

# Biološka aktivnost polifenola zelenog čaja u kombinaciji s antitumorskim lijekovima

---

**Barišić, Mihaela**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2020**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:433676>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-09**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



**Mihaela Barišić**

**Biološka aktivnost polifenola zelenog čaja u  
kombinaciji s antitumorskim lijekovima**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2020.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Dizajniranje novih lijekova Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za farmaceutsku kemiju pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Monike Barbarić.

*Zahvaljujem ponajprije svojoj mentorici, izv. prof. dr. sc. Moniki Barbarić, na strpljenju, pomoći te usmjeravanju pri pisanju ovog rada.*

*Najviše zahvaljujem svojim roditeljima i sestri na podršci i pomoći tijekom cijelog studija. Posebno zahvaljujem Nikolini i Andrei što su me uvijek motivirale i pomagale mi, ne samo na studiju, već i u svakodnevnim situacijama, uz vas je cijeli ovaj put bio jednostavniji. Veliko hvala Heleni, Mariji, Dariji i Klari na svim savjetima i ohrabrivanju, s vama su studentski dani bili lakši, ljepši i zabavniji.*

# SADRŽAJ

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. UVOD</b> .....  | <b>1</b>  |
| 1.1. Zeleni čaj.....  | 1         |
| 1.2. Tumori.....  | 4         |
| 1.3. Interakcije.....   | 5         |
| 1.4. Sinergizam.....  | 7         |
| <b>2. OBRAZLOŽENJE TEME</b> .....   | <b>9</b>  |
| <b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....   | <b>10</b> |
| <b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....  | <b>11</b> |
| 4.1. Osnovni modeli i mehanizmi – sinergizam na molekularnoj razini.....                              | 11        |
| 4.1.1. Jednostavna reakcijska shema za enzimsku inhibiciju.....                                       | 11        |
| 4.1.2. Michaelis-Menten kinetika.....   | 14        |
| 4.1.3. Receptori ionskih kanala kontrolirani ligandom .....   | 17        |
| 4.2. Mehanizmi i tehnike sinergijskog ispitivanja u složenim biomedicinskim slučajevima.....          | 23        |
| 4.2.1. Analiza srednjeg učinka .....  | 23        |
| 4.2.2. Indeks interakcije, metoda izobole i kombinirani indeks.....                                   | 25        |
| 4.2.3. Analiza površine odgovora.....   | 28        |
| 4.2.4. Praktična ograničenja .....  | 29        |
| 4.3. Granice sinergizma – potenciranje, koalizam, inercija, metaboličke smetnje .....                 | 31        |
| 4.4. Sinergizam kroz discipline .....   | 32        |
| 4.4.1. Sinergizam u toksikologiji .....   | 32        |
| 4.4.2. Sinergizam u epidemiologiji .....  | 33        |
| 4.4.3. Sinergizam u prehrani .....  | 33        |
| 4.5. Sinergizam polifenola zelenog čaja i kombinacije s lijekovima .....                              | 34        |
| 4.5.1. Biološka aktivnost polisaharida i polifenola iz oolong čaja na hepatocelularni karcinom.....   | 34        |
| 4.5.2. Biološka aktivnost polifenola čaja u kombinaciji s cisplatinom na stanice karcinoma dojke..... | 34        |

|   |           |
|---|-----------|
| 4.5.3. Biološka aktivnost epigalokatehin-3-galata u kombinaciji s cisplatinom na stanice karcinoma jajnika i stanice karcinoma žučnih puteva..... | 35        |
| 4.5.4. Biološka aktivnost epigalokatehin-3-galata i sulforafana na stanice karcinoma kolona .....   | 36        |
| 4.5.5. Biološka aktivnost polifenola čaja na stanice karcinoma usne šupljine.....   | 37        |
| 4.5.6. Biološka aktivnost polifenola čaja u kombinaciji s askorbinskom kiselinom na stanice adenokarcinoma pluća.....                             | 37        |
| 4.5.7. Biološka aktivnost polifenola čaja na stanice karcinoma dojke.....   | 38        |
| 4.5.8. Biološka aktivnost katehina zelenog čaja na stanice karcinoma želuca.....  | 39        |
| 4.5.9. Višestruka biološka aktivnost katehina u zelenom čaju na antifungalno djelovanje antimikotika protiv <i>Candida albicans</i> .....         | 39        |
| <b>5. ZAKLJUČAK.....</b>  | <b>40</b> |
| <b>6. LITERATURA .....</b>  | <b>42</b> |
| <b>7. SAŽETAK/SUMMARY .....</b>   | <b>49</b> |

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA / BASIC DOCUMENTATION CARD

## 1. UVOD

### 1.1. Zeleni čaj

Zeleni čaj proizvodi se iz lišća biljke *Camellia sinensis* L., grma porijeklom iz Azije (slika 1). Listovi tog zimzelenog tropskog grma su zašiljeni, kožasti i sjajni, bez mirisa, a na rubovima su nazubljeni. Cvjetovi su mu veliki, pojedinačni ili u manjim nakupinama, svijetloružičaste ili bijele boje, a mirišu poput jasmina, dok je plod drvenasti smeđi tobolac s tri sjemenke. Grmovi se sade u velikim čajnim vrtovima na visinama od 100 do 2000 m nadmorske visine. Mladi mekani izdanci daju najfiniji čaj, a beru se samo gornja dva lista i pupoljak. Vrsta čaja ovisi o načinu proizvodnje čajne biljke. Razlike u njihovom okusu, boji i mirisu posljedica su različitog stupnja djelovanja enzima prisutnih u listovima, poput polifenol oksidaze, peptidaze, alkohol dehidrogenaze i drugih. Ti enzimi omogućavaju kemijske promjene proteina, masnih kiselina, polifenola i drugih spojeva koje su odgovorne za razlike u organoleptičkim svojstvima pojedinih vrsta čaja. Na okus čaja može utjecati i mjesto uzgoja biljke ([www.inpharma.hr](http://www.inpharma.hr)).

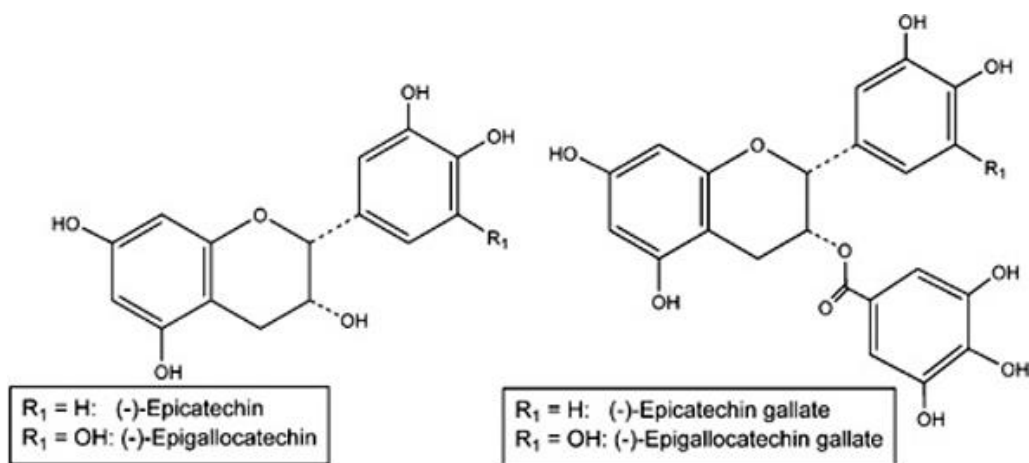
Svježi listovi biljke *Camellia sinensis* bogati su flavonoidima iz skupine katehina. Prilikom usitnjavanja lišća katehini dolaze u dodir s polifenol oksidazom koja katalizira reakciju njihovog spajanja u dimerne i polimerne oblike poznate kao teaflavini i tearubigini. Djelovanjem topline deaktivira se polifenol oksidaza i zaustavlja se proces oksidacije katehina.



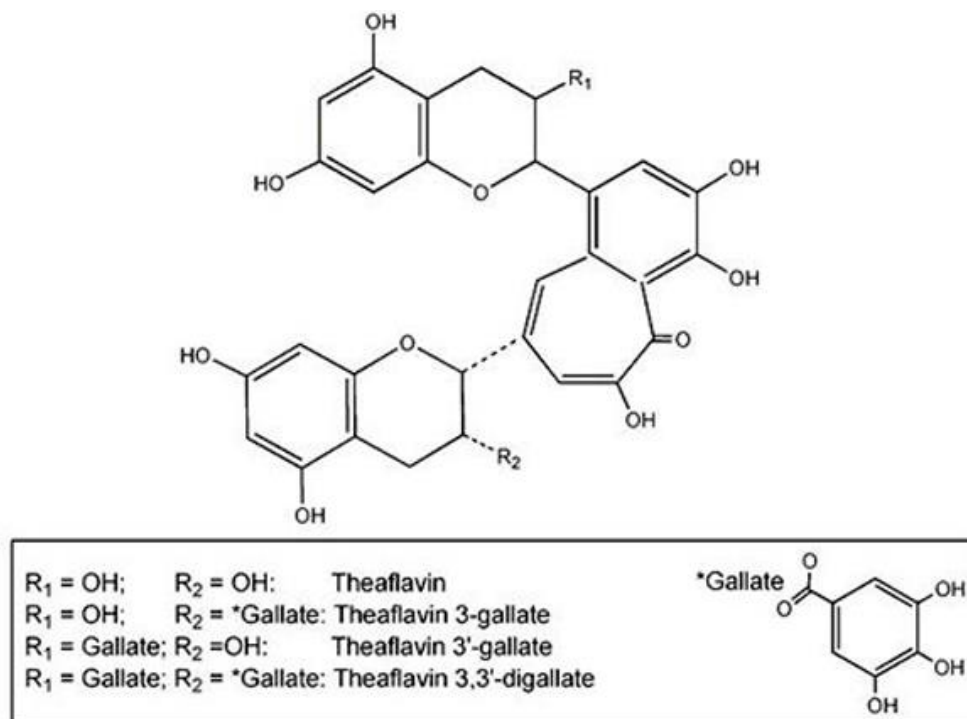
Slika 1. Grmlje biljke čajevca *Camellia sinensis* L. ([www.big-win.hr](http://www.big-win.hr))

Postoje različite vrste čaja, ali najčešće se dijeli u četiri glavne skupine: bijeli, zeleni, oolong i crni čaj. Skupine se temelje na različitim stupnjevima oksidacije katehina kojoj se podvrgavaju tijekom proizvodnje. Proizvodnja bijelog čaja započinje izlaganjem mladog lišća i pupoljaka povišenoj temperaturi kako bi se deaktivirala polifenol oksidaza, a zatim slijedi sušenje tih dijelova. U tom je postupku proces oksidacije katehina neznatan, a dobiveni čaj bogat je katehinima, a udio dimera i polimera je malen. Zeleni se čaj dobiva iz zrelijeg lišća koje, prije izlaganja povišenoj temperaturi, treba uvenuti. Zbog toga se i udio katehina u zelenom čaju razlikuje od onog u bijelom čaju. Oolong čaj se po svojim svojstvima, tj. stupnju fermentacije i udjelu katehina nalazi između zelenog i crnog čaja. Njegovi su listovi u vrijeme branja zreliji od onih koji se koriste u proizvodnji zelenog čaja. Listovi se nakon branja izlažu suncu, a nakon toga se pušta da uvenu. Listovi se zatim tresu i suše te se taj postupak ponavlja sve dok listovi ne pocrvene, a središnji dio ostane zelen. Žarenjem listova na visokoj temperaturi deaktivira se enzim i time se zaustavlja proces kada je postignuta željena razina oksidacije. Crni se čaj dobiva drobljenjem listova kako bi se dobila maksimalna interakcija katehina i polifenol oksidaze. Bogat je teaflavinima i tearubiginima jer u procesu njegovog dobivanja dolazi do potpune oksidacije katehina, ali udio monomernih katehina je nizak ([www.inpharma.hr](http://www.inpharma.hr)).

Zeleni čaj ima vrlo bogat i složen kemijski sastav. Do sada je poznato više od 300 njegovih sastavnica. Najznačajnije sastavnice su: kofein, polifenoli, B-vitamini i askorbinska kiselina, eterično ulje, proteini, klorofil, aminokiseline među kojima je i l-teanin, jedna od ključnih sastavnica u oblikovanju egzotičnog okusa zelenog čaja, a od minerala u znatnijoj količini sadrži samo fluor. Polifenoli su glavne sastavnice zelenog čaja. Većina polifenola zelenog čaja su flavanoli. Monomeri flavanola poznati su kao katehini i najznačajnije su biološki aktivne sastavnice zelenog čaja: (-)-epigalokatehin-3-galat (EGCG), (-)-epigalokatehin (EGC), (-)-epikatehin-3-galat (ECG), (-)-epikatehin (EC), (+)-galokatehin i (+)-katehin (slika 2). Najvažniji među njima je EGCG za koji je otkriveno da inhibira proliferaciju i inducira apoptozu u stanicama raka. On se u najvećoj količini nalazi u lisnim pupoljcima i prvim, najmlađim listićima, dok je udio EGCG-a u sušenim listovima 8-12%. Katehini se većinom nalaze u bijelom i zelenom čaju, dok u oolong i crnom čaju prevladavaju teaflavini (slika 3) i tearubigini. Važno mjesto imaju i flavonoli, među kojima su najzastupljeniji kemferol, kvercetin i mircetin ([www.inpharma.hr](http://www.inpharma.hr)).



Slika 2. Glavni katehini u zelenom čaju (www.inpharma.hr)



Slika 3. Teaflavini u zelenom čaju (www.inpharma.hr)

Zeleni je čaj drugo najviše konzumirano piće na svijetu, a u ljekovite se svrhe koristi već stoljećima. Listovi zelenog čaja manje su obrađeni od listova crnog čaja i sadrže bogate izvore antioksidansa koji štite stanice tijela od oštećenja i pomažu u smanjenju kardiovaskularnih bolesti, poput infarkta miokarda i moždanog udara. Prevenciji tih bolesti pridonosi i



djelotvornost sastavnica zelenog čaja u kontroli tjelesne mase, a zbog toga ga se često preporuča u mnogim dijetama za mršavljenje. Najvažniju ulogu u tome imaju katehini i kofein. Novija istraživanja pokazuju da zeleni čaj zbog l-teanina poboljšava koncentraciju i povećava sposobnost učenja, djeluje antagonistički na visoke koncentracije kofeina i time ublažava njegov negativan učinak, pogoduje sniženju krvnog tlaka i ublažava simptome PMS-a. Sinergističko djelovanje sastavnica zelenog čaja rezultira pozitivnim utjecajem na oralnu i crijevnu mikrofloru; smanjuje upalne procese i štiti DNA od oštećenja, inhibira rast *Streptococcus mutans*, bakterije koja se smatra glavnim uzročnikom krvarenja zubi, djeluje antivirusno i s duljim osvježavajućim učinkom od kave. Zeleni čaj osim što posjeduje antifungalna, antibakterijska i antivirusna djelovanja, također usporava i zaustavlja nastajanje nekih kancerogenih tvari u tijelu, kao što su nitrozamini, zbog čega se posebno preporuča konzumiranje tog napitka uz jelo. Pozitivni učinci zelenog čaja postižu se samo konzumiranjem umjerenih količina jer prekomjerni unos može izazvati negativne učinke na CNS i nadražiti sluznicu želuca. Negativni se učinci manifestiraju prilikom unošenja više od 300 mg kofeina, što odgovara otprilike 5 šalica čaja. Preporučenom dnevnom dozom od 3 šalice unosi se 240-320 mg polifenola ([www.inpharma.hr](http://www.inpharma.hr)).

