



PROSPERITAS VESTRA FINIS NOSTRA!

**Медицински университет
„Проф. д-р Параскев Стоянов“ – Варна
Факултет „Фармация“
Катедра „Фармакология, токсикология и фармакотерапия“**

ас. маг.-фарм. Мая Петрова Радева-Илиева

**Изолиране и анализ на метилксантинова фракция,
катехинова фракция и цялостен екстракт от зелен
чай Банча и проучване на влиянието им върху
фармакокинетиката на силденафил при плъхове**

ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД

за

присъждане на образователна и научна степен „ДОКТОР“

**Област на висше образование: 7. Здравеопазване и спорт
Професионално направление: 7.3. Фармация
Научна специалност: „Фармакология /вкл. фармакокинетика и
химиотерапия/“**

**Научен ръководител:
Доц. маг.-фарм. Калоян Добринов Георгиев, д. ф. н.**

Варна, 2022 г.

СЪДЪРЖАНИЕ

I.	ВЪВЕДЕНИЕ	8
II.	ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР	11
1.	Зелен чай	13
1.1.	Съдържание на биологично активни вещества в зеления чай	14
1.2.	Методи за анализ на екстракти от зелен чай	26
1.3.	Потенциални токсични ефекти на екстракта от зелен чай	26
2.	Лекарствени взаимодействия и взаимодействия между лекарства и фитопрепарати/храни/напитки	27
2.1.	Регулация на лекарствени продукти и фитопрепарати	28
2.2.	Видове лекарствени взаимодействия	29
2.3.	Взаимодействия между конвенционални лекарства	32
2.4.	Взаимодействие между конвенционални лекарства и фитопрепарати	34
2.5.	Взаимодействия между конвенционални лекарства и екстракт от зелен чай и/или негови компоненти	36
2.6.	Взаимодействия между sildenafil и фитопрепарати/храни/напитки	42
3.	Методи за проучване на лекарствени взаимодействия	45
3.1.	Физиологично базиран фармакокинетичен (ФБФК) модел	46
3.2.	Конструиране на ФБФК модел	47
3.3.	Софтуер за изготвянето на ФБФК модел	47
3.4.	Верификация на ФБФК модел	47
3.5.	Приложение на ФБФК моделирането	48
III.	ЦЕЛ И ЗАДАЧИ	49
1.	Цел	49
2.	Задачи	49
2.1.	Получаване на растителни извлеци от японски зелен чай Банча	49
2.2.	Качествен и количествен анализ на получените екстракти	49

2.3.	Качествено и количествено определяне на sildenafil в състава на плазмени проби от експериментални животни	49
2.4.	Проучвания при опитни животни за оценка на влиянието на получените екстракти върху фармакокинетиката на sildenafil	49
2.5.	Разработване на ФБФК модели за прогнозиране на потенциални взаимодействия между sildenafil и ТЕ, КФ или МФ от зелен чай при хора	50
2.6.	Статистическа обработка на резултатите	50
IV.	МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ	51
1.	Материали	51
1.1.	Използвани химикали и реактиви	51
1.2.	Използвани лабораторни и медицински реактиви	51
1.3.	Използвана апаратура и инструменти	51
1.4.	Опитни животни	52
1.5.	Компютърен софтуер	52
2.	Експериментални методи	53
2.1.	Методи за екстракция	53
2.2.	Методи за качествено и количествено определяне на метилксантини и катехини в екстракта и фракциите, получени от японски зелен чай Банча	54
2.3.	Течнохроматографски метод за качествено и количествено определяне на sildenafil в биологични проби от експериментални животни	57
2.4.	Фармакокинетични проучвания при опитни животни	58
2.5.	ФБФК модели за предсказване на потенциални взаимодействия между sildenafil и ТЕ, КФ и МФ от зелен чай Банча при хора	64
2.6.	Методи за статистически анализ	67
V.	РЕЗУЛТАТИ	68
1.	Изолиране на ТЕ, КФ и МФ от японски зелен чай Банча	68
1.1.	Изолиране на тотален екстракт	68
1.2.	Изолиране на катехинова фракция	68
1.3.	Изолиране на метилксантинова фракция	68

2.	Качествен и количествен анализ на ТЕ, КФ и МФ, изолирани от зелен чай Банча	69
2.1.	Анализ на цялостен екстракт от Банча и на изолираната катехинова фракция ...	69
2.2.	Анализ на изолираната метилксантинова фракция	71
3.	Качествен и количествен анализ на sildenafil в плазмени проби от експериментални животни	73
3.1.	Валидиране на метода	73
3.2.	HPLC-UV анализ на биологични проби, съдържащи sildenafil	73
4.	Фармакокинетични проучвания при опитни животни	73
4.1.	Проучване на фармакокинетиката на sildenafil след многократно приложение на ТЕ, КФ и МФ от зелен чай Банча	74
4.2.	Проучване на фармакокинетиката на sildenafil след еднократно приложение на МФ от зелен чай Банча	80
5.	Разработване на ФБФК модели	83
VI.	ДИСКУСИЯ	85
1.	Изолиране на ТЕ, КФ и МФ от зелен чай Банча	86
1.1.	Изолиране на ТЕ от зелен чай Банча	86
1.2.	Изолиране на КФ от зелен чай Банча	88
1.3.	Изолиране на МФ от зелен чай Банча	88
2.	Качествен и количествен анализ на ТЕ, КФ и МФ, изолирани от зелен чай Банча	88
2.1.	Течнохроматографски анализ на ТЕ и КФ от зелен чай Банча	88
2.2.	Течнохроматографски анализ на МФ от зелен чай Банча	91
3.	Качествено и количествено определяне на sildenafil в плазмени проби от експериментални животни	92
3.1.	Пробоподготовка	92
3.2.	Течнохроматографски анализ	93
4.	Фармакокинетични проучвания при опитни животни	93
4.1.	Приготвяне на разтвори/суспензии за приложение при опитни животни при двата опита	96

4.2.	Влияние на многократното приложение на ТЕ, КФ и МФ върху фармакокинетиката на sildenafil	97
4.3.	Влияние на еднократния прием на МФ от зелен чай Банча върху фармакокинетиката на sildenafil	103
5.	Разработване на ФБФК модели	105
VII.	ИЗВОДИ	107
VIII.	ПРИНОСИ	109
IX.	СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИТЕ И УЧАСТИЯТА, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД	110
X.	УЧАСТИЕ В НАУЧНИ ПРОЕКТИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД	111
XI.	БИБЛИОГРАФИЯ	112
XII.	БЛАГОДАРНОСТИ	139

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

БАВ	Биологично активни вещества
ГК	Галокатехин
ГКГ	Галокатехин-3-галат
ДНК	Дезоксирибонуклеинова киселина
ЕГК	Епигалокатехин
ЕГКГ	Епигалокатехин-3-галат
ЕК	Епикатехин
ЕКГ	Епикатехин-3-галат
КФ	Катехинова фракция
МФ	Метилксантинова фракция
СЗО	Световна здравна организация
СЧТ	Стомашно-чревен тракт
ТЕ	Тотален екстракт
т. т.	Телесно тегло
УДФ	Уридиндифосфат
ФБФК	Физиологично базиран фармакокинетичен
ФДЕ5	Фосфодиестераза тип 5
ХЕБ	Хематоенцефална бариера
цГМФ	Цикличен гуанозин монофосфат
ЦНС	Централна нервна система
ЧЕД	Човешка еквивалентна доза
AUC	Площ под кривата
BCRP	Breast cancer resistance protein
CI/F	Привиден клирънс
C_{max}	Максимална плазмена концентрация
COMT	Катехол-О-метилтрансфераза
COX	Циклооксигеназа
CYP450	Цитохром P450
EFSA	Европейски орган за безопасност на храните
EMA	Европейска агенция по лекарствата
FDA	Американска агенция по храни и лекарства
HPLC	Високоэффективна течна хроматография
ICH	Международна конференция по хармонизация
LOQ	Граница на количествено определяне
MAPK	Митоген-активирана протеин киназа

MATE	Multidrug and toxin extrusion
MRP2	Multidrug resistance-associated protein 2
NF-κB	Нуклеарен фактор капа В
NO	Азотен оксид
OATP	Органичен анион-транспортиращ полипептид
OCT	Органичен катионен транспортер
PXR	Прегнан Х рецептор
P-gp	P-гликопротеин
SARS-CoV-2	Тежък остър респираторен синдром коронавирус 2
SD	Стандартно отклонение
T_{max}	Време за постигане на максимална плазмена концентрация
TNF alpha	Тумор некротизиращ фактор алфа
t_{1/2}	Плазмен полуживот
UV	Ултравиолетова област на светлината
V_z/F	Привиден обем на разпределение
w/w	Тегловно/тегловно

I. ВЪВЕДЕНИЕ

Зеленият чай е една от най-консумираните напитки в световен мащаб. Той се произвежда от листата на чаеното растение *Camellia sinensis* (L.) Kuntze. Зеленият чай е известен с редица полезни за здравето ефекти като антиоксидантна, противовъзпалителна и антимикробна активност, противотуморен ефект, както и превантивно действие при ракови заболявания, понижаване на телесното тегло, забавяне на стареенето и други, които са наблюдавани при редица *in vitro* и *in vivo* проучвания [264, 320]. Чаените листа съдържат голямо разнообразие от биологично активни вещества (БАВ) като полифенолни съединения, полизахариди, алкалоиди, сапонини, свободни мастни киселини, витамини, минерали и други [308, 349].

Приема се, че основно значение за описаните благоприятни ефекти на зеления чай имат съдържащите се полифеноли и по-специално катехините. В най-голямо количество обикновено се съдържат следните четири катехина – (–)-епигалокатехин-3-галат (ЕГКГ), (–)-епигалокатехин (ЕГК), (–)-епикатехин-3-галат (ЕКГ) и (–)-епикатехин (ЕК). ЕГКГ е преобладаващият катехин в чаените листа и обикновено представлява 50 до 70 % от съдържащите се катехини. В допълнение, ЕГКГ се посочва като най-активното съединение от групата на катехините, което е отговорно за повечето от биологичните им ефекти [36, 160, 193, 208, 272]. Дискутират се различни механизми на действие на катехините и ЕГКГ, но се счита, че голяма част от ефектите им се дължат на модулиране на ключови сигнални пътища и транскрипционни фактори, в резултат на което оказват влияние върху генната експресия и експресията на протеини в клетките [248, 305, 320; 353]. Въпреки докладваните полезни ефекти обаче, употребата на катехините като потенциални терапевтични средства при различни заболявания е ограничена, поради ниската им стабилност, както и ниската орална бионаличност, вследствие на което постигат много ниски плазмени концентрации [51, 56, 346].

Друга важна група БАВ, съдържаща се в зеления чай са метилксантините. Към природните метилксантини се отнасят кофеин (1,3,7-триметилксантин), теофилин (1,3-диметилксантин) и теобромин (3,7-диметилксантин). В чаените листа в най-голямо количество се среща кофеинът. Теобромин се открива в много ниски количества, а теофилин обикновено не се засича [279]. Кофеин е популярен със своето стимулиращо действие върху централната нервна система (ЦНС), в резултат на което е най-използваният и най-лесно достъпен психостимулант в световен мащаб [104, 240]. Този ефект се дължи най-вероятно на блокадата на аденозинови рецептори в ЦНС, което се приема за основен механизъм на действие на кофеин, отговорен за повечето от фармакологичните му ефекти [15, 99, 231, 326]. Други важни терапевтични ефекти на кофеин са приложението му при лечение на апнея при недоносени деца, както и като адювант в комбинация с неопиоидни аналгетици и нестероидни противовъзпалителни лекарства за потенциране на аналгетичния им ефект [17, 96, 273].

Интересен е фактът, че съставът на зеления чай може да варира в широки граници, в зависимост от редица фактори като условията, при които се отглеждат чаените растения, времето за събиране на листата, процесите на обработка след събиране и условията на съхранение. Различията в съдържанието на БАВ е свързано и с различни органолептични свойства на чаените листа и съответно на чаената напитка след приготвяне [175, 332]. В допълнение, налични са различни видове зелен чай, например китайски, японски, корейски и други, в зависимост от географските условия, при които са отгледани чаените растения, като е установено, че това също оказва влияние върху качествено и количествено съдържание на БАВ [53, 166]. Например, един от най-често консумираните видове зелен чай в Япония се

нарича Банча. Той се получава от чаените листа, които се събират в края на лятото или началото на есента, т.нар. късно сезонно бране, докато от първата и втора реколта листа се получава чайт Сенча [203]. Има данни, че зеленият чай Банча съдържа по-малко количество БАВ, в сравнение с други популярни видове японски зелен чай, например Сенча и Матча, но информацията в научната литература е ограничена [50, 53, 236].

Редица проучвания съобщават за потенциални взаимодействия при едновременен прием на зелен чай и конвенционални лекарства, особено медикаменти, използвани в терапията на сърдечно-съдови и туморни заболявания. Промените в плазмените концентрации на лекарствата могат да повлияят техния терапевтичен потенциал или тяхната безопасност. Въпреки че екстрактът от зелен чай съдържа голям брой компоненти, които могат да взаимодействат с лекарствените молекули, се приема, че катехините са основните съединения, които освен, че са носители на биологичната активност, са причина и за възникване на взаимодействия [345]. Проведени са редица предклинични и клинични проучвания за да се оцени потенциалът на екстракта от зелен чай и/или на съдържащите се в него катехини да модулират активността на лекарство-метаболизиращите ензими, както и на някои трансмембранни транспортери [18]. Резултатите от *in vitro* проучвания сочат, че екстрактът от зелен чай и/или ЕГКГ инхибират активността на цитохромите (CYP1A1, CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C19, CYP2C8, CYP2C9, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4), както и на някои трансмембранни транспортери като Р-гликопротеин (P-gp), органични анион-транспортиращи полипептиди (OATP1A2, OATP1B1, OATP1B3, OATP2B1), органични катионни транспортери (OCT1, OCT2) и транспортери, пренасящи множество лекарства и токсини (MATE1, MATE2-K) [18, 148, 165, 245, 285, 345]. При опитни животни е установено, че екстрактът от зелен чай, както и ЕГКГ самостоятелно повишават плазмените нива на лекарства субстрати на CYP3A4 и на P-gp и понижават плазмените концентрации на лекарства, субстрати на органичните анионни транспортери, вероятно поради инхибиране на активността им. При клинични проучвания обаче, резултатите са противоречиви [18, 345]. От друга страна, кофеинът като основен представител на метилксантините също може да взаимодейства с определени лекарства. Докладвани са предимно взаимодействия на ниво резорбция и метаболизъм, основно със субстрати на CYP1A2 [44, 55]. В допълнение, в предишно проучване наблюдавахме, че метилксантинови фракции, изолирани от Банча и Пуер чаени листа, както и чист кофеин инхибират активността на CYP3A4 *in vitro* [113]. В литературата също се съобщава, че кофеинът потискат активността на ензима CYP3A4 [172]. Освен това, *in vitro* е наблюдавано, че кофеин инхибира метаболизма на dextromethorphan от CYP2D6 [44]. Въпреки това, наличната информация за потенциални взаимодействия между кофеин и лекарства, субстрати на други ензими, освен CYP1A2 е ограничена.

Следователно, предвид докладваните към момента взаимодействия между екстракта от зелен чай и/или ЕГКГ с лекарства, субстрати на CYP3A4 се налага провеждането на допълнителни проучвания за откриване на потенциални взаимодействия. Sildenafil е селективен инхибитор на ензима фосфодиестераза тип 5 (ФДЕ5), използван в терапията на еректилна дисфункция и белодробна артериална хипертония [27, 31]. Той е пример за лекарство, което се подлага почти изцяло на метаболизъм, при това основно от CYP3A4 и се елиминира главно под форма на метаболити [6, 23, 127]. В допълнение, sildenafil спада към лекарствените вещества от клас II (малка разтворимост и висока проникваемост), съгласно Биофармацевтичната класификационна система (BCS) [221]. В допълнение, има данни, че sildenafil е субстрат на P-gp. Предполага се, че ефлуксният транспорт, медиран от този

трансмембранен протеин допринася за ниската орална бионаличност на препарата [66, 137, 148]. Именно лекарства с висока проникваемост, които се подлагат на значителен метаболизъм, какъвто е sildenafil, често участват в лекарствени взаимодействия [221, 259]. Още повече, поради значителния принос на CYP3A4 в метаболизма на sildenafil, едновременното му приложение с лекарства, храни, напитки или билкови екстракти, които повлияват активността на този ензим, може да доведе до възникване на фармакокинетични взаимодействия. Те от своя страна могат да станат причина за повишена токсичност на sildenafil или неуспех на терапията [6]. Известни са взаимодействията между sildenafil и инхибитори на CYP3A4, които могат да повишат риска за поява на нежелани ефекти [82, 206]. Същевременно са докладвани и взаимодействия между sildenafil и растителни екстракти, които също повлияват фармакокинетиката на препарата. Освен това, sildenafil се приема и от мъже без медицински показания с цел повишаване на сексуалната издръжливост, което може да доведе до неправилно използване на лекарството и повишен риск за нежелани лекарствени реакции, особено ако се прилага едновременно с други медикаменти и/или фитопрепарати. В допълнение, има данни, че sildenafil е бил незаконно добавен към състава на някои растителни препарати и алкохолни напитки. Възможността да бъде закупен и използван без лекарско предписание или да бъде приет случайно допълнително задълбочава проблема с неговата ирационална употреба и повишава вероятността за лекарствени взаимодействия, включително взаимодействия с растителни компоненти [31, 251, 297].

Следователно, въз основа на гореизложеното, има сериозни основания да се предположи, че е възможно да настъпят взаимодействия при едновременен прием на sildenafil и екстракт от зелен чай и/или ЕГКГ. В допълнение, предвид наблюдаваната *in vitro* инхибиция на CYP3A4 от метилксантинови фракции, изолирани от Банча и Пу-ер чай и чист кофеин, предполагаме, че е възможно да възникне фармакокинетично взаимодействие *in vivo* след едновременно приложение на sildenafil и метилксантини, в частност кофеин. Настоящият дисертационен труд има за цел да провери изложената хипотеза, като сме избрали да използваме конкретен вид зелен чай, а именно японски зелен чай Банча. Причината е, че информацията в научната литература относно съдържанието на активни вещества, потенциалните терапевтични и токсични ефекти на този вид японски зелен чай, както и потенциалът да участва в лекарствени взаимодействия е доста оскъдна, въпреки че Банча е един от масово употребяваните чайове в Япония.

II. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

През последните десетилетия значително нараства употребата на растителни препарати под форма на чайове, хранителни добавки или лекарствени продукти. Все по-широката употреба на фитопрепарати е породена от търсенето на алтернативни начини за профилактика и/или лечение на редица заболявания [32, 33]. Растенията са използвани още от нашите предци като средства за прехранване. Впоследствие, растенията и техни части се превръщат в основен компонент на т.нар. традиционна медицина, която се е практикувала в целия свят в продължение на хиляди години. В различните страни по света се срещат различни форми на традиционна медицина като традиционна китайска медицина, аюрведа (традиционна индийска медицина), кампо (традиционна японска медицина), традиционна корейска медицина и други, които се практикуват и до днес. С бурното развитие на съвременната медицина през 19 в. и получаването на първите синтетични лекарства е имало сериозни опасения, че значително ще се ограничи използването на растителни продукти. Това обаче не се е осъществило и в днешно време растенията продължават да бъдат важен източник за изолиране на биологично активни съединения, които се проучват като потенциални лекарствени средства или служат за получаване на полусинтетични производни [29, 363]. Понастоящем терапевтичните ефекти на някои лекарствени продукти с растителен произход са добре проучени и потвърдени в клинични изпитвания и се използват широко в практиката. Класически примери са екстрактът от плодове на бял трън (*Silybum marianum*), който има хепатопротективно действие, екстрактът от жълт кантарион (*Hypericum perforatum*), използван като фитоантидепресант и екстрактът от листа на гинко билоба (*Ginkgo biloba*), който се прилага при деменция и периферни съдови заболявания [22, 88]. В таблица 1 са представени някои често употребявани фитопрепарати.

Таблица 1. Често употребявани фитопрепарати и техните основни фармакологични ефекти.

Растителие	БАВ	Ефект	Механизъм	Източник
Екстракт от жълт кантарион (<i>Hypericum perforatum</i>)	Хиперфорин, хиперицин	Антидепресантен	Предполага се инхибция на обратния транспорт на серотонин и допамин в пресинаптичните неврони на ЦНС и намалена експресия на бета-адренорецептори в ЦНС	242
Екстракт от листа на гинко билоба (<i>Ginkgo biloba</i>)	Флавоноиди, терпенови лактони (гинколиди и билобалид)	Антиоксидантен, подобрява когнитивната функция, вазодилатиращ	Предполага се повишаване на холинергичната невротрансмисия в ЦНС чрез инхибиране на ацетилхолинестеразата, намаляване на производството на свободни радикали в ЦНС, повишено освобождаване на ендогенни вазодилатиращи субстанции	241

Екстракт от плодове на бял трън (<i>Silybum marianum</i>)	Силимарин	Антиоксидантен, хепатопротективен, противовъзпалителен	Потиска активността на нуклеарен фактор капа В (NF-kB) и производството на цитокини, улавя свободните радикали, потиска липидната пероксидация и др.	97
Екстракт от плодове на сереноа репенс (<i>Serenoa repens</i>)	Масни киселини и фитостероли	Подобрява симптомите при доброкачествена простатна хиперплазия	Предполага се антиандрогенен ефект (инхибиция на 5-алфа-редуктаза) и противовъзпалителен ефект	177
Екстракт от листа на зелен чай (<i>Camellia sinensis</i>)	Катехини	Антиоксидантен	Улавяне на свободните радикали чрез пренос на водороден атом или единичен електрон	258
Екстракт от андрографис (<i>Andrographis paniculate</i>)	Дитерпенови лактони (андрографолид и др.)	Противовъзпалителен	Предполага се инхибиция на NF-kB, активиране на ядрения еритроид-свързан фактор 2 (Nrf2) и предотвратяване разграждането на хистон деацетилаза 2 (HDAC2)	307, 374
Екстракт от корен и коренище на женшен (<i>Panax ginseng</i>)	Тритерпенови сапонини (гинзенозиди)	Тонизиращ, Антиоксидантен, Противовъзпалителен	Потиска натрупването на свободни радикали; предполага се инхибиране на NF-kB сигналния път	257, 339
Екстракт от ехинацея (<i>Echinacea spp.</i>)	Производни на кафеената киселина, полизахариди, алкариди	Имуностимулиращ	Предполага се активиране на неутрофилите, макрофагите, полиморфонуклеарните левкоцити и клетките естествени убийци	207
Екстракт от червен ориз	Монаколин К	Понижава нивата на холестерол в кръвта (LDL и общ холестерол)	Потиска синтеза на холестерол чрез инхибиране на 3-хидрокси-3-метил- глутарил-КоА редуктаза (HMG-CoA редуктаза)	72
Екстракт от спирулина (<i>Spirulina platensis</i>)	Фикоцианин	Имуностимулиращ	Предполага се стимулиране на фагоцитната активност на макрофагите и повишено производство на цитокини като тумор некротизиращ	347

			фактор алфа (TNF alpha), интерферон гама (IFN gamma), интерлевкени (ILs), както и чрез активиране и мобилизиране на Т- и В-лимфоцити	
Екстракт от ферментирани соеви зърна (<i>natto</i>) под действието на <i>Bacillus subtilis</i>	Натокиназа	Тромболитичен	Директно разгражда фибрина, освен това повишава нивата на тъканния плазминогенен активатор (tPA) и ендогенната урокиназа	24, 344
Екстракт от годжи бери (<i>Lycium barbarum</i>)	Полизахариди, полифеноли	Антиоксидантен	Улавяне на свободните радикали, повишаване на нивата на ендогенните антиоксидантни ензими като супероксид дисмутаза (SOD), каталаза (CAT) и глутатион пероксидаза (GSH-Px), намаляване на плазмените нива на малондиалдехид (MDA)	105, 201

През последните години все по-популярна става употребата на антиоксиданти с растителен произход, най-често под формата на подправки към храните или във вид на хранителни добавки, съдържащи един или няколко растителни екстракта. Съществуват доказателства, че натурални антиоксиданти като аскорбиновата киселина и токоферолите намаляват риска за развитие на сърдечно-съдови и туморни заболявания. Освен това е доказано, че съществува връзка между повишените нива на свободни радикали и развитието на някои заболявания (възпалителни заболявания на червата, атеросклероза, рак и други) [256, 320]. Съвременният начин на живот, който е съпроводен от ежедневно излагане на стресови фактори, неправилно хранене и намалена физическа активност играе важна роля в индукцията на оксидативен стрес. Това налага търсенето на различни методи за поддържане на клетъчната хомеостаза, с цел да се намали риска от клетъчно и тъканно увреждане [289]. Натурални антиоксиданти се срещат в зърнените храни, плодовете и зеленчуците, някои семена (ленено, слънчогледово, тиквено и други), билки, какаови продукти, напитки като кафе, чай, червено вино и други. Природните антиоксиданти са представители основно на полифенолите, каротеноидите и витамините [256, 350]. Добре известна е например широката употреба на зелен чай поради съдържанието на вещества с изразени антиоксидантни свойства [22].

1. Зелен чай

Чаят е една от най-популярните напитки в света, втора по консумация след водата. Чаят се приготвя от листата на чаеното растение *Camellia sinensis* (L.) Kuntze, което принадлежи към семейство Чаеви (Theaceae) [264]. Чаят се разделя най-общо на зелен чай, оолонг чай и черен чай, в зависимост от производствения процес и степента на ферментация, на която са подложени чаените листа. Различията в производството на тези видове чай са причина за

различно качествено и количествено съдържание на БАВ [264, 362]. Според други източници, чаят може да се раздели на бял, зелен, жълт, оолонг, черен и тъмен чай отново в зависимост от начина, по който са обработени чаените листа и по-специално липсата или наличието на ферментационен процес, както и неговата продължителност [308, 368].

Зеленият чай е пример за ежедневно консумирана напитка с растителен произход в световен мащаб. В някои държави като Китай и Япония приемът на зелен чай се е превърнал в специален ритуал, който представлява част от националните традиции и ценности [149]. В допълнение, зелен чай се предлага и под форма на хранителни добавки, съдържащи растителен екстракт. Зеленият чай произхожда от Китай, но в днешно време се отглежда в редица страни [308]. Той се произвежда чрез обработка и последващо сушене на чаените листа без провеждане на ферментационен процес. В Япония листата се обработват с пара при около 100 °С, докато в Китай се използва по-висока температура. Тази техника е предназначена да деактивира ензимите, отговорни за разграждане на някои БАВ и хлорофила, в резултат на което се запазва антиоксидантната активност и зеленият цвят на чаените листа. След това, листата се сушат при температура 85-88 °С за около 20 минути, при което съдържанието на вода се намалява до определена стойност и се осигурява стабилността на готовия продукт по време на съхранение [87, 174, 349]. Съставът на зеления чай може да варира в широки граници, в зависимост от условията, при които се отглеждат чаените растения, времето за събиране на листата, процесите на обработка след събиране и условията на съхранение. Установено е, че най-високо съдържание на БАВ се открива, когато чаените листа се обработят с пара непосредствено след събирането им, като по този начин се инактивира окислението на активните компоненти. Различията в съдържанието на БАВ е свързано и с различен вкус, аромат и цвят на чаените листа и съответно на чаената напитка след приготвяне [175, 332].

На пазара са налични различни видове зелен чай, например китайски, японски, корейски и други, в зависимост от географските условия, при които са отгледани чаените растения, като е установено, че това също оказва влияние върху качествено и количествено съдържание на БАВ [53, 166]. Един от основните видове зелен чай, който се консумира в Япония се нарича Банча. Той се получава при обиране на третата или четвърта реколката от чаени листа в края на лятото или началото на есента (късно сезонно бране), докато от първата и втора реколтата листа се получава чай, наречен Сенча [203]. Има данни, че зеленият чай Банча съдържа по-малко количество БАВ, като например кофеин и L-теанин в сравнение с други популярни видове японски зелен чай, например Сенча и Матча, но има противоречива информация относно съдържанието на катехини [50, 53, 236]. Информацията в научната литература относно съдържанието на активни вещества, потенциалните терапевтични и токсични ефекти на този вид японски зелен чай, както и потенциалът да участва в лекарствени взаимодействия е доста оскъдна, въпреки че Банча е един от масово употребяваните чайове в Япония.

1.1. Съдържание на биологично активни вещества в зеления чай

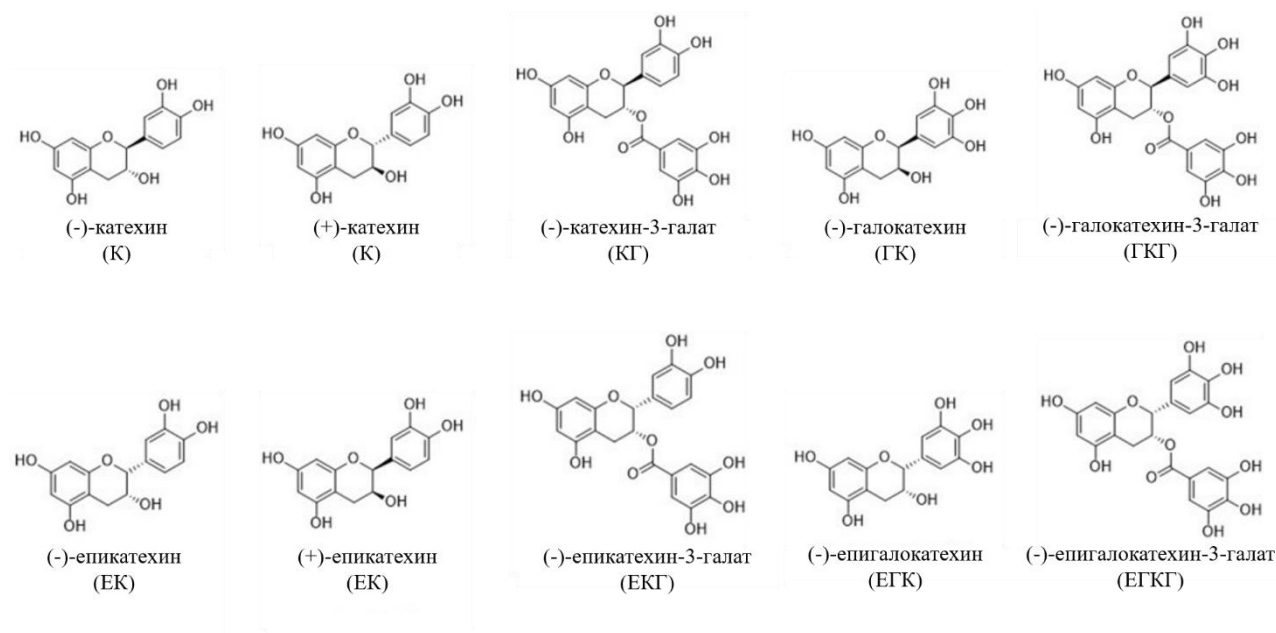
Екстрактът от зелен чай съдържа голямо разнообразие от БАВ като полифенолни съединения, полизахариди, алкалоиди, сапонини, свободни мастни киселини, витамини, минерали и други [308, 349].

1.1.1. Полифенолни съединения

Чаените листа съдържат голямо количество полифенолни съединения, предимно флавоноиди и техни производни (катехини, теафлавини, теарубигини, танини, кверцетин,

кемпферол, мирицетин и други) и фенолни киселини (галова киселина, хлорогенова киселина, елагова киселина и други). При различните видове чай преобладават различен вид полифенолни съединения в зависимост от степента на ферментация, която са претърпели, тъй като някои от тях са нестабилни и се подлагат на окисление [264, 308, 320, 353].

Зеленият чай съдържа основно катехини (флаван-3-оли), които представляват близо 70 % от тоталното полифенолно съдържание и могат да достигнат 30 до 42 % от сухото тегло на чаените листа. Основните катехини, които се откриват в чаените листа са (-)-епигалокатехин-3-галат (ЕГКГ), (-)-галокатехин-3-галат (ГКГ), (-)-епигалокатехин (ЕГК), (-)-галокатехин (ГК), (-)-епикатехин-3-галат (ЕКГ), (-)-катехин-3-галат, (-)-епикатехин (ЕК), (+)-епикатехин, (-)-катехин и (+)-катехин. На фиг. 1 са представени техните структурни формули. В най-голямо количество обикновено се съдържат следните четири катехина – (-)-ЕГКГ, (-)-ЕГК, (-)-ЕКГ и (-)-ЕК. От тях, ЕГКГ е преобладаващият катехин в чаените листа и представлява 50 до 70 % от съдържащите се катехини [36, 160, 193, 208].



Фигура 1. Структурни формули на основните катехини, срещани се в зеления чай [268].

❖ Фармакокинетика

След перорално приложение резорбцията на катехините се осъществява вероятно в началните отдели на тънките черва, но оралната им бионаличност е много ниска, поради слаба резорбция в стомашно-чревния тракт (СЧТ). Оралната бионаличност на ЕГКГ е около 1 %. Установено е, че след прием на гладно резорбцията се повишава [36, 146]. Плазмените концентрации на катехините след перорално приложение обикновено са значително по-ниски (5-50 пъти) от ефективните концентрации, използвани при много *in vitro* проучвания. Има предположения, че е възможно ефлуксни транспортери като MRP2 протеина (multidrug resistance-associated protein 2) да са причина за ниската степен на резорбция на катехините при хора. В допълнение към това, при *in vitro* проучвания е установено, че катехините са субстрати на MRP2 транспортера. Освен това, катехините са субстрати и на P-гр, един от основните ефлуксни протеини в чревните клетки. Въпреки ниските плазмени нива на катехини след перорално приложение, при хора е наблюдавано непропорционално нарастване на площта под кривата плазмена концентрация-време (AUC) и максималната плазмена концентрация (C_{max})

на ЕГКГ с повишаване на приетата доза екстракт от зелен чай, което би могло да се обясни с насищането на чревни ефлуксни транспортери или насищане на ензимите, отговорни за пресистемния метаболизъм при прием на по-високи дози от екстракта, в резултат на което се повишават значително степента на резорбция и оралната бионаличност на ЕГКГ. Наличието на полиморфизъм в Р-гр също може да е причина за вариации в бионаличността на катехините след перорален прием на зелен чай [14, 51, 69]. В допълнение, катехините, и особено ЕГКГ са нестабилни съединения, което вероятно също допринася за тяхната ниска орална бионаличност. ЕГКГ бързо се разлага под въздействието на светлина, висока температура, промени в рН или в присъствието на кислород [36, 56, 146]. Катехините са сравнително стабилни при кисело рН и нестабилни при по-високи стойности на рН, например в червата, което води до тяхното разграждане [69, 268, 269]. Известно е, че катехините претърпяват процеси на автоокисление и епимеризация в зависимост от условията на средата (температура, рН), в която се намират. Още повече, катехините вероятно са субстрати на различни транспортери в чревните епителни клетки и резорбцията им е стереоспецифична и структурно специфична. Освен това, различията в структурата са причина и за различен антиоксидантен потенциал [69, 268, 346, 353]. В кръвната плазма са установени по-високи плазмени концентрации на епи-изомерите (ЕГК, ЕК и ЕГКГ). Също така е наблюдавано, че катехините, които не са конюгирани с галова киселина (ЕГК, ГК и ЕК) постигат по-високи плазмени нива, отколкото естерите на катехините с галова киселина (ЕГКГ, ГКГ и ЕКГ) [69]. Все пак, има редица начини за повишаване на стабилността и оралната бионаличност на катехините като едновременен прием с аскорбинова киселина, ксилитол, захароза, лимонена киселина, бутилхидрокситолуен, етилендиамин тетраоцетна киселина (ЕДТА) или с плодови сокове [36, 56].

Въпреки че, плазмените концентрации на катехините са ниски, не се изключва възможността да постигат високи концентрации в тъканите. Установено е, че се разпределят в различни тъкани като око, бели дробове, СЧТ, пикочен мехур и други. При голяма част от проведените проучвания, най-висока концентрация на ЕГКГ се открива в СЧТ. Интересен е фактът, че разпределението на катехините в очните тъкани също показва стереоспецифичност, като е установено, че в стъкловидното тяло на окото се натрупват предимно не епи-изомерите на катехините (ГК, катехин, ГКГ), но без съществена разлика в постигнатите концентрации на отделните катехини, в зависимост от конюгацията с галова киселина [69].

След перорален прием катехините се подлагат на метаболизъм в черния дроб и червата като преминават реакции на глюкурониране, сулфатиране и метилиране под действие съответно на ензимите уридин дифосфат (УДФ) глюкуронил трансфераза, сулфотрансфераза и катехол-О-метилтрансфераза (СОМТ). Получените метаболити също могат да бъдат подложени на реакции на конюгация. В допълнение, има предположения, че естерите на галовата киселина не се подлагат на метаболитни реакции от фаза II. Тези съединения показват по-дълъг плазмен полуживот, вероятно поради по-високата си липофилност и по-здравото свързване с плазмените протеини [69, 136]. Нерезорбираните катехини се подлагат на катаболизъм в дебелото черво от бактериалната микрофлора и получените метаболити (фенолни киселини и други) могат впоследствие да бъдат резорбирани [36, 51, 69, 269].

Екскрецията на катехините се осъществява чрез бъбреците и жлъчката като се елиминират предимно под формата метаболити в състава на урината и фекалиите. Катехините, които не са конюгирани с галова киселина се елиминират основно с урината под форма на изходните съединения и техни конюгати, докато естерите на катехините с галова киселина се

елиминират предимно с фекалиите. ЕГКГ и негови конюгати не са открити в урината, което показва, че екскрецията му не е ренална [36, 51, 69, 136, 269].

❖ **Механизъм на действие и терапевтични ефекти**

Редица *in vitro* и *in vivo* проучвания съобщават за протективните и лечебни ефекти на чаените катехини. Въпреки че зеленият чай е отдавна известен и консумиран от хората под различни форми, неговото активно проучване продължава и до днес.

Антиоксидантен ефект

Един от най-добре проучените ефекти на чаените полифеноли, в частност катехините е антиоксидантният ефект. Той е наблюдаван както *in vitro*, така и *in vivo*, включително в клинични проучвания. Чаените полифеноли включват голям брой съединения с различна структура, поради което притежават и различна антиоксидантна активност [320, 353]. Отделните катехини също показват различна биологична активност, включително антиоксидантен потенциал, което се дължи на тяхната структура и по-специално на броя и разположението на хидроксилните групи в молекулата им. Установено е, че ЕГКГ е най-активното съединение и се предполага, че той е отговорен за повечето биологични ефекти на катехините [34, 272, 290, 351].

Приема се, че няколко основни механизма са отговорни за антиоксидантния потенциал на катехините – повишаване на нивата на ендогенните антиоксидантни ензими чрез регулиране на тяхната експресия, инхибиране на липидната пероксидация, директно улавяне на свободните радикали и хелатиране на метални йони, което потиска окислителните реакции [353]. Доказано е, че антиоксидантна активност на катехините е свързана с повишаване на серумните нива на ендогенните антиоксидантни ензими като каталаза (CAT), глутатион пероксидаза (GSH-Px), супероксид дисмутаза (SOD) и едновременно намаляване на образуването на малон диалдехид (MDA), който се получава в процеса на липидна пероксидация и се използва като маркер за оксидативен стрес [12, 353]. Една от основните физиологични роли на антиоксидантните ензими е инактивиране на свободните радикали, които представляват продукти от нормалния клетъчния метаболизъм. Те биват свободни кислородни форми (ROS) и свободни азотни форми (RNS). При нормални условия в клетката съществува баланс между генерирането на свободни радикали и тяхното отстраняване. Вследствие нарушаването на този баланс се повишава количеството на генерираните свободни радикали в клетките. Тези съединения са нестабилни и силно реактивни и могат да атакуват липидите, протеините и нуклеиновите киселини. Това е причината за възникване съответно на оксидативен или нитрозативен стрес, които водят до клетъчно увреждане [256, 272, 320]. Освен това, катехините могат директно да улавят свободните радикали, чрез взаимодействие с нестабилните и силно реактивни форми, при което се образуват относително стабилни фенолни кислородни радикали [189, 320, 353]. Също така, катехините могат да хелатират метални йони (Fe^{2+} , Cu^{2+} , Ca^{2+}), които също катализират някои окислителни реакции, като образуват с тях неактивни комплекси. В резултат на описаните процеси, катехините потискат и иницирането на процеса липидна пероксидация [320, 353].

Противовъзпалителен ефект

Катехините показват противовъзпалителна активност, свързана с модулиране на ключови сигнални пътища и транскрипционни фактори в клетката като нуклеарен фактор капа В (NF- κ B), AP-1 транскрипционен фактор, сигналния път митоген-активирана протеин киназа

(МАРК) и други. Това е свързано с повлияване на генната експресия и експресията на протеини в клетките. Крайният резултат е намалена продукция на проинфламаторни цитокини като тумор некротизиращ фактор алфа (TNF alpha), интерлевкини (IL-1, IL-6, IL-8) и други [248, 305, 320]. Предполага се, че инхибицията на NF-kB сигналният път има основно значение за противовъзпалителната активност на катехините [178, 305]. NF-kB сигналният път е въввлечен в редица клетъчни процеси, включително възпаление, имунен отговор, клетъчна пролиферация, диференциация и смърт. Този сигнален път е подложен на строго регулиране и нарушенията в регулацията му се свързват с развитието на някои заболявания. Активиране на NF-kB сигналният път се наблюдава при възпалителни реакции, туморни заболявания и нарушения във функционирането на имунната система [142, 226, 290]. В допълнение, катехините могат да инхибират и други сигнални пътища в клетката, в резултат на което се потиска активирането на STAT1 транскрипционен фактор, чието активиране също има отношение към иницирането на възпалителната реакция [320]. Освен това, има данни, че ЕГКГ потиска активността на циклооксигеназите (COX), като намалява тяхната експресия вследствие на влиянието върху различни клетъчни сигнални пътища, което вероятно допринася за неговата противовъзпалителна активност [248, 290].

Противотуморна активност

Редица проучвания показват, че катехините са ефективни в превенцията и лечението на туморни заболявания. ЕГКГ е сочен като агент, който може да предотврати развитието на раковите образувания [69, 310]. Проведени са голям брой предклинични изследвания, с цел да се оцени противотуморната активност на екстракта от зелен чай, катехините и/или ЕГКГ и да са проучат предполагаемите механизми, отговорни за наблюдаваните ефекти. В допълнение, противотуморният ефект на ЕГКГ е изследван и в клинични проучвания [126]. Въпреки че точният механизъм на действие на катехините не е напълно изяснен се предполага, че противотуморната активност е свързана с техния антиоксидантен ефект, индуциране на апоптоза, инициране на промени в клетъчния цикъл, модулиране на клетъчни сигнални пътища (например NF-kB сигналния път) и на експресията на протеини, модулиране на активността на ензими, включително лекарство-метаболизиращите и други. Описаните механизми вероятно са отговорни и за стимулиране на физиологичните функции и превенцията на раковите заболявания [69, 290, 320]. Освен това, голям брой предклинични проучвания съобщават, че ЕГКГ се намесва в няколко основни клетъчни сигнални пътя в туморните клетки. Това са NF-kB, EGFR, VEGF, МАРК и PI3k/АКТ сигналните пътища. В резултат на това, ЕГКГ регулира експресията на редица протеини и проявява антипролиферативен ефект, като потиска растежа и деленето на туморните клетки, индуцира апоптоза, блокира прогресията на клетъчния цикъл и води до клетъчна смърт [126, 290, 295]. Установено е също, че ЕГКГ инхибира активността на ензима циклооксигеназа 2 (COX-2), вследствие на потискане на МАРК сигналния път, което се свързва с ефектите му върху клетъчния цикъл и с индукцията на клетъчна смърт при ракови модели [290, 295]. В допълнение, цитохромите (CYP450) участват в метаболитните реакции от фаза I, както и в превръщането на проканцерогените в силно реактивни междинни продукти, които могат да се свържат с молекулата на дезоксирибонуклеиновата киселина (ДНК), липиди или протеини и да иницират образуването на свободни радикали. Същевременно, ензимите от фаза II участват в детоксикацията на клетката чрез реакции на конюгация с ендогенни субстрати. Има данни, че катехините инхибират CYP450 ензимите и активирането на проканцерогените и

едновременно с това повишават нивата на детоксикиращите ензими от фаза II. Предполага се, че тези процеси допринасят за техния противотуморен ефект, както и за антиоксидантната и противовъзпалителна активност [295, 320]. Докладвана е също инхибиция на различни тирозин кинази от чаените полифеноли, поради което се предполага, че биха могли да потенцират противотуморната активност на тирозин киназните инхибитори, основни лекарства, използвани в таргетната противотуморна терапия [202]. В допълнение, ЕГКГ самостоятелно също би могъл да се използва като адювантно средство към противотуморната химиотерапия. Наблюдаван е синергистичен антипролиферативен и про-апоптичен ефект при едновременно приложение на ЕГКГ и *tamoxifen in vitro*, при човешки клетъчни линии от рак на гърдата, а също и *in vivo*. Синергизъм е установен и при комбиниране на ЕГКГ с други противотуморни средства като *doxorubicin* и *paclitaxel* [126, 290, 310]. Не бива да се забравя обаче, че е възможно да възникнат взаимодействия между противотуморните средства и екстракта от зеления чай или ЕГКГ. Следователно, потенциалните рискове, свързани с комбинираното им приложение трябва да бъдат внимателно проучени и оценени [202].

Понижаване на холестероловите нива и намаляване на телесното тегло

Различни проучвания докладват, че екстрактът от зелен чай води до намаляване на телесното тегло, подобряване на глюкозия и липидния метаболизъм, особено при пациенти със затлъстяване и метаболитен синдром [191]. Консумацията на зелен чай се свързва с по-нисък риск за развитие на захарен диабет тип 2 и на сърдечно-съдовите усложнения, свързани със захарния диабет [59]. Yuan и сътрудници (2018) са изготвили мета-анализ на проведени рандомизирани контролирани проучвания, според който употребата на зелен чай понижава плазмените нива на общия холестерол и на липопротеините с ниска плътност (LDL) при хора с наднормено тегло и затлъстяване [362]. Дискутират се различни механизми, отговорни за влиянието на зеления чай върху телесното тегло. Според някои автори понижаването на теглото се дължи на влияние върху чревната микрофлора или на потискане на храносмилането и резорбцията на макронутриенти с храната (липиди, протеини, въглехидрати), вероятно поради инхибиция на храносмилателни ензими и трансмембранни транспортери. Според друг предполагаем механизъм, катехините, включително ЕГКГ активират аденозин монофосфат-активирана протеин киназа (АМРК) и регулират експресията на протеини, участващи в клетъчния метаболизъм, което обяснява повечето метаболитни ефекти на зеления чай [270, 354]. Освен това е установено, че катехините инхибират натрупването на липиди в преадипоцитите, както и тяхната диференциация и индуцират апоптоза в зрелите адипоцити, вероятно поради активиране на АМРК или поради модулиране на други сигнални пътища [145, 191]. В допълнение, катехините инхибират активността на ензима СОМТ, в резултат на което повишават ендогенните нива на норадреналин, който стимулира окислението на мастните киселини и термогенезата [145].

Антимикробна активност

Зеленият чай и съдържащите се в него катехини притежават антибактериална и противовирусна активност [346, 351]. Антибактериалната активност на катехините е наблюдавана в много *in vitro* проучвания. Те проявяват бактерициден ефект срещу някои грам-положителни (*Staphylococcus aureus*) и грам-отрицателни бактерии (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Helicobacter pylori*), включително мултирезистентни щамове стафилококи. В допълнение, наблюдаван е синергизъм при едновременно приложение на някои катехини с антибактериални лекарства. Установено е, че катехините имат директни и

индиректни ефекти върху бактериалната клетка, вероятно дължащи се на повлияване на генната експресия, инхибиране на есенциални ензими и директно свързване с бактериалната клетъчна мембрана. Последното може да доведе до повишена пропускливост на мембраната или генериране на водороден пероксид (H_2O_2) и последващо увреждане на клетъчната мембрана, както и до невъзможност за свързване с клетките на гостоприемника. Освен това е докладвано, че катехините инхибират активността на бактериалните токсини [60, 121, 269, 346]. Още повече, при *in vitro* проучвания е установено, че ЕГКГ инхибира образуването на зъбна плака и растежа на *Streptococcus mutans*, една от основните бактерии, които се свързват с появата на кариес, вероятно поради повлияване на генната експресия и образуването на есенциални протеини [269, 284].

Катехините проявяват противовирусен ефект срещу редица ДНК- и РНК-вируси, наблюдаван *in vitro*. Предполага се, че това се дължи на свързване на ЕГКГ с протеини в клетките и нарушаване на техните функции, на взаимодействие с рецептори, разположени по повърхността на клетъчната мембрана, в резултат на което се потиска вирусното проникване или на повлияване на генната експресия [181, 219, 351]. Частично пречистена фракция, получена от воден екстракт от листа на зелен чай (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze), наречена синекатехини е одобрена от Американската агенция по храни и лекарства (FDA) за локално лечение на външни генитални и перианални брадавици, чиито основен причинител е човешкият папиломен вирус. Тази катехинова фракция съдържа между 85 % и 95 % катехини тегловно, от които > 55 % ЕГКГ и се прилага при имунокомпетентни пациенти на 18 годишна възраст или повече [36, 227, 316, 389].

В допълнение към противовирусната активност на катехините, през последната година *in vitro* проучвания съобщават, че ЕГКГ потиска репликацията на вируса SARS-CoV-2 (тежък остър респираторен синдром коронавирус 2). Това е нов щам на коронавирус, открит преди около 2 години. Той е причинител на заболяването коронавирусна болест 2019 (COVID-19), което през 2020 г. е обявено от Световната здравна организация (СЗО) за пандемично заболяване и към днешна дата е причина за смъртта на милиони хора по света от началото на пандемията. Протичането на COVID-19 е строго индивидуално при отделните пациенти – от липса на симптоматика до развитие на тежки усложнения като дихателна и мултиорганна недостатъчност, както и нарушения в коагулацията с потенциална опасност за живота [115, 329]. През изминалите две години непрекъснато се работи върху създаването на нови лекарствени средства, които да се прилагат в терапията на заболяването. До момента са създадени и се прилагат ваксини, които имат за цел да предотвратят заразяването с вируса или да намалят тежестта на протичане, в случай на заразяване. Лекарствените средства със специфично противовирусно действие срещу SARS-CoV-2 обаче са малко, някои още в процес на изпитване. Противовирусните препарати, които са включени в наръчника за лечение на COVID-19, издаден от Националните институти по здравеопазване (National Institutes of Health, NIH) към Департамента по здравеопазване на САЩ са: nirmatrelvir/ritonavir, molnupiravir, remdesivir, sotrovimab, tixagevimab/cilgavimab, casirivimab/imdevimab [381]. От тях, nirmatrelvir/ritonavir, remdesivir, sotrovimab, casirivimab/imdevimab, както и regdanvimab са одобрени от Европейската агенция по лекарствата (European Medicines Agency, EMA) за приложение в Европейската общност. Препаратът molnupiravir очаква получаване на разрешение за употреба, докато tixagevimab/cilgavimab е в процес на преглед и оценка на представената документация [382]. Междувременно не спират да се проучват и утвърдени лекарствени средства, както и съединения с растителен произход, които биха могли да бъдат

използвани при лечението на коронавирусното заболяване. Предвид известните противовирусни свойства на катехините, ЕГКГ е потенциален противовирусен агент в борбата срещу SARS-CoV-2. Противовирусната му активност вероятно се дължи на действие върху ACE2 рецептора, необходим за навлизане на вируса в клетките на гостоприемника или на потискане на вирусната протеаза и РНК-зависимата РНК полимераза, необходими за вирусното размножаване. Въпреки това, на този етап ЕГКГ не може да се счита за терапевтично средство при COVID-19 поради липсата на специфичност, но би могъл да се приема като помощно средство, особено в началните етапи на болестта с цел стимулиране на физиологичните функции [45, 115]. Все пак, не бива да се подценява възможността за лекарствени взаимодействия с другите едновременно прилагани медикаменти при лечение на коронавирус.

Други ефекти

Проучванията показват, че зеленият чай, както и ЕГКГ имат невропротективно действие. Установено е, че консумацията на зелен чай се свързва с по-нисък риск за развитие на Болест на Алцхаймер, Болест на Паркинсон и деменция при азиатците. Освен това, зеленият чай и съдържащият се в него ЕГКГ потискат образуването на амилоид в процеса на стареене и могат да облекчат когнитивните нарушения, свързани с неговото натрупване [159, 209, 334]. Не на последно място, консумацията на зелен чай намалява риска за сърдечно-съдови заболявания, поради понижаване на нивата на LDL, понижаване на кръвното налягане и подобряване на ендотелната функция [354].

Към настоящия момент, терапевтичното приложение на катехините е ограничено основно поради тяхната ниска орална бионаличност и ниска стабилност. Въпреки това се проучват различни методи, чрез които да се преодолеят тези проблеми. Основен подход е включването на катехините в състава на липозоми, наночастици или други лекарствени форми, използвани като носители на лекарствени вещества, които да повишат стабилността, стомашно-чревната резорбция и съответно плазмените концентрации. Различни проучвания показват, че тези методи имат потенциала да повишат ефективността на катехините, включително ЕГКГ *in vivo* [51, 56, 346].

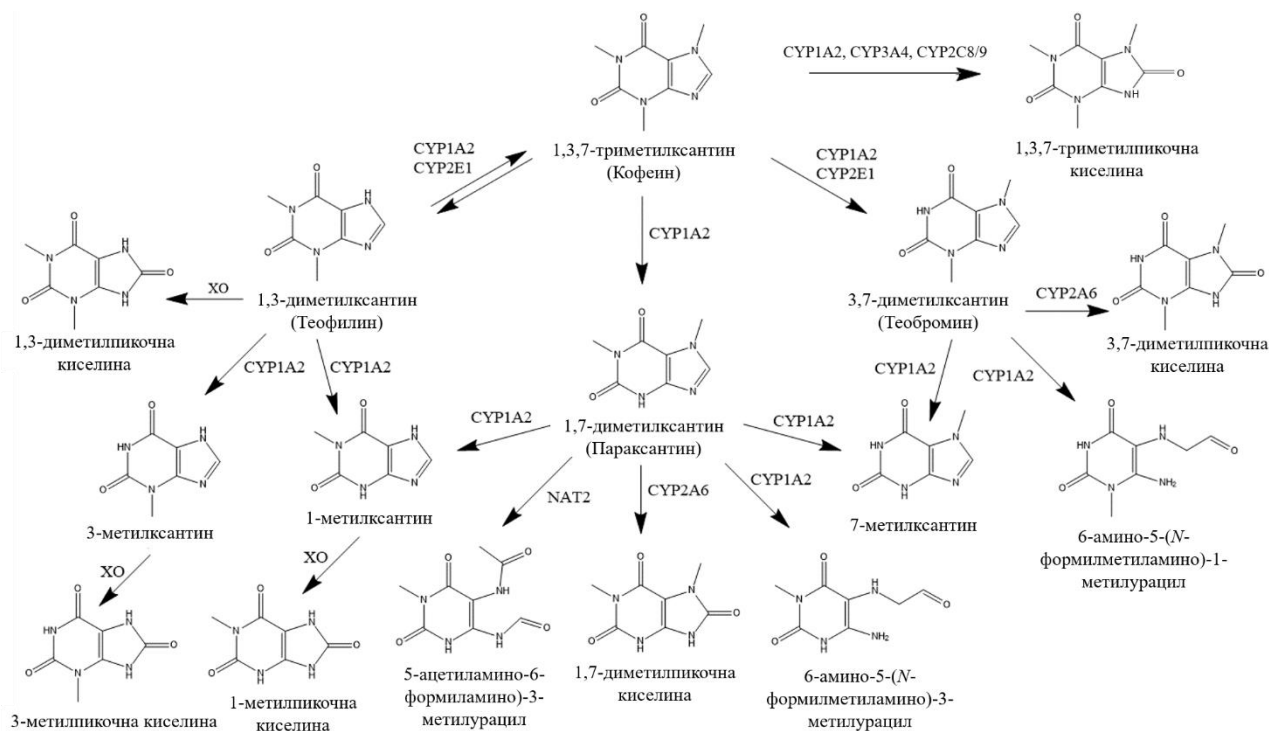
1.1.2. Алкалоиди

От алкалоидите, влизащи в състава на зеления чай, с най-голямо значение са пуриновите алкалоиди. Към тях спадат метилксантините с природни представители – кофеин (1,3,7-триметилксантин, caffeine), теофиллин (1,3-диметилксантин, theophylline) и теобромин (3,7-диметилксантин, theobromine). В зеления чай в най-голямо количество се среща кофеинът. Теобромин се открива в много ниски количества, а теофиллин обикновено не се засича [279]. Според Xing и сътрудници, кофеинът представлява около 2 до 4 % от сухото тегло на зеления чай [349]. Чаените листа, заедно с кафеените и какаови зърна, йерба мате и гуарана са основните природни източници на метилксантини [279]. Поради това, че кофеинът е основният метилксантин в чаените листа са разгледани основно неговата фармакокинетика, фармакодинамика и терапевтични ефекти.

❖ Фармакокинетика

След перорално приложение кофеинът се резорбира бързо и напълно в тънките черва и стомаха. При хора > 99 % от приетия кофеин се резорбира в рамките на 45 минути след приема.

Плазменият му полуживот е средно 3 до 5 часа, но може да варира и зависи пряко от приетата доза [39, 52, 240, 271]. Кофеинът има добро разпределение в организма като преминава хематоенцефалната бариера, както и плацентарната бариера. Подлага се почти изцяло на метаболизъм в черния дроб като само 2 – 3 % от приетата доза се елиминира в непроменен вид с урината [52, 315]. Основният метаболитен път за кофеин при хора е N-деметиране предимно от ензима CYP1A2 до параксантин (около 84 %), теобромин (около 12 %) и теофилин (около 4 %) [39]. Получените метаболити се подлагат отново на деметиране основно от CYP1A2, след това на ацетиране от N-ацетилтрансфераза 2 и на окисление от ксантин оксидаза или CYP3A4 до получаването на метаболити, които се елиминират предимно с урината. Слабо застъпено е участието на други цитохроми като CYP2E1, CYP2A6, CYP2C8/9 и CYP3A4 в реакциите на N-деметиране. Малка част от приетата доза (около 6 %) се подлага на C-8 хидроксилиране от CYP1A2, CYP3A4 и CYP2C8/9 до 1,3,7-триметил пикочна киселина [52, 171, 271, 315]. Метаболизмът на метилксантините е представен на фигура 2. Трябва да се има предвид, че е възможно е да се наблюдават различия в отговора към кофеин, поради генетични вариации, които са причина за променена активност на CYP1A2. Необходими са допълнителни проучвания в тази насока за да се установи влиянието на генетичния полиморфизъм в гените, кодиращи лекарство-метаболизиращите ензими върху метаболизма на кофеин [271].



Фигура 2. Метаболизъм на метилксантини при хора [30, 113, 315].

❖ Механизъм на действие

Установени са различни механизми на действие на метилксантините, в частност кофеин като блокада на аденозинови рецептори, инхибиция на фосфодиестеразите, повишаване на калциевите нива в клетките и други. Докладвани са редица молекулни таргети за кофеин в ЦНС, но комплексният му механизъм на действие не е напълно изяснен към този момент [122, 356]. Към настоящия момент се приема, че инхибицията на аденозинови рецептори е

основният механизъм, който е отговорен за голяма част от наблюдаваните фармакологични ефекти.

Блокада на аденозинови рецептори

Кофеинът е компетитивен антагонист на аденозиновите рецептори и предотвратява активирането им от ендегенния лиганд – аденозин [323]. Аденозинът е предимно инхибиторен невромедиатор в ЦНС, който потиска невроналната възбудимост и предизвиква церебрална вазодилатация [265]. Аденозиновите рецептори се разделят на четири подтипа – A_1 -, A_{2A} -, A_{2B} - и A_3 -рецептори. Те са локализирани в ЦНС, сърдечно-съдовата система, белите дробове, бъбреците, стомашно-чревния тракт и др. Кофеинът има най-голям афинитет към A_1 - и A_{2A} -рецепторите [323, 325]. Тези рецептори са G-протеин свързани рецептори (A_1 - са от подвида $G_{i/o}$, а A_{2A} - са G_s рецептори), разположени пре- и постсинаптично. A_1 -рецепторите са широко разпространени в ЦНС, където активирането на пресинаптичните A_1 -рецептори води до инхибиране на екзоцитозата на невромедиатори, докато активирането на постсинаптичните A_1 -рецептори предизвиква хиперполяризация на невроналната мембрана и потиска предаването на нервните импулси. В периферията A_1 -рецепторите реализират отрицателен ино-, хроно- и дромotropни ефекти, бронхоконстрикция, намаляват бъбречния кръвоток, инхибират липолизата и др. В ЦНС A_{2A} -рецепторите са разположени главно в стриатума, където засилват освобождаването на някои невротрансмитери като глутамат, ацетилхолин, допамин и др. На ниво ЦНС са отговорни също за редуциране на локомоторната активност, а в периферията предизвикват вазодилатация и инхибират тромбоцитната агрегация [46, 292, 301, 325]. Блокадата на аденозиновите рецептори от кофеин води до повишено освобождаване на редица невротрансмитери като допамин, глутамат, норадреналин и други, както и до намалена секреция на гама-аминомаслена киселина на ниво ЦНС [231, 326]. Интересно е да се отбележи, че аденозинът чрез активиране на A_{2A} -рецепторите стимулира производството на азотен оксид (NO) с последваща вазодилатация, а чрез активиране на A_1 -рецепторите намалява освобождаването на NO и предизвиква вазоконстрикция. Следователно, в зависимост от афинитета за свързване на кофеин с тези рецептори и от приложената доза, той може да реализира противоположни ефекти върху кръвоносните съдове като вазоконстрикция или вазодилатация, а понякога е възможно да не повлияе съществено тонуса на съдовете. Обикновено кофеинът предизвиква вазодилатация, с изключение на ЦНС, където води до церебрална вазоконстрикция, повишава мозъчно-съдовата резистентност и намалява мозъчния кръвоток [244].

Неселективна инхибиция на фосфодиестеразите

Кофеинът е неселективен инхибитор на фосфодиестеразите – ензими, които участват в разграждането на вторичните посредници цикличен аденозин монофосфат (цАМФ) и цикличен гуанозин монофосфат (цГМФ). Натрупването на тези медиатори в клетките усилва техните физиологични ефекти като гладкомускулна релаксация, вазодилатация и бронходилатация [122, 252]. Инхибиция на фосфодиестеразите обаче се наблюдава при прием на високи дози кофеин, поради което се счита, че този механизъм на действие няма съществено значение за ефектите на кофеин при хора. Приема се, че във физиологичните дози, в които се приема кофеинът, например с чаша кафе или чай, действа основно като антагонист на аденозиновите рецептори [99, 151, 231].

Модулиране на калциеви канали

Кофеинът навлиза вътреклетъчно и модулира калциеви канали в клетките като се свързва с рианодиновите рецептори (клас вътреклетъчни калциеви канали), активира ги и води до повишено освобождаване на калциеви йони от саркоплазматичния ретикулум, който служи като депо за калциеви йони в клетките. Увеличените калциеви нива в скелетно-мускулните и нервните клетки може да доведе съответно до мускулна контракция или стимулиране екзоцитозата на невромедиатори [39, 217]. Този механизъм на действие вероятно също няма съществено значение за фармакологичните ефекти, които се постигат при прием на терапевтични дози кофеин [55].

Като представители на метилксантините, теофилин и теобромин споделят описаните по-горе механизми на действие. Теофилин, подобно на кофеин е стимулант на ЦНС и предизвиква бронходилатация. Теофилин, както и теобромин имат стимулиращо действие върху сърдечния мускул и разширяват коронарните артерии [231].

❖ Терапевтични ефекти

Метилксантините проявяват разнообразни фармакологични ефекти и тяхното проучване продължава и в днешно време. Кофеин е популярен със своето стимулиращо действие върху ЦНС, поради което се употребява масово в състава на напитки като кафе или чай. Теофилин се прилага като бронходилататор предимно в терапията на бронхиална астма и хронична обструктивна белодробна болест, докато теобромин притежава изразени ефекти върху сърдечно-съдовата система, но не намира приложение като лекарствено средство [152, 279].

Психостимулиращ ефект

Кофеинът е най-използваният и най-лесно достъпен психостимулант в световен мащаб [104, 240]. Психостимулиращите ефекти се изразяват в премахване на умората и сънливостта, повишаване на бдителността, подобряване на вниманието, концентрацията и когнитивните функции, подобряване на скоростта на реакцията, по-бърза обработка на информацията и стимулиране на моторната активност. Тези ефекти се дължат вероятно на блокадата на аденозинови рецептори в ЦНС [15, 99, 326]. Може да се каже, че стимулиращото действие върху ЦНС е най-значимият ефект на кофеин [39]. В допълнение, кофеинът притежава и невропротективен ефект, дължащ се отново на блокадата на аденозинови рецептори.

Потенциране на аналгетичния ефект на обезболяващи средства

Друго основно приложение на кофеин е като адювант в комбинация с неопиоидни аналгетици и нестероидни противовъзпалителни лекарства, поради потенциране на обезболяващия им ефект [96]. Механизмът, по който се реализира този ефект на кофеин не е напълно изяснен. Има предположения, че не е свързан с намалена продукция на простагландини, въпреки че в литературата се откриват данни, според които кофеин инхибира активността на COX-2 *in vitro*. Друго възможно обяснение е повишаването на степента на резорбция на някои аналгетици като парацетамол, ацетилсалицилова киселина и ибупрофен, вероятно поради намаляване на стомашното рН от кофеин. Особено подходящо е приложението на аналгетични средства в комбинация с кофеин при мигренозно главоболие, поради вазоконстрикторния ефект на кофеина върху мозъчните кръвоносни съдове [43, 195, 244].

Лечение на апнея при недоносени деца

Установено е също, че кофеинът модулира активността на имунната система като проявява имunosупресивно и противовъзпалително действие, дължащо се на потискане на активацията и пролиферацията на лимфоцитите, както и на продукцията на цитокини като IL-2, IL-6 и TNF alpha [17, 173]. Кофеинът има и стимулиращ ефект върху дихателната система, вероятно дължащ се на блокадата на централни аденозинови рецептори, като по този начин се премахва инхибиращият ефект на аденозина върху дихателния център в продълговатия мозък. Освен това, кофеинът повишава чувствителността на дихателния център към CO₂, дихателният обем и минутната вентилация [225]. Поради тези ефекти върху имунната и дихателна система кофеинът се прилага за лечение на апнея при недоносени деца и е установено, че намалява бронхопулмоналната дисплазия чрез потискане на белодробното възпаление [17, 273].

Други ефекти

На нивото на сърдечно-съдовата система кофеинът може да стимулира сърдечния мускул и да увеличи сърдечната честота, сърдечния дебит и средното артериално кръвно налягане, вследствие на повишено освобождаване на катехоламини [356]. Кофеинът повишава бъбречния кръвоток, гломерулната филтрация и диурезата. Освен това, стимулира секрецията на стомашен сок, както и стомашно-чревната перисталтика [93]. Кофеинът притежава ергогенен ефект, изразяващ се в подобряване на представянето по време на физическо натоварване, повишаване на аеробната издръжливост и на мускулната сила [129, 262]. Докладвано е, че кофеинът стимулира липолизата, което води до увеличаване на нивото на свободни мастни киселини, вероятно поради повишаване на активността на симпатиковата нервна система и на нивото на циркулиращия адреналин [161].

В литературата се откриват изследвания, които съобщават, че кофеин проявява противовирусна активност срещу РНК и ДНК вируси. При *in vitro* проучвания е наблюдавано че кофеинът инхибира размножаването на херпес симплекс вирус 1 (HSV-1) и полиовирус, но не проявява вируцидно действие по отношение на тези вируси [235]. Освен това се съобщава, че кофеин инхибира трансдукцията на човешки имунодефицитен вирус тип 1 (HIV-1), както и че инхибира дозозависимо репликацията на вируса на хепатит С (HCV) [43, 75]. През последните две години има данни от *in silico* проучвания, според които кофеинът показва висок афинитет за свързване с вирусна протеаза (3-chymotrypsin-like protease) на SARS-CoV-2 и вероятно може да инхибира активността ѝ, което би нарушило репликацията и транскрипцията на вируса [91]. Освен това, *in silico* е наблюдавана тенденция за свързване на кофеин с ACE2 рецептора, следователно кофеинът би могъл да блокира неговата активност и взаимодействието му със спайк протеина на SARS-CoV-2 [228]. Същевременно, наличните към момента данни относно полезните ефекти на кофеин предполагат, че би могъл да се използва като адювантно средство при лечението на COVID-19, поради неговите имуномодулиращи и противовъзпалителни свойства [230].

1.1.3. Полизахариди

Полизахаридите са друга основна група БАВ, съдържащи се в чаените листа. Количеството на полизахаридите се увеличава със зрелостта на чаените листа, за разлика от полифенолите, за които е установено по-ниско съдържание на тотални полифеноли в по-зрелите листа [197, 308]. Полизахаридите се различават по молекулно тегло и монозахариден

състав в различните видове чай, в зависимост от методите на обработване и сушене. Смята се, че е възможно полизахаридите да допринасят за някои от полезните ефекти на зеления чай като антиоксидантна, противотуморна, имуномодулираща и антидиабетна активност [130, 308].

1.2. Методи за анализ на екстракта от зелен чай

Според редица проучвания, катехините и кофеинът, съдържащи се в зеления чай са отговорни за биологичната му активност и за специфичните вкусови качества [368]. В днешно време се използват различни методи за качествен и количествен анализ на полифеноли и метилксантини, съдържащи се в екстракта от зелен чай. Един от основните методи, които се прилагат е течната хроматография. Тя е определена от СЗО като подходящ метод, който заема важна част от процедурите за стандартизацията на растителни продукти [124, 391]. Високоэффективната течна хроматография се предпочита пред газовата хроматография, поради съдържанието на термолабилни съединения в екстракта от зелен чай, като например полифенолните съединения и по-специално катехините. Използват се също спектрофотометрични методи за анализ при дължина на вълната в ултравиолетовата (UV) и видимата област на спектъра [200].

Както вече беше споменато, съдържанието на катехини и кофеин варира в големи граници при различните видове зелен чай, в зависимост от редица фактори. Според Европейския орган за безопасност на храните (EFSA) чаша от 100.0 mL зелен чай съдържа 126.0 mg катехини, а съгласно FDA 100.0 mL зелен чай съдържат 71.0 mg ЕГКГ [264]. Съдържанието на кофеин в чаша зелен чай може да достигне 33.0 до 45.0 mg [279]. Същевременно, Liczbiński и съавт. (2022) съобщават, че чаша чаена напитка, приготвена от 1.0 g чаени листа на 100.0 mL вода при продължителност на инфузията 3 минути обикновено съдържа 30 до 42 % катехини и между 3 и 6 % кофеин [193].

1.3. Потенциални токсични ефекти на екстракта от зеления чай

1.3.1. Катехини

Има подозрения, че прекомерната употреба на зелен чай може да е свързана и с поява на токсични ефекти, поради докладвани случаи на чернодробно увреждане. Смята се, че е възможно да има връзка между консумацията на ЕГКГ и хепатотоксичността. В допълнение, не се изключва и възможността други съединения, съдържащи се в екстракта от зелен чай да допринасят за неговата хепатотоксичност (напр. пиролизидинови алкалоиди). В редица клинични проучвания, при които са изследвани благоприятните ефекти на екстрактите от зелен чай са проследявани междувременно и плазмените нива на чернодробните ензими. След обработването на данните от клинични проучвания, EFSA дава становище, че приемът на ЕГКГ в доза равна или по-голяма от 800.0 mg/дневно в продължение на поне 4 месеца води до повишаване на серумните нива на аланин аминотрансфераза (ALAT) и аспартат аминотрансфераза (ASAT) при малка част от популацията. Употребата на ЕГКГ в доза равна или по-малка от 316.0 mg/дневно не води до повишаване на нивата на чернодробните трансаминази. Въпреки това, доклад от клиничен случай съобщава за чернодробно увреждане след дневен прием на 80 %-ен етанол екстракт от зелен чай, съответстващ на 375.0 mg ЕГКГ. Поради това, EFSA заключава, че не е възможно да се определи дозата на ЕГКГ в екстракти от зелен чай, която да се счита за безопасна. Други клинични случаи също докладват за хепатотоксични ефекти при прием на ЕГКГ в дози между 140.0 и 1000.0 mg/дневно [87, 249].

1.3.2. Метилксантини

Кофеинът притежава характерни ефекти върху нервната и сърдечно-съдова система, както беше споменато и има опасения за потенциално опасни нежелани ефекти при прекомерната му употреба. Някои от токсичните ефекти, които се наблюдават при прием на високи дози кофеин са тахикардия, сърдечни аритмии, гърчове и делириум [55]. Поради това, EFSA посочва дозите на кофеин, които се приемат за безопасни. Съгласно препоръките, възрастните хора не бива да приемат повече от 200.0 mg кофеин еднократно (около две чаши кафе) и повече от 400.0 mg кофеин/дневно. Бременните жени не трябва да приемат повече от 200.0 mg кофеин/дневно, а децата и юношите – не повече от 3.0 mg/kg телесно тегло в рамките на деня [240, 279].

В заключение, зеленият чай и съдържащите се в него катехини и метилксантини показват редица здравословни ефекти, а кофеинът дори се прилага като лекарствено средство. Същевременно продължава проучването на потенциалните протективни и терапевтични ефекти на екстракта от зелен чай и неговите БАВ. Трябва да се има предвид обаче, че при едновременната употреба на медикаменти със зелен чай под формата на напитка или екстракт съществува риск от настъпване на взаимодействия, които могат да доведат до сериозни нежелани реакции. Следователно, е необходимо да се направи цялостна оценка на ползите и рисковете от комбинираното приложение на зелен чай, ЕГКГ и кофеин с лекарства.

2. Лекарствени взаимодействия и взаимодействия между лекарства и фитопрепарати/храни/напитки

Лекарствените взаимодействия представляват основен проблем за съвременната фармакотерапия и могат да доведат до поява на нежелани лекарствени реакции. Това се наблюдава по-често при по-възрастни пациенти, които обикновено имат съпътстващи заболявания и приемат голям брой лекарства едновременно [184]. В допълнение, лекарствените взаимодействия са сред най-честите проблеми, свързани с лекарствената употреба и имат пряко отношение към безопасността на пациента по време на лекарствената терапия, като в повечето случаи могат да бъдат предвидени и избегнати [78, 278]. В миналото, животозастрашаващи нежелани реакции вследствие на лекарствени взаимодействия са станали причина за изтегляне на някои лекарства от пазара и спиране на тяхната употреба (cerivastatin, cisapride, terfenadine и др.) [259, 318]. Поради това, регулаторните агенции като FDA и ЕМА периодично актуализират своите насоки за проучване на лекарствени взаимодействия в процеса на разработване на нови лекарства. В резултат на това, броят на изтеглените от пазара лекарства, поради опасни лекарствени взаимодействия значително намалява през последните години [318].

Лекарственото взаимодействие може да се дефинира като взаимодействие между две или повече едновременно приемани лекарства, което оказва влияние върху токсичността или ефективността на някое от лекарствата [78]. Взаимодействията могат да се разделят на клинично значими и на такива без клинична изява, в зависимост от наличието или липсата на симптоматика. Клинично значимите взаимодействия са потенциално опасни, тъй като повлияват ефективността или токсичността на едно от едновременно прилаганите лекарства. Трябва да се има предвид, че не всички потенциални взаимодействия са клинично значими. Тоест, дадено лекарствено взаимодействие може да не повлияе съществено плазмената концентрация на едно от едновременно приеманите лекарства и следователно няма да има

ефект върху неговата токсичност или терапевтичен ефект. Клинично значимите лекарствени взаимодействия обаче могат да доведат до сериозни и дори животозастрашаващи нежелани лекарствени реакции (кървене, бъбречна недостатъчност, сърдечни аритмии и други), при които се налага хоспитализация на пациента, а това от своя страна води до възникване на редица проблеми, както от медицинска, така и от икономическа гледна точка [78, 184].

Същевременно, голяма част от хората считат фитопрепаратите за безопасни, понеже са с природен произход. Освен това, често ги приемат едновременно с конвенционални лекарства без предварителна консултация с лекар или фармацевт. Комбинираната употреба на продукти, съдържащи растителни екстракти и лекарства също може да доведе до възникване на взаимодействия, водещи до промяна в бионаличността на лекарствата и по-слаб терапевтичен ефект или повишен риск за поява на сериозни нежелани реакции. За разлика от лекарствените взаимодействия, които често могат да бъдат предвидени и избегнати, взаимодействията между компоненти на фитопрепарати и лекарства са по-слабо проучени и документирани [10, 11, 25, 192]. Вероятността за възникване на взаимодействия между лекарствени продукти и растителни екстракти е дори по-висока, поради съдържанието на много компоненти в екстрактите. В резултат на това взаимодействията обикновено са по-комплексни и по-сложни [64, 187]. Такъв тип взаимодействия възникват най-често след едновременно приложение на билкови препарати с противотуморни лекарства, лекарства за лечение на сърдечно-съдови заболявания или имunosупресори [32, 33]. Особено опасно е комбинирането на билки или фитопрепарати с противотуморни медикаменти. Тази тенденция обаче се превръща в обичайна практика през последните години. Пациентите със злокачествени заболявания често търсят алтернативни методи за лечение едновременно с конвенционалната терапия, поради страх от заболяването и неговия изход, недоверие в терапевтичния ефект на прилаганите лекарства или други причини. Интересен е фактът, че голяма част от пациентите получават препоръки за употреба на билки или хранителни добавки от близки и приятели или намират информация в интернет, включително в социалните мрежи. Това обаче крие сериозен риск, тъй като по този начин се представят главно полезните свойства на растителните продукти за здравето, но не се обръща внимание на нежеланите ефекти или на потенциалните лекарствени взаимодействия, които в някои случаи могат да бъдат сериозни и опасни [64].

2.1. Регулация на лекарствени продукти и фитопрепарати

Употребата на фитопрепарати с цел профилактика или лечение на редица заболявания е разпространена в целия свят, но в зависимост от това до каква степен се предписват и прилагат растителни средства се наблюдават специфични различия в някои страни [92]. В България изискванията към хранителните добавки, съдържащи растителни вещества най-често под формата на екстракт се определят от Наредба № 47 от 28.12.2004 г. за изискванията към хранителните добавки, издадена от Министъра на здравеопазването [380]. Хранителните добавки подлежат на контрол от Българската агенция по безопасност на храните (БАБХ) [377]. За разлика от тях, всички лекарствени продукти, включително лекарствените продукти с растителен произход, които съдържат изолирани чисти съединения или стандартизирани растителни екстракти подлежат на контрол от Изпълнителната агенция по лекарствата (ИАЛ) [379]. Преди да получи регистрация за употреба всеки лекарствен продукт преминава през два основни етапа на предклинично и клинично проучване, които гарантират неговата ефикасност и безопасност [63]. Оценява се също потенциала на лекарственото вещество да участва в лекарствени взаимодействия като инхибитор/индуктор или субстрат на лекарство-

метаболизиращи ензими и/или трансмембранни транспортери [360]. Фитопрепаратите, които са регистрирани като хранителни добавки обаче не подлежат на задължителни предклинични и клинични изпитвания преди да бъдат пуснати на пазара, поради което е възможно тяхната фармакокинетика, фармакологична активност и токсикологичен профил да не са напълно проучени и изяснени. В допълнение, на пазара се срещат дори хранителни добавки, съдържащи растителни екстракти, които не са стандартизирани [2].

2.2. Видове лекарствени взаимодействия

Лекарствените взаимодействия могат да възникнат на фармакокинетично и на фармакодинамично ниво. Както фармакокинетичните, така и фармакодинамичните взаимодействия могат да повлияят терапевтичния ефект и/или безопасността на лекарствата [259].

2.2.1. Фармакокинетични лекарствени взаимодействия

Фармакокинетиката изучава движението на лекарствата в организма. Това включва процесите на резорбция, разпределение, метаболизъм и екскреция. Следователно, фармакокинетични лекарствени взаимодействия се наблюдават, когато едно лекарство оказва ефект върху резорбцията, разпределението, метаболизма и/или екскрецията на друго едновременно приемано лекарство. Те могат да доведат до промяна в плазмената концентрация на едно от прилаганите лекарства и последващо намаляване на ефективността или повишаване на токсичността му [79, 185, 243]. Повишаването на плазмената концентрация на дадено лекарствено вещество обикновено води до по-висок риск за поява на нежелани и токсични ефекти [128]. От друга страна, по-ниската бионаличност вследствие на фармакокинетично взаимодействие, напр. ензимна индукция обикновено е причина за по-слаб терапевтичен ефект на лекарството, чиято биотрансформация е компрометирана [204].

На ниво резорбция лекарствени взаимодействия възникват поради комплексообразуване, промяна на рН в стомашно-чревния тракт (СЧТ), влияние върху мотилитета на СЧТ, инхибиция или индукция на трансмембранни транспортери, разположени в чревния епител и др. На ниво разпределение взаимодействията могат да възникнат предимно поради конкуренция за свързване с плазмените протеини или поради влияние върху активността на трансмембранни транспортери [140]. Инхибицията и индукцията на лекарство-метаболизиращите ензими са основната причина за възникване на взаимодействия на ниво метаболизъм [158, 255]. Лекарствените взаимодействия на нивото на екскреция обикновено се дължат на конкуренция за едни и същи транспортни протеини, разположени в бъбречните тубули [148]. Най-често докладваните клинично значими фармакокинетичните взаимодействия се дължат на модулиране на активността на лекарство-метаболизиращите ензими и/или на трансмембранни транспортни протеини. Поради това проучването на влиянието на лекарствата върху активността на ензими и транспортери е заложено и в гайдлайните на регулаторните агенции [383, 387, 388]. В процеса на предклинични и клинични проучвания, лекарството, което показва висок риск за участие в лекарствени взаимодействия може да бъде оценено или като субстрат (лекарство жертва) или като инхибитор/индуктор (лекарство извършител) на лекарство-метаболизиращи ензими и/или на трансмембранни транспортери [259, 318].

Модулиране на активността на лекарство-метаболизиращи ензими

Основните лекарство-метаболизиращи ензими, които вземат участие в лекарствената биотрансформация са цитохромите (CYP3A4/5, CYP2D6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP1A2), УДФ-глюкуронил трансфераза, сулфотрансфераза, глутатион-S-трансфераза, N-ацетил трансфераза и други [150, 259, 300]. Цитохромите представляват суперфамилия от хем-съдържащи изоензими, които са въввлечени в метаболизма на ендогенни и екзогенни субстанции. Това са основните ензими, които участват в метаболитните реакции от фаза I на лекарствената биотрансформация [300]. От тях, CYP3A4 е отговорен за метаболизма на около 50 % от предписваните лекарства, а CYP2C, CYP2D6 и CYP3A изоформите участват в биотрансформацията на близо 75 % от лекарствата. Основните ензими, които медиират пресистемния метаболизъм на лекарствата (чернодробен и интестинален) след перорално приложение са CYP3A изоформите [300, 312]. Ензимите УДФ-глюкуронил трансфераза, сулфотрансфераза, глутатион-S-трансфераза, N-ацетил трансфераза и други вземат участие в реакциите от втора фаза на лекарствения метаболизъм, които представляват реакции на конюгация с ендогенни субстрати. Цитохромите и УДФ-глюкуронил трансфераза са главните ензими, които са обект на лекарствени взаимодействия. Те са експресирани в различни тъкани, но в най-високо количество се откриват в черния дроб и чревните епителни клетки. В резултат на лекарствено взаимодействие активността на тези ензими може да бъде инхибирана или индуцирана [150, 259, 300]. В допълнение, лекарствата с висока проникваемост, които се елиминират предимно чрез метаболизъм често участват в лекарствени взаимодействия [259].

В резултат от потискането на активността на цитохромите се повишава плазмената концентрация на лекарството субстрат на съответния ензим, както и вероятността за поява на нежелани ефекти. Изключение се наблюдава, когато лекарството субстрат е предлекарство, което изисква да бъде активирано при първото си преминаване през черния дроб под действие на цитохромите. Инхибирането на активността им в този случай води до по-слаб или липсващ терапевтичен ефект на лекарството, поради невъзможност да се активира. Инхибицията на CYP450 ензимите се разделя на обратима (компетитивна и некомпетитивна) и необратима (или привидно необратима). Тя обикновено е резултат от директно взаимодействие между лекарството инхибитор и ензима и се реализира бързо във времето. Резултатът, вследствие на ензимната инхибиция се проявява бързо или непосредствено след образуване на комплекса инхибитор-ензим [80, 128]. При компетитивната инхибиция лекарственото вещество се свързва с активния център на ензима и го блокира като не позволява свързването на субстрати. Наблюдава се конкуренция за едно и също свързващо място между инхибиторите и субстратите за този ензим. При некомпетитивната инхибиция в повечето случаи лекарството се свързва с алостеричното място на ензима и по този начин намалява ензимната активност. Възможно е лекарството инхибитор да окупира и двете свързващи места на ензима и тогава се наблюдава смесена инхибиция. При обратимата инхибиция ензимната активност се възстановява след дисоцииране на инхибитора от ензимно-инхибиторния комплекс [80]. При необратимата ензимна инхибиция, наричана още време-зависима инхибиция или суицидна инхибиция, лекарството инхибитор също се свързва с активното място на ензима, но се трансформира в електрофилен метаболит, който се свързва ковалентно с активния център на ензима. Образованата ковалентна връзка е практически необратима и води до загуба на ензимна активност. В тези случаи активността на лекарство-метаболизиращите ензими се възстановява след разграждане на свързаните с инхибитор ензими и *de novo* синтез на нови протеини [80, 128]. При привидно необратимата инхибиция полученият реактивен метаболит

образува стабилен комплекс с активния център на ензима, но комплексът може да бъде разрушен [80]. Счита се, че ензимите от фаза II на метаболизма по-рядко са обект на лекарствени взаимодействия, в сравнение с цитохромите. Напоследък вниманието се насочва към УДФ-глюкуронил трансферазите и N-ацетилтрансферазите, при които е установен и генетичен полиморфизъм, в резултат на което може да се наблюдава различна метаболитна активност при отделните индивиди. Следователно, инхибицията или индукцията на ензими от фаза II, водещи до промяна в тяхната активност също може да окаже влияние върху биотрансформацията на техни субстрати [366].

Ензимната индукция се свързва с ускорен метаболизъм на лекарствата и повишен клирънс, което може да доведе до намалена терапевтична ефективност. В някои случаи, индукцията може да е причина за повишено образуване на реактивни междинни продукти или токсични метаболити, което повишава риска за нежелани или токсични реакции [229]. Ензимната индукция е индиректен процес, който може да възникне по различни механизми, но най-често се дължи на активиране на ядрени рецептори, като прегнан X рецептор (PXR), арил хидрокарбон рецептор (AhR) и конститутивен андростан рецептор (CAR). В резултат на това лекарството индуктор води до повишено образуване на лекарство-метаболизиращи ензими и съответно повишена метаболитна активност. По описания механизъм се повишава експресията на някои цитохроми (CYP3A4, CYP2C9, CYP1A2 и други) и на ензими от фаза II, като УДФ-глюкуронил трансферазите. В допълнение, активирането на PXR рецептора е отговорно за силна индукция на CYP3A4. Трябва да се отбележи, че индукцията е процес, който е свързан с повлияване на генната транскрипция в клетките. Следователно, влиянието върху метаболизма и съответно терапевтичният ефект или безопасността на дадено лекарство, вследствие на индуцирането на определен ензим ще настъпва по-бавно, в сравнение с ензимната инхибиция. Счита се, че максимална индукция може да се наблюдава след продължителна експозиция на веществото индуктор в продължение на 5 до 10 дни [127, 229].

Модулиране на активността на трансмембранны транспортери

Основните трансмембранны транспортери, които участват в преноса на лекарства и имат най-голямо значение за настъпване на лекарствени взаимодействия са P-gp, органични анионни транспортери като органичните анион-транспортиращи полипептиди (OATP1A2, OATP1B1/OATP1B3, OATP2B1 и други) и органичните анионни транспортери (OAT1/OAT3), органични катионни транспортери (OCT2), транспортери за пренос на множество лекарства и токсини (MATE1/MATE2K) и Breast Cancer Resistance Protein (BCRP) [183, 259]. Тези транспортни протеини са представители на двете основни суперфамилии трансмембранны транспортери:

- ❖ SLC транспортери (Solute-linked carrier) – OATP1A2, OATP1B1/OATP1B3, OATP2B1, OAT1/OAT3, OCT2, MATE1/MATE2K и други;
- ❖ ABC транспортери (ATP-binding cassette) – P-gp, BCRP, MRP2 и други.

SLC транспортерите осъществяват двупосочен пренос на лекарствата през биомембраните, докато ABC транспортерите извършват еднопосочен ефлукс и не позволяват навлизането на лекарствените молекули в клетките [190, 232, 259]. Трансмембранните протеини са локализирани в плазмената мембрана на различни клетки и изпълняват разнообразни функции. Транспортерите, локализирани в чревния епител участват в процеса на резорбция на лекарствени вещества, както и в чревния ефлукс, в хепатоцитите транспортните протеини осъществяват преноса на лекарствени молекули вътре в чернодробните клетки, с цел

подлагане на биотрансформация, в мембраната на нефрона медираят тубулната секреция и реабсорбция на лекарствата, на ниво хематоенцефална бариера (ХЕБ) регулират навлизането на ендогенни и екзогенни вещества в ЦНС и други [22, 259]. Например, OATP1A2 и OATP2B1 транспортерите са локализирани в чревните клетки, хепатоцитите, ХЕБ, нефроните и други, докато OATP1B1/OATP1B3 протеините са експресирани предимно в хепатоцитите, а OAT1/OAT3 транспортерите главно в нефроните. В допълнение, OAT2 и MATE1/MATE2-K транспортерите са локализирани основно в бъбречните тубулни клетки, като OAT2 се среща и в мозъчните капиляри, а MATE1/MATE2-K в хепатоцитите [22, 165, 232, 348]. Едни от най-добре проучените транспортни протеини от ABC суперфамилията са P-gp (ABCB1) и BCRP (ABCG2). Те се откриват в редица тъкани като СЧТ, черен дроб, бъбреци, ХЕБ и други. Тези протеини са силно експресирани в някои туморни клетки и обуславят лекарствената резистентност към определени противотуморни препарати [117, 232, 296]. Транспортерите, подобно на лекарство-метаболизиращите ензими могат да бъдат инхибирани или индуцирани и съответно представляват обект на лекарствени взаимодействия. Инхибицията е свързана с блокиране на трансмембрания транспорт на лекарствата, включително потискане на клетъчния ефлукс. Подобно на цитохромите, инхибицията на транспортни протеини е резултат от директното свързване на инхибитора с транспортния протеин. Индукцията на трансмембранните транспортни протеини се осъществява предимно чрез активиране на нуклеарни рецептори. В резултат на това се повишава експресията на транспортерите и на медирания от тях транспорт. В допълнение, активирането на PXR рецептора води до индукция на P-gp [128, 192]. Променената активност или експресия на трансмембранните транспортери може да окаже съществено влияние върху резорбцията, разпределението, метаболизма и/или екскрецията на лекарствата. Предполага се, че инхибирането на трансмембранни транспортери повлиява не само фармакокинетиката на едновременно приемани лекарства, но и физиологичните функции на някои транспортери и е причина за появата на нежелани лекарствени реакции като хиповитаминоза, оток, дислипидемия, холестаза, хиперурикемия и други [183]. Също така е установено, че експресията на някои трансмембранни транспортери (OATP, P-gp) е променена при определени заболявания, например раковите [22].

2.2.2. Фармакодинамични лекарствени взаимодействия

Фармакодинамичните взаимодействия се появяват, когато едно лекарство повлиява фармакологичния ефект на друго едновременно прилагано лекарство поради конкуренция за свързване с една и съща таргетната структура или вследствие на взаимодействие с различни структури. Взаимодействията на фармакодинамично ниво могат да се разделят на синергизъм, адитивен ефект и антагонизъм [243]. Синергизъм и адитивен ефект се наблюдават, когато ефектът от комбинираното приложение на лекарствата е съответно по-голям или равен на сумата от индивидуалните ефекти на тези лекарства. Когато ефектът от комбинацията е по-малък от сумата на ефектите на лекарствата по отделно взаимодействието се означава като антагонизъм [281]. Фармакодинамичният антагонизъм от своя страна се разделя на конкуритивен (конкурентен) и неконкуритивен (неконкурентен).

2.3. Взаимодействия между конвенционални лекарства

Лекарствените взаимодействия, независимо от механизма, по който възникват могат да бъдат желани (полезни) или нежелани (вредни). Пример за желано фармакокинетично взаимодействие е приложението на ниска доза ritonavir (силен инхибитор на ензима CYP3A4)

като бустер на останалите протеазни инхибитори в терапията на синдрома на придобитата имунна недостатъчност (СПИН), с цел повишаване на плазмените им концентрации и подобряване на терапевтичния отговор [128]. Повечето фармакокинетични лекарствени взаимодействия в практиката обаче са нежелани и трябва да се избягват. Например, противогъбичният препарат itraconazole (силен инхибитор на CYP3A4) не трябва да се прилага едновременно с midazolam (субстрат на CYP3A4), поради забавяне на биотрансформацията и клирънса на midazolam и засилване на седацията, която предизвиква [250]. Синергизмът като вид фармакодинамично взаимодействие също може да бъде търсен и желан ефект от комбинираното приложение на лекарствата или да се разглежда като нежелан ефект. Пример за синергизъм е комбинираното лечение с аминокликозиден и бета-лактамен антибиотик, с което се постига по-добър антибактериален ефект като едновременно се атакуват две различни таргетни структури в бактериалните клетки. Едновременната употреба на инхибитори на ФДЕ5 с нитрати също е пример за синергизъм, но води до повишен риск за развитие на тежка хипотония и представлява потенциално опасно фармакодинамично взаимодействие. На таблица 2 са представени някои клинично значими лекарствени взаимодействия.

Таблица 2. По-важни клинично значими взаимодействия при комбинираното приложение на конвенционални лекарства.

Лекарствено взаимодействие	Механизъм	Ефект	Източник
Кумаринови антикоагуланти и тромбоцитни антиагреганти (acetylsalicylic acid, clopidogrel), статини (fluvastatin, atorvastatin, lovastatin, simvastatin), макролиди (erythromycin), противогъбични азоли (fluconazole, voriconazole) и др.	Тромбоцитните антиагреганти потенцират антикоагулантната активност на кумариновите антикоагуланти, а статините, макролидите и азолите инхибират метаболизма им и повишават плазмените им нива	Повишен риск от кървене	84, 378
Инхибитори на протонната помпа (omeprazole, esomeprazole) и clopidogrel	Инхибиторите на протонната помпа потискат образуването на активния метаболит на clopidogrel	По-слаб терапевтичен ефект на clopidogrel и повишен риск от тромбоемболиозно образуване	340
Антиаритмични лекарства (amiodarone, quinidine, procainamide) и макролидни антибиотици (erythromycin, clarithromycin, telithromycin), флуорохинолони (ciprofloxacin, levofloxacin, moxifloxacin) или противогъбични азоли (ketoconazole, itraconazole, voriconazole, posaconazole)	Макролидите и азолите инхибират метаболизма на антиаритмичните лекарства от цитохромите и повишават плазмените им нива. В допълнение, макролидите, а също и флуорохинолоните инхибират K ⁺ -каналите (IKr) в сърцето и потенцират ефекта на антиаритмичните лекарства.	Повишен риск за удължаване на QT-интервала и развитие на <i>torsades de points</i> (животозастрашаваща вентрикуларна аритмия)	8, 90, 317
Антиациди и антибактериални лекарства (тетрациклини и флуорохинолони)	Образуване на нерезорбируеми комплекси и понижаване на оралната бионаличност на антибактериалните средства	Намалена терапевтична ефективност на антибактериалните лекарства	247

Макролидни антибиотици и калциеви блокери	Макролидите инхибират активността на CYP3A4 и потискат метаболизма на калциевите антагонисти	Изразена хипотония	338
Макролидни антибиотици (erythromycin, clarithromycin) и статини (simvastatin, atorvastatin)	Макролидите инхибират метаболизма на статините и повишават плазмените им нива	Повишен риск за мускулна токсичност и рабдомиолиза	338
Антидепресанти (трициклични антидепресанти, citalopram, escitalopram, fluoxetine) и антипсихотици (olanzapine, haloperidol, risperidone, quetiapine)	Антидепресантите и антипсихотиците блокират йонни канали в сърдечно мускулните клетки (бързи натриеви канали, бавни калциеви канали, калиеви канали, особено IKr)	Повишен риск за удължаване на QT-интервала и развитие на <i>torsades de points</i>	77, 294
Протеазни инхибитори и калциеви антагонисти (дихидропиримидини, verapamil, diltiazem)	Протеазните инхибитори потискат метаболизма на калциевите блокери и повишават плазмените им нива	Повишен риск за изразена хипотония и кардиодепресивни ефекти	100
Протеазни инхибитори и имunosупресори (ciclosporin, tacrolimus, sirolimus)	Протеазните инхибитори потискат метаболизма на имunosупресорите и повишават плазмените им нива	Повишен риск за нежелани ефекти (нефротоксичност, хепатотоксичност и др.)	100, 385
Протеазни инхибитори и статини (atorvastatin, lovastatin, simvastatin)	Протеазните инхибитори потискат метаболизма на статините и повишават плазмените им нива	Повишен риск за мускулна токсичност и рабдомиолиза	100
Ciclosporin и статини	Ciclosporin инхибира метаболизма на статини и повишава значително плазмените им нива	Повишен риск за мускулна токсичност и рабдомиолиза	385
Противогъбични азоли и статини (atorvastatin, lovastatin, simvastatin, fluvastatin)	Азолите инхибират CYP450-медирания метаболизъм на статините и повишават плазмените им нива	Повишен риск за мускулна токсичност и рабдомиолиза	54, 86
Инхибитори на ФДЕ5 и нитрати	Инхибиторите на ФДЕ5 потенцират вазодилатиращия ефект на нитратите, поради сходен механизъм на действие	Тежка хипотония	54

2.4. Взаимодействия между конвенционални лекарства и фитопрепарати

Едновременното приложение на фитопрепарати и лекарства също може да доведе до възникване на фармакокинетични и/или фармакодинамични взаимодействия със сериозни последици за здравето, особено когато билковите препарати се приемат без препоръка и консултация от лекар [11, 192]. Растителните екстракти често съдържат редица съединения,

някои от които могат да модулират активността на лекарство-метаболизиращи ензими и/или трансмембранни транспортери или могат да бъдат техни субстрати. Обикновено CYP450 ензимите (CYP3A4/5, CYP1A2, CYP2D6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19) и транспортерите от ABC фамилията (P-gp, MRP1, MRP2, BCRP) са въввлечени във взаимодействията между лекарства и растителни дроги. В последно време все повече проучвания съобщават и за участието на SLC транспортерите, по-специално някои органични анионни транспортери (OATPs) и органични катионни транспортери (OCTs) като потенциални места на взаимодействие [22, 25, 48, 187].

Често докладвани са взаимодействията между лекарства и растителни лекарствени продукти, съдържащи екстракт от жълт кантарион и гинко билоба. Екстрактът от жълт кантарион индуцира активността на цитохромите (CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4, CYP2E1) и P-gp, в резултат на което може да повлияе терапевтичния ефект или безопасността на някои лекарства [233]. Екстрактът от гинко билоба и по-специално съдържащите се гинколиди пък могат да засилят антикоагулантния ефект на оралните антикоагуланти, поради инхибиране на тромбоцитната агрегация и повишаване на риска от кървене [306, 336]. Добре известни са и взаимодействията между някои храни и лекарства. Класически пример е взаимодействието между сокът от грейпфрут, който съдържа фуранокумарини и флавоноиди, потискащи активността на CYP3A4 с редица лекарства, субстрати на CYP3A4 [233]. Има обаче и редица случаи, при които в *in vitro* проучвания се наблюдава взаимодействие между растителен екстракт и определено лекарство, но при *in vivo* изследване наблюдаваното взаимодействие не се потвърждава. Такъв е примерът с екстрактът от плодове на бял трън, съдържащ силимарин. Няколко проучвания докладват, че силимарин инхибира активността на CYP3A4 *in vitro*. При провеждане на клинични изследвания обаче е установено, че силимарин не повлиява съществено плазмените нива на midazolam и irinotecan, субстрати на CYP3A4 и следователно не инхибира активността на ензима [118]. В таблица 3 са представени някои клинично значими взаимодействия между лекарствени средства и растителни екстракти или храни.

Таблица 3. Важни клинично значими взаимодействия между лекарства и растителни екстракти или компоненти на храни.

Растителен или диетичен продукт	БАВ	Лекарство	Предполагам механизъм	Ефект	Източник
Екстракт от гинко билоба (<i>Ginkgo biloba</i>)	Гинколиди	Warfarin	Гинколидите инхибират тромбоцитната агрегация	Екстрактът от гинко може да потенцира антикоагулантния ефект на warfarin и да повиши риска от кървене	182, 306
Екстракт от зелен чай (<i>Camellia sinensis</i>)	Витамин К	Warfarin	Витамин К е необходим за синтеза на витамин К – зависимите фактори на кръвосъсирване	Екстрактът от зелен чай може да антагонизира антикоагулантния ефект на warfarin и да намали неговият ефект	107, 182, 306

Екстракт от жълт кантарион (<i>Hypericum perforatum</i>)	Хиперфорин	Warfarin	Екстрактът от жълт кантарион засилва клирънса на едновременно прилагани лекарства вероятно поради активиране на PXR рецептора и индукция на цитохромите (CYP3A4, CYP2C9, CYP2B6) и P-gp	Намален терапевтичен ефект на warfarin и риск от тромбози	64, 107, 118, 242, 299
		Ciclosporin		Намален имunosупресивен ефект на ciclosporin	
		Орални контрацептиви		Намалена терапевтична ефективност на оралните контрацептиви и риск от нежелана бременност	
		Протеазни инхибитори (indinavir)		Намалена противовирусна активност	
		Противотуморни лекарства (irinotecan, imatinib, docetaxel)		Намалена противотуморна активност	
Сок от грейпфрут (<i>Citrus paradisi</i>)	Фуранокумарини	Статини (simvastatin, atorvastatin)	Фуранокумарини -те инхибират активността на цитохромите (основно CYP3A4 в стомашно-чревния тракт) и повишават оралната бионаличност на редица лекарства	Повишен риск от мускулна токсичност и рабдомиолиза	37, 95, 212
		Калциеви блокери (verapamil)		Кардиодепресия и AV-блок	
		Антиаритмични лекарства (amiodarone)		Повишен риск за удължаване на QT-интервала и развитие на <i>torsades de points</i>	
		Противотуморни лекарства (docetaxel, nilotinib и др.)		Повишена токсичност на противотуморните препарати (миелотоксичност, кардиотоксичност и др.)	
		Имуносупресори (ciclosporin, tacrolimus)		Повишена токсичност на имunosупресорите (нефротоксичност и др.)	
Екстракт от годжи бери (<i>Lycium barbarum</i>)	Полизахариди	Warfarin	Инхибиция на CYP2C9 и повишаване на плазмените нива на warfarin	Повишен риск от кървене	42, 70, 111

2.5. Взаимодействия между конвенционални лекарства и екстракт от зелен чай и/или негови компоненти

Редица проучвания съобщават за потенциални взаимодействия между зелен чай и конвенционални лекарства, използвани в терапията на сърдечно-съдови и туморни заболявания. Въпреки че екстрактът от зелен чай съдържа голям брой компоненти, които могат да взаимодействат с други лекарства, се приема, че катехините са основните съединения, които освен, че са носители на биологичната активност, са причина и за възникване на взаимодействия [345]. В таблица 4 са посочени някои от докладваните взаимодействия между екстракта от зелен чай и/или негови компоненти и конвенционални лекарства, наблюдавани при *in vivo* проучвания.

2.5.1. Катехини

Проведени са много на брой предклинични (*in vitro* и *in vivo*) и клинични проучвания за да се оцени потенциалът на екстракта от зелен чай и/или на съдържащите се в него катехини да модулират активността на лекарство-метаболизиращите ензими, както и на някои трансмембранни транспортери [18].

***In vitro* проучвания**

Катехините и ЕГКГ инхибират некомпетитивно активността на СYP3A ензимите *in vitro*, а както вече споменахме, СYP3A4 е основният цитохром ензим, участващ в лекарствения метаболизъм в черния дроб и червата [41, 345]. В различни *in vitro* изследвания е наблюдавана също инхибиция на СYP1A1, СYP1A2, СYP2A6, СYP2B6, СYP2C19, СYP2C8, СYP2C9, СYP2D6, СYP2E1, като в едно от проучванията се твърди, че ЕГКГ показва най-силен инхибиращ ефект върху активността на цитохромите [18, 345]. Satoh и сътрудници (2016) съобщават, че катехините, които са конюгирани с галова киселина инхибират активността на СYP1A2, СYP2C9 и СYP3A4 *in vitro*, но не и СYP2D6, докато неконюгираните катехини не инхибират цитохромите [282]. В допълнение, ЕГКГ е показал инхибиращ ефект върху активността на УДФ-глюкуронил трансферазите, по-специално UGT1A1 [18]. ЕГКГ инхибира също активността на ензима СОМТ *in vitro*, но при хора не е наблюдаван такъв ефект [285].

Според *in vitro* изследвания ЕГКГ потиска активността на органичния анионен транспортер ОАТР1В1, който участва в преноса на лекарствени молекули към черния дроб за да бъдат подложени на биотрансформация [106, 285, 345]. Съобщава се също, че екстракт от зелен чай и ЕГКГ инхибират анионни транспортери (ОАТР1А2, ОАТР1В1, ОАТР1В3 и ОАТР2В1), които са разположени в ентероцитите, черния дроб, бъбреците, хематоенцефалната бариера, както и транспортери, пренасящи органични катиони като ОСТ1, ОСТ2, МАТЕ1 и МАТЕ2-К транспортерите, които са въввлечени в реналната екскреция на лекарствата [18, 148, 165, 245, 285]. Освен това, катехините и ЕГКГ във високи дози инхибират активността и на Р-гр, основният ефлуксен протеин, който осъществява преноса на лекарствените молекули от клетките към извънклетъчното пространство. Този протеин е експресиран в редица тъкани като на ниво СЧТ е отговорен за по-ниската степен на резорбция на някои лекарства като digoxin [18, 116, 165, 285, 345].

***In vivo* проучвания**

При опитни животни е установено, че екстрактът от зелен чай, както и ЕГКГ самостоятелно повишават плазмените нива на лекарства, субстрати на СYP3A4 и на Р-гр и

понижават плазмените концентрации на лекарства, субстрати на органичните анионни транспортери, вероятно поради инхибиране на активността им [18, 345]. Някои проучвания при хора обаче не показват съществено влияние на зеления чай върху плазмените концентрации на субстрати на CYP1A2, CYP2C9, CYP2D6 и CYP3A4. Тези резултати са в противоречие с резултатите от повечето *in vitro* проучвания, което не е необичайно явление при оценката на потенциални взаимодействия между лекарства и билки. Същевременно, има данни от клинични изследвания, при които екстрактът от зелен чай повишава значително AUC на лекарства, субстрати на CYP3A4 и P-gp, като според авторите наблюдаваните резултати вероятно се дължат на инхибиране на метаболизма и/или чревния ефлукс. В допълнение, екстрактът от зелен чай понижава серумната концентрация на nadolol, субстрат на OATP1A2, вероятно също поради потискане на активността му [18, 222, 223].

В заключение, докладвано е, че екстрактът от зелен чай и/или ЕГКГ самостоятелно инхибират активността на цитохромите и други лекарство-метаболизиращи ензими, както и на редица трансмембранни транспортери, но някои от наблюдаваните *in vitro* взаимодействия не се потвърждават *in vivo*. Поради ниската орална бионаличност на чаените катехини при хора се предполага, че наблюдаваните взаимодействия с перорално приемани лекарства възникват предимно на ниво СЧТ [345]. За да се предвидят по-точно потенциалните взаимодействия между зеления чай и едновременно приемани лекарства е необходимо да се провеждат *in vivo* проучвания, както при опитни животни, така и при хора.

2.5.2. Метилксантини

Кофеинът, приеