14, 15 и 16 са обобщени данните за четирите използвани ендоморфин-2 аналози.

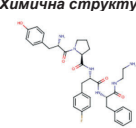
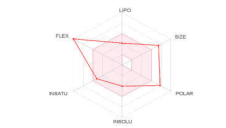
Химична структура	
	
Физикохимични свойства	
Брой акцептори на протони	8
Брой донори на протони	6
Тотална полярна повърхност (TPSA)	179.88 Å
Липофилност (Log P _{ow}) (средна от 5 предсказани)	1.99
Водоразтворимост (Log S) (ESOL метод)	-4.02 (умерена разтворимост)
Фармакокинетични свойства	
ГИ резорбция	Ниска
Пенетрация през ХЕБ	Не
Субстрат на P-gp	Да
Инхибитор на CYP1A2	Не
Инхибитор на CYP2C19	Не
Инхибитор на CYP2C9	Не
Инхибитор на CYP2D6	Не
Инхибитор на CYP3A4	Да

Таблица 13. Физико-химични и фармакокинетични свойства на *Tyr-Pro-Phe(pF)-Phe-1,2-ethylenediamine* предвидени от *swissADME* софтуера.

Червеният шестоъгълник наличен в таблиците (т.нар. радарна диаграма за бионаличност) показва оптималните ФК свойства, които трябва да притежава една молекула при перорален прием – липофилност (*LIPQ*) $-0,7 < XLogP3 < 5,0$; големина (*SIZE*) Mw 150–500 g/mol; полярност (*POLAR*) $TPSA$ 20–130 Å²; неразтворимост (*INSOLU*) $LogS$ (ESOL) 0–6; ненаситеност (*INSATU*) фракция на $Csp3$ 0,25–1; флексибилност (*FLEX*) брой връзки със свободна ротация 0–9. Показателите на подходящите за перорален прием молекули не би трябвало да излизат от защитованата част.

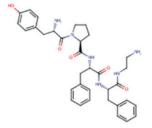
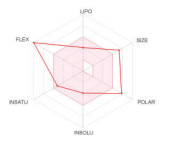
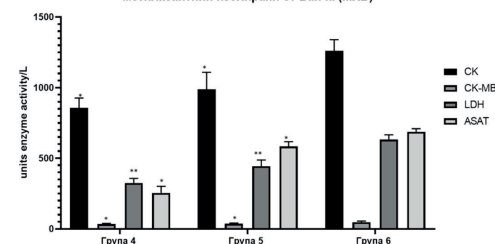
Химична структура	
	
Физиохимични свойства	
Брой акцептори на протони	7
Брой донори на протони	6
Тотална полярна повърхност (TPSA)	179.88 Å
Липофилност (Log Po/w)	1.73
Водоразтворимост (Log S) (ESOL метод)	-3.85
Фармакокинетични свойства	
ГИ резорбция	Ниска
Пенетрация през ХЕБ	Не
Субстрат на <i>P-gp</i>	Да
Инхибитор на CYP1A2	Не
Инхибитор на CYP2C19	Не
Инхибитор на CYP2C9	Не
Инхибитор на CYP2D6	Не
Инхибитор на CYP3A4	Не

Таблица 14. Физиохимични и фармакокинетични свойства на *Tyr-Pro-Phe-Phe-1,2-ethylenediamine* предвидени от *swissADME* софтуера.

Получените данни от *swissADME* софтуера показват, че ендоморфин-2 аналозите не са подходящи, поне на този етап, за перорално приложение. Свойства, като големина на молекулата, полярност и липофилност, са в основата за предполагаемата ниска резорбция и ограничеността за преминаване през ХЕБ. Ако трябва да бъдат отнесени към Биофармацевтичната класификационна система (*BSC*), то те биха били към клас IV – ниска разтворимост и нисък пермеабилитет [Amidon GL et al., 1995].

Това което прави впечатление от предвиждането на софтуера е, че загатва за възможна инхибция на два от ендоморфин-2 аналозите (*Tyr-Pro-Phe(pF)-Phe-1,2-ethylenediamine* и *Deoxycholic-Tyr-Pro-Phe(pCl)-Phe-OH*) върху CYP3A4 изоензимите (използван векторен модел изграден от 7518 молекули и тестван върху 2579 молекули) и отхвърля такива върху CYP2C9 (използван векторен модел изграден от 5940 молекули и тестван върху 2075 молекули) – свойства, които бяха наблюдавани при *in vitro* тестванията. Също така, програмата предсказва, че и четирите пептида са субстрати на *P-gp* (използван векторен модел изграден от 1033 молекули и тестван върху 415 молекули).

Промени в биохимичните маркери за кардиотоксичност при претретиране с метилксантини изолирани от Банча (MXB)

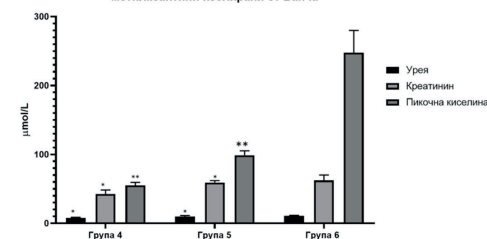


Фигура 12. Промени в биохимичните маркери за кардиотоксичност при претретиране с *MXB* 5 mg/kg (група 4), *MXB* 1 mg/kg (група 5), сравнени с модела *doxorubicin* (група 6). Стойностите са представени като средна стойност \pm SD. ANOVA one-way test е проведен за сравнение между групите. * $p < 0.5$ и ** $p < 0.01$ в сравнение с модела.

Групи	Серумни нива на урея (BUN) μ mol/L	Серумни нива на креатинин μ mol/L	Серумни нива на пикочна к-на μ mol/L
Група 1 – контрола	6.3 \pm 0.8	37.71 \pm 3.6	32.7 \pm 2.6
Група 2 – 5 mg/kg (p.o.) MXB	7.4 \pm 0.54	38.64 \pm 2.7	36.6 \pm 3.43
Група 3 – 1 mg/kg (p.o.) MXB	7.7 \pm 0.96	35.75 \pm 2.8	34.6 \pm 1.7
Група 4 – 5 mg/kg (p.o.) MXB + Doxo 20 mg/kg (i.p.)	7.88 \pm 1.1	42.54 \pm 5.98	55.2 \pm 4.32
Група 5 – 1 mg/kg (p.o.) MXB + Doxo 20 mg/kg (i.p.)	9.87 \pm 1.6	59.3 \pm 2.8	98.8 \pm 6.5
Група 6 – Doxo 20 mg/kg (i.p.)	11.11 \pm 0.8	62.45 \pm 5.6	247.41 \pm 25.4

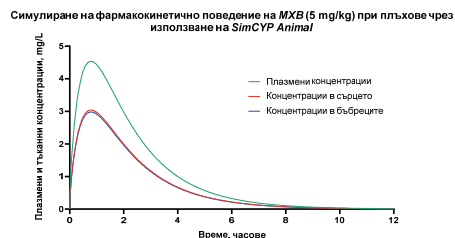
Таблица 10. Ефекти на метилксантини изолирани от Банча приложени в дози 5 mg/kg (група 4) и 1 mg/kg (група 5) върху серумните нива на урея, креатинин и пикочна к-на при *doxorubicin*-индуцирана нефротоксичност (20 mg/kg).

Промени в биохимичните маркери за нефротоксичност при претретиране с метилксантини изолирани от Банча



Фигура 13. Промени в биохимичните маркери за нефротоксичност при претретиране с *MXB* 5 mg/kg (група 4), *MXB* 1 mg/kg (група 5), сравнени с модела *doxorubicin* (група 6). Стойностите са представени като средна \pm SD. ANOVA test е проведен за сравнение между групите. * $p < 0.5$ и ** $p < 0.01$ в сравнение с модела.

Както се вижда от таблиците, моделите на кардио- и нефротоксичност, индуцирани с приложение на кумулативна доза *doxorubicin*, приложен интраперитонеално (20 mg/kg), показват значителни разлики в биохимичните



Фигура 11. Симулиране на фармакокинетично поведение на метилксантини изолирани от Банча (МХВ) приложени в доза 5 mg/kg p.o. при пълхове. Симулациите са проведени със SimCYP Animal софтуера.

	C_{max} mg/L	t_{max} h	AUC (mg.h/L)
Плазмени концентрации	4.94	0.64	13.76
Концентрации в сърцето	3.04	0.79	8.62
Концентрации в бърбреците	2.98	0.79	8.46

Таблица 8. Стойности на C_{max} , t_{max} и AUC в плазмата, сърцето и бърбреците при прилагане на 5 mg/kg МХВ p.o. Стойностите са изчислени на база проведените симулациите със SimCYP Animal софтуера.

Както се вижда от графиката и таблицата, двата богато кръвоснабдени органа – сърце и бърбреци, получават значително количество от прилаганата метилксантинова фракция. Пиковите в тъканните концентрации се постигат след близо 47 минути.

2.2.2. Ефекти върху биохимичните показатели за кардио- и нефротоксичност

В таблица 9 и 10 и Фигури 12 и 13 са обобщени резултатите, които отразяват влиянието на метилксантините, изолирани от Банча (МХВ), върху серумните нива на биохимичните показатели за кардио- и нефротоксичност.

Групи	Креатин киназа (CK), U/L	Креатин киназа МВ-фракция (CK-MB), U/L	Лактат дехидрогеназа (LDH), U/L	Аспартат аминотрансфераза (ASAT), U/L
Група 1 – контрола	324±14	22.3±1.6	209.63±19.6	89.87±9.87
Група 2 – 5 mg/kg (p.o.) МХВ	304±9.7	24.7±3.6	155.63±7.6	78±5.7
Група 3 – 1 mg/kg (p.o.) МХВ	311±9.6	23.7±3.6	164.7±5.8	69.7±6.7
Група 4 – 5 mg/kg (p.o.) МХВ + Дохо 20 mg/kg (i.p.)	856.8±69.4	34±5.7	325±32.6	254.8±46.9
Група 5 – 1 mg/kg (p.o.) МХВ + Дохо 20 mg/kg (i.p.)	987.65±121.4	37±4.6	444±43.7	584±32.8
Група 6 – Дохо 20 mg/kg (i.p.)	1260±80.1	47.8±7.8	633.11±32.4	687.23±22.35

Таблица 9. Ефекти на метилксантини изолирани от Банча приложени в дози 5 mg/kg (група 4) и 1 mg/kg (група 5) върху активностите на ензимите CK, CK-MB, LDH и ASAT при doxorubicin-индуцирана кардиотоксичност (20 mg/kg кумулативна доза).

Химична структура	Физикохимични свойства
Брой акцептори на протони Брой донори на протони Тотална полярна повърхност (TPSA) Липофилност (Log Po/w) Водоразтворимост (Log S) (ESOL метод)	10 7 205.60 6.02 -9.23
Фармакокинетични свойства	
ГИ резорбция Пенетрация през ХЕБ Субстрат на P-gp Инхибитор на CYP1A2 Инхибитор на CYP2C19 Инхибитор на CYP2C9 Инхибитор на CYP2D6 Инхибитор на CYP3A4	Ниска Не Да Не Не Не Не Не

Таблица 15. Физико-химични и фармакокинетични свойства на Deoxycholic-Tyr-Pro-Phe(pF)-Phe-OH предвидени от swissADME софтуера.

Химична структура	Физико-химични свойства
Брой акцептори на протони Брой донори на протони Тотална полярна повърхност (TPSA) Липофилност (Log Po/w) Водоразтворимост (Log S) (ESOL метод)	9 7 205.60 6.29 -9.66
Фармакокинетични свойства	
ГИ резорбция Пенетрация през ХЕБ Субстрат на P-gp Инхибитор на CYP1A2 Инхибитор на CYP2C19 Инхибитор на CYP2C9 Инхибитор на CYP2D6 Инхибитор на CYP3A4	Ниска Не Да Не Не Не Не Да

Таблица 16. Физико-химични и фармакокинетични свойства на Deoxycholic-Tyr-Pro-Phe(pCl)-Phe-OH предвидени от химичната структура с помощта на swissADME софтуера.

С помощта на следващата уеб платформа бяха получени останалите базисни фармакокинетични параметри, които бяха необходими за изграждането на моделите. pkCSM предоставя платформа за анализ и оптимизация на

фармакокинетичните и токсичните свойства, реализирани в удобен за потребителя безплатен уеб интерфейс (<http://structure.bioc.cam.ac.uk/pkcsfm>), ценен инструмент за подпомагане на медицинските химици, да намерят баланс между потентност, безопасност и фармакокинетични свойства [Pires DE et al., 2015].

Получените данни са обобщени в таблиците 17 (с коментари по отношение базата данни от лекарства, използвани за генерираните данни), 18, 19 и 20.

<i>Tyr-Pro-Phe(pF)-Phe-1,2-ethylenediamine</i>	Предсказани стойности (коментар)
Фармакокинетични свойства	
Абсорбция	49.808 %
ГИ резорбция	0.925 (10 ⁻⁶ cm/s) (базиран на 674 подобни молекули)
Сосо2 пермеабилитет	Да (базиран на 332 подобни молекули)
Субстрат на P-gp	Да (базиран на 332 подобни молекули)
Разпределение	11.61 L/kg (базиран на 670 подобни молекули)
V _{dis}	0.254 (базиран на 552 подобни молекули)
Несвързана фракция (f _i)	(Моделите за инхибиция са базирани на 14 000-18 000 подобни молекули)
Метаболизъм	
Инхибитор на CYP1A2	Не
Инхибитор на CYP2C19	Не
Инхибитор на CYP2C9	Не
Инхибитор на CYP2D6	Да (базиран на 671 подобни молекули)
Субстрат на CYP2D6	Да*
Инхибитор на CYP3A4	Да (базиран на 671 подобни молекули)
Субстрат на CYP3A4	
Екскреция	
Тотален клирънс (CL _{tot})	0.2566 L/h/kg (базиран на 398 подобни молекули)
Субстрат на OCT2	Не (базиран на 906 подобни молекули)

Таблица 17. Предсказани фармакокинетични свойства на *Tyr-Pro-Phe(pF)-Phe-1,2-ethylenediamine* с помощта на pkCSM софтуера. *лекарството се предполага, че е инхибитор ако концентрацията необходима за 50% инхибиция на ензима е < 10 µM

<i>Tyr-Pro-Phe-Phe-1,2-ethylenediamine</i>	Предсказани стойности
Фармакокинетични свойства	
Абсорбция	51.555 %
ГИ резорбция	0.81 (10 ⁻⁶ cm/s)
Сосо2 пермеабилитет	Да
Субстрат на P-gp	Да
Разпределение	8.43 L/kg
V _{dis}	0.297
Несвързана фракция (f _i)	
Метаболизъм	
Инхибитор на CYP1A2	Не
Инхибитор на CYP2C19	Не
Инхибитор на CYP2C9	Не
Инхибитор на CYP2D6	Не
Субстрат на CYP2D6	Да
Инхибитор на CYP3A4	Да*
Субстрат на CYP3A4	Да
Екскреция	
Тотален клирънс (CL _{tot})	0.2993 L/h/kg
Субстрат на OCT2	Не

Таблица 18. Предсказани фармакокинетични свойства на *Tyr-Pro-Phe-Phe-1,2-ethylenediamine* с помощта на pkCSM софтуера. *лекарството се предполага, че е инхибитор ако концентрацията необходима за 50% инхибиция на ензима е < 10 µM.

няма да се различават като действие от тези от Пу-ер, тъй като двете метилксантинови фракции са сходни по състав. Въпреки това, получените резултати дадоха основание за размисъл. Метилксантините, изолирани от Банча, показаха силно изразен синергичен ефект с *doxorubicin* върху клетъчната линия *MDA-MB-231*, оценен от двата използвани метода за комбинационни ефекти. Hertz и кол. (2015) са наблюдавали повишаване на антипролиферативните ефекти при комбиниране на екстракт от гуарана с конвенционални противотуморни лекарства, като *doxorubicin*, върху клетки от рак на гърдата – *MCF-7* [Hertz et al., 2015]. Ефектът от комбинациите върху клетъчната жизнеспособност след 24 часа показва значително увеличаване на пролиферативната активност на клетките, докато след 72 часа се трансформира до антипролиферативен ефект. Авторите предполагат, че други компоненти, като катехини, са отговорни за тези времеви промени. Трите цитирани изследвания [Cadoń FC et al., 2016 & 2017; Hertz E et al., 2015], не са напълно съпоставими с нашите резултати, поради факта че екстрактите от гуарана, освен че са богати на метилксантини, съдържат и значителни количества катехини, които притежават описаните биологични ефекти и могат да доведат до грешно интерпретиране на резултатите.

2.2. Кардио- и нефропротективни ефекти на метилксантинова фракция изолирана от Банча (МХВ) при модел *doxorubicin*-индуцирана кардио- и нефротоксичност при плъхове

От проведените предварителните изследвания *in vitro*, бяха селектирани метилксантините от Банча за тестване *in vivo*, за органна протекция срещу *doxorubicin*-индуцирани модели на кардио- и нефротоксичност при плъхове. Беше определено, метилксантините от Банча да бъдат прилагани в дози 5 mg/kg и 1 mg/kg.

2.2.1. Симулиране на фармакокинетично поведение на метилксантиновата фракция при плъхове

С помощта на предоставената платформа *SimCYP Animal* (Version 18, Release 1) беше симулирано фармакокинетично поведение на метилксантиновата фракция при плъхове. Отново, както в предишната глава, беше направено предположение, че фармакокинетичното поведение на метилксантините би било като това на *caffeine*. Въз основа на това, и наличните физикохимични и фармакокинетични данни за *caffeine* при плъхове в предоставения софтуер, беше симулиран експериментален дизайн с използваната по-висока доза – 5 mg/kg, за да се определят пиковите в плазмата и тъканите (сърце и бъбреци), където се очакваха да бъдат наблюдавани протективни ефекти. За целта беше използван пълен ФБФК модел на дистрибуция, а резултатите от симулациите са показани на фигура 11 и таблица 8.

за интеркалиране в нишката на ДНК и директно образуване на комплекси от метилксантини с ароматни съединения.

От получените резултати от самостоятелното приложение на метилксантиновата фракция от Пу-ер и Банча върху тестваните човешки туморни линии – *BJ*, *HT-29*, *MCF-10A*, *MCF-7*, *MDA-MB-231*, може като цяло да се заключи, че метилксантиновите фракции нямат изразен антипролиферативен ефект върху тези клетки. Това, което прави впечатление, макар и не толкова показателно, е повишената активност върху туморните за сметка на нетуморните клетъчни линии (таблица 1). Тези ефекти са наблюдавани и описани от други автори, които обаче са работили с екстракт от гуарана (*Paullinia cupana*) – богат на метилксантини, *caffeine* (12.240 mg/g) и *theobromine* (6.733 mg/g), но също така съдържащ и високи нива на тотални катехини (4.336 mg/g) [Cadoná FC et al., 2017]. Авторите доказват, че екстрактът от гуарана инхибира важни сигнални пътища, участващи в пролиферацията на туморните клетки, а именно *MAPK* (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) и *mTOR* (*mammalian Target Of Rapamycin*).

Използването на тотални екстракти, изолирани фракции или чисти вещества от растителен произход, самостоятелно или в комбинация с одобрени конвенционални лекарства при лечението на множество заболявания, не е нещо ново, а вече е стандарт във фармацевтичната индустрия. Това обаче повдига въпроси за това, доколко тези препарати от природен произход ще подпомогнат основното лечение и дали няма да влязат във взаимодействие, които да компрометират лечението. Търсенето на такива синергични взаимодействия, между природните продукти и стандартната терапия, които биха могли да увеличат терапевтичната полза или да подобрят степента на неблагоприятните ефекти на конвенционалните лекарства, е от особено значение за област като онкологията [Pezzani R et al., 2019].

Именно поради това, беше определено да бъдат тествани, изолираните от нас растителни фракции със стандартни цитотоксични лекарства. В първото проучване не бяха открити синергични ефекти на метилксантините, когато бяха комбинирани с *oxaliplatin* върху клетъчните линии *MDA-MB-231* и *HT-29* (фигури 1 и 2). Martins IL и кол. (2013) демонстрират синтез на ново производно на *caffeine*, *6-selenocaffeine*, който намалява цитотоксичните ефекти на *oxaliplatin* върху *MCF-7* клетките, като същевременно повишава активността на *doxorubicin* [Martins IL et al., 2013]. Cadoná FC и кол. (2016) са наблюдавали повишаване на чувствителността на *oxaliplatin* при едновременно третиране с екстракт от гуарана (по-горе се споменава за състава) върху *HT-29* клетъчната линия [Cadoná FC et al., 2016]. Обясняват го с повишената експресия на проапоптотични гени – *p53* и *Bax/Bcl-2*.

В последвалото изследване, беше оценен потенциала на метилксантините, да повишат чувствителността на клетките от рак на гърдата - *MCF-7* и *MDA-MB-231* към действието на *doxorubicin*. Комбинацията от метилксантини изолирани от Пу-ер с *doxorubicin* не доведе до очакваните синергични ефекти. Hill и кол. (2011) обясняват подобни ефекти наблюдавани при *caffeine*, с възможната протективна роля на *caffeine*, която предпазва ДНК на раковите клетки от възможна интеркалация [Hill GM et al., 2011]. Именно поради това, предположенията бяха, че метилксантините изолирани от Банча,

Deoxycholic-Tyr-Pro-Phe(pF)-Phe-OH	Предсказани стойности
Фармакокинетични свойства	
Абсорбция	
ГИ резорбция	40.802 %
S _{сo2} пермеабилитет	0.42 (10 ⁻⁶ cm/s)
Субстрат/инхибитор на P-gp	Да/Не
Разпределение	
V _{дss}	0.48 L/kg
Несвързана фракция (f _u)	0.231
Метаболизъм	
Инхибитор на CYP1A2	Не
Инхибитор на CYP2C19	Не
Инхибитор на CYP2C9	Не
Инхибитор на CYP2D6	Не
Субстрат на CYP2D6	Да
Инхибитор на CYP3A4	Не
Субстрат на CYP3A4	Да
Екскреция	
Тотален клирънс (CL _{tot})	0.41 L/h/kg
Субстрат на OCT2	Не

Таблица 19. Предсказани фармакокинетични свойства на *Deoxycholic-Tyr-Pro-Phe(pF)-Phe-OH* с помощта на *pkCSM* софтуера.

Deoxycholic-Tyr-Pro-Phe(pCl)-Phe-OH	Предсказани стойности
Фармакокинетични свойства	
Абсорбция	
ГИ резорбция	43.732 %
S _{сo-2} пермеабилитет	0.4 (10 ⁻⁶ cm/s)
Субстрат/инхибитор на P-gp	Да/Не
Разпределение	
V _{дss}	0.4 L/kg
Несвързана фракция (f _u)	0.239
Метаболизъм	
Инхибитор на CYP1A2	Не
Инхибитор на CYP2C19	Не
Инхибитор на CYP2C9	Не
Инхибитор на CYP2D6	Не
Субстрат на CYP2D6	Да
Инхибитор на CYP3A4	Не
Субстрат на CYP3A4	Да
Екскреция	
Тотален клирънс (CL _{tot})	0.44 L/h/kg
Субстрат на OCT2	Не

Таблица 20. Предсказани фармакокинетични свойства на *Deoxycholic-Tyr-Pro-Phe(pCl)-Phe-OH* с помощта на *pkCSM* софтуера.

pkCSM софтуерът също загатна за инхибиторното действие върху *CYP3A4* на етилендиаминовете аналози на ендоморфин-2, като тук се предполага и стойност на *IC₅₀* около или по-малка от 10 μM. Отново потвърждение на наблюдаваната *in vitro* инхибиция на *CYP3A4* с етилендиаминовите аналози на ендоморфин-2 (таблица 12).

За изграждане на ФБФК модели (построяване на концентрация/време криви) на ендоморфин-2 аналозите, беше необходимо да се направят няколко предположения относно фармакокинетичното поведение, които не бяха предвидени от *swissADME* и *pkCSM* уеб платформите.

Параметри	Tyr-Pro-Phe(pF)-Phe-1,2-ethylenediamine	Deoxycholic-Tyr-Pro-Phe(pCl)-Phe-OH	Референция/Коментар
Дозов режим	1 mg и 10 mg	1 mg и 10 mg	-
MW – молекулно тегло	632.74	981.67	ChemDraw
LogP – логаритмична стойност на октанол/вода разпределителния коефициент	1.99	6.29	Предсказана от swissADME/ Взета е усреднената стойност от различните методи за предсказване
Fa – фракция абсорбирана от ГИТ	0.5	0.44	Резорбция предсказана от от <i>pkCSM</i> /Параметър базиран на предположения
k_a – скоростна константа на абсорбция	2.0	2.0	Стойност приета за изготвяне на модела
CL_{и, mb} – чернодробен вътрешен клирънс (L/h)	3.59	9.24	Стойност приета за изготвяне на модела на база предсказан тотален клирънс от <i>pkCSM</i>
CL_r – ренален клирънс (L/h)	14.37	21.56	Стойност приета за изготвяне на модела на база предсказан тотален клирънс от <i>pkCSM</i>
Vd_t – обем на разпределение в централен компартимент (L)	55	28	Стойност предсказана от <i>pkCSM</i> /За Tyr-Pro-Phe(pF)-Phe-1,2-ethylenediamine е приета стойност близка до общ обем тел. течности
f_{u,p} – фракция несвързана в плазмата	0.254	0.239	Стойност предсказана от <i>pkCSM</i>
R₀ – съотношение плазма-кръв концентрация	0.8	0.8	Стойност приета за изготвяне на модела

Таблица 21. Физикохимични и фармакокинетични параметри използвани за изграждане на фармакокинетичното поведение Tyr-Pro-Phe(pF)-Phe-1,2-ethylenediamine и Deoxycholic-Tyr-Pro-Phe(pCl)-Phe-OH с помощта на ADMEWORKS DDI.

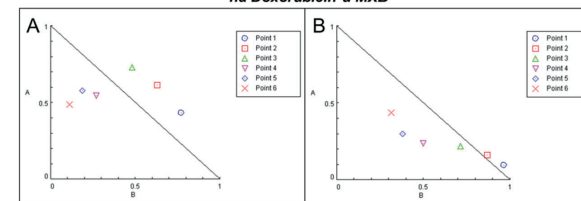
Първо, по отношение на изчисления тотален клирънс, се прие, че основно елиминацията е ренална (70%) и в по-малка степен чернодробна (30%). Тези заключения бяха направени въз основа на по-горните предположения, че аналозите на ендоморфин-2 спадат към IV група от Биофармацевтичната класификация, и предположените механизми на елиминиране от Wu CY и Benet LZ по отношение на тази група [Wu CY & Benet LZ, 2005]. И второ, ADMEWORKS DDI софтуера изисква стойност на обем на разпределение в централен компартимент (V_1), а не в стационарно състояние (V_{dss}). При Tyr-Pro-Phe(pF)-Phe-1,2-ethylenediamine аналога, независимо от предсказания голям обем на разпределение в стационарно състояние ($V_{dss} = 11.61$ L/kg) беше прието, че обема на разпределение в централния компартимент се приближава или в най-добрия случай леко надвишава общия обем телесни течности ($V_1 = 0.7-0.8$ L/kg), както е при повечето лекарствени молекули с пептидна структура [Diao L & Meibohm B, 2013].

Беше симулирано ФК поведение с ADMEWORKS DDI софтуера на два от аналозите на ендоморфин-2 – Tyr-Pro-Phe(pF)-Phe-1,2-ethylenediamine и Deoxycholic-Tyr-Pro-Phe(pCl)-Phe-OH с данните представени в таблица 21. Резлтатите са представени на фигура 21 и таблица 22 при приети дозови режими 1 mg и 10 mg.

Концентрация на doxorubicin (μM)	MXB концентрация ($\mu\text{g/mL}$)	CI	MXB концентрация ($\mu\text{g/mL}$)	CI
0.02	200.0	1.20636	600.0	1.06166
0.04	200.0	1.24558	600.0	1.03197
0.075	200.0	1.21176	600.0	0.93512
0.15	200.0	0.81526	600.0	0.73723
0.3	200.0	0.76702	600.0	0.68348
0.6	200.0	0.59957	600.0	0.75423

Таблица 7. Изчислен комбинационен индекс (CI) след третиране на MDA-MB-231 клетки с комбинация doxorubicin (0.02-0.6 μM) + MXB (200 и 600 $\mu\text{g/mL}$).

Изоболограми генерирани от CalcuSyn® софтуера при комбинирането на Doxorubicin и MXB

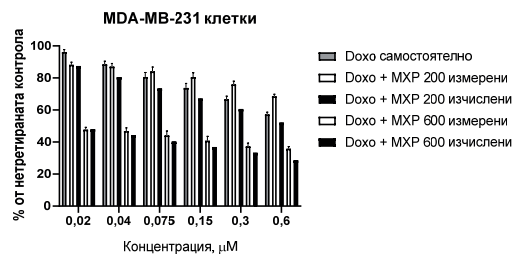


Фигура 10. Изоболограми генерирани от CalcuSyn® софтуера при комбинирането на doxorubicin (0.02-0.6 μM) и MXB 200 $\mu\text{g/mL}$ (A) и MXB 600 $\mu\text{g/mL}$.

Изчисленият комбинационен индекс и генерираните изоболограми показват, че съчетаването на doxorubicin (0,15-0,6 μM) и MXB (200 и 600 $\mu\text{g/mL}$) има значителен синергичен ефект.

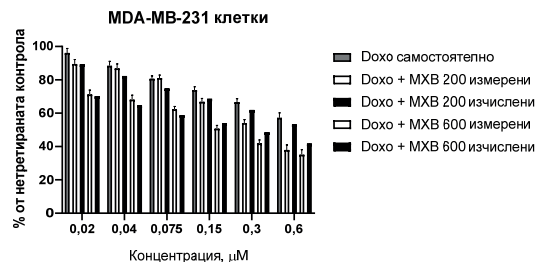
2.1.1. Дискусия

Природни продукти, съдържащи метилксантинови фракции, и по-специално техния основен компонент, *caffeine*, са едни от най-консумираните в световен мащаб [Verster JC & Koenig J, 2018]. Данните от литературата показват, че съществуват различни механизми, които се обсъждат като възможни за действието на метилксантините (и по-специално *caffeine*) срещу туморните клетки и тяхната комбинация с други химиотерапевтични лекарства. Повечето от тях са инхибиране на поправката (репарацията) на ДНК [Selby CP & Sancar A, 1990; Iliakis G et al., 1986] и инхибиране на ефлуксните помпи [Kakuyama (nee Iwazaki) A & Sadzuka Y, 2001; Sadzuka Y et al., 1995]. И двата механизма предполагат повишена чувствителност на туморните клетки към действието на цитотоксичните лекарства и лъчетерапията. От друга страна, има данни, че метилксантините намаляват фармакологичните ефекти на ароматни противоракови съединения, като doxorubicin, mitoxanthron, topotecan, camptotecin, както и други мутагенни агенти [Traganos F et al., 1991; Piosik J et al., 2005; Nahon E et al., 1993; Kimura H & Aoyama T, 1989]. Възможните механизми, предложени от тези автори, включват намаляване на възможността



Фигура 8. MDA-MB-231 клетъчна линия, третирана с *doxorubicin* (Doxo) самостоятелно в концентрационен диапазон 0.02-0.6 µM и в комбинация с 200 и 600 µg/mL метилксантини, изолирани от Пу-ер (MXP). Неутрал ред тест след 72 часа.

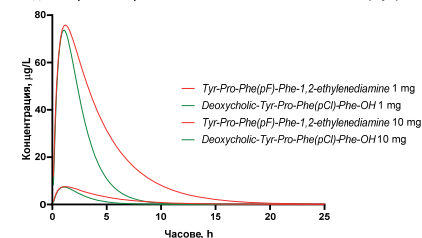
Метилксантините, изолирани от Пу-ер, само с най-ниската концентрация на *doxorubicin* (0.02 µM), показаха адитивен ефект, докато при всички други концентрации показаха антагонистични ефекти (фигура 8). Ситуацията с метилксантините, изолирани от Банча, беше напълно различна. В по-ниските концентрации *doxorubicin* (0.02-0.075 µM) и MXB (200 и 600 µg/mL) бяха наблюдавани адитивни ефекти, докато в най-високите концентрации (0.15-0.6 µM) комбинацията е със силно изразен синергичен ефект (фигура 9).



Фигура 9. MDA-MB-231 клетъчна линия, третирана с *doxorubicin* (Doxo) самостоятелно в диапазон на концентрация 0.02-0.6 µM и в комбинация с 200 и 600 µg/mL метилксантини, изолирани от Банча (MXB). Неутрал ред тест след 72 часа.

За оценка на наблюдаваните синергични ефекти от комбинацията *doxorubicin* + MXB, беше използван *CalcuSyn*[®] (сега е заменен от *Compusyn*) софтуера. Базирайки се на уравнението на *Chou-Talalay*, софтуерът калкулира комбинационния индекс от приложението на двете съединения. Резултатите от изчисленията са представени в таблица 7. На фигура 10 са представени изоболограмите от приложението на комбинацията. Точките под линията на адивността сочат за синергични, докато тези над – за антагонистични ефекти.

Симулиране на концентрация/време графика на ендоморфин-2 аналози при различни дозови режими чрез използване на *ADMEWORKS DDI* софтуер



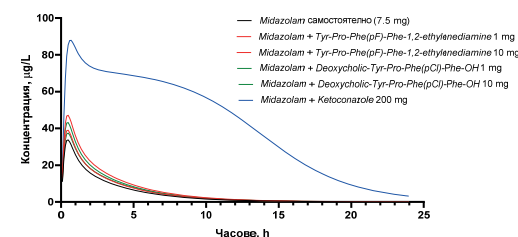
Фигура 21. Симулация на самостоятелно перорално приложение на 1 mg и 10 mg на *Tyr-Pro-Phe(pF)-Phe-1,2-ethylenediamine* и *Deoxycholic-Tyr-Pro-Phe(pCI)-Phe-OH* с помощта на *ADMEWORKS DDI* софтуера.

Съединение, Доза	C_{max} (µg/L)	T_{max} (h)	AUC (µg·h/L)
<i>Tyr-Pro-Phe(pF)-Phe-1,2-ethylenediamine</i> , 1 mg	7.58	1.09	38.23
<i>Tyr-Pro-Phe(pF)-Phe-1,2-ethylenediamine</i> , 10 mg	75.83	1.09	382.34
<i>Deoxycholic-Tyr-Pro-Phe(pCI)-Phe-OH</i> , 1 mg	7.368	1.08	22.056
<i>Deoxycholic-Tyr-Pro-Phe(pCI)-Phe-OH</i> , 10 mg	73.676	1.08	220.56

Таблица 22. Стойности на C_{max} , t_{max} и AUC при проведени симулации с *ADMEWORKS DDI* софтуера при различни еднократни перорални дози на ендоморфин-2 аналози.

За симулиране на лекарствени взаимодействия на фармакокинетично ниво, двата новосинтезирани аналога на ендоморфин-2, *Tyr-Pro-Phe(pF)-Phe-1,2-ethylenediamine* и *Deoxycholic-Tyr-Pro-Phe(pCI)-Phe-OH*, бяха предвидени да бъдат тествани в дозови режими 1 mg и 10 mg, приложени еднократно, перорално. Доказаната инхибиция *in vitro*, а също така предвидената *in silico* от използваните уеб платформи (*swissADME* и *pkCSM*), беше тествана с помощта на *ADMEWORKS DDI*, за предсказване риска от лекарствени взаимодействия *in vivo*. Класическият субстрат на *CYP3A4* и положителната контрола в симулации бяха *midazolam* и *ketoconazole* респективно. Резултатите са представени на фигура 22 и таблица 23.

Симулации на *Midazolam* 7.5 mg еднократна доза самостоятелно и при едновременно приложение на аналози на ендоморфин-2



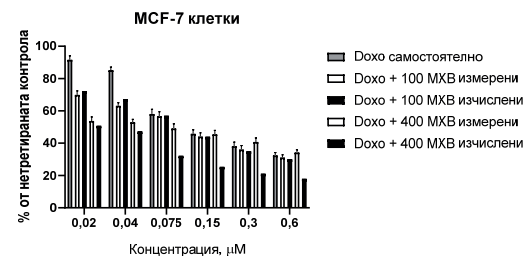
Фигура 22. Симулация на *midazolam* самостоятелно (7.5 mg единична доза перорално) и едновременно приложение на ендоморфин-2 аналози (1 mg и 10 mg, перорално). Използван за положителен контрол е *ketoconazole* в дозов режим 200 mg. Симулациите са проведени с *ADMEWORKS DDI* софтуера.

Ендоморфин-2 аналози в различни дозови режими и ketoconazole	C_{max} ratio p.o.	AUCR p.o.
Tyr-Pro-Phe(pF)-Phe-1,2-ethylenediamine 1 mg	1.142	1.137
Tyr-Pro-Phe(pF)-Phe-1,2-ethylenediamine 10 mg	1.38	1.375
Deoxycholic-Tyr-Pro-Phe(pCl)-Phe-OH 1 mg	1.062	1.06
Deoxycholic-Tyr-Pro-Phe(pCl)-Phe-OH 10 mg	1.281	1.275
Ketoconazole 200 mg	2.602	10.13

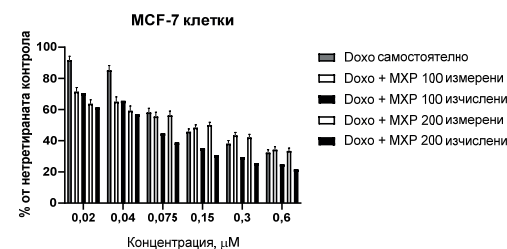
Таблица 23. Промени в съотношенията C_{max} и AUCR (AUC съотношение), когато midazolam (7,5 mg/единична доза) се използва едновременно с различни дози ендоморфин-2 аналози (1 mg и 10 mg) и ketoconazole (200 mg). Симулациите са проведени с ADMEWORKS DDI софтуера.

2.3.1.1. Дискусия

Изграждането на фармакокинетични модели на олигопептиди, както е в нашия случай, е изключително трудно, тъй като притежават свойства от една страна на големи полипептиди/протеинни молекули, а от друга страна на малки молекули [Sable R et al., 2017]. По отношение на новосинтезираните от нас пептидни аналози на ендоморфин-2, липсваха достатъчно данни за изграждане на симулационните модели. Поради това, бяха използвани два налични софтуера в интернет пространството – *swissADME* и *pkCSM*, които на база химична структура можеха да предвидят фармакокинетични параметри. Софтуерът позволява оценката на дадено съединение дали ще бъде субстрат на *P-gp* или субстрат/инхибитор на най-важните *CYP* изоензими - *CYP1A2*, *CYP2C19*, *CYP2C9*, *CYP2D6* и *CYP3A4*, с помощта на векторен алгоритъм (*support vector machine, SVM*) [Cortes C & Vapnik V, 1995] върху големи масиви от данни на известни субстрати/не-субстрати или инхибитори/не-инхибитори. Моделът заключава с „да“ или „не“, ако изследваната молекула има по-голяма вероятност да бъде или не субстрат на *P-gp* (съответно инхибитор или не-инхибитор на даден *CYP*). Другата свободно достъпната уеб платформа, *pkCSM*, предлага по-подробна информация относно фармакокинетичните параметри на тестваното съединение. Тя се базира на графичното моделиране, с добре установени математически представяния на химичните съединения, от които могат да бъдат извлечени различни дескриптори, обхващащи молекулната структура. Заедно с експерименталните данни, представляващи интерес (като напр. *ADMET* свойства), тези дескриптори могат след това да се използват като доказателство за обучение на изключително точни прогнозни модели чрез методи на машинно обучение [Pires DE et al., 2015]. Платформата прогнозира също така дали тестваното съединение се явява субстрат и/или инхибитор на най-честите цитохромни изоформи (*CYP1A2*, *CYP2C19*, *CYP2C9*, *CYP2D6* и *CYP3A4*) и *P-gp*, прогнозираните въз основа на структура-активност връзка (*admetSAR*) [Cheng F et al., 2012]. *SwissADME* софтуерът прогнозира, че етилендиаминовият аналог на ендоморфин-2 – Tyr-Pro-Phe(pF)-Phe-1,2-ethylenediamine се явява инхибитор на *CYP3A4*, докато същата модификация, но без пара-флуорния атом в трета позиция, не го засича като възможен за повлияването на *CYP3A4*. Подобна беше ситуацията и с другите два аналога – конюгираните с дезоксихолиева киселина. *SwissADME* прогнозира възможен инхибиторен ефект при Deoxycholic-Tyr-Pro-Phe(pCl)-Phe-OH, докато при Deoxycholic-Tyr-Pro-Phe(pF)-Phe-OH аналога не беше засечен такъв. *pkCSM* софтуерът прогнозира, че етилендиаминовите аналози освен че се явяват инхибитори, но също така са и субстрати на *CYP3A4*. При дезоксихолиевите



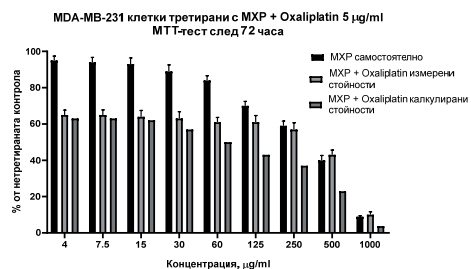
Фигура 6. MCF-7 клетки, третирани с doxorubicin (Doxo) самостоятелно в концентрационен диапазон 0.02-0.6 μM и в комбинация със 100 и 400 $\mu\text{g/mL}$ метилксантини, изолирани от Банча (MXB). Неутрал ред тест след 72 часа.



Фигура 7. MCF-7 клетки, третирани с doxorubicin (Doxo) самостоятелно в концентрационен диапазон 0.02-0.6 μM и в комбинация със 100 и 200 $\mu\text{g/mL}$ метилксантини, изолирани от Пу-ер (MXP). Неутрал ред тест след 72 часа.

Както може да се види от фигура 6, по-ниски концентрации на doxorubicin (0.02-0.04 μM) със 100 $\mu\text{g/mL}$ MXB имат синергични ефекти и с повишаване на концентрациите на doxorubicin (0.075-0.6 μM) ефектите преминават в адитивни. Използването на по-висока концентрация на MXB – 400 $\mu\text{g/mL}$, води до антагонистични ефекти. Ситуацията с метилксантини от Пу-ер беше подобна. Адитивни ефекти бяха наблюдавани при по-ниски концентрации на doxorubicin (0.02-0.04 μM) и при двете използвани концентрации на MXP. Другите концентрации в комбинацията показваха антагонистични ефекти (фигура 7).

Бяха определени и комбинационните ефекти на doxorubicin и метилксантини, изолирани от Банча и Пу-ер, върху клетъчната линия MDA-MB-231. Тъй като клетъчната линия MDA-MB-231 е по-устойчива на действието на doxorubicin (таблица 5), бяха използвани по-високи концентрации на метилксантини – 200 и 600 $\mu\text{g/mL}$ (стойности под и над техните IC_{50} респективно), докато doxorubicin бе прилаган в концентрации по ниски от неговата IC_{50} стойност върху тази клетъчна линия. Резултатите са представени на фигури 8 и 9.



Фигура 5. MDA-MB-231 клетки, третираны с метилксантини изолирани от Пу-ер (МХР) самостоятелно в концентрационен диапазон 4-1000 µg/mL и в комбинация с Oxaliplatin 5 µg/mL. MTT-тест след 72 часа.

Оценката на комбинационните ефекти беше направена чрез използване на фракционния анализ (независимост на Bliss). И при двете клетъчни линии комбинацията не показва синергични ефекти. В ниските концентрации на метилксантините се наблюдаваха адитивни ефекти, а в по-високите антагонистични.

Също така, за да бъде оценен комбинационния потенциал на метилксантините изолирани от Пу-ер и Банча, те бяха приложени едновременно с doxorubicin, върху клетки от рак на гърдата – MCF-7 и MDA-MB-231. Първоначално бяха определени стойностите на IC_{50} с 95% доверителен интервал при самостоятелно третиране с doxorubicin (таблица 6).

	MCF-7 клетъчна линия	MDA-MB-231 клетъчна линия
Doxorubicin IC_{50} (95% CI)	0.07 µM (0.02173-0.1160)	0.79 µM (0.25353-1.0654)

Таблица 6. Изчислени стойности на IC_{50} с 95% доверителен интервал при самостоятелно третиране с doxorubicin на MCF-7 и MDA-MB-231 клетки.

В комбинацията тествана върху MCF-7 клетките, doxorubicin беше прилаган в променливи концентрации от 0,02 до 0,6 µM (обхващащи IC_{50} стойността), докато метилксантини от Банча бяха във фиксирани концентрации 100 и 400 µg/mL (стойности под и близки до техните IC_{50} , респективно), а метилксантините от Пу-ер бяха във фиксирани концентрации 100 и 200 µg/ml (стойности под техните IC_{50}). Клетъчната пролиферация беше оценявана чрез използване на неутрал ред тест. Резултатите от третирането на MCF-7 клетки са показани на Фигура 6 и 7.

конюгати беше прогнозирано единствено, че се явяват субстрати на CYP3A4. И двата софтуера затвърждаваха наблюдаваните *in vitro* резултати, че етилендиаминовите ендоморфин-2 конюгати са по-потентни инхибитори от дозоксихолиевите по отношение на CYP3A4 и с предполагаем по-висок риск от евентуални взаимодействия с CYP3A4 субстрати.

Предвидените от ADMEWORKS DDI софтуера стойности на съотношението AUC_i (с инхибитор)/ AUC_o (без инхибитор) ($AUCR$) сочеха за липса на възможни взаимодействия със субстрати на CYP3A4 при приложение на ниската доза от 10 mg и за възможен умерен риск при използване на десет пъти по-висока доза, в случая 100 mg от аналозите на ендоморфин-2. ADMEWORKS DDI платформата разполага и с възможност за предвиждане на лекарствени взаимодействия чрез използване на базисен модел (уравнения 13, 14, 28, 29 от дисертацията). Проведените изчисления с високите дози на аналозите (100 mg) не показаха риск от взаимодействия (таблица 24).

Ендоморфин-2 аналози	$R_{i, CYP3A4}$ ($K_{i, in vitro}$; $I = I_{max}$, μ)	$R_{o, CYP3A4}$ ($K_{i, in vitro}$; $I_B = \text{доза}/250 \text{ ml}$)
Tyr-Pro-Phe(pF)-Phe-1,2-ethylenediamine 10 mg	1.003	9.429
Deoxycholic-Tyr-Pro-Phe(pCl)-Phe-OH 10 mg	1.001	3.806

Таблица 24. Промени в AUC съотношение ($AUCR$) на субстратите на CYP3A4 при едновременен прием с ендоморфин-2 аналози (10 mg). Изчисленията са проведени чрез използване на базисни модели заложи в ADMEWORKS DDI софтуера.

Софтуерът не разполага с възможност за смяна на лекарствената форма и пътя на приложение на инхибитора. Същото се отнася и за субстрата. Както се вижда от предсказаните свойства от swissADME платформата, новосинтезираните пептидни аналози на ендоморфин-2 не са пригодни за перорално приложение. Именно поради това, би трябвало при оценка на лекарствени взаимодействия, да се симулира парентерално, интравенозно приложение при тези съединения, тъй като по този път на приложение биха били евентуално одобрени в бъдеще.

За проверка и оценка на риска от възможни лекарствени взаимодействия наблюдавани с динамичните модели на ADMEWORKS DDI софтуера, както и симулиране на такива взаимодействия със смяна на пътя на въвеждане, беше използван отново SimCYP софтуера.

2.3.2. Изграждане на ФБФК модели и симулиране на лекарствени взаимодействия на ендоморфин-2 аналози с помощта на SimCYP софтуера

За разлика от ADMEWORKS DDI, SimCYP платформата разполага с възможности за прогнозиране на голяма част от фармакокинетичните параметри. При тези, които липсваше такава възможност, бяха използвани предсказаните стойности от уеб платформите (swissADME и pkCSM). Данните, използвани за симулиране на фармакокинетичното поведение, са представени в таблица 25. Всички симулации са проведени при виртуална популация от

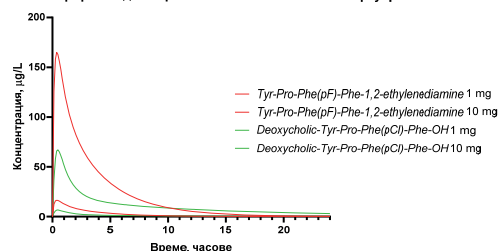
здравни доброволци, на възраст от 20 до 50 години, като 50% са жени. Броят на изследванията са 10 с по 10 субекта или общо 100 проведени изследвания.

Параметри	Tyr-Pro-Phe(pF)-Phe-1,2-ethylenediamine	Deoxycholic-Tyr-Pro-Phe(pCI)-Phe-OH	Референция/Коментар
Дозов режим	1 mg и 10 mg	1 mg и 10 mg	-
MW – молекулно тегло	632.74	981.67	ChemDraw
LogP – логаритмична стойност на октанол/вода разпределителния коефициент	1.99	6.29	Предсказана от swissADME/ Взета е усреднената стойност от различните методи за предсказване
pKa – отрицателен логаритъм на константата на дисоциация	3.71; -0.4	9.67; 9.02	Предсказани стойности на база химична структура
Fa – фракция абсорбирана от ГИТ	0.992	0.999	Стойност предсказана от SimCYP
k _a – скоростна константа на абсорбция	2.09	3.5	Стойност предсказана от SimCYP
CL _{н, инт} – чернодробен вътрешен клирънс (L/h)	3.59	9.24	Стойност приета за изготвяне на модела на база предсказан тотален клирънс от pkCSM
CL _r – ренален клирънс (L/h)	14.37	21.56	Стойност приета за изготвяне на модела на база предсказан тотален клирънс от pkCSM
Vd _{ss} – обем на разпределение в стационарно състояние (L/kg)	0.81*	4.38**	Стойност предсказана от SimCYP
f _{up} – фракция несвързана в плазмата	0.74	0.75	Стойност предсказана от SimCYP
R _p – съотношение плазма-кръв концентрация	0.8	0.8	Стойност приета за изготвяне на модела
K _{i,CYP3A4 (in vitro) (µg/L)}	4745.55	14 253.85	Определена с помощта на rhCYP3A4/Приет е обратим, конкурентен механизъм на инхибицията

Таблица 25. Физикохимични и фармакокинетични параметри използвани за изграждане на фармакокинетичното поведение Tyr-Pro-Phe(pF)-Phe-1,2-ethylenediamine и Deoxycholic-Tyr-Pro-Phe(pCI)-Phe-OH с помощта на SimCYP.*стойност предсказана по метод предложен от Roulin P & Theil FT (2000);**стойност предсказана по метод предложен от Rodgers T & Roland M (2007)

Беше симулирано ФК поведение на ендоморфин-2 аналозите с помощта на SimCYP софтуера, като бяха използвани минимален и пълен ФБФК модел. Резултатите са показани на фигура 23 и таблица 26.

Симулиране на концентрация/време графика на ендоморфин-2 аналози при различни перорални дози чрез използване на SimCYP софтуер



Фигура 23. Симулация на самостоятелно приложение на Tyr-Pro-Phe(pF)-Phe-1,2-ethylenediamine и Deoxycholic-Tyr-Pro-Phe(pCI)-Phe-OH при 1 mg/24 часа и 10 mg/24 h дозови режими с помощта на SimCYP софтуера.

2. Резултати и дискусия

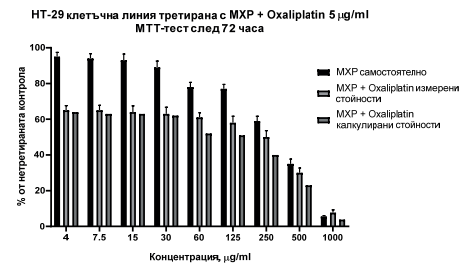
2.1. Анализ и оценка на комбинационните ефекти на изолираните метилксантинови фракции със стандартни противотуморни агенти върху нетуморни и туморни клетъчни линии

Първоначално беше направен скрининг върху няколко туморни и нетуморни клетъчни линии, за да бъде определена активността на метилксантиновите фракции изолирани от Пу-ер и Банча върху пролиферативната активност на тези клетки. Резултатите са представени в таблица 5. С цел да бъде оценено дали тази фракция е способна да увеличава активността на стандартни противотуморни лекарства, като сенсibiliзира клетките към тяхното действие, бяха проведени следните комбинирани третириания.

Клетъчна линия	IC ₅₀ µg/mL ± стандартно отклонение (SD), MXP		IC ₅₀ µg/mL ± стандартно отклонение (SD), MXB	
	MTT-тест след 72 час		MTT-тест след 72 час	
BJ	497.54 ± 89.4		-	
HT-29	364.8 ± 94		-	
MCF-10A	596.67 ± 76.9		723.43 ± 54.5	
MCF-7	387.32 ± 65.6		396.34 ± 43.6	
MDA-MB-231	392.5 ± 99		482.32 ± 69.4	

Таблица 5. IC₅₀ стойности със стандартни отклонения на метилксантинова фракция изолирана от Пу-ер (MXP) и Банча (MXB). MTT-тест след 72 часа.

Беше изследвана ефикасността на комбинацията – метилксантинова фракция изолирана от Пу-ер в променливи концентрации (4-1000 µg/ml) и oxaliplatin в константна концентрация (5 µg/ml), върху клетъчна линия от карцином на дебелото черво – HT-29 и клетъчна линия на рак на гърдата – MDA-MB-231. Oxaliplatin, използван във фиксираната концентрация от 5 µg/ml, индуцираше приблизително 40% и 30% инхибиране на клетъчната пролиферация на MDA-MB-231 и HT-29 клетъчните линии респективно. Резултатите са представени съответно на фигура 4 и фигура 5.



Фигура 4. HT-29 клетки, третирани с метилксантини изолирани от Пу-ер (MXP) самостоятелно в концентрационен диапазон 4-1000 µg/mL и в комбинация с Oxaliplatin 5 µg/mL. MTT-тест след 72 часа.

, където A_1 и B_2 са процент на инхибиране с единични агенти, изразени като процент от нетретираната контрола. За всяка концентрация бяха изчислени теоретичните стойности, които впоследствие бяха сравнявани с тези, които се получаваша в действителност: при еднакви измерени и изчислени теоретични стойности ($SE_{\text{измерен}} = SE_{\text{изчислен}}$) ефекта се приемаше като адитивен; при по-малки стойности на измерените от изчислените ($SE_{\text{измерено}} < SE_{\text{изчислено}}$) като синергичен и при по-големи стойности на измерените от изчислените ($SE_{\text{измерен}} > SE_{\text{изчислен}}$) – като антагонистичен.

1.7.2. Chou-Talalay комбинационен индекс

Вторият метод, който беше приложен, е най-широко използваният и се основава на метода на множественото лекарствено действие на Chou-Talalay. Бяха определяни стойностите на комбинационен индекс (CI) за всяка една от използваните комбинации с помощта на *CalcuSyn*[®] софтуера (Biosoft, Cambridge, UK) [Chou TC & Hayball MP, 1997]. Интерпретацията на стойностите на комбинационния индекс е представена в таблица 4.

Комбинационен индекс (CI)	Сила	Синергизъм/Антагонизъм
<0.1	+++++	Много силен синергизъм
0.1-0.3	++++	Силен силен синергизъм
0.3-0.7	+++	Синергизъм
0.7-0.85	++	Умерен синергизъм
0.85-0.9	+	Слаб синергизъм
0.0-1.1	-	Адидивност
1.1-1.2	-	Слаб антагонизъм
1.2-1.45	--	Умерен антагонизъм
1.45-33	---	Антагонизъм
3.3-10	----	Силен антагонизъм
>10	-----	Много силен антагонизъм

Таблица 4. Стойности на комбинационния индекс и тяхната интерпретация.

С цел опростяване на интерпретацията, стойности на CI по-малки от 0.9 бяха приемани за синергизъм, CI равен на 0.9-1.10 беше приеман за адитивно взаимодействие и стойности на CI по-големи от 1.10 бяха приемани за антагонизъм.

1.8. Статистически анализ

За изграждане на графиките и определяне на IC_{50} с 95% доверителен интервал, беше използвана четирипараметрична логистична крива (4PL) генерирана от *Graph Pad Prism 8.01* софтуер (*GraphPad Software, USA*). Всички резултати са изразени като средно аритметични \pm стандартно отклонение (SD). Разликите между групите бяха анализирани с помощта на ANOVA, за всяка различна концентрация/доза бяха използвани шест повторения и P стойност < 0.05 се приемаше за статистически значима разлика.

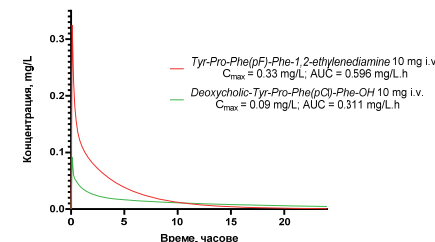
Съединение, Доза	C_{max} ($\mu\text{g/L}$)		T_{max} (h)	AUC ($\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$)
	min PBPK/full PBPK	min PBPK/full PBPK		
<i>Tyr-Pro-Phe(pF)-Phe-1,2-ethylenediamine, 1 mg</i>	12.83/16.5	0.98	53.4/53.14***	
<i>Tyr-Pro-Phe(pF)-Phe-1,2-ethylenediamine, 10 mg</i>	128.35/165.3	0.98	533.53/535.75***	
<i>Deoxycholic-Tyr-Pro-Phe(pCl)-Phe-OH, 1 mg</i>	2.81/6.72	1.7/0.49	28.69/27.88*	
<i>Deoxycholic-Tyr-Pro-Phe(pCl)-Phe-OH, 10 mg</i>	28.11/67.18	1.7/0.49	286.85/278.65*	

Таблица 26. Стойности на C_{max} , t_{max} и AUC при проведени симулации със *SimCYP* софтуера при различни дози на ендоморфин-2 аналози. Проведен *Student's t-test* за сравняване на стойностите получени с *ADMEWORKS DDI* и тези на *SimCYP* за AUC . * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

Симулираните фармакокинетични модели на ендоморфин-2 аналозите със *SimCYP* симулатора показаха отново статистически разлики с *ADMEWORKS DDI* в получените AUC стойности (таблица 26), като вероятната причина е в различните стойности във фармакокинетичните параметри, които бяха използвани.

SimCYP симулаторът позволява смяна на пътя на въвеждане, така че с двата аналога на ендоморфин-2 бяха проведени симулации при интравенозно болус приложение (30 минути продължителност на въвеждането) във високия дозов режим от 10 mg и използване на пълен ФБФК модел на дистрибуция. Резултатите и изчислените стойности на C_{max} и AUC са показани на фигура 23.

Симулиране на концентрация/време графика на ендоморфин-2 аналози приложение интравенозно болус чрез използване на *SimCYP* софтуер



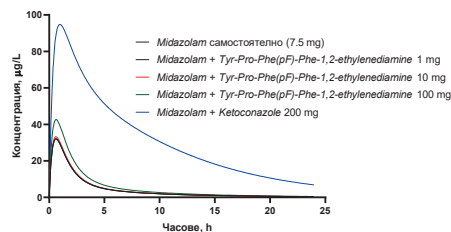
Фигура 24. Симулации на ендоморфин-2 аналози – *Tyr-Pro-Phe(pF)-Phe-1,2-ethylenediamine* и *Deoxycholic-Tyr-Pro-Phe(pCl)-Phe-OH* приложени интравенозно болус в доза 10 mg с помощта на *SimCYP* софтуера. Изчислени са стойностите на C_{max} и AUC .

За определяне на потенциала на взаимодействие на ендоморфиновите аналози със субстрати на *CYP3A4* бяха проведени няколко симулации в различни дозови режими и различен път на въвеждане. *SimCYP* платформата позволява отчитане на възможния риск от взаимодействия чрез използване на два модела – статичен и динамичен. Всички симулации са проведени при виртуална популация от здрави доброволци, на възраст от 20 до 50 години, като 50% са жени. Броят на изследванията са 10 с по 10 субекта или общо 100 проведени изследвания.

Първоначално бяха проведени симулации с ендоморфин-2 аналога – *Tyr-Pro-Phe(pF)-Phe-1,2-ethylenediamine*. Беше симулирано приложение с различни дозови режими – 1 mg, 10 mg и 100 mg, приложени едновременно с класическия субстрат на *CYP3A4* – *midazolam* (7.5 mg/p.o.). Резултатите са представени на

фигура 25 и 26 и са обобщени в таблица 27. Беше симулирано също така при същите условия приложение на *Tyr-Pro-Phe(pF)-Phe-1,2-ethylenediamine* парентерално, интравенозно болус (продължителност на приложението 30 минути).

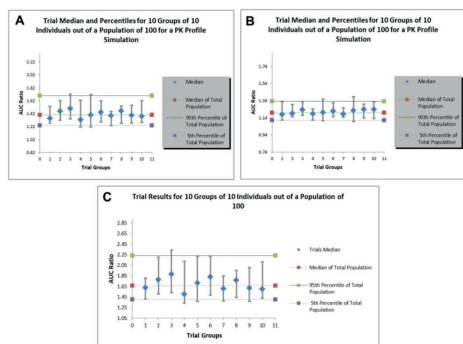
Симулации на *Midazolam* 7.5 mg еднократна доза самостоятелно и при едновременно приложение с *Tyr-Pro-Phe(pF)-Phe-1,2-ethylenediamine* в различни дозови режими



Фигура 25. Симулация на *midazolam* самостоятелно (7,5 mg единична доза, перорално) и едновременно приложение на *Tyr-Pro-Phe(pF)-Phe-1,2-ethylenediamine* перорално в дози 1 mg, 10 mg и 100 mg. Използван за положителен контрол е *ketoconazole* в доза 200 mg/перорално. Симулациите са проведени с *SimCYP* софтуера.

<i>Tyr-Pro-Phe(pF)-Phe-1,2-ethylenediamine</i> в различни дозови режими и <i>ketoconazole</i>	C_{max} /AUCR Динамичен p.o.	C_{max} /AUCR Динамичен i.v. bolus	AUCR Статичен p.o.
<i>Tyr-Pro-Phe(pF)-Phe-1,2-ethylenediamine</i> 1 mg	1.0/1.0	1.0	1.01
<i>Tyr-Pro-Phe(pF)-Phe-1,2-ethylenediamine</i> 10 mg	1.02±0.01/1.03±0.01	1.04±0.01	1.14±0.04**
<i>Tyr-Pro-Phe(pF)-Phe-1,2-ethylenediamine</i> 100 mg	1.36±0.11/1.42±0.12	1.18±0.06/1.22±0.07	1.67±0.26**
<i>Ketoconazole</i> 200 mg	3.68±1.08/9.83±3.8	10.03±4.18	17.99±9.54

Таблица 27. Промени в съотношенията C_{max} и AUCR (AUC съотношение), когато *midazolam* (7.5 mg/единична доза) се използва едновременно с различни дози *Tyr-Pro-Phe(pF)-Phe-1,2-ethylenediamine* (1 mg, 10 mg и 100 mg) и *ketoconazole* (200 mg). Симулациите са проведени с *SimCYP* софтуера. Проведен *Student's t-test* за сравняване на стойностите получени AUCR (динамичен) с AUCR (статичен). **p<0.01



Фигура 26. Промените в AUCR при приложение на *Tyr-Pro-Phe(pF)-Phe-1,2-ethylenediamine* (100 mg) по двата метода заложи в *SimCYP* симулатора – динамичен перорално (A), динамичен i.v. bolus (B) и статичен перорално (C).

анестезирани чрез инхалиране на етилов етер и е събрана кръв за биохимичен анализ от задорбиталния плексус.

Серумът беше отделен чрез центрофугиране при 6000 g/min за 5 min и замразен при -20°C за оценка на биохимичните параметри. Отпрепарирани бяха сърцата и бъбреците на плъховете и съхранявани в буферен разтвор на 10%-ов формалин до извършване на хистопатологичния анализ.

1.5. Биохимични анализи

Серумните концентрации на креатинин, пикочна киселина и урея, както и нивата на серумните ензими (креатинин киназа, CK; креатинин киназа MB фракция, CK-MB; аспартатаминотрансфераза, ASAT; лактатдехидрогеназа, LHD) и електролитите (Na⁺, K⁺, Cl⁻) бяха анализирани съгласно инструкциите, предоставени със съответните ензимни комплекти от търговски реагенти с биохимичен анализатор Cobas® 6000 (F. Hoffmann-La Roche Ltd.) в лицензирана лаборатория в гр.Варна. Информация за използваните методи за анализ са налични на сайта на фирмата.

1.6. Хистопатология на сърце и бъбреци

Лявата и дясната камера на сърцата, а така също и бъбреците бяха фиксирани в 10% неутрален формалин, вградени в парафин, и разделени с помощта на ротационен микротом на дебелина 4-6 µm, и оцветени с хематоксилин и еозин (H&E). Бяха изследвани минимум 6 полета от всяко бъбречно сечение и беше определена тежестта на промяна от наблюдател, който не беше информиран за лечението на животните. Всички срезове са оценени за структурни промени под светлинен микроскоп *Leica DM 1000 LED* и камера *Leica MC120 HD* (Leica Microsystems AG, Wetzlar, Германия) и са заснети при 200x или 400x увеличение чрез използване на софтуер.

1.7. Оценка на комбинационни ефекти

Бяха използвани два метода за определяне на фармакодинамичните лекарствени взаимодействия.

1.7.1. Независимост на Bliss

Първият метод, беше анализът на фракционния ефект (FA) или независимостта на *Bliss* [Webb JL, 1963]. Ефектът при този метод се счита за синергичен, когато наблюдаваният ефект е по-голям от произведението от ефектите на всеки отделен агент. Уравнението, използвано за изчисляване на комбинационния ефект (CE) е:

$$CE = \frac{A_1 \times B_1}{100}$$

Уравнение 7

1.4. Експериментален дизайн

1.4.1. Симулиране на фармакокинетично поведение на метилксантинови фракции при плъхове

За целите е използван *SimCYP*[®] *Animal* софтуер (Version 18, Release 1), които може да симулира фармакокинетично поведение при опитни животни, като плъхове, мишки, кучета и маймуни. Използвани са наличните данни в софтуера, за фармакокинетичното поведение на *caffeine* при плъхове, и бяха извършени симулации при избраните дозови режими чрез използване на пълен ФБФК модел на разпределение.

1.4.2. Индуциране на кардио- и нефротоксичност при плъхове чрез приложение на *doxorubicin*

Животните бяха рандомизирани в групи, състоящи се от 6 плъха в група. Експерименталният дизайн на изследването за кардио- и нефропротекция чрез използване на метилксантини изолирани от Пу-ер и Банча, а така също и с изолираните фракции от *L.barbarum* беше проведен по един и същ начин, който е описан по-долу поотделно.

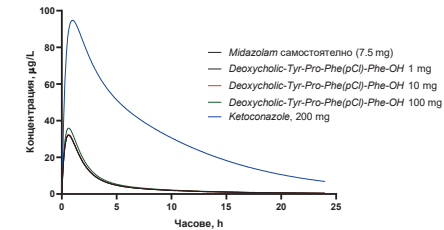
Опит с метилксантини: Група 1 (контролна група) получава 1 ml физиологичен разтвор перорално със сонда в продължение на 17 дни. Плъховете в групи 2 и 3 получаваха по 1 ml метилксантинови фракции в две различни дози (съответно 5 mg/kg и 1 mg/kg) в продължение на 17 дни. Групи 4 и 5 получаваха 1 ml метилксантинови фракции при две различни дози (съответно 5 mg/kg и 1 mg/kg) през устата в продължение на 17 дни и *doxorubicin* интаперитонеално (10 mg/kg, 47 минути след приложението на пероралната доза метилксантини) на 15-ия и 17-ия ден (кумулятивна доза: 20 mg/kg). Плъховете от група 6 (*DOXO* група) получават 1 ml физиологичен разтвор през устата в продължение на 17 дни и *doxorubicin* интраперитонеално (10 mg/kg телесно тегло, две дози) на 15 и 17 ден (кумулятивна доза: 20 mg/kg).

Опит с фракции от *L.barbarum*: Група 1 (контролна група) получава 1 ml 0,9% физиологичен разтвор перорално чрез сондиране в продължение на 13 дни. Плъховете от група 2, 3 и 4 получаваха по 1 ml пектин-свободна фракция, полизахаридна фракция и комбинация от двете фракции на *L.barbarum* в доза 2 mg/kg в продължение на 13 дни. Група 5, 6 и 7 получават 1 ml пектин-свободна фракция, полизахаридна фракция и комбинация от двете фракции на *L.barbarum* в доза 2 mg/kg в продължение на 13 дни и *doxorubicin* интаперитонеално (10 mg/kg, две дози) на 11 и 13 ден (кумулятивна доза: 20 mg/kg). Плъховете от група 8 (*DOXO* група) получават 1 ml 0,9% физиологичен разтвор перорално в продължение на 13 дни и *doxorubicin* интраперитонеално (10 mg/kg, две дози) на 11-ия и 13-ия ден от експеримента (кумулятивна доза: 20 mg/kg).

По време на опита, един плъх от *DOXO* групата беше открит мъртъв след първата интраперитонеална инжекция на *doxorubicin* в опита с метилксантини. В останалите групи по време на опита не бяха наблюдавани смъртни случаи. На 18-тия ден (при опита с метилксантини) и на 14-ден (при опита с фракциите на *L.barbarum*) – 24 часа след последната доза *doxorubicin*, всички плъхове бяха

По аналогичен начин бяха проведени симулациите и с другия ендоморфин-2 аналог – *Deoxycholic-Tyr-Pro-Phe(pCl)-Phe-OH*. Беше симулирано приложение с различни перорални и интравенозни дози – 1 mg, 10 mg и 100 mg, еднократно, едновременно с *midazolam*. Резултатите са представени на фигура 27 и 28 и са обобщени в таблица 28.

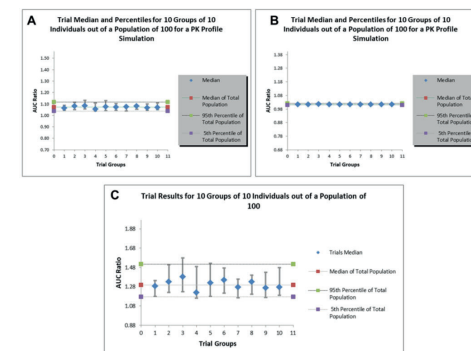
Симулации на *Midazolam* 7.5 mg еднократна доза самостоятелно и при едновременно приложение с *Deoxycholic-Tyr-Pro-Phe(pCl)-Phe-OH* в различни дозови режими



Фигура 27. Симулация на *midazolam* самостоятелно (7,5 mg единична доза) и едновременно приложение на *Deoxycholic-Tyr-Pro-Phe(pCl)-Phe-OH* в дозови режими 1 mg, 10 mg и 100 mg/p.o.. Използван за положителен контрол е *ketoconazole* в дозов режим 200 mg/p.o. Симулациите са проведени с *SimCYP* софтуера.

Deoxycholic-Tyr-Pro-Phe(pCl)-Phe-OH в различни дозови режими и ketoconazole	C_{max} /AUCR Динамичен p.o.	C_{max} /AUCR Динамичен i.v.	AUCR Статичен p.o.
Deoxycholic-Tyr-Pro-Phe(pCl)-Phe-OH 1 mg	1.0/1.0	1.0	1.0
Deoxycholic-Tyr-Pro-Phe(pCl)-Phe-OH 10 mg	1.01/1.01	1.0	1.04±0.01
Deoxycholic-Tyr-Pro-Phe(pCl)-Phe-OH 100 mg	1.08±0.02/1.08±0.02	1.01/1.01	1.30±0.11**
Ketoconazole 200 mg	3.68±1.08/9.83±3.8	10.03±4.18	17.99±9.54

Таблица 28. Промени в съотношенията C_{max} и AUCR (AUC съотношение), когато *midazolam* (7,5 mg/p.o.) се използва едновременно с различни дози *Deoxycholic-Tyr-Pro-Phe(pCl)-Phe-OH* (1 mg, 10 mg и 100 mg/p.o. и i.v.) и *ketoconazole* (200 mg/p.o. и i.v.). Симулациите са проведени с *SimCYP* софтуера. Проведен *Student's t-test* за сравняване на стойностите получени AUCR (динамичен) с AUC (статичен). **p<0.01



Фигура 28. Промените в AUCR при приложение на *Deoxycholic-Tyr-Pro-Phe(pCl)-Phe-OH* (100 mg) по двата метода заложили в *SimCYP* симулатора – динамичен перорално (A), динамичен i.v. bolus (B) и статичен перорално (C).

2.3.2.1. Дискусия

Използване на статичния модел за оценка на риска от лекарствени взаимодействия в някои случаи може да доведе до надценяване на този риск поради използване на статични концентрации на инхибитора. В случая беше наблюдавано завишаване на стойностите на *AUCR* при *Tyr-Pro-Phe(pF)-Phe-1,2-ethylenediamine* аналога на едноморфин-2 при използване статично-механистичния метод, като тези стойности бяха статистически значими при симулациите с 10 mg и 100 mg (таблица 27). При *Deoxycholic-Tyr-Pro-Phe(pCl)-Phe-OH* аналога статистически значими различия между динамичните и статичните методи бяха наблюдавани при дозата от 100 mg.

Проведените динамични симулации на *Tyr-Pro-Phe(pF)-Phe-1,2-ethylenediamine* с *SimCYP* софтуера не показаха риск от възможни лекарствени взаимодействия при перорално приложение със субстрати на *CYP3A4* (в случая *midazolam*) при използването на дози – 1 mg и 10 mg. Единствено с най-високата доза – 100 mg, показаха умерен риск от възможни такива (таблица 27). При *Deoxycholic-Tyr-Pro-Phe(pCl)-Phe-OH* аналога не беше регистриран риск от лекарствени взаимодействия и в трите дози (1, 10 и 100 mg), използвани за симулацията (таблица 28). Както беше споменато по-горе, основното приложение на ендоморфин-2 и неговите аналози към този момент би било парентерално. Именно поради това, бяха симулирани лекарствени взаимодействия при парентерално приложение – интравенозно, болус със същите дози. При *Tyr-Pro-Phe(pF)-Phe-1,2-ethylenediamine* аналога на едноморфин-2 смяната на пътя на приложение на най-високата доза използвана в симулациите (100 mg) доведе до намаляване на съотношението *AUCR* и съответно на риска – умерен при *per os* приложението, до нисък при *i.v. bolus* приложение (таблица 27). При *Deoxycholic-Tyr-Pro-Phe(pCl)-Phe-OH* аналога, смяната на пътя също повлия на *AUCR* съотношението и изключи възможен риск от лекарствени взаимодействия със субстрати на *CYP3A4* в най-високата доза използвана в симулациите – 100 mg (таблица 28).

2.3.3. Сравняване на двата използвани симулатора – *ADMEWORKS DDI* и *SimCYP*

Използваните симулационни програми, *ADMEWORKS DDI* и *SimCYP*, разчитайки на въведените физикохимични и фармакокинетични данни в тях, получени от клинични изследвания или преизчислени от *in vivo* и *in vitro* стойности, са способни да прогнозира фармакокинетично поведение доближаващо се максимално до това, наблюдавано в клинични условия [Jamei M et al., 2009; Morita T et al., 2019]. И двата софтуера са снабдени с данни за най-честите „жертви“ и „извършители“ на фармакокинетични лекарствени взаимодействия. *ADMEWORKS DDI* софтуера разполага с данни за общо 77 лекарства (47 лекарства субстрати и 30 лекарства инхибитори), които включват препоръчаните от *FDA* за изследване на всички основни *CYP* изоформи (1A2, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6, 3A4). Това прави възможно за потребителите на този софтуер лесно да симулират лекарствени взаимодействия със собствени съединения. От споменатите 47 субстрата на цитохромите, 28 от тях са субстрати на *CYP3A4*.

при 4°C и е стабилен за около месец. След изтичане на инкубацията със съответното изпитвано вещество 1 mL от работния разтвор на *MTT* се прибавя към 15 mL *DMEM* среда и след това се накапваше по 100 µL във всяка ямка. След добро размесване, плаките бяха инкубирани за 3 часа при 37°C и 5% CO₂. След приключване на инкубацията средата беше отстранявана. За разтварянето на формазановите кристали бе използван лизис буфер *DMSO* в етанол в съотношение 1:1. От него беше прибавян по 100 µL на ямка. Плаките се преместват на клатачна машина за 10 мин за разтваряне на веществото. Оптичната плътност беше отчитана на *ELISA* четец (*TECAN, Sunrise®*, *Grodig/Sazburg, Austria*) при дължина на вълната 540 nm и референтна стойност от 640 nm.

Получените стойности бяха преизчислявани като процент от нетретираната контрола по формулата:

$$\% \text{ витални клетки} = \frac{\text{абсорбция на проба} - \text{бланк}}{\text{абсорбция на контрола} - \text{бланк}} \times 100 \quad \text{Уравнение 6}$$

(нетретираните клетки)

Пресметнато беше стандартно отклонение за всяка приложена концентрация.

1.2.2. Неутрал ред тест

Неутрал ред тестът беше проведен въз основа на стандартен протокол [Borenfreund E & Puerner JA, 1984], с някои модификации. Той се основава на способността на жизнеспособните клетки да включат и свързват неутрал ред багрилото в лизозомите. Клетките се инкубират с използваните съединения и клетъчната жизнеспособност се определя 24, 48 или 72 часа по-късно. Обработващата среда се заменя с *DMEM*, съдържаща 100 µg/mL неутрал ред багрило и клетките се инкубират в продължение на три часа. След това клетките се промиват с фосфатно буферизиран физиологичен разтвор (*PBS*). Оптичната плътност на пробите беше измерена с четец на микроплаки (*TECAN, Sunrise®*, *Groedig/Salzburg*, Австрия) при 540 nm. Жизнеспособността на клетките се изразява като процент от контролните стойности (Уравнение 6).

1.3. Опитни животни

В изследването бяха използвани мъжки възрастни плъхове от порода *Wistar* (общо 72 плъха). Плъховете бяха настанени в контролирана среда (температура 23 ± 2°C, влажност 50 ± 10% и 12 часа светъл/12 часа тъмен цикъл) с неограничен достъп до храна и вода.

Всички опитни процедури са провеждани съобразно с националните принципи за експерименти с животни, които са в съответствие с директивите на Европейския съюз (*European Communities Council Directives 86/609/EEC*). За извършваните експериментални процедури е получено разрешение от Българска агенция по безопасност на храните (БАБХ).

отношение на *HER2*. Морфологично представлява епителоподобни клетки, растящи в монослой и имащи способността да образува „кълъстери“ (клетъчни сгрупвания).

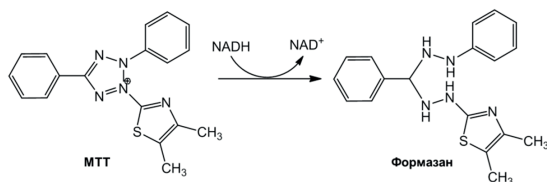
- *MDA-MB-231* – човешка клетъчна линия от карцином на млечна жлеза, тройно негативна (*ER*, *PR*, *HER2*). Морфологично представлява епителни клетки растящи адхерентно в монослой.

Всички клетъчни линии са поддържани в препоръчителните за техния растеж хранителни среди, като *DMEM (Dulbecco Modified Eagle's medium)* или *RPMI (Roswell Park Memorial Institute)-1640* с добавяне на 10% фетален телешки серум и антибиотици в инкубатор, поддържащ влажна атмосфера с 5% CO_2 и 37°C. След третиране с трипсин-EDTA (*FlowLab®*, *Australia*) бяха посявани в 96-ямкови плаки (*Greiner®*, *Germany*) в концентрация 10^3 или 10^4 клетки/ямка в зависимост от изследването. За проведените експерименти, клетките са поддържани в експоненциална фаза на растеж (т.нар. *log*-фаза), когато фракцията на дялящите се клетки е висока (обикновено 90-100%).

1.2. Оценка на виталността на клетките

1.2.1. MTT-тест

MTT-тестът се основава на трансформацията на багрилото (*MTT*) до цветни водонерастворими формазанови кристали (Фиг.3) в количество, право пропорционално на броя витални клетки, които могат да бъдат определени спектрофотометрично.



Фигура 3. Превръщане на *MTT* в формазанови кристали под действието на митохондриалните дехидрогенази.

MTT тестът беше проведен в 96-ямкови платки следващ стандартния протокол [Mossman T, 1983], с някои модификации. Клетките бяха посяти по 1×10^4 кл/ямка (цитотоксичен ефект, отчитане на резултатите на 24 час след третирането с веществата) или 1×10^3 кл/ямка (антипролиферативен ефект, отчитане на резултатите на 72 час след третирането с веществата) в обем 150 μ L и бяха оставени да се прирепят за дъното на плаката в продължение на 24 часа в инкубатор на 37°C и 5% CO_2 . Отделните фракции бяха прибавяни в съответните концентрации в шест повторения. След добро размесване, плаките бяха инкубирани за 72 часа в инкубатор на 37°C и 5% CO_2 . Работният разтвор на *MTT* беше приготвян в стерилен фосфатен буфер в концентрация 5 mg/mL и филтруван през 0.2 μ m филтър. Този разтвор може да се съхранява

Софтуерна платформа	Предимства	Недостатъци
SimCYP®	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Избор на тествана популация (общо 19 на брой) ➤ Избор на път на приложение и дозов режим ➤ Пълни фармакологични характеристики на лекарствата предоставени в софтуера ➤ Пълни фармакологични характеристики и на някои от основните метаболити от лекарствата ➤ Възможност за предсказване на голяма част от фармакокинетичните параметри ➤ Възможност за изграждане на минимални и пълни ФБФК модели ➤ Възможност за провеждане на симулации с повече от един инхибитор ➤ Възможност за провеждане на анализ на чувствителността на използваните параметри ➤ Възможност за изграждане на <i>bottom-up</i> и <i>up-down</i> модели при постъпване на данни от предклинични и клинични изследвания ➤ Постоянно обновяване на софтуера с новопостъпилата информация 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Сложност за работа със софтуера – необходимост от провеждане на курс по обучение ➤ Сравнително малко на брой субстрати (45) и инхибитори (27) предоставени със софтуера
ADMEWORKS DDI®	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Лесен за употреба (не изисква курс за обучение) ➤ Информация за относително много на брой лекарства - 84 (в сравнение със <i>SimCYP</i>) ➤ Възможност за симулиране на лекарствени взаимодействия по трите метода – базичен, механично-статичен и динамичен ФБФК модел. 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Недостатъчна информация за лекарствата ➤ Невъзможност за промяна на път на приложение – на лекарството „жертва“ и „извършител“. Провеждане на симулации само при перорално приложение. ➤ Липса на информация за повлияване на транспортни протеини

Таблица 29. Сравнителни характеристики на използваните симулаторни платформи.

Данни за тях са представени в таблица 4 в секцията Приложение. Провеждането на симулации с *ADMEWORKS DDI* програмата е максимално улеснено и не изисква специализирани курсове за обучение за работа със софтуера. Данните за физико-химичните и фармакокинетични свойства на лекарствата необходими за изграждане на желаните симулации са сравнително малко и лесно могат да се набавят, което опростява работата със симулатора. *ADMEWORKS DDI* симулатора количествено прогнозира степента на лекарство-лекарство взаимодействията, произтичащи от съвместното им приложение чрез симулация на концентрации на всяко лекарство в организма чрез използване на физиологично базирани фармакокинетични (ФБФК) математически модели. Тъй като симулатора е способен единствено да определя тези взаимодействия в идеални условия, без да взема предвид особености на тестваната популация (пол, възраст, генетични особености и др.) и използваната лекарствена форма (пътища на въвеждане), той е подходящ за първоначална оценка на потенциала за взаимодействие на тестваното съединение в предклиничните тествания.

Използван от всички топ 10 световни фармацевтични компании, заедно с Американската агенция по храните и лекарствата (FDA) и други ключови регулаторни агенции, *SimCYP* симулатора е най-сложното решение в сектора за подпомагане на подбора на дозата и информиране на етикетиранието на продукта. Разработката на *SimCYP* симулатора започва с прости статични изчисления за лекарство-лекарство взаимодействия. След това се развиват

динамичните модели и минималния ФБФК модел, който впоследствие се разширява до пълен ФБФК модел. Той свързва *in vitro* данните с *in vivo* ADME (абсорбция, разпределение, метаболизъм и екскреция) и фармакокинетични/фармакодинамични (PK/PD) резултати, за да помогне за изследване на потенциални клинични сложности преди изследванията при хора и да подкрепи вземането на решения при разработването на лекарства. *SimCYP* симулатора може точно да прогнозира лекарство-лекарство взаимодействия в съответната популация от пациенти. Това се прави на две нива – прогнозиране на нетната промяна в експозицията и прогнозиране на промяната в пълната плазмена концентрация на лекарството – времеви профил. Популационно-базирания симулатор на *SimCYP* позволява на потребителите да идентифицират лица с най-голям риск от лекарство-лекарство взаимодействия на много ранен етап от разработването на лекарства. Способността да се използват множество субекти в симулацията, като по този начин се отчита променливото съдържание на техните лекарство-метаболизиращи ензими в човешката популация, е важна характеристика на *SimCYP*. Този популационен модел също позволява да се разгледат подгрупи от популацията, които са изложени на по-голям риск от клинично значими взаимодействия, за да се оцени дали имат ниво на риск, различно от останалата част от популацията (например, лоши метаболитатори, нарушена бъбречна функция). Освен това, възможността за въвеждане на ключови подробности за дизайна на клиничните проучвания и симулационните динамични концентрации са други предимства на *SimCYP* платформата. Трябва да се отбележи, че прогнозите със *SimCYP* изискват по-изчерпателни входни данни като физиохимични свойства, абсорбция, разпределение и елиминиране, за да бъдат направени точни прогнози.

3. Заключение

В заключение, от направените изчисления при използването на базисните, статичните и динамичните модели за оценка на лекарствени взаимодействия и приетите множество условия, можем да обобщим:

- Хранителни добавки на база *L.barbarum* трябва да се използват с повишено внимание при пациенти приемащи лекарства субстрати на CYP2C9. Съдържанието на полифеноли е отговорно за повишения риск от лекарствени взаимодействия, свързани с тази изоформа на цитохромите.
- Метилксантиновите фракции показаха нисък риск от лекарствени взаимодействия със субстрати на CYP3A4, от което следва, че не е необходимо, съгласно препоръките на регулаторните агенции, провеждане на клинични изследвания за тяхното проследяване и оценяване, ако след време се създаде лекарствена форма на база метилксантини и състава се доближава до този на изолираните фракции от *Банча* и *Пу-ер*.
- От олигопептидните аналози на ендоморфин-2, единствено при *Tyr-Pro-Phe(pF)-Phe-1,2-ethylenediamine* аналога, ако получи в бъдеще одобрение за използване в дози 100 mg или по-големи, ще има нужда от провеждане на клинични изследвания с цел определяне на риска от лекарствени взаимодействия със субстрати на CYP3A4. Разбира се,

симулациите са проведени с *in silico* данни генерирани от ADME-предикторни софтуери и ако в бъдеще се съберат такива от *in vivo* модели, ситуацията може да се промени, и ще бъдат необходими провеждането на нови такива.

В тази глава са илюстрирани единствено ситуации, в които са въввлечени предимно CYP2C9 и CYP3A4 изоформите на цитохромите, и фракциите и олигопептидите са оценени по отношения на техните потенциали да ги повлияват. Другите изоформи на цитохромите, като CYP1A2, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C19 и CYP2D6, глюкуронилтрансферази – UGT1A1 и UBT2B7, както и транспортни протеини, като P-gp, BCRP, OATP1B1, OATP1B3, OAT1, OAT3, OCT2, MATE1, MATE2-K, трябва да бъдат оценявани по същия начин, ако е доказан риск за настъпване на лекарствени взаимодействия.

Глава V. Проучване на фармакодинамични лекарствени взаимодействия

Задачата на настоящото изследване беше да се оцени комбинационния потенциал на селектираните растителни фракции с конвенционални противотуморни лекарства (като антрациклинови антибиотици, *doxorubicin*) *in vitro* върху здрави и неопластични клетъчни линии чрез най-често използваните методи за оценка на комбинационни фармакодинамични ефекти и да се сравнят получените резултати от тях.

С цел проучване на комбинационните фармакодинамичните взаимодействия, но този път не върху фармакологичния таргет, а върху органите свързани със странични ефекти при употреба на антрациклинови антибиотици (*doxorubicin*), втората задача беше да се оценят органопротективните ефекти на селектираните растителни фракции при модели на кардио- и нефротоксичност при плъхове предизвикани от приложение на *doxorubicin*.

1. Материали и методи

1.1. Клетъчни линии

- *BJ* – човешка кожна фибробластна клетъчна линия.
- *HT-29* – човешка колокарциномна клетъчна линия. Морфологично представлява адхерентни, епителоподобни клетки. Расте като монослой и на големи колонии.
- *MCF-10A* – нетуморна човешка епителиална клетъчна линия от гърда
- *MCF-7* – човешка клетъчна линия от рак на гърдата, положителна за естрогенови (ER⁺) и прогестеронови рецептори (PR⁺) и негативна по