## 1.2. Tumori

Tumor je naziv za patološku tvorbu nastalu kao posljedica prekomjernog i nekontroliranog umnažanja abnormalnih stanica čiji je rast nesvrhovit, nepravilan i neorganiziran. Takve novotvorine mogu biti dobroćudne i zloćudne. Zloćudne su agresivnijeg rasta te sklone metastaziranju i infiltriranju u druga tkiva. Ukoliko se taj proces ne kontrolira, razaranje okolnog tkiva može dovesti i do smrti. Postoji nekoliko načina liječenja tumora, a sam pristup ovisi o vrsti i lokalizaciji samog tumora. Tumorska oboljenja liječe se zračenjem (radioterapija), antitijelima (imunoterapija), genskom terapijom, primjenom hipertermije (zagrijavanje tumora), operacijom (fizičko uklanjanje), hormonskom terapijom i citostaticima (kemoterapija). Kemoterapijska sredstva ublažavaju simptome, mogu produljiti život i izliječiti bolesnika, ali njihovi glavni nedostaci su nuspojave (umor, crvenilo, iritacije, povraćanje, opadanje dlaka i dr.). Promjenom u strukturi spojeva biljnog porijekla i/ili već poznatih lijekova pokušavaju se razviti lijekovi dobre učinkovitosti s minimalnim nuspojavama (Vrdoljak i sur, 2013).

Polifenoli koji se nalaze u zelenom čaju mogu utjecati na povećanje aktivnosti enzima koji sprečavaju oksidacijske procese u organizmu, što pridonosi prevenciji nastanka karcinoma. Istraživanja provedena na životinjama pokazala su značajno povećane aktivnosti enzima koji kataliziraju antioksidativne i detoksikacijske procese u tankom crijevu, jetri i plućima (glutation peroksidaze, glutacion reduktaze, glutacion-S-transferaze, katalaze i kinon reduktaze). Danas je sve više dokaza o djelovanju zelenog čaja u prevenciji nekih vrsta karcinoma, najčešće u gastrointestinalnim traktu, plućima te estrogen ovisnim karcinomima. Studije su pokazale da redovito konzumiranje zelenog čaja smanjuje rizik od raka dojke, želuca, jednjaka, debelog crijeva i raka prostate ([www.inpharma.hr](http://www.inpharma.hr)).

### **1.3. Interakcije**

Interakcije lijekova odnose se na promjene učinka jednog lijeka zbog istovremenog uzimanja nekog drugog lijeka (lijelek-lijelek interakcija) ili hrane (hrana-lijelek interakcija). Osim drugih lijekova i hrane i razne druge tvari kao što su alkohol, pušenje, bolest i zagađivači okoliša mogu utjecati na učinke lijeka. Interakcije lijekova mogu pojačati ili smanjiti očekivane učinke, ali mogu i pojačati nuspojave. Posljedice klinički značajnih interakcija su: usporavanje ili ubrzavanje terapijskog učinka, smanjenje i/ili izostanak terapijskog učinka, povećanje terapijskog učinka, povećanje učestalosti i/ili intenziteta nuspojava, nastajanje novih nuspojava te intoksikacija. Interakcije su češće štetne i nepoželjne, ali mogu biti korisne i poželjne kao npr. kod liječenja hipertenzije, tuberkuloze, složenih infekcija ili bronhalne astme (Delafuente, 2003).

Interakcije s lijekovima razmatraju se prema mehanizmima uključenim u njihov nastanak. Mehanizmi interakcija dijele se na farmakodinamičke i farmakokinetičke, a postoje i kombinirane interakcije. Farmakokinetičke interakcije nastaju tijekom apsorpcije, raspodjele, metabolizma i izlučivanja lijeka iz tijela. Primjena antacida, koji mijenjaju pH u gastrointestinalnom traktu, rezultirat će smanjenjem apsorpcije nekih lijekova (npr. beta blokatora), dok će nekim lijekovima povećati bioraspoloživost (npr. levodopa). Hrana smanjuje apsorpciju antibiotika, poput penicilamina, doksiciklina, eritromicina, azitromicina, zbog čega ih treba uzimati najmanje 1 sat prije ili 2 sata nakon obroka. Tijekom raspodjele može doći do natjecanja za vezanje na proteine plazme, npr. salicilati istiskuju peroralne antikoagulanse i oralne antidijabetike s proteina plazme. Najčešće klinički značajne interakcije se događaju na razini metabolizma. Te interakcije obuhvaćaju inhibiciju i

indukciju mikrosomalnih enzima jetre. Najčešći inhibitori su: amiodaron, itrakonazol, ketokonazol, metronidazol, eritromicin, ciprofloksacin, cimetidin i verapamil. Inhibicijom enzima povećavaju plazma koncentraciju drugog lijeka koji se metabolizira istim enzimom. Induktori imaju suprotno djelovanje, a najčešći su: rifampicin, karbamazepin, fenitoin i fenobarbiton. Promjene se mogu dogoditi i kod izlučivanja lijeka urinom, npr. salicilati se reapsorbiraju u kiselom urinu, a barbiturati se bolje izlučuju u alkalnom. Kod farmakodinamičkih interakcija učinci jednog lijeka promijenjeni su zbog prisutnosti drugog lijeka na istom mjestu djelovanja. Farmakodinamičke interakcije dijele se na kompetitivni antagonizam, funkcionalni sinergizam i antagonizam na različitim receptorima, a dovode do istog ili suprotnog učinka. Primjeri za kompetitivni antagonizam su nalokson koji smanjuje učinak opijata i vitamin K koji smanjuje učinak oralnih antikoagulansa. U svakodnevnoj praksi važne su interakcije kardiotonika, primjerice tiazidi snižuju koncentraciju kalija i povećavaju učestalost aritmija. Pojava hiperkalijemije moguća je zbog istodobne primjene diuretika koji štede kalij i ACE inhibitora. Učinak antihipertenziva smanjen je uz istodobnu primjenu nesteroidnih protuupalnih lijekova. Amiodaron povećava koncentraciju varfarina što može uzrokovati opasna krvarenja (Delafuente, 2003).

Kombinirane interakcije nastaju kod primjene dvaju ili više lijekova koji i sami mogu imati toksični učinak na neki organ. Primjerice, istodobnom primjenom dva nefrotoksična lijeka može doći do oštećenja bubrega iako su primijenjeni u dozi koja nije dovoljna za izazivanje takvih oštećenja. Ponekad se namjerno propisuju dva slična lijeka kako bi se postigao bolji učinak (sinergizam). Tako liječnici često propisuju dva antihipertenziva osobama kojima se povišeni krvni tlak teško kontrolira. Također i u liječenju malignih bolesti kombinira se više lijekova radi boljeg učinka.

Biljni proizvodi također mogu uzrokovati kliničke značajne interakcije. Ginko biloba uz istodobnu primjenu acetilsalicilne kiseline i peroralnih antikoagulansa može uzrokovati krvarenja. Gospina trava stupa u interakcije s brojnim lijekovima (inhibitori HIV proteaze, antikongulzivi, inhibitori ponovne pohrane serotonina, triptani). Aktivne komponente soka od grejpa uzrokuju porast koncentracije mnogih lijekova, primjerice makrolidnih antibiotika, ciklosporina ili statina (Delafuente, 2003).

Stupnjevi kliničke značajnosti su: X-kontraindicirana primjena, D-nužna intervencija u propisanu terapiju, C-pojačan nadzor, intervencija prema potrebi, B-intervencija nije potrebna (nema dovoljno podataka), A-nema kliničke značajnosti (nema podataka).

Na pojavu interakcija lijekova utječu kemijska struktura i svojstva samog lijeka, broj istovremeno korištenih lijekova te pripadnost rizičnim skupinama. U rizične skupine spadaju bolesnici starije životne dobi, bolesnici s oštećenim funkcijama organa i s kroničnim bolestima. Kod osoba starije životne dobi česti su slučajevi komorbiditeta, istodobne primjene većeg broja lijekova te smanjene suradljivosti. Kod bolesnika koji uzimaju više lijekova treba obratiti pozornost na točnu anamnezu farmakoterapije, istodobno propisivati manje lijekova, misliti na korisne interakcije i iskoristavati ih, a nekorisne izbjegavati te misliti na to da bi interakcija mogla biti razlog nuspojave (Delafuente, 2003).

#### **1.4.Sinergizam**

Primjenom više lijekova istovremeno, lijekovi pokazuju određene oblike interakcije. Tri su moguća načina interakcije:

- bez interakcije - podrazumijeva jednostavno zbrajanje djelovanja lijekova bez međusobnog utjecaja,
- sinergizam - kombinacija lijekova daje veći rezultat od očekivanog i
- antagonizam - kombinacija rezultira manjim učinkom nego što je očekivano.

Navedene interakcije važan su aspekt farmakologije i biomedicine. Jedna od često korištenih vrsta interakcija je sinergizam. Izraz sinergizam dolazi iz grčke riječi *syn-ergos*, što u prijevodu znači "raditi zajedno"; interakcijom dvaju ili više agenasa nastaje kombinirani efekt koji je veći od zbroja pojedinačnih efekata svake tvari. Biološka aktivnost koja proizlazi iz sinergizma očituje se npr. u liječenju tumorskih oboljenja i infekcija gdje se kombiniraju niže doze više citotoksičnih lijekova kako bi se postigao bolji terapijski učinak s manje toksičnih nuspojava. Isto se primjenjuje i u izradi kombinacije antibiotika što kao dodatni pozitivni učinak ima i smanjenje razvoja rezistencije (Breitinger, 2012).

Sinergizam se može promatrati u jednostavnim sustavima - dva lijeka koja djeluju na jedan ciljni protein određenim mehanizmom pri čemu se djelovanje lijekova može pojačati. U složenijim sustavima, npr. kad bolesnik uzima više lijekova istovremeno potrebno je uzeti u obzir apsorpciju lijeka, raspodjelu po tkivima i klirens. Neki lijekovi ometaju metaboličke puteve drugih lijekova poput, smanjenja eliminacije pri čemu dolazi do povećanja koncentracije jednog od lijekova i njegovog duljeg zadržavanja u tijelu. Posljedično može doći do većeg terapijskog odgovora ili toksičnosti. Neke interakcije nisu predvidljive pa je važna provjera i oprez u kliničkoj praksi (Breitinger, 2012).

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Sinergizam lijekova i drugih tvari važan je u biomedicinskom svijetu. Mnoge se složene bolesti, posebno razna tumorska oboljenja liječe raznim „koktelima“ lijekova te razumijevanje interakcija tih lijekova postaje sve važnije za osiguravanje uspješnog liječenja. Tijekom posljednjih godina sve više se proučavaju i interakcije lijekova i sastavnica biljnog podrijetla. Tvari biljnog podrijetla mogu umanjiti učinak lijeka i dovesti do ozbiljnih nuspojava, a neke mogu doprinijeti u liječenju dajući pojačan terapijski učinak.

Zeleni čaj posjeduje antifungalno, antibakterijsko, antivirusno i antikancerogeno djelovanje. Sva ta svojstva čine je vrlo korisnom i zanimljivom biljkom za istraživanje te je sve više studija koje dokazuju njezin djelotvoran učinak, bilo da se koristi sama ili u kombinaciji s nekim lijekovima.

Cilj je ovog rada prikazati mehanizme i modele po kojima se interakcije proučavaju te kako sastavnice zelenog čaja djeluju u terapiji određenih bolesti i stanja, same ili u sinergizmu s određenim lijekovima.

### **3. MATERIJALI I METODE**

Za izradu ovog diplomskog rada proučavana je stručna i znanstvena literatura te članci s javno dostupnih internetskih stranica.

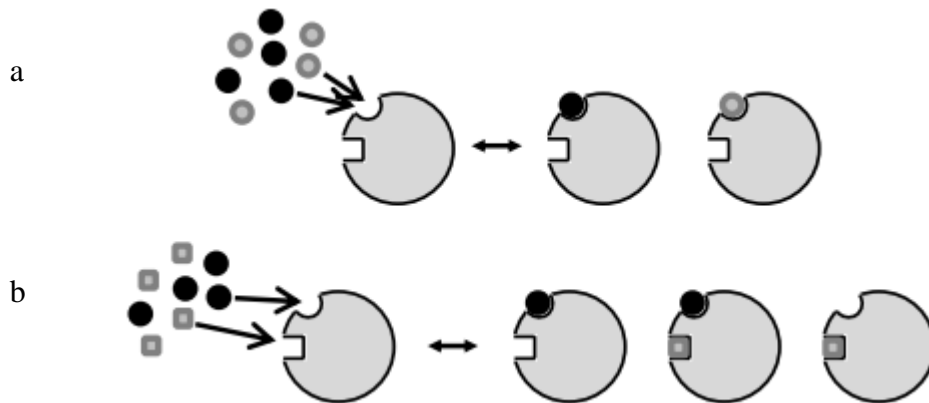
Pretraživana je znanstvena baza *Web of Science* prema ključnim riječima:  
synergy, tea polyphenols, combination, drug

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Osnovni modeli i mehanizmi – sinergizam na molekularnoj razini

#### 4.1.1. Jednostavna reakcijska shema za enzimsku inhibiciju

Enzim, uz aktivno mjesto na koje se veže supstrat, posjeduje i jedno ili više mjesta vezanja za inhibitore (slika 4a). Na koje će se mjesto inhibitor vezati ovisi o njegovoj vrsti. Kompetitivni se inhibitor veže na aktivno mjesto enzima, umjesto supstrata, a nekompetitivni na različito mjesto od aktivnog mjesta.



Slika 4. Princip inhibicije. a) kompetitivna inhibicija, b) nekompetitivna inhibicija (preuzeto iz Breitinger, 2012. i prilagođeno za potrebe rada)

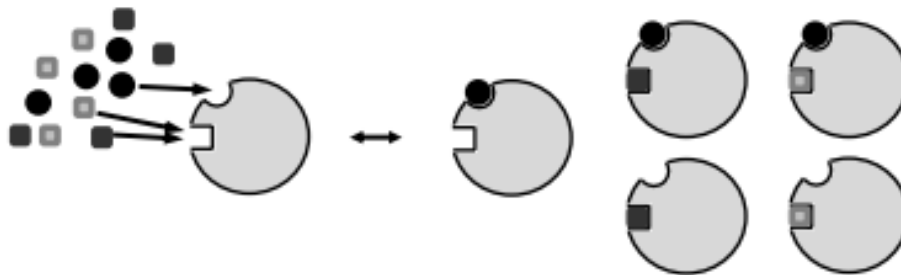
Prema definiciji kompetitivne inhibicije, inhibitor (svijetli krugovi) se veže na aktivno mjesto na enzimu na isto mjesto na koje se veže i supstrat (tamni krugovi). Stoga dva kompetitivna inhibitora ne mogu djelovati sinergistički na istom enzimu jer oba ne mogu biti vezana istovremeno.

Druga vrsta inhibicije je nekompetitivna inhibicija (slika 4b). Inhibitor (svijetli kvadrati) se veže na različito mjesto od aktivnog mjesta te ne utječe na vezivanje supstrata. Inhibitor



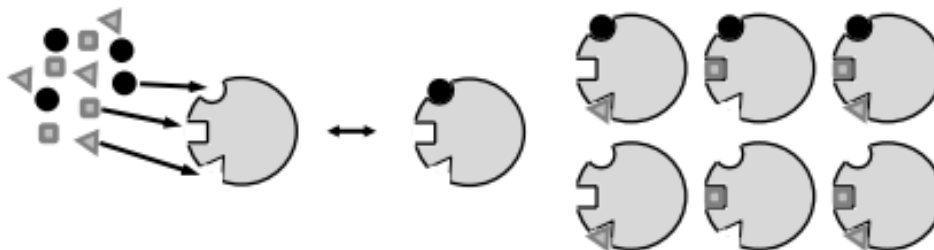
pretvara enzim u neaktivno stanje (nema stvaranja produkta), a prisutnost nekompetitivnog inhibitora smanjuje količinu aktivnih enzima.

Ako se dva nekompetitivna inhibitora (kvadratići) vežu na isto mjesto na enzimu, tada inhibitorno mjesto može biti zauzeto inhibitorima A ili B, ali ne u isto vrijeme (slika 5). To je slučaj međusobnog isključivanja dva inhibitora. Ako je prisutan jedan inhibitor te se doda drugi, prisutnost drugog inhibitora stvara pojačani inhibitorni učinak. To povećanje inhibicije je zbog aditivnosti, a ne sinergizma (Breitinger, 2012).



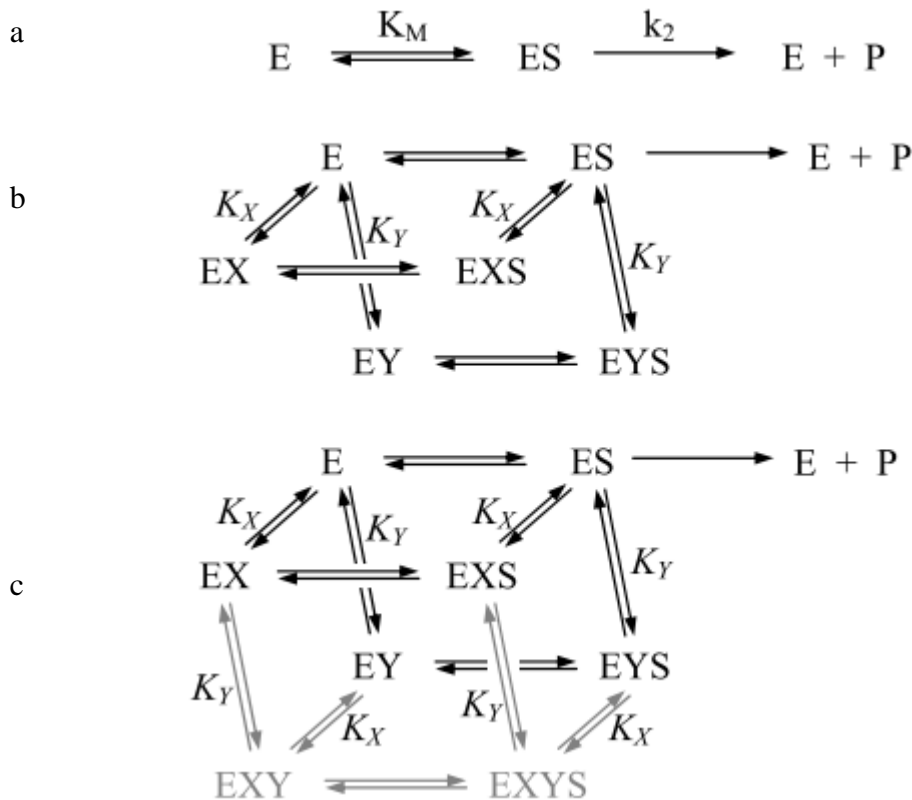
Slika 5. Princip dva nekompetitivna inhibitora koja se vežu na isto mjesto (preuzeto iz Breitinger, 2012)

Nekompetitivna inhibicija dva neisključiva inhibitora (kvadrat, trokut) odvija se kad se oni vežu na različita mjesta na ciljnom proteinu. Vezivanje jednog inhibitora tada ne sprječava vezanje drugog (slika 6). Prisutnost drugog inhibitora tada ne daje samo aditivni učinak, već i stvara dodatna inhibirana stanja.



Slika 6. Reakcijska shema za dva međusobno neisključiva kompetitivna inhibitora (preuzeto iz Breitinger, 2012)

Konstanta ravnoteže vezanja za inhibitor A ista je bilo da se A veže na enzim bez liganda ili na enzim koji ima supstrat i/ili vezani drugi inhibitor. S obzirom na ove pretpostavke, mehanizmi za aktivaciju (slika 7a) i nekompetitivnu inhibiciju (slika 7b, c) pokazuju različita stanja u kojima enzim postoji u prisutnosti dva nekompetitivna inhibitora koji se vežu na isto mjesto (slika 7b), ili na različita mjesta na enzimu (slika 7c).



Slika 7. Mehanizam katalize i nekompetitivne inhibicije enzima Michaelis-Menten kinetikom.

E = enzim, S = supstrat, P = produkt,  $K_M$  = Michaelisova konstanta,  $k_2$  = brzina stvaranja produkta od ES (preuzeto iz Breitinger, 2012)

Mehanizam aktivacije enzima koji slijedi Michaelis-Menten (MM) kinetiku prikazan je na slici 7a. Pojednostavljena MM kinetička shema koristi se pod pretpostavkom da nema povratne reakcije  $EP \rightarrow ES$ .

Na slici 7b prikazana je inhibicija enzima koji podliježu Michaelis-Menten kinetici s dva nekompetitivna inhibitora X i Y, koji se međusobno isključuju (vežu se na isto mjesto). Pretpostavlja se da je enzim s vezanim inhibitorom potpuno neaktivan, tj. ne tvori produkt. Inhibitor X ili Y može se vezati u bilo kojem trenutku, a prisutnost drugog inhibitora može samo pokazati aditivni učinak, ali nije sinergistički.

Inhibicija enzima koji podliježu Michaelis-Menten kinetici od strane dva nekompetitivna inhibitora X i Y, koji su međusobno neisključivi, tj. vežu se za različita mjesta na enzimu prikazana je na slici 7c. Ovdje se oba inhibitora mogu vezati istovremeno, što dovodi do sinergističke inhibicije (Breitinger, 2012).

#### 4.1.2. Michaelis-Menten kinetika

Da bi se ilustrirale posljedice međusobno isključivih i neisključivih inhibitora, koriste se najjednostavniji mehanizmi. Iz mehanizma enzima koji podliježu Michaelis-Menten kinetici (slika 7a) i zakona mase, proizlazi:

$$K_M = \frac{[E][S]}{[ES]} \rightarrow [ES] = \frac{[E][S]}{K_M} \quad (1)$$

Enzim E može postojati kao slobodni enzim E ili enzim-supstrat-kompleks ES. Ukupna koncentracija enzima je  $[E_{tot}]$ , a  $K_M$  je Michaelisova konstanta. Samo ES može tvoriti produkt, a maksimalna brzina stvaranja produkta je  $V_{max}$ .

$$[E_{tot}] = [E] + [ES] \quad (2)$$

$$V_{max} = k_2 [E_{tot}] \quad (3)$$

$V_0$ , stvarna brzina stvaranja produkta u određenoj koncentraciji supstrata ovisi o frakciji ES koja je prisutna u ravnoteži. Stoga se  $V_0$  može izraziti izrazima "brojnost" ili  $f_{ES}$ , što je udio enzima koji je prisutan u kompleksu enzim-supstrat (ES).

(4)

$$f_{ES} = \frac{[ES]}{[E] + [ES]}$$

(5)

$$V_0 = k_2 [ES] \rightarrow V_0 = V_{max} \frac{[ES]}{[E_{tot}]}, V_0 = V_{max} \frac{[ES]}{[E] + [ES]} = V_{max} f_{ES}$$

Ova jednadžba se lako pretvara u uobičajeni oblik Michaelis-Menten jednadžbu, ako se izraz za  $K_M$  (jednadžba 1) supstituira u jednadžbu 5.

(6)

$$V_0 = V_{\max} \frac{1}{1 + \frac{K_M}{S}}$$

U prisutnosti jednog nekompetitivnog inhibitora moguće su dodatne enzimске vrste (EX, EXS na slici 7b). Tada  $f_{ES}$  postaje:

(7)

$$f_{ES,X} = \frac{[ES]}{[E] + [ES] + [EX] + [EXS]}$$

Brzina stvaranja produkta u prisutnosti jednog nekompetitivnog inhibitora je:

(8)

$$V_{0,X} = V_{\max} \frac{1}{\left(1 + \frac{K_M}{S}\right) \left(1 + \frac{X}{K_X}\right)}$$

Za dva međusobno isključiva inhibitora X i Y (slika 7b), dobiva se:

(9)

$$V_{0,X,Y} = V_{\max} \frac{1}{\left(1 + \frac{K_M}{S}\right) \left(1 + \frac{X}{K_X} + \frac{Y}{K_Y}\right)}$$

A za dva međusobno neisključiva inhibitora (slika 7c) jednačba brzine je:

(10)

$$V_{0,X,Y} = V_{\max} \frac{1}{\left(1 + \frac{K_M}{S}\right) \left(1 + \frac{X}{K_X}\right) \left(1 + \frac{Y}{K_Y}\right)}$$

Postoji jednostavna tehnika za određivanje vrste inhibicije enzima pomoću dva inhibitora i je li njihovo djelovanje na enzim sinergističko. To se može odrediti iz omjera početne brzine u odsutnosti (kontrola,  $V_0$ ) i u prisutnosti inhibitora ( $V_{0,x}$ ).  $S_0$  je kontrolni signal, a  $S_x$  je signal dobiven u prisutnosti inhibitora.

(11)

$$\frac{S_0}{S_X} = \frac{V_0}{V_{0,X}} = \frac{V_{\max} \frac{1}{\left(1 + \frac{K_M}{S}\right)}}{V_{\max} \frac{1}{\left(1 + \frac{K_M}{S}\right) \left(1 + \frac{X}{K_X}\right)}} = \left(1 + \frac{X}{K_X}\right)$$

Dakle, ravna se linija dobiva kada je  $S_0/S_X$  crtano naspram  $[X]$  (raznovrsna koncentracija inhibitora X), a nagib te linije daje inhibicijsku konstantu  $K_X$ .

Dobiveni graf linearan je u cijelom rasponu koncentracije inhibitora. U slučaju dva međusobno isključiva inhibitora, omjer postaje:

(12)

$$\frac{S_0}{S_{X,Y}} = \frac{V_0}{V_{0,X,Y}} = \frac{V_{\max} \frac{1}{\left(1 + \frac{K_M}{S}\right)}}{V_{\max} \frac{1}{\left(1 + \frac{K_M}{S}\right) \left(1 + \frac{X}{K_X}\right) \left(1 + \frac{Y}{K_Y}\right)}} = \left(1 + \frac{X}{K_X} + \frac{Y}{K_Y}\right)$$

Prisutnost drugog inhibitora rezultira samo dodatnim izrazom  $(Y/K_Y)$  koji pomiče  $S_0/S_{X,Y}$  krivulju prema gore. Ovaj izraz označava aditivnost dva inhibitora, ali inhibitorna snaga (nagib krivulje) se ne mijenja (Breitinger, 2012).

Za dva međusobno neisključiva inhibitora, omjer je:

(13)

$$\frac{S_0}{S_{X,Y}} = \frac{V_0}{V_{0,X,Y}} = \frac{V_{\max} \frac{1}{\left(1 + \frac{K_M}{S}\right)}}{V_{\max} \frac{1}{\left(1 + \frac{K_M}{S}\right) \left(1 + \frac{X}{K_X}\right) \left(1 + \frac{Y}{K_Y}\right)}} = \left(1 + \frac{X}{K_X}\right) \left(1 + \frac{Y}{K_Y}\right)$$

Razlika između međusobno isključivih i neisključivih inhibitora može se izravno uočiti iz eksperimenta u kojem je koncentracija inhibitora X konstantna, a koncentracija inhibitora Y se mijenja. Jednadžba 13 se može preurediti u:

$$\frac{S_0}{S_{X,Y}} = 1 + \frac{X}{K_X} + \frac{Y}{K_Y} \left( 1 + \frac{X}{K_X} \right)$$

U slučaju međusobno isključivih inhibitora, krivulja  $S_0/S_{X,Y}$  je pomaknuta. Y je pomaknut prema gore konstantnom koncentracijom od X, a nagib krivulje se također povećava za faktor  $(1 + X / K_X)$ . Ova metoda omjera odnosi se na najjednostavniji slučaj sinergijskog djelovanja lijekova. Potrebno je prikupiti osnovne podatke o farmakokinetici lijeka iz kojih se dobije graf iz kojeg se brzo i jednostavno može provjeriti djeluju li dvije tvari tj., dva lijeka na isto mjesto na enzimu ili različito, odnosno mogu li djelovati sinergistički ili ne. Potrebno je otkriti imaju li dvije krivulje isti nagib (međusobno isključivo vezanje, aditivni učinak) ili različite nagibe (međusobno neisključivo vezanje, sinergizam). Za postizanje te razlike potrebni su kvalitetni podaci koji se dobivaju iz eksperimenta i analize podataka (Breitinger, 2012).

Ovaj način daje dva važna podatka:

1. Vrijednost  $K_X$ , konstanta inhibicije, nije promijenjena ako su samo dva inhibitora aditivna, i smanjuje se ( $\sim$  veća inhibicijska moć) u prisutnosti drugog inhibitora.
2. Potvrdu vežu li se dva inhibitora na isto ili na različita mjesta na enzimu. To može biti važan rezultat za razvoj lijeka, a dobiva se bez strukturnih podataka. Rezultat samo govori je li vezanje dva inhibitora uzajamno isključivo ili neisključivo.

Metoda je izvorno predstavljena za ionske kanale kontrolirane ligandima (Karpen i sur., 1982; Karpen i Hess, 1986), a kasnije je korištena za proučavanje djelovanja više inhibitora na ionske kanale (Karpen i sur., 1982; Karpen i Hess, 1986; Breitinger i sur., 2001; Raafat i sur., 2010).

Ovaj osnovni mehanizam nije dovoljan da opiše multimerne enzime, enzime koji zahtijevaju kofaktore i različite načine inhibicije. Proučavani su složeniji mehanizmi inhibicije enzima koji podliježu Michaelis-Menten kinetici, uključujući i one gdje nekoliko inhibitora djeluju na jedan enzim (Palatini, 1983).

#### **4.1.3. Receptori ionskih kanala kontrolirani ligandom**

Ionski kanali kontrolirani ligandima glavni su posrednici brzog sinaptičkog prijenosa između živčanih stanica i u neuromuskularnom čvoru. U usporedbi s enzimima koji prate Michaelis-Menten kinetiku, njihov mehanizam aktivacije je složeniji. Prvi korak aktivacije ionskog kanala je vezanje aktivirajućeg liganda, odnosno neurotransmitera. Ovisno o tipu receptora

potrebno je više od jedne molekule liganda. Vezanje liganda izaziva konformacijsku promjenu receptora koji se iz zatvorenog stanja pretvara u otvoreno koje onda provodi ione (slika 8a) (Hess, 1993; Colquhoun, 1998).

Signal u ovom slučaju nije brzina stvaranja proizvoda, već ionska struja, odnosno brzina translokacije iona kroz otvoreni kanal. Pod pretpostavkom stalnog transmembranskog napona i samo jednog vodljivog stanja (tj. samo jedna veličina kanala), tada bi promatrani  $S_L$  signal bio:

$$S_L = I_L = n_{Ch} J_{ion} \quad (15)$$

gdje je  $I_L$  promatračka struja,  $n_{Ch}$  je broj otvorenih kanala, a  $J_{ion}$  je brzina translokacije iona. Signal maksimalne struje promatrao bi se ako bi svi ionski kanali bili otvoreni u isto vrijeme.  $F_{open}$ , koji predstavlja udio otvorenih kanala, tada bi bio jednak 1.

$$S_{max} = I_{max} F_{open} \quad (16)$$

Pod pretpostavkom da samo receptori s dva vezana liganda mogu prolaziti prijelazni otvor (slika 8a), frakcija otvorenih kanala može se izraziti kao:

$$F_{open} = \frac{[RL_2(open)]}{[R] + 2[RL] + [RL_2] + [RL_2(open)]} \quad (17)$$

Pomoću zakona o masi, može se definirati:

$$K_D = 2 \frac{[R][L]}{[RL]} \quad (18)$$

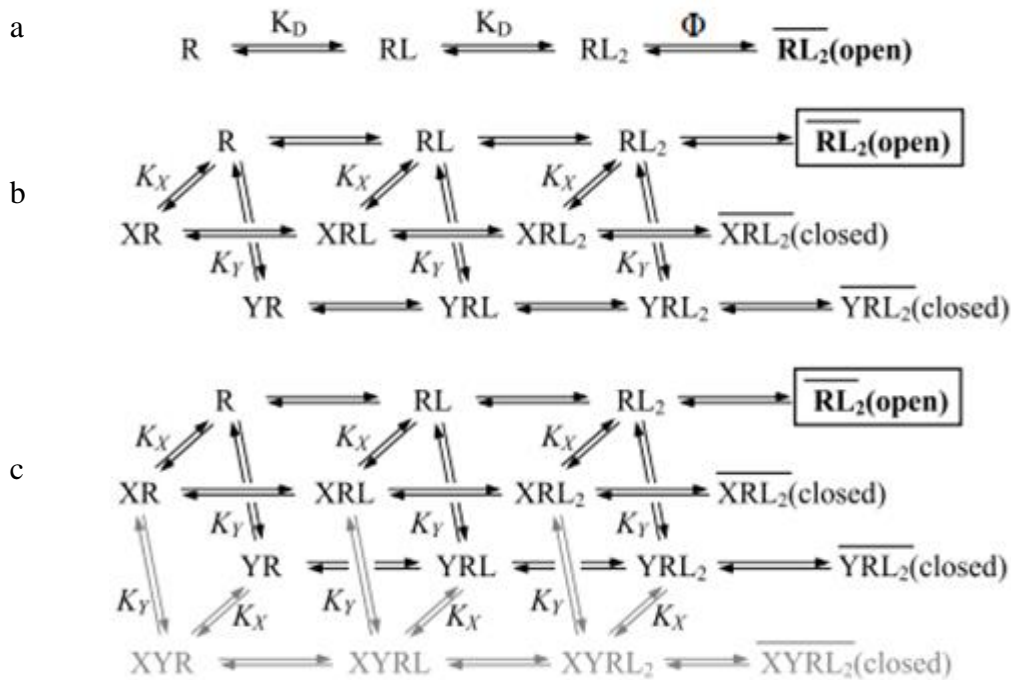
$$K_D = \frac{[RL][L]}{[RL_2]} \quad (19)$$

$$\phi = \frac{[RL_2]}{[RL_2(open)]} \quad (20)$$

i zatim dobiti:

(21)

$$S_0 = I_{\max} F_{\text{open}} = I_{\max} \frac{1}{\left(\frac{K_D}{L} + 1\right)^2 \phi + 1}$$



Slika 8. Mehhanizmi aktivacije i nekompetitivne inhibicije receptora ionskih kanala (preuzeto iz Breitinger, 2012)

Za aktivaciju ionskog kanala kontroliranog ligandom potrebna su dva osnovna koraka, vezanje liganda (disocijacija, konstantna  $K_D$ ) i konformacijska promjena u otvoreno stanje (ravnoteža otvorenog-zatvorenog stanja  $\phi$ ). R = receptor, L = aktivirajući ligand. U ovom primjeru potrebno je vezanje dvije molekule liganda za otvaranje kanala (slika 8a).

Mehanizam inhibicije receptora ionskog kanala od strane dva nekompetitivna inhibitora X i Y koji su međusobno isključivi (vežu se na isto mjesto) prikazan je na slici 8b. Inhibitor X ili Y može se vezati u bilo kojem trenutku, a prisutnost drugog inhibitora može samo pojačati učinak, ali nije sinergističan.



Mehanizam inhibicije receptora ionskog kanala od strane dva nekompetitivna inhibitora X i Y koji su međusobno neisključivi (vežu se na različita mjesta na receptoru) prikazan je na slici 8c. Vežanje dva međusobno neisključiva inhibitora daje sinergistički učinak.

U prisutnosti jednog nekompetitivnog inhibitora X, dobiva se jednačba za signal  $S_X$ :

(22)

$$S_X = I_{\max} \frac{1}{\left[ \left( \frac{K_D}{L} + 1 \right)^2 \phi + 1 \right] \left( 1 + \frac{X}{K_X} \right)}$$

gdje je  $K_X$  konstanta inhibicije,  $L$  je koncentracija aktivirajućeg liganda, a  $X$  je koncentracija inhibitora. Lako se mogu izračunati omjeri kontrolnog signala i signala u prisustvu inhibitora:

(23)

$$\frac{S_0}{S_X} = \frac{I_{\max} \frac{1}{\left[ \left( \frac{K_D}{L} + 1 \right)^2 \phi + 1 \right]}}{I_{\max} \frac{1}{\left[ \left( \frac{K_D}{L} + 1 \right)^2 \phi + 1 \right] \left( 1 + \frac{X}{K_X} \right)}} = 1 + \frac{X}{K_X}$$

U slučaju kada se dva inhibitora vežu na isto mjesto omjer postaje:

(24)

$$\frac{S_0}{S_{X,Y}} = 1 + \frac{X}{K_X} + \frac{Y}{K_Y}$$

A za dva inhibitora koja ciljaju različita mjesta na receptoru, omjer signala je:

(25)

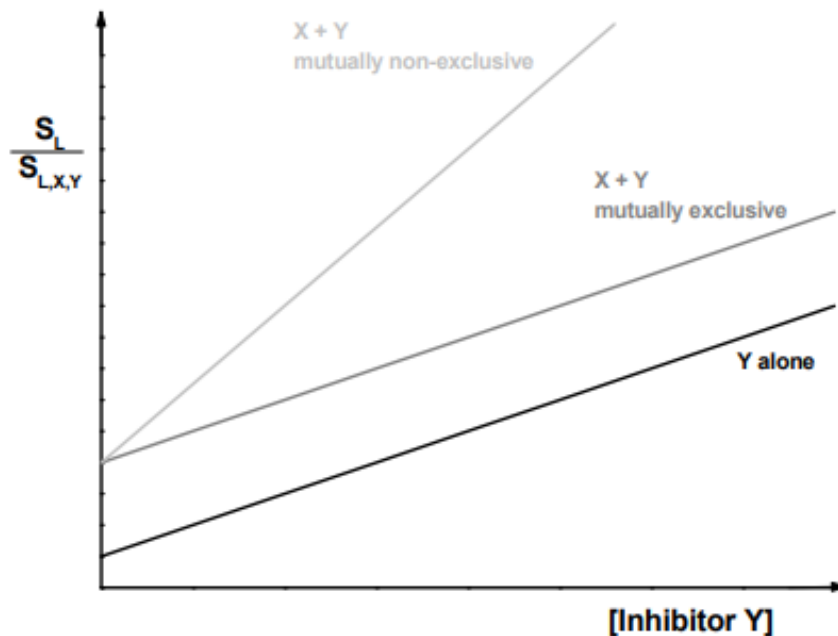
$$\frac{S_0}{S_{X,Y}} = 1 + \frac{X}{K_X} + \frac{Y}{K_Y} + \left( 1 + \frac{X}{K_X} \right)$$

Jednačbe 23 - 25 identične su jednačbama 11-14.

Kao i kod Michaelis-Menten kinetike, dobiva se linearni sustav jednačbi koje opisuju djelovanje jednog ili dva inhibitora na receptore ionskih kanala. Ako se koncentracija inhibitora X drži konstantnom, a koncentracija drugog inhibitora Y je promjenjiva, omjer

$S_0/S_{X,Y}$  pomiče se za konstantnu količinu  $X/K_X$ , ali nagib ( $1/K_Y$ ) je nepromijenjen. Nagib krivulje predstavlja inhibicijsku snagu i stalni pomak prema gore nastaje zbog aditivnog učinka dva međusobno isključiva inhibitora (Breitinger, 2012).

U prisutnosti dva međusobno neisključiva inhibitora, nagib (tj. inhibicijska snaga) je uvećan za faktor  $(1 + X/K_X)$ . Uzimanjem omjera kontrolnih i inhibiranih signala dolazi se do jednadžbe koja postaje neovisna o mehanizmu i odgovara glavnim jednadžbama koje se koriste za opisivanje interakcije lijeka. Metoda omjera rezultira jednostavnim grafom koji opisuje vrstu zajedničkog djelovanja dvaju inhibitora na enzim, neurotransmiterski receptor ili opću metu proteina (slika 9).



Slika 9. Graf metode omjera (preuzeto iz Breitinger, 2012)

Graf prikazuje omjer signala  $S_0/S_{X,Y}$  u odnosu na koncentraciju inhibitora za slučaj jednog inhibitora (crna krivulja), dva međusobno isključiva inhibitora (siva krivulja) i dva međusobno neisključiva inhibitora (svijetlosiva krivulja). U slučaju međusobno neisključivih inhibitora inhibicijska sposobnost inhibitora Y povećava se u prisutnosti inhibitora X (Breitinger, 2012).

Kada se radi o složenijim sustavima, analize utemeljene na mehanizmima više nisu izvedive, nego su potrebni općenitiji opisi interakcije lijekova. Jednadžba 25 tada se može preurediti u oblik:

$$\frac{S_0}{S_{X,Y}} = 1 + \frac{X}{K_X} + \frac{Y}{K_Y} + \frac{X \cdot Y}{K_X K_Y} \quad (26)$$

Ova jednadžba slična je općoj jednadžbi koja opisuje zajedničko djelovanje dva lijeka na određenom cilju ili biokemijskom procesu (Greco i sur. 1995).

$$1 = \frac{D_1}{ID_{X,1}} + \frac{D_2}{ID_{X,2}} + f\left(\frac{D_1}{ID_{X,1}}, \frac{D_2}{ID_{X,2}}, \alpha, p\right) \quad (27)$$

Ovdje su D1 i D2 koncentracije lijeka 1 i 2 u smjesi; ID<sub>X,1</sub> i ID<sub>X,2</sub> su koncentracije koje proizvode određeni učinak (odgovara EC<sub>50</sub> ili IC<sub>50</sub> vrijednostima); α je parametar za sinergizam/antagonizam, a p predstavlja dodatne parametre koji opisuju interakcije dva lijeka. Gore navedeni modeli su najjednostavniji pristup sinergizmu između lijekova. U fiziološkim uvjetima prisutnost nekog lijeka uvijek će rezultirati promijenjenom metabolizma i tako će utjecati na druge lijekove (Gessner 1974).

U biomedicinskom modeliranju, alternativni je pristup korištenje opisa aktivnosti bez mehanizma, kao što je aktivnost enzima, funkcija ionskih kanala, propusnost cijelog biokemijskog puta ili čak preživljavanje stanica u ispitivanjima toksičnosti. Najčešći je pristup upotreba logističkih jednadžbi koje jednostavno povezuju koncentraciju efektor (agonist ili inhibitor) na izmjereni učinak (enzimska aktivnost, stvaranje proizvoda, opstanak stanica).

Najčešće korišteni formalizam je Hillova jednadžba:

$$E_0 = E_{\max} \frac{1}{1 + \left(\frac{EC_{50}}{L}\right)^n} \quad (28)$$

Ovdje je E<sub>0</sub> promatrani učinak, E<sub>max</sub> je maksimalni signal, EC<sub>50</sub> koncentracija liganda L koji proizvodi 50% maksimalnog odgovora, a n je koeficijent koji definira nagib krivulje doza -

odgovor. Sličnost s Michaelis-Menten kinetikom je vidljiva, ali logistički formalizam nije baziran na bilo kojem mehanizmu (Breitinger, 2012).

#### **4.2. Mehanizmi i tehnike sinergijskog ispitivanja u složenim biomedicinskim slučajevima**

Mehanizmi aktivacije enzima ili receptora su kompleksni. Medicinska intervencija nije usmjerena samo na pojedinačne proteine nego i na cijele putove i upravljačke strukture, poput faktora transkripcije, koje pokreću ili kontroliraju biokemijske procese. Neke terapije, poput kemoterapije raka, imaju cilj uništavanje stanica, tj. interferiraju s cijelim živim organizmom. U većini ovih situacija mehanizmi djelovanja nisu poznati ili su previše složeni da bi se moglo raditi s njima. Dodatni je problem što se s povećanjem složenosti biološkog sustava pronalazi sve jači nedostatak eksperimentalnih podataka. Čak i jednostavna krivulja doza-odgovor donosi značajnu pogrešku. Za opisivanje eksperimentalnih podataka treba odabrati najjednostavniji mogući mehanizam. Složene kliničke situacije zahtijevaju uporabu modela bez mehanizama za analizu interakcije lijeka (Chou, 1976; Berenbaum, 1978; Berenbaum, 1980; Chou i Talalay, 1981; Berenbaum, 1989; Tallarida, 1992; Greco i sur. 1995).

##### **4.2.1. Analiza srednjeg učinka**

Chou i sur. izveli su jednadžbu srednjeg učinka koja proizlazi iz detaljne izvedbe enzimskog Michaelis-Menten mehanizma (Chou, 1976; Chou i Talalay, 1977; Chou i Talalay, 1981; Chou, 2006)

(29)

$$\frac{d}{M} = \frac{E_d}{1-E_d}$$

gdje je  $d$  doza lijeka,  $E_d$  učinak uzrokovan ovom količinom lijeka,  $M$  srednja doza (doza koja izaziva 50% učinka, tj.  $EC_{50}$  ili  $IC_{50}$ ). Preuređenjem Michaelis-Mentenove jednadžbe 6 dobiva se:

(30)

$$\frac{[S]}{K_M} = \frac{\frac{V_0}{V_{\max}}}{1 - \frac{V_0}{V_{\max}}}$$

Ovdje je [S] koncentracija supstrata koja daje promatrani  $V_0$ ,  $K_M$  je Michaelisova konstanta, a omjer  $V_0/V_{\max}$  je efekt uzrokovan [S], izražen ovdje kao frakcijska brzina. Jednadžba srednjeg učinka predložena je kao središnja jednadžba iz koje se mogu izvesti osnovni skupovi jednadžbi Henderson-Hasselbalch, Scatchard, Hill i Michaelis-Menten (Chou, 2006; Chou, 2010). Jednadžba srednjeg učinka izvedena je matematičkom analizom iz enzima koji podliježe Michaelis-Menten kinetici. Jednadžba se može proširiti i na složenije sustave (Chou, 2006)

(31)

$$\frac{E_d}{1-E_d} = \left(\frac{d}{M}\right)^n$$

gdje je  $n$  konstanta koja daje nagib krivulje doza-odgovor.

Jednadžba se može izraziti i u obliku:

(32)

$$\frac{f_A}{f_{UA}} = \left(\frac{d}{M}\right)^n$$

gdje  $f_A$  i  $f_{UA}$  predstavljaju frakcije zahvaćenog i nezahvaćenog enzima. Važnost jednadžbe srednjeg učinka je ta što se sastoji od omjera učinaka ( $E_d$ ,  $(1-E_d)$ ,  $f_A$  i  $f_{UA}$ ) i omjera doze (stvarna doza  $d$ , srednja doza  $M$ ). Iako je izvedena iz mehaničke analize, jednadžba srednjeg učinka poništava konstante specifične za mehanizam te samo povezuje dozu i učinak. To je čini vrlo važnim alatom za analizu složenih sustava. Jednadžba srednjeg učinka može se linearizirati uzimajući logaritme na obje strane, dajući Hill graf (Berenbaum, 1989) koji je ravna crta.

(33)

$$\log \left[ \frac{f_A}{f_{UA}} \right] = n(\log d - \log M)$$

Jednadžbe srednjeg učinka mogu se smatrati izuzetno korisnim preuređenim oblikom krivulja doza-odgovor, povezujući omjere doze lijeka s omjerima opaženih učinaka. Jednadžba srednjeg učinka radiće i s jednadžbama baziranim na mehanizmu (npr. Michaelis-Menten) i

s jednadžbama baziranim na efektu (npr. logističke). Razvijeni su i softverski paketi (CompuSyn ands CalcuSyn) koji omogućuju pouzdano testiranje parametara interakcije lijekova (Chou, 2002; Chou, 2006; Chou, 2010).

#### 4.2.2. Indeks interakcije, metoda izobole i kombinirani indeks

Interakcija dva ili više lijekova za stvaranje kombiniranog učinka može se opisati indeksom interakcije I (Berenbaum, 1977).

$$I = \frac{D_1}{ID_{X,1}} + \frac{D_2}{ID_{X,2}} \quad (34)$$

Jednadžba se može zapisati i u obliku:

$$I = \frac{d_1}{M_1} + \frac{d_2}{M_2} \quad (35)$$

gdje su  $D_1$ ,  $D_2$   $d_1$  i  $d_2$  koncentracije lijeka 1 i 2 koje daju određeni učinak ako se primjenjuju zajedno;  $ID_{X,1}$ ,  $ID_{X,2}$ ,  $M_1$  i  $M_2$  su koncentracije koje daju isti učinak ako se daju same. Na primjer, ako želimo 50% inhibicije, tada bi jednadžba 34 bila:

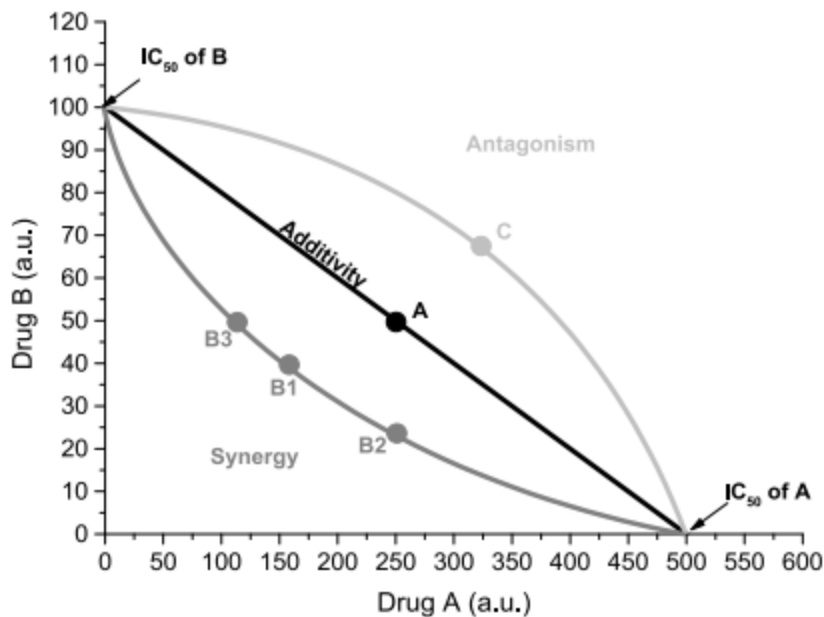
$$I = \frac{D_1}{IC_{50,1}} + \frac{D_2}{IC_{50,2}} \quad (36)$$

Ovdje su  $IC_{50,1}$  i  $IC_{50,2}$  vrijednosti  $IC_{50}$  za lijek 1 i lijek 2 kada se primjenjuju sami.  $D_1$  i  $D_2$  su doze lijeka 1, odnosno 2, koje također proizvode 50% inhibicije kada se primjenjuju zajedno. Indeks interakcije, koji je predložio Berenbaum (Berenbaum, 1977), trebao bi biti konstantan u slučaju kada nema interakcije. Berenbaum (Berenbaum, 1985) metodu je proširio i razvio u opću metodu koja se temelji na analizi svakog pojedinog lijeka, a zatim simulira kombinirano djelovanje oba lijeka na temelju Loewe aditivnosti (Greco i sur., 1995).

Indeks interakcije u osnovi je jednog od najčešće korištenih grafičkih prikaza sinergizma i antagonizma lijekova, izobolograma. Najčešća metoda kvantitativne procjene neobičnih interakcija između agonističkih lijekova je metoda izobola. To je grafički postupak koji je

uveo i razvio Loewe (Loewe, 1953). Izobole je prvi koristio Fraser 1870. godine kao jednostavnu ilustraciju bez matematičkog izvoda (Breitinger, 2012).

Ovdje doze lijekova A i B daju apscisu i ordinatu, odnosno učinak kombinacije lijekova prikazan je kao graf (slika 10). U primjeru (slika 10), prikazani učinak je za 50% inhibiciju enzima. Učinci svakog pojedinog lijeka (tj.  $IC_{50}$ ) mogu se iščitati s apcise i ordinate. Izobologram pokazuje učinak, poput  $IC_{50}$  ( $IC_{10}$  ili  $IC_{80}$ , koji god je učinak od interesa) i koja je koncentracija lijeka potrebna za postizanje tog učinka.



Slika 10. Izobologram (preuzeto iz Breitinger, 2012)

Na apscisi i ordinati su koncentracije lijekova A i B. Čvrsta crna linija povezuje koncentracije koje proizvode isti učinak na ciljani protein, enzim ili sustav. U ovom primjeru dana je linija  $IC_{50}$ . Lijek A ima  $IC_{50}$  (koncentracija daje 50% inhibicije) od 500 a.u. (proizvoljne jedinice),  $IC_{50}$  lijeka B je 100 a.u. Aditivnost (crna linija), kombinacija 250 a.u. od A sa 50 a.u. od B također treba dati 50% inhibicije (točka A). Ako se postigne 50% inhibicije u nižim koncentracijama dvaju lijekova (npr. 150 a.u. A i 40 a.u. B - točka B1), lijekovi bi pokazali sinergizam. Ako bi promatrana inhibicija kombinacijom bila manja od 50%, lijekovi A i B reagirali bi na antagonistički način (točka C). Siva linija pokazuje sinergizam, a svjetlo siva antagonizam. U slučaju sinergije dva lijeka,  $IC_{50}$  krivulja nije ravna linija, već konkavna prema gore (siva linija), a i u slučaju antagonizma linija je konkavna prema dolje (svjetlosiva linija). Izobologram vrijedi samo za lijekove čiji se učinci međusobno isključuju (Chou i Talalay, 1983).

Jednadžbe 34 - 36 definiraju ravne linije za dva lijeka koja ne pokazuju nikakvu interakciju. Očekuje se da će dva lijeka koja pokazuju aditivnost pasti na liniju aditivnosti (slika 10). Ako dva lijeka djeluju sinergistički, potrebne su niže koncentracije u smjesi da se postigne isti učinak. Njihov kombinirani graf bio bi konkavan prema gore (siva linija na slici 10), prateći nejednakost:

(37)

$$\frac{D_1}{ID_{X,1}} + \frac{D_2}{ID_{X,2}} < 1$$

Suprotno tome, dva antagonistička lijeka će trebati veće doze u kombinaciji da bi postigli isti učinak:

(38)

$$\frac{D_1}{ID_{X,1}} + \frac{D_2}{ID_{X,2}} > 1$$

Predstavljajući oblik jednadžbe srednjeg učinka, izobole su postale korisne za predstavljanje složenih načina interakcije lijekova. Ovisno o oblicima krivulja doza-odgovor oba lijeka, izobole ne moraju biti linearne (Greco i sur., 1995).

Jednadžbe 34 i 35 primjenjuju se za slučaj Loewe aditivnosti, gdje dva lijeka ne pokazuju sinergiju ili antagonizam. Za lijekove koji pokazuju bilo koju vrstu interakcije, jednadžba 34 je proširena kako bi se definirao kombinirani indeks (CI), što pokazuje vrstu i količinu interakcije između dva (ili više) lijeka s obzirom na eksperimentalni parametar koji se proučava (Chou i Talalay, 1983).

Za aditivnost vrijedi:

(39)

$$CI = \frac{D_1}{ID_{X,1}} + \frac{D_2}{ID_{X,2}} = 1$$

Za antagonizam vrijedi  $CI > 1$ , a za sinergizam  $CI < 1$ .

CI vrijednost za antagonizam može biti između 1 i beskonačnosti, a za sinergiju između 0 i 1. Chou i Chou uveli su indeks smanjenja doze DRI (Chou i Chou, 1988), koji se temelji na

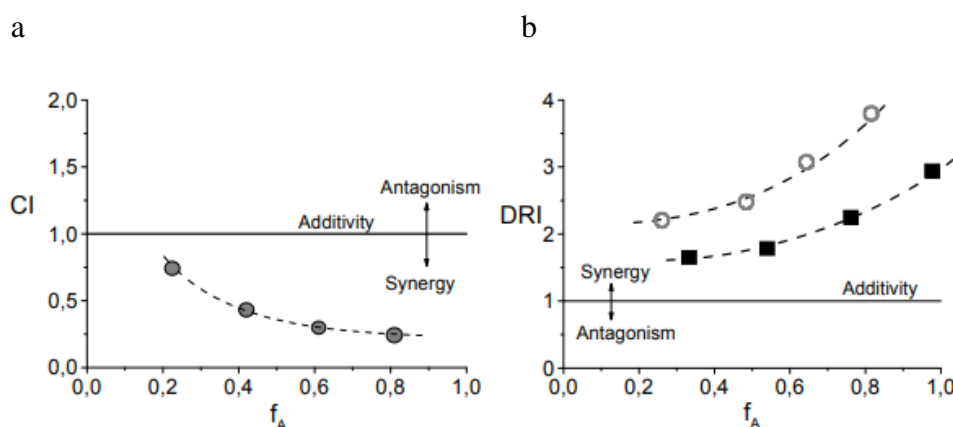


interpretaciji jednadžbe kombiniranog indeksa (jednadžba 39). Pod pretpostavkom da dva lijeka pokazuju sinergiju, očekuje se da je za postizanje istog učinka potrebna manja doza svakog od njih. Ova niža koncentracija ( $D_1$  i  $D_2$  u jednadžbama 34-39) može se povezati sa srednjim učinkom ( $IC_{50}$  u jednadžbi 36), kako bi se dobio indeks smanjenja doze DRI.

(40)

$$CI = \frac{1}{(DRI)_1} + \frac{1}{(DRI)_2}$$

Kombinirani indeks (CI) i indeks smanjenja doze (DRI) mogu se koristiti za crtanje podataka o kombinaciji lijekova kako bi se dobila vizualizacija sinergije ili antagonizma (slika 11, (Chou, 2006)).



Slika 11. Prikaz podataka o interakciji s lijekovima (preuzeto iz Breitinger, 2012)

(a) Graf CI- $f_A$ : Kombinirani indeks CI crta se prema  $f_A$ , udjelu pogođenog enzima ili biološke funkcije.

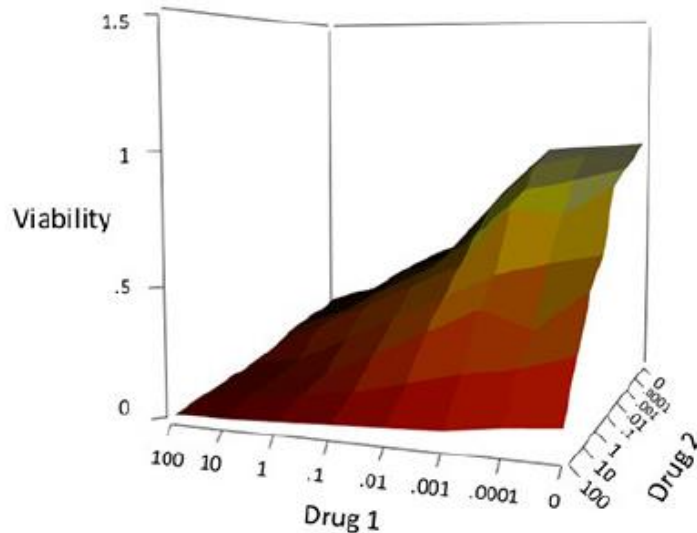
(b) Graf DRI: indeks smanjenja doze (DRI) se grafički prikazuje prema  $f_A$ .

#### 4.2.3. Analiza površine odgovora

Površine odgovora mogu se izračunati i način su da se predstave učinci kombinacija lijekova kao graf na kojoj su koncentracije lijeka prikazane kao horizontalna x-y-ravnina, a efekt je iscrtan na osi z. Izobole se mogu vidjeti kao 2D odjeljci kroz površine odgovora, a metoda omogućava grafičku analizu podataka o interakciji lijekova. Iz doza-odgovor podataka svakog pojedinog lijeka crta se očekivana površina odgovora na temelju nulte reakcije (nema

interakcije). Zatim se stvarni podaci o kombinaciji lijeka unose u graf, a slično kao i kod analize izobole, odstupanja od referentne površine ukazuju na synergizam ili antagonizam (Breitinger, 2012).

Graf prikazuje 3D površinu gdje vrhovi iznad nule i doline ispod nule pokazuju synergizam ili antagonizam.



Slika 12. Graf analize površine odgovora (preuzeto iz Roell i sur., 2017)

#### 4.2.4. Praktična ograničenja

U literaturi je predloženo 13 modela za opisivanje podataka o kombinaciji lijekova. Svaki je model prikladan za određenu situaciju i nije primjenjiv na druge. Međutim, svi modeli koji opisuju synergizam mogu se pratiti samo prema dvije vrste slučaja "nula" (bez interakcije):

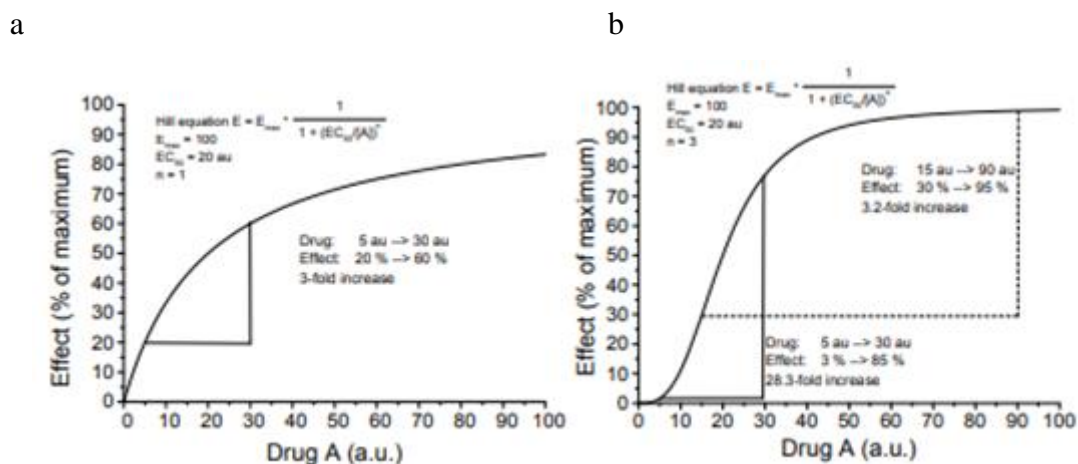
Loewe aditivnost: Oba lijeka pokazuju učinak, ali se međusobno isključuju, ili jedan ili drugi mogu biti aktivni u određenom trenutku. To odgovara uobičajenom mjestu interakcije u najjednostavnijem mehaničkom slučaju (slika 5).

Bliss neovisnost: Lijekovi su međusobno neisključivi, odnosno oba mogu biti aktivna istovremeno. U najjednostavnijem slučaju, svaki lijek ima određeno, neovisno mjesto interakcije (slika 6).

Zapravo se svi modeli odnose na ova dva osnovna slučaja. Loewe aditivnost najbolje je opisana jednadžbom 34, a svako odstupanje od toga može se smatrati sinergizmom. U slučaju neovisnosti očekuje se da oba lijeka djeluju neovisno.

Prednost se daje definiciji Loewe aditivnosti kao definiciji bez sinergizma. Aditivnost ispravno opisuje eksperiment kontrole, lažne smjese istog lijeka, a slijedi opću definiciju sinergizma, gdje kombinacija rezultira većim učinkom nego što je zbroj učinaka pojedinih komponenata (Breitinger, 2012).

U mnogim kliničkim slučajevima koriste se kombinacije lijekova koji djeluju na dva različita ciljna proteina ili stanični put. U radioterapiji koristi se kombinacija zračenja i lijekova, a u kombinaciji su potrebne niže doze u odnosu na pojedinu terapiju. Isto tako, kombinacije lijekova koji ciljaju potpuno različite stanične putove mogu djelovati sinergistički citotoksično. Ne postoji jedinstvena metodologija koja bi bila primjerena za sve biomedicinske situacije. Problem u tumačenju podataka o kombinaciji lijekova je kvaliteta izmjerenih podataka. Biološki sustavi uvijek nose eksperimentalnu pogrešku. Čak i s najboljim podacima, analiza zajedničkog djelovanja dva lijeka ima još jedan problem. Dva različita lijeka mogu imati različite karakteristike i odgovor. Promjene učinkovitih koncentracija mogu pokazati sinergiju tamo gdje je nema. Glavni prikaz ovog problema dan je na slici 12 (Chou, 2006; Chou, 2010), pokazujući da ista promjena relativne koncentracije može proizvesti sasvim različite učinke (slika 12 a, b). Oblici izobolograma za lijekove s različitim karakteristikama, reakcijama na dozu i komplikacijama proizašle iz ove činjenice detaljno su proučavane (Berenbaum, 1989; Greco i sur., 1995; Tallarida, 2001; Chou, 2006).



Slika 13. Krivulje doze-učinak različitog oblika (preuzeto iz Breitinger, 2012)

Obje krivulje simulirane su korištenjem Hill jednadžbe i parametara  $E_{max} = 100\%$ ,  $EC_{50} = 20$  au (proizvoljne jedinice). Krivulja simulirana za  $n = 1$  daje hiperboličnu krivulju (slika 13a), a sigmoidna krivulja dobije se za  $n = 3$  (slika 13b). Razlika je u obliku krivulje i različit je učinak pri promjeni koncentracije agonista A od 5 do 30 au. U hiperboličnom slučaju učinak se povećava 3 puta, u sigmoidnom slučaju povećanje je 28,3 puta. Učinci promjena koncentracije agonista različiti su ovisno o rasponu odgovora gdje se događaju. Sigmoidne krivulje doza-odgovor najstrmije su oko sredine. Na primjer, porast koncentracije 6 puta (sa 5 na 30 au) prouzročit će 28,3 puta povećanje opaženog učinka. Povećavajući koncentraciju s 15 na 90 au, učinak se samo povećava 3,2 puta. Dakle, ako prisutnost drugog lijeka B povećava kooperativnost lijeka A ili ako lijek B pomakne odgovarajući raspon doza-učinak od A na srednju vrijednost isključivo aditivnim (nesinergističkim) sredstvima, uočit će se veći porast učinka od očekivanog i pogrešno će se tumačiti kao sinergizam (Breitinger, 2012).

#### 4.3. Granice sinergizma – potenciranje, koalizam, inercija, metaboličke smetnje

Sinergizam se može pojaviti i u kombinacijama lijekova ili metodama koje imaju potpuno različite načine djelovanja. U terapiji raka često se koristi kombinacija zračenja i citostatika. Kombinacija tvari i okolišni uvjeti (toplina, pH, zračenje) su analizirani zbog sinergije (Johnson i sur., 1945). Postoje slučajevi da jedan lijek nema nikakvu aktivnost, ali pojačava aktivnost drugog, što je uočeno za antinocicepciju paracetamola u kombinaciji s fenolaminom (Raffa i sur., 2001). Krajnji slučaj bila bi kombinacija dvaju lijekova koji sami po sebi nemaju učinka, ali su učinkoviti u kombinaciji.

Tablica 1. Terminologija kombiniranog djelovanja lijekova (nakon Greco i sur. 1995, preuzeto iz Breitinger, 2012)

| Učinak kombinacije lijeka | Oba lijeka pojedinačno imaju isti učinak | Samo jedan lijek je djelotvoran | Niti jedan lijek nije djelotvoran |
|---------------------------|--|---------------------------------|-----------------------------------|
| Veći od 0                 | Sinergizam                               | Sinergizam                      | Koalizam                          |
| Jednak 0                  | Aditivnost/neovisnost                    | Inercija                        | Inercija                          |
| Manji od 0                | Antagonizam                              | Antagonizam                     |                                   |

Drugi učinak koji dovodi do očite sinergije ili antagonizma je učinak koji neki lijek može imati na unos, metabolizam i uklanjanje drugih lijekova. Ovisno o putu primjene, mora se razmotriti metabolizam prvim prolazom kroz jetru, uključujući jedan od najkritičnijih koraka biotransformacije lijeka, a to je oksigenacija citokromom P450, oksigenazom koja katalizira oksigenaciju supstrata pomoću NADPH i kisika (O<sub>2</sub>). Ova oksigenacija R-H→R-OH ključan je korak u metabolizmu i eventualnom uklanjanju lijekova i tvari iz tijela. Do danas je u ljudima pronađeno 56 podvrsta citokrom P450, od kojih su neke ključne u metabolizmu endogenih tvari poput medicinskih lijekova. Tvari koje ometaju citokrom P450 mogu, utjecati na klirens lijeka, a time i na stvarnu koncentraciju određenog lijeka u tijelu (Flockhart, 1995; Flockhart i Oesterheld, 2000; Shin i sur., 2002; Takada i sur., 2004).

Istraživanje interakcija lijekova u biomedicinskom polju široko je rasprostranjeno i mora uključivati sljedeće aspekte:

- mehanizam djelovanja pojedinog lijeka
- mehanizmi djelovanja dva (ili više) lijekova koji djeluju na istu fiziološku metu
- interakciju dvaju lijekova kroz nuspojave, sekundarne mete, itd.
- učinci na metabolizam primarnog lijeka

Studije proučavanja mehanizma djelovanja nisu dovoljne da pokriju sve aspekte interakcije lijekova te je kliničko promatranje jednako bitno.

#### **4.4. Sinergizam kroz discipline**

Do sada su razrađene metode za otkrivanje sinergije u biomedicinskoj i farmakološkoj domeni, vjerojatno zbog važnosti sinergije u terapijskim tretmanima za rak i druge složene bolesti (Greco i sur., 1995). Istovremeno je razvijen i primijenjen postupak sinergije u drugim područjima, posebno u toksikologiji.

##### **4.4.1. Sinergizam u toksikologiji**

Ideja sinergizma poznata je u toksikologiji. Bliss je 1939. godine objavio poznati referentni model, Bliss Independence (Bliss neovisnost), koji se i prema Gearyju (Geary, 2013) često koristi u toksikološkom području.

Marking (1977) razvio je metodu za procjenu učinaka interakcije i potencijalne sinergije. Mumtaz i Durkin (1992) također su razvili metodu koja proširuje indeks toksičnosti. Indeks toksičnosti predstavila je američka agencija za zaštitu okoliša (SAD EPA) za procjenu opasnosti od kemijskih smjesa (Groten i sur., 2001) usredotočujući se na kemikalije koje djeluju na isti cilj. Indeks opasnosti ograničen je na procjenjivanje smjesa sa spojevima koje proizvode isti toksični učinak istim načinom djelovanja (Groten, 2000).

Glavni problem u sinergijskoj metodologiji je sposobnost otkrivanja sinergizma među smjesama s više od dva agensa kao i otkrivanje koji agensi u smjesi zapravo doprinose sinergijskim interakcijama. Za farmakološke primjene broj lijekova / kemikalija uključenih u smjese je obično mali, ali u okolišnim mješavinama smjese mogu biti složene i nije ih lako mjeriti. Osnovne referentne metode, kao i neke metode kvantifikacije, kao što je, na primjer, Chou-Talalay metoda, mogu se proširiti na više od dva agensa (Chou i Talalay, 1984). Međutim, mnogo je teže identificirati agense unutar njihove smjese koji doprinose sinergističkom učinku bez odgovarajućeg, često gotovo nemogućeg, eksperimentalnog dizajna (Fouquier i Guedj, 2015). To je poznati problem između lijekova, ali također predstavlja problem i u području toksikologije.

#### **4.4.2. Sinergizam u epidemiologiji**

Sinergizam je također primjećena u epidemiološkim studijama, često kroz promatranje bolesti za koje se čini da povećavaju rizik od stjecanja drugih bolesti. To se može vidjeti u istraživanju HIV-a i spolno prenosivih bolesti. Pretpostavlja se da HIV može povećati ili čak produžiti zaraznost spolno prenosivih infekcija kod zaražene jedinice (Wasserheit, 1992). Sinergističke interakcije promatraju se i među faktorima rizika za leukemiju kod pacijenata koji su u obitelji imali povijest karcinoma dojke (Olshan i sur., 2001).

#### **4.4.3. Sinergizam u prehrani**

Sinergističke interakcije primijećene su i u prehrani. Liu (2004) je proučavao različite fitokemikalije u različitim namirnicama koje pomažu u prevenciji karcinoma i imaju potencijalne sinergističke interakcije (Liu, 2004). Gutierrez i suradnici pokazali su da kombinacije biljnih esencijalnih ulja i njihove interakcije s prehranbenim sastojcima pokazuju potencijalnu sinergiju, aditivnost ili antagonizam koristeći indekse frakcijskih

inhibicijskih koncentracija, prema konceptu sličnom Loewe aditivnosti (Gutierrez i sur., 2008, Gutierrez i sur., 2009).

#### **4.5. Sinergizam polifenola zelenog čaja i kombinacije s lijekovima**

Sinergističke kombinacije lijekova pokazale su vrlo učinkovito terapijsko djelovanje (Lehar, 2009, Yin i sur., 2014). Sinergizam lijekova traženi je cilj u razvoju kombinacije lijekova.

##### **4.5.1. Biološka aktivnost polisaharida i polifenola iz oolong čaja na hepatocelularni karcinom**

Wang i suradnici proveli su istraživanje s ciljem određivanja sinergističkog učinka polisaharida (OTPS) i polifenola (OTP) na hepatocelularni karcinom, *in vitro* i *in vivo*, te imali molekularna masa polisaharida utjecaj na učinak. Korišteni su OTPS i OTP ekstrahirani iz oolong čaja. Četiri uspoređivane frakcije polisaharida razlikovale su se u molekularnoj težini, udjelu prirodnih šećera, uronske kiseline, proteina i sastavu monosaharida. Prema korištenoj literaturi, kombinacija polisaharida i drugih antikancerogenih lijekova poput doksorubicina i paklitaksela donosi nekoliko prednosti poput smanjene toksičnosti, povećane topljivosti u biološkim tekućinama, mogućnosti prevladavanja određenih mehanizama rezistencije na lijekove i sposobnost izazivanja imuno-stimulativnih učinaka (Vittorio i sur., 2012). Istraživanje Wang i suradnika (2017) potvrdilo je rezultate dotadašnjih istraživanja. Rezultati studije potvrdili su da polisaharidi i polifenoli iz oolong čaja sinergističkim djelovanjem smanjuju proliferaciju i rast tumora. Imunosni i antioksidativni odgovor bili su pojačani nakon primjene istraživanih sastavnica oolong čaja, a oštećenje jetre se smanjilo čime bi se povećala i kvaliteta života, a ne samo kvantiteta preživljenja. Najbolji rezultati dobiveni su kombinacijom polifenola i frakcije polisaharida molekularne mase veće od 80 kDA (Wang i sur., 2017).

##### **4.5.2. Biološka aktivnost polifenola čaja u kombinaciji s cisplatinom na stanice karcinoma dojke**

Polifenoli u čaju imaju snažna antioksidacijska i antikancerogena svojstva, posebno kod pacijenata koji su podvrgnuti zračenju ili kemoterapiji. Istraživanje kombinacije polifenola iz čaja i antitumorskog lijeka cisplatina (CP) proveli su Periasamy i Alshatwi (2012). U studiji

su stanice karcinoma dojke (MCF-7) tretirane različitim koncentracijama polifenola i kombinacijama polifenola i CP. Ispitan je utjecaj polifenola na rast stanica karcinoma dojke, razinu unutarstaničnih reaktivnih kisikovih vrsta (ROS), apoptozu i ekspresiju gena kaspaze-3, kaspaze-8 i kaspaze-9 i p53. Rezultati studije (MTT testom (3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolij bromid)) ukazuju da su MCF-7 stanice manje osjetljive na inhibiciju rasta kad se tretiraju polifenolima, nego kad se koristi sam CP ili kombinirana terapija. Nuklearno obojenje propidijum-jodidom pokazalo je da je udio apoptotskih jezgara veći ako se koristi kombinacija, a ne samo jedan agens. Analiza protočne citometrije korištena je za kvantificiranje promjena u intracelularnim ROS-ovima. Detekcija aktiviranih kaspaza fluorescentno obilježenim inhibitorima kaspaza (FLICA) u kombinaciji s testom propusnosti plazma membrane pokazuje da je postotak ranih i kasnih apoptotskih/sekundarnih nekrotičnih stanica bio veći u stanicama tretiranim kombinacijom nego u onima tretiranim samo s polifenolima ili CP. Kombinacija polifenola i CP sinergistički izaziva apoptozu aktivacijom kaspaze-8 i kaspaze-9 i p53 prekomjernom ekspresijom. Rezultati istraživanja pokazuju da se kombinacija polifenola i CP može koristiti kao učinkovita kombinirana terapija na bazi antioksidanata za estrogini receptor (ER) i pozitivni p53 karcinom dojke (Periasamy i Alshatwi, 2012).

#### **4.5.3. Biološka aktivnost epigalokatehin-3-galata u kombinaciji s cisplatinom na stanice karcinoma jajnika i stanice karcinoma žučnih puteva**

Karcinom jajnika jedan je od najsmrtonosnijih ginekoloških karcinoma u čijem se liječenju kao standardni izbor koriste cisplatina i karboplatina. Veliki problem u liječenju uzrokuje rezistencija karcinoma na platinu. Iz tog se razloga počelo u liječenju uvoditi paladij, ali i provoditi sve više istraživanja s ciljem pronalaska tvari koja će sinergističkim (ili antagonističkim) djelovanjem smanjiti rezistenciju na platinu. Jedno od takvih istraživanja proveo je Ehsanul sa suradnicima (2012). U studiji su različiti modeli humanog tumora jajnika tretirani CP ili paladijem i epigalokatehin-3-galat (EGCG), polifenolom ekstrahiranim iz zelenog čaja. Proučavali su nakupljanje i djelotvornost platine, tj. paladija ukoliko se primijeni istovremeno s EGCG-om (0/0h), četiri sata prije EGCG-a (0/4h) ili četiri sata nakon EGCG-a (4/0h). Rezultati su pokazali kako EGCG, poznat kao antioksidant, može djelovati pro-oksidacijski ukoliko je primijenjen u visokim koncentracijama i tada uzrokuje oštećenje stanica. Stanice karcinom jajnika pod utjecajem EGCG-a proizvode vodikov peroksid koji



pojačava citotoksični učinak CP. Statistički i klinički značajan sinergizam postignut je primjenom EGCG-a četiri sata nakon primjene cisplatina (0/4h). Ovakvi rezultati idu u prilog tome da kombinacija lijekova temeljenih na platini (cisplatina) može djelovati i na platina-rezistentne tumore, ukoliko se uz cisplatinu primijeni i EGCG iz zelenog čaja i postigne sinergistički učinak (Ehsanul i sur., 2012).

Sinergistički učinak EGCG-a i CP predmet je istraživanja i Mayr i suradnika (2015), ali cilj njihovog rada bio je utjecaj te sinergije na karcinom žučnih puteva (BTC). Za većinu bolesnika s BTC-om moguća je samo palijativna terapija, što dovodi do prosječnog preživljavanja od oko jedne godine. Kemorezistencija je glavni problem koji pridonosi visokim stopama smrtnosti BTC-a. U ovom istraživanju, učinak liječenja EGCG-om samim ili u kombinaciji sa standardnim cisplatinom analiziran je u osam BTC staničnih linija. Uz to, analizirani su učinci EGCG na aktivnost kaspaze, raspodjelu staničnog ciklusa i ekspresiju gena u BTC staničnoj liniji TFK-1. EGCG je značajno smanjio staničnu vitalnost u svih osam BTC staničnih linija (koncentracija EGCG > 5  $\mu$ M). Kombinirani tretman EGCG i cisplatine pokazao je sinergistički citotoksični učinak u pet staničnih linija i antagonistički učinak na dvije stanične linije. EGCG je smanjio količinu mRNA različitih gena povezanih sa staničnim ciklusom, istovremeno povećavajući ekspresiju p21 inhibitora staničnog ciklusa i receptora koji potiču na apoptozu. Ovo zapažanje popraćeno je povećanjem aktivnosti kaspaze i stanica u sub-G1 fazi staničnog ciklusa, što ukazuje na indukciju apoptoze. EGCG je također potaknuo redukciju ekspresije gena matičnih stanica i gena koji su povezani s agresivnim kliničkim karakterom tumora, kao što su cd133 i abcg2.

EGCG djeluje antikancerogenou BTC staničnim linijama i stoga bi mogao biti potencijalni lijek protiv raka za buduće studije o BTC-u. Uz to, EGCG pokazuje sinergistički citotoksični učinak s cisplatinom u većini testiranih BTC staničnih linija (Mayr i sur., 2015).

#### **4.5.4. Biološka aktivnost epigalokatehin-3-galata i sulforafana na stanice karcinoma kolona**

Kolorektalni karcinom jedan je od vodećih uzročnika smrtnosti i jedan od najčešćih karcinoma u populaciji. Predmet je mnogih kliničkih i znanstvenih istraživanja. Neka od tih istraživanja pokazala su kako manje šanse od obolijevanja imaju osobe koje prehranom više unose određeno povrće, kao na primjer brokulu. Spoj koji se u visokoj koncentraciji nalazi u

brokuli i za koji se smatra da je odgovoran za otpornost na karcinom kolona je sulforafan (SFN). EGCG-a u zelenom čaju također se pokazao kao zaštitni čimbenik. Nair i suradnici (2008) istraživali su kombinacije tih dvaju kemopreventivnih prehrambenih faktora u stanicama karcinoma ljudskog kolona HT-29 AP-1.

Kombinacije SFN i EGCG značajno su poboljšale transkripcijsku aktivaciju AP-1 reportera u HT-29 stanicama. Izobologramska analiza pokazala je sinergističku aktivaciju za kombinacije s kombiniranim indeksom, CI <1. Istovremeni tretman sa sredstvom za uklanjanje slobodnih radikala ublažio je sinergizam izazvan kombinacijom. Preživljenje stanica smanjeno je na 70% primjenom kombinacije malih doza, a primjenom visokih doza na 40% u 48 h. U zaključku rada navodi se da sinergistička aktivacija AP-1 kombinacijom kemoprotektivnih prehrambenih faktora EGCG i sulforafana rezultira utjecajem na daljnji signalni put karcinogeneze što upućuje da je moguće multifaktorijski kontrolirati karcinom kolona (Nair i sur., 2008).

#### **4.5.5. Biološka aktivnost polifenola čaja na stanice karcinoma usne šupljine**

Pozitivni učinci konzumiranja zelenog čaja primjećeni su prilikom konzumacije zelenog čaja s mlijekom. Laktoferin iz mlijeka i polifenoli iz zelenog i crnog čaja su zaštitni faktori u razvitku karcinoma usne šupljine. Mohan i suradnici (2006) istraživali su antikancerogeno i apoptotičko djelovanje zelenog i crnog čaja zasebno, kao i u kombinaciji s mlijekom s posebnim naglaskom na mitohondrijski put apoptoze. Oni su pokazali da i polifenoli zelenog crnog čaja inhibiraju rast tumorskih stanica, da su polifenoli iz zelenog čaja učinkovitiji od polifenola iz crnog čaja, a u kombinaciji s kravljim mlijekom ta se učinkovitost još pojačava. Mehanizam kojim se objašnjava takav apoptotički utjecaj polifenola čaja na stanice karcinoma usne šupljine je stvaranje reaktivnih kisikovih radikala koji aktiviraju apoptozu, nuklearnu fragmentaciju i kondenzaciju (Mohan i sur., 2006).

#### **4.5.6. Biološka aktivnost polifenola čaja u kombinaciji s askorbinskom kiselinom na stanice adenokarcinoma pluća**

Osim EGCG i neki teaflavini pokazuju antikancerogeno djelovanje. Li i suradnici (2010) istraživali su učinke teflavin-3-3'-digalata (TF<sub>3</sub>), jednog od glavnih teaflavinskih monomera u crnom čaju na stanice adenokarcinom pluća (SPC-A-1). Učinci TF<sub>3</sub> na staničnu održivost i

stanične cikluse stanica adenokarcinoma pluća, proučavani su u kombinaciji s askorbinskom kiselinom (AA) i (-) - epigalokatehinom -3-galatom (EGCG), glavnim polifenolom u zelenom čaju. Rezultati analize protočne citometrije ukazuju da kombinacija TF<sub>3</sub> i askorbinska kiselina i EGCG i askorbinska kiselina povećavaju staničnu populaciju u fazi G0/G1 staničnog ciklusa SPC-A-1.

Kombinacije TF<sub>3</sub> + AA i EGCG + AA pokazuju sinergističke inhibicijske učinke na proliferaciju stanica SPC-A-1 i značajno su zadržale stanice SPC-A-1 u fazi G0/G1. Rezultati dokazuju da kombinacija TF<sub>3</sub> sa AA ili EGCG s AA pojačava njihovu antikancerogenu aktivnost (Li i sur., 2010).

#### **4.5.7. Biološka aktivnost polifenola čaja na stanice karcinoma dojke**

Status receptora za estrogen ( $\alpha$ ) (ER $\alpha$ ) je presudan za kliničku prognozu i terapijski pristup karcinomu dojke. ER $\alpha$ -negativni karcinom dojke je klinički agresivan i ima lošu prognozu zbog nedostatka hormonskih ciljanih terapija. Studije su pokazale da epigenetska regulacija igra glavnu ulogu u prigušivanju ER $\alpha$  u stanicama ljudskih karcinoma dojke. Otkriveno je da EGCG može reaktivirati ekspresiju ER $\alpha$  u stanicama karcinoma dojke MDA-MB-231 negativne na ER $\alpha$ . U istraživanju Li i sur. (2010) korištenjem EGCG s inhibitorom histon deacetilaze (HDAC), trihostatinom A (TSA), otkriven je sinergistički učinak reaktivacije ekspresije ER $\alpha$  u stanicama karcinoma dojke negativne na ER $\alpha$ . Reaktivacija ER $\alpha$  ekspresije tretmanom EGCG i TSA senzibilizira staničnu reakciju ovisnu o ER $\alpha$  na aktivator 17 $\beta$  estradiol (E<sub>2</sub>) i antagonist tamoksifen u stanicama karcinoma dojke negativnih ER $\alpha$ . Otkriveno je da EGCG može dovesti do remodeliranja kromatinske strukture ER $\alpha$  promotora, promjenom statusa acetilacije i metilacije histona, što rezultira reaktivacijom ER $\alpha$ . Smanjeno vezanje transkripcijskog kompleksa u regulatornom području ER $\alpha$  promotora također doprinosi aktivaciji transkripcije ER $\alpha$  tretmanom s EGCG i / ili TSA. Ove studije pokazuju da EGCG zelenog čaja može vratiti ekspresiju ER $\alpha$  reguliranjem epigenetskih mehanizama, a taj se učinak pojačava u kombinaciji s inhibitorom HDAC (Li i sur.,2010).

#### **4.5.8. Biološka aktivnost katehina zelenog čaja na stanice karcinoma želuca**

Hoire i suradnici u svom su istraživanju ispitivali učinke različitih katehina iz zelenog čaja u stanicama dobivenim iz karcinoma ljudskog želuca. Proliferacija četiri stanične linije (MKN-1, MKN-45, MKN-74 i KATO-III) inhibirana je s EGCG na način ovisan o dozi. EGCG najbolje je inhibirao rast MKN-45 stanica. Također, tretiranje stanica MKN-45 s EGCG i (-)-epikatehinom (EC) pokazalo je veliki sinergistički učinak na indukciju apoptoze. Da bi se proučavali molekularni mehanizmi izazivanja apoptoze EGCG-om, ispitivana je aktivnost kaspaza u stanicama MKN-45 tretiranim EGCG-om. Razine aktivnosti kaspaza-3, -8 i -9 povišene su u stanicama tretiranim EGCG, što sugerira da su te kaspaze uključene u apoptozu induciranu EGCG-om. Sinergijski učinak EC s EGCG na indukciju apoptoze je poništen liječenjem katalazom, sugerirajući da sinergizam uključuje izvanstaničnu proizvodnju reaktivnih kisikovih vrsta (Hoire i sur., 2005).

#### **4.5.9. Višestruka biološka aktivnost katehina u zelenom čaju na antifungalno djelovanje antimikotika protiv *Candida albicans***

Cilj studije koje su proveli Hirasawa i Takada (2003) bio je analizirati antifungalni učinak katehina iz zelenog čaja na *Candida albicans*. Osjetljivost *Candida albicans* na katehine ovisna je o pH uvjetima. Rezultati su pokazali da pirogalol katehin ima jače antifungalno djelovanje protiv *C. albicans* u odnosu na katehol katehin. Dodavanje EGCG amfotericinu B pri pH 7.0 rezultiralo je pojačanjem antifungalnog učinka amfotericina B protiv amfotericina B - osjetljivog ili - rezistentnog *C. albicans*. Kombinirano liječenje s EGCG plus amfotericin B značajno je smanjilo rast *C. albicans* rezistentnog na amfotericin. Kad je *C. albicans* osjetljiv na flukonazol tretiran s EGCG i flukonazolom, njegov rast je inhibiran za 93,0% – 99,4% u usporedbi s njegovim rastom u prisutnosti samo flukonazola. Kombinirana primjena EGCG i flukonazola inhibirala je rast *C. albicans* otpornog na flukonazol za 98,5% – 99,7%. Ovi rezultati pokazuju da EGCG pojačava antifungalni učinak amfotericina B ili flukonazola protiv *C. albicans*-osjetljivog i -rezistentnog na antimikotike. Kombinirano liječenje katehinom omogućava upotrebu nižih doza antimikotika, izaziva višestruko antifungalno djelovanje i smanjuje pojavu nuspojava (Hirasawa i Takada, 2003).

## 5. ZAKLJUČAK

Interakcije se mogu javiti između više lijekova ili između lijekova i hrane (ili nekih drugih agenasa). Treba misliti na korisne interakcije i iskorištavati ih, a nekorisne i štetne izbjegavati. Postoji nekoliko metoda za istraživanje interakcija, a najviše korištene su metoda izobole i kombinirani indeks.

Važnost interakcija posebno je istaknuta u biomedicinskom području jer se kombinacije lijekova često koriste u liječenju različitih bolesti.

Biljka čajevac, lat. *Camellia sinensis*, pokazuje antibakterijska, antivirusna, antifungalna i antikancerogena svojstva i to dokazuju gotovo sva provedena istraživanja. Za takvo djelovanje najviše je odgovoran (-)-epigalokatehin galat (EGCG) koji spada u skupinu polifenola. Zeleni čaj može poboljšati aktivnost imunosnog sustava, inhibirati angiogenezu te poboljšati djelovanje raznih lijekova. Stoga redovna konzumacija zelenog čaja može pridonijeti u prevenciji raznih bolesti i smanjiti rizik od raka dojke, želuca, jednjaka, debelog crijeva i raka prostate.

Zeleni čaj s drugim agensima najčešće djeluje sinergistički, što znači da nastaje kombinirani efekt koji je veći od zbroja pojedinačnih efekata svakog agensa.

Velik broj istraživanja bavio se proučavanjem interakcija zelenog čaja s antikancerogenim lijekom. Dosadašnji rezultati, koje u većini treba tek klinički dokazati, pokazuju sljedeće:

- u liječenju hepatocelularnog karcinoma koristan je sinergistički učinak polisaharida i polifenola iz oolong čaja
- kao korisna terapija za ER+ i p53+ karcinome dojke pokazala se kombinacija polifenola iz zelenog čaja i cisplatine
- za liječenje tumora jajnika kombinacija cisplatine i EGCG-a ovisi o načinu i slijedu davanja; najjači je učinak postignut davanjem EGCG-a 4 sata nakon cisplatine
- cisplatina i EGCG imaju sinergistički povoljan učinak u liječenju karcinoma žučnih puteva. Ti su karcinom jako otporni na terapiju pa se EGCG pokazao potencijalnim izborom za prvu liniju liječenja
- dokazana mogućnost multifaktorijalne kontrole karcinoma debelog crijeva korištenjem EGCG-a i sulforafana uz antikarcinogene lijekove
- polifenoli korisni i u prevenciji liječenja karcinoma usne šupljine

- zeleni čaj pojačava antikancerogenu aktivnost liječenja karcinoma pluća kao i karcinoma želuca gdje se pokazalo da pojačava apoptozu ciljanih stanica
- EGCG pojačava učinak amfotericina B i flukonazola u liječenju *C. albicans*.

S obzirom na veliki potencijal sastavnica zelenog čaja i činjenicu da mogu povećati aktivnost lijekova i time smanjiti nuspojave koje se javljaju uslijed primjene lijekova, može se zaključiti da su daljnja istraživanja u tom području od velike važnosti, kako za liječenje upala, tako i za liječenje neoplazmatskih procesa koji su i dalje veliki medicinski problem.

## 6. LITERATURA

Berenbaum MC. Synergy, additivism and antagonism in immunosuppression. A critical review. *Clin Exp Immunol*, 1997, 28, 1, 1-18.

Berenbaum MC. A method for testing for synergy with any number of agents. *J Infect Dis*, 1978, 137, 2, 122-130.

Berenbaum MC. Correlations between methods for measurement of synergy. *J Infect Dis*, 1980, 142, 3, 476-480.

Berenbaum MC. The expected effect of a combination of agents: the general solution. *J Theor Biol*, 1985, 114, 3, 413-431.

Berenbaum MC. What is synergy?. *Pharmacol Rev*, 1989, 41, 2, 93-141.

Bijnsdorp IV, Giovannetti E, Peters GJ. Analysis of drug interactions. *Methods Mol Biol*, 2011, 731, 421-34.

Breitinger HG. Drug Synergy – Mechanisms and Methods of Analysis. U: Toxicity and Drug Testing. Prof. Bill Acree, InTech, 2012, str.143-166.

Breitinger HG, Geetha N, Hess GP. Inhibition of the serotonin 5-HT<sub>3</sub> receptor by nicotine, cocaine, and fluoxetine investigated by rapid chemical kinetic techniques. *Biochemistry*, 2001, 40, 28, 8419-8429.

Chandra Mohan K.V.P., Gunasekaran P, Varalakshmi E, Hara Y, Nagini S. *In vitro* evaluation of the anticancer effect of lactoferrin and tea polyphenol combination on oral carcinoma cells. *Cell Biology International* 31, 2007, 599-608.

Chen H, Qu Z, Fu L, Dong P, Zhang X. Physicochemical properties and antioxidant capacity of 3 polysaccharides from green tea oolong tea, and black tea. *J. Food Sci.*, 2009, 74, C469–C474.

Chen H, Wang Z, Qu Z, Fu L, Dong P, Zhang X. Physicochemical characterization and antioxidant activity of a polysaccharide isolated from oolong tea. *Eur. Food Res. Technol*, 2009, 229, 629–635.

Chou TC. Derivation and properties of Michaelis-Menten type and Hill type equations for reference ligands. *J Theor Biol*, 1976, 59, 2, 253-276.

Chou TC. Synergy determination issues. *J Virol*, 2002, 76, 20, 10577.

Chou TC. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacol Rev*, 2006, 58, 3, 621-681.

Chou TC. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. *Cancer Res*, 2010, 70, 2, 440-446.

Chou TC, Chou JH. Distinction between multiple ligand exclusivity and competitiveness in receptor binding topology. *FASEB J.*, 1988, 2, A1778.

Chou TC, Talalay P. A simple generalized equation for the analysis of multiple inhibitions of Michaelis-Menten kinetic systems. *J Biol Chem*, 1977, 252, 18, 6438-6442.

Chou TC, Talalay P. Generalized equations for the analysis of inhibitions of Michaelis-Menten and higher-order kinetic systems with two or more mutually exclusive and nonexclusive inhibitors, *Eur J Biochem*, 1981, 115, 1, 207-216.

Chou TC, Talalay P. Analysis of combined drug effects: a new look at a very old problem. *Trends Pharmacol Sci*, 1983, 4, 450–454.

Chou TC, Talalay P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regul*, 1984, 22, 27-55.

Colquhoun D. Binding, gating, affinity and efficacy: the interpretation of structureactivity relationships for agonists and of the effects of mutating receptors. *Br J Pharmacol*, 1998, 125, 5, 924-947.



Delafuente JC. Understanding and preventing drug interactions in elderly patients. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2003, 48,2,133-143.

Ehsanul Hoque Mazumder M, Beale P, Chan C, Yu JQ, Huq F. Epigallocatechin gallate acts synergistically in combination with cisplatin and designed *trans*-palladiums in ovarian cancer cells. *Anticancer Research*, 2012, 32, 4851-4860.

Flockhart DA. Drug interactions and the cytochrome P450 system. The role of cytochrome P450 2C19. *Clin Pharmacokinet*, 1995, 29, 45-52.

Flockhart DA, Oesterheld JR.. Cytochrome P450-mediated drug interactions. *Child Adolesc Psychiatr Clin N A*, 2000, 9, 1, 43-76.

Foucquier J, Guedj M..Analysis of drug combinations: current methodological landscape. *Pharmacol. Res. Perspect.*, 2015

Geary N. Understanding synergy. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 2013, 304, E237-E253.

Gessner PK. The isobolographic method applied to drug interactions. U: Drug Interactions, P. L. Morselli, S. Garattini & S. N. Cohen (Eds), Raven Press, New York, 1974, 349-362.

Greco WR., Bravo G, Parsons JC. The search for synergy: a critical review from a response surface perspective. *Pharmacol. Rev.*, 1995, 47, 2, 331-385.

Grmlje biljke čajevca *Camellia sinensis*, L., <https://big-win.hr/product/camellia-sinensis/>, pristupljeno: 18.3.2020.

Groten JP. Mixtures and interactions. *Food Chem. Toxicol.*, 2000, 38, S65-S71.

Groten JP, Feron VJ, Sühnel J. Toxicology of simple and complex mixtures. *Trends Pharmacol. Sci.*, 2001, 22, 316-322.

Gutierrez J, Barry-Ryan C, Bourke P. The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. *Int. J. Food Microbiol.*, 2008, 124, 91-97.

Gutierrez J, Barry-Ryan C, Bourke P. Antimicrobial activity of plant essential oils using food model media: efficacy, synergistic potential and interactions with food components. *Food Microbiol.*, 2009, 26, 142-150.

Hess GP. Determination of the chemical mechanism of neurotransmitter receptor-mediated reactions by rapid chemical kinetic techniques. *Biochemistry*, 1993, 32, 4, 989-1000.

Hirasawa M, Takada K. Multiple effects of green tea catechin on the antifungal activity of antimycotics against *Candida albicans*, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2004, 53, 225-229.

Hoire N, Hirabayashi N, Takahashi Y, Miyauchi Y, Taguchi H, Takeishi K. Synergistic effect of green tea catechins on cell growth and apoptosis induction in gastric carcinoma cells. *Biol. Pharm. Bull.* 2005, 28(4), 574-579.

Interakcije lijekova, 2020, <https://www.ljekarne-dvorzak.hr/cd/15017/interakcije-lijekova-savjeti-ljekarne-dvorzak-internet-ljekarna> , pristupljeno: 18.3.2020.

inPharma – Sinergističko djelovanje sastavnica zelenog čaja, <http://www.inpharma.hr/index.php/news/155/22/Sinergisticko-djelovanje-sastavnica-zelenog-čaja> , pristupljeno: 17.3.2020.

Johnson FH, Eyring H, Steblay R, Chaplin H, Huber C, Gherardi G. The nature and control of reactions in bioluminescence: with special reference to the mechanism of reversible and irreversible inhibitions by hydrogen and hydroxyl ions, temperature, pressure, alcohol, urethane, and sulfanilamide in bacteria. *J Gen Physiol*, 1945, 28, 5, 463-537.

Karpen JW, Aoshima H, Aboud LG, Hess GP. Cocaine and phencyclidine inhibition of the acetylcholine receptor: analysis of the mechanisms of action based on measurements of ion flux in the millisecond-to-minute time region. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1982, 79, 8, 2509-2513.

Karpen JW, Hess GP. Cocaine, phencyclidine, and procaine inhibition of the acetylcholine receptor: characterization of the binding site by stopped-flow measurements of receptor controlled ion flux in membrane vesicles. *Biochemistry*, 1986, 25, 7, 1777-1785.

Lehar J, Krueger AS, Avery W, Heilbut AM, Johansen LM, et al. Synergistic drug combinations tend to improve therapeutically relevant selectivity. *Nat. Biotechnol.*, 2009, 27, 659-666.

Li W, Wu JX, Tu YY. Synergistic effects of tea polyphenols and asorbic acid on human lung adenocarcinoma SPC-A-1 cells. *J.Zhejiang Univ-Sci B (Biomed & Biotechnol)*, 2010, 11(6), 458-464.

Li Y, Yuan YY, Meeran SM, Tollefsbol TO. Synergistic epigenetic reactivation of estrogen receptor- $\alpha$  (ER $\alpha$ ) by combined green tea polyphenol and histone deacetylase inhibitor in ER $\alpha$ -negative breast cancer cells. *Molecular Cancer*, 2010, 9, 274.

Liu RH. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *J.Nutr.*, 2004, 134, 347S-348S.

Loewe S. The problem of synergism and antagonism of combined drugs. *Arzneimittelforschung*, 1953, 3, 6, 285-290.

Mayr C, Wagner A, Neureiter D, Pichler M, Jakab M, Illig R, Berr F, Kiesslich T. The green tea catechin epigallocatechin gallate induces cell cycle arrest and shows potential synergism with cisplatin in biliary tract cancer cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 2015, 15, 194.

MSD medicinski priručnik za pacijente: Interakcije lijekova, 2014, <http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-za-pacijente/lijekovi/cimbenici-odgovora-na-lijek/interakcije-lijekova> , pristupljeno: 18.3.2020.

Nair S, Hebbar V, Shen G, Gopalakrishnan A, Khor TO, Yu S, Xu C, Kong AN. Synergistic effects of a combination of dietary factors sulforaphane and (-) epigallocatechin-3-gallate in HT-29 AP-1 human colon carcinoma cells. *Pharmaceutical Research*, 2008, 25(2), 387-399.

Olshan AF, Weissler MC, Watson MA, Bell DA. Risk of head and neck cancer and the alcohol dehydrogenase 3 genotype. *Carcinogenesis*, 2001, 22, 57-61.

Palatini P. The interaction between full and partial inhibitors acting on a single enzyme. A theoretical analysis. *Mol Pharmacol*, 1983, 24, 1, 30-41.

Periasamy VS, Alshatwi AA. Tea polyphenols modulate antioxidant redox system on cisplatin-induced reactive oxygen species generation in human breast cancer cells. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 2013, 112, 374-384.

Raafat K, Breitinger U, Mahran L, Ayoub N, Breitinger HG. Synergistic inhibition of glycinergic transmission in vitro and in vivo by flavonoids and strychnine. *Toxicol Sci*, 2010, 118, 1, 171-182.

Raffa RB, Stone DJ, Tallarida RJ. Unexpected and pronounced antinociceptive synergy between spinal acetaminophen (paracetamol) and phentolamine. *Eur J Pharmacol*, 2001, 412, 2, R1-2.

Roell KR., Reif DM., Motsinger-Reif AA. An introduction to terminology and methodology of chemical synergy – perspectives from across disciplines. *Front. Pharmacol.*, 2017, 8, 158.

Shin JG, Park JY, Kim MJ, Shon JH, Yoon YR, Cha IJ, Lee SS, Oh SW, Kim SW, Flockhart DA. Inhibitory effects of tricyclic antidepressants (TCAs) on human cytochrome P450 enzymes in vitro: mechanism of drug interaction between TCAs and phenytoin. *Drug Metab Dispos*, 2002, 30, 10, 1102-1107.

Takada K, Arefayene M, Desta Z, Yarboro CH, Boumpas DT, Balow JE, Flockhart DA, Illei GG. Cytochrome P450 pharmacogenetics as a predictor of toxicity and clinical response to pulse cyclophosphamide in lupus nephritis. *Arthritis Rheum*, 2004, 50, 7, 2202-2210.

Tallarida RJ. Statistical analysis of drug combinations for synergism. *Pain*, 1992, 49, 1, 93-97.

Tallarida RJ. Drug synergism: its detection and applications. *J Pharmacol Exp Ther*, 2001, 298, 3, 865-872.

Vittorio O, Cirillo G, Iemma F, Di Turi G, Jacchetti E, Curcio M, Barbuti S, Funel N, Parisi OI, Puoci F, Picci N. Dextran-catechin conjugate: a potential treatment against the pancreatic ductal adenocarcinoma. *Pharm. Res.*, 2012, 29, 2601–2614.

Vrdoljak E, Šamija M, Kusić Z, Petković M, Gugić D, Krajina Z. Klinička onkologija. Zagreb, Medicinska naklada, 2013, str.1-11.

Tallarida RJ. Quantitative methods for assessing drug synergism. *Genes & Cancer*, 2011, 2(11), 1003-1008.

Wang H, Gao T, Du Y, Yang H, Wei L, Bi H, Ni W. Anticancer and immunostimulating activities of a novel homogalacturonan from *Hippophae rhamnoides* L. berry. *Carbohydr. Polym.*, 2015, 131, 288–296.

Wang J, Liu W, Chen Z, Chen H. Physicochemical characterization of the oolong tea polysaccharides with high molecular weight and their synergistic effects in combination with polyphenols on hepatocellular carcinoma. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 90, 2017, 160-170.

Yin N, Ma W, Pei J, Ouyang Q, Tang C, Lai L. Synergistic and Antagonistic drug combinations depend on network topology *Plos One*, 2014, 9(4).

Zeleni čaj i njegove prednosti, 2017, <https://www.cajevi.hr/hr/content/14-zeleni-caj-i-njegove-prednosti>, pristupljeno: 17.3.2020.

Zeleni čaj: sve čarobne i ljekovite čajne boje jedne biljke, 2017, <https://www.adiva.hr/zdravlje/dijabetes/sve-carobne-i-ljekovite-cajne-boje-jedne-biljke/>, pristupljeno: 18.3.2020.

Zhu L, Cao J, Chen G, Xu Y, Lu J, Fang F, Chen K. Anti-tumor and immunomodulatory activities of an exopolysaccharide from *Rhizopus nigricans* on CT26 tumor-bearing mice. *Int. Immunopharmacol.*, 2016, 36, 218– 224.

## 7. SAŽETAK/SUMMARY

Zeleni čaj proizvodi se iz lišća biljke *Camellia sinensis* L., grma porijeklom iz Azije. Uz zeleni, postoji još nekoliko vrsti čaja. Zeleni čaj ima vrlo bogat i složen kemijski sastav, a najznačajnije sastavnice su polifenoli. Najvažniji u skupini polifenola je (-)-epigallocatehin-galat (EGCG). EGCG stupa u interakcije s mnogim agensima. Najčešće te interakcije rezultiraju sinergizmom, što znači da nastaje kombinirani efekt koji je veći od zbroja pojedinačnih efekata svakog agensa. Postoji nekoliko metoda za istraživanje interakcija, a najviše korištene su metoda izobole i kombinirani indeks. Istraživane su interakcije polifenola zelenog čaja i drugih agenasa (polisaharida, sulforafana, laktoferina iz mlijeka, antitumorskog lijeka-cisplatin, askorbinska kiselina, inhibitor histon deacetilaze, antimikotika-amfotericin B i flukonazol). Rezultati su pokazali da polifenoli s drugim tvarima djeluju sinergistički na proliferaciju i rast različitih tumora i pojačavaju antifungalni učinak lijeka. Može se zaključiti da je konzumacija zelenog čaja poželjna jer pomaže u terapiji mnogih bolesti, ali treba biti oprezan u konzumaciji i kombiniranju jer nisu još sve interakcije istražene.

Green tea is made from the leaves of the *Camellia sinensis* L., a plant native to Asia. Except green, there are few more different types of tea. Green tea has a very rich and complex chemical composition with the most important component being polyphenols. The most important polyphenol is (-) –epigallocatechin gallate (EGCG) which interacts with many agents. These interactions mostly result in synergism, meaning that a combined effect is greater than the sum of the individual effects of each agent. There are several methods for exploring interactions and the most used are the isobole method and the combined index. The interactions of green tea polyphenols and other agents (polysaccharides, sulforaphane, milk lactoferrin, anticancer drug- cisplatin, ascorbic acid, histone deacetylase inhibitor, antifungal amphotericin B and fluconazole) have been investigated. The results showed that polyphenols with other substances act synergistically on the proliferation and growth of different tumors and enhance the antifungal effect of the drugs. It can be concluded that consumption of green tea is advisable because it helps treating many diseases, but caution in combining is still needed because not all interactions have been yet investigated.

## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Farmacija  
Zavod za farmaceutsku kemiju  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

### BIOLOŠKA AKTIVNOST POLIFENOLA ZELENOG ČAJA U KOMBINACIJI S ANTITUMORSKIM LIJEKOVIMA

**Mihaela Barišić**

#### SAŽETAK

Zeleni čaj proizvodi se iz lišća biljke *Camellia sinensis* L., grma porijeklom iz Azije. Uz zeleni, postoji još nekoliko vrsti čaja. Zeleni čaj ima vrlo bogat i složen kemijski sastav, a najznačajnije sastavnice su polifenoli. Najvažniji u skupini polifenola je (-)-epigalokatehin-galat (EGCG). EGCG stupa u interakcije s mnogim agensima. Najčešće te interakcije rezultiraju sinergizmom, što znači da nastaje kombinirani efekt koji je veći od zbroja pojedinačnih efekata svakog agensa. Postoji nekoliko metoda za istraživanje interakcija, a najviše korištene su metoda izobole i kombinirani indeks. Istraživane su interakcije polifenola zelenog čaja i drugih agenasa (polisaharida, sulforafana, laktoferina iz mlijeka, antitumorskog lijeka-cisplatin, askorbinska kiselina, inhibitor histon deacetilaze, antimikotika-amfotericin B i flukonazol). Rezultati su pokazali da polifenoli s drugim tvarima djeluju sinergistički na proliferaciju i rast različitih tumora i pojačavaju antifungalni učinak lijeka. Može se zaključiti da je konzumacija zelenog čaja poželjna jer pomaže u terapiji mnogih bolesti, ali treba biti oprezan u konzumaciji i kombiniranju jer nisu još sve interakcije istražene.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 49 stranica, 13 grafičkih prikaza, 1 tablicu i 69 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: sinergizam, zeleni čaj, polifenoli, kombinacija, antitumorski lijekovi

Mentor: **Dr. sc. Monika Barbarić**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Monika Barbarić**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

**Dr. sc. Cvijeta Jakobušić Brala**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

**Dr. sc. Ana Karković Marković**, *viši asistent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: svibanj 2020.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Pharmacy  
Department of Pharmaceutical Chemistry  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma Thesis

### **BIOLOGICAL ACTIVITY OF GREEN TEA POLYPHENOLS IN COMBINATION WITH ANTITUMOR DRUGS**

**Mihaela Barišić**

#### **SUMMARY**

Green tea is made from the leaves of the *Camellia sinensis* L., a plant native to Asia. Except green, there are few more different types of tea. Green tea has a very rich and complex chemical composition with the most important component being polyphenols. The most important polyphenol is (-) –epigallocatechin gallate (EGCG) which interacts with many agents. These interactions mostly result in synergism, meaning that a combined effect is greater than the sum of the individual effects of each agent. There are several methods for exploring interactions and the most used are the isobole method and the combined index. The interactions of green tea polyphenols and other agents (polysaccharides, sulforaphane, milk lactoferrin, anticancer drug-cisplatin, ascorbic acid, histone deacetylase inhibitor, antifungal amphotericin B and fluconazole) have been investigated. The results showed that polyphenols with other substances act synergistically on the proliferation and growth of different tumors and enhance the antifungal effect of the drugs. It can be concluded that consumption of green tea is advisable because it helps treating many diseases, but caution in combining is still needed because not all interactions have been yet investigated.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 49 pages, 13 figures, 1 tables and 69 references. Original is in Croatian language.

Keywords: synergy, tea polyphenols, combination, drug

Mentor: **Monika Barbarić, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Monika Barbarić, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Cvijeta Jakobušić Brala, Ph.D.** Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Ana Karković Marković, Ph.D.** Assistant, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: May 2020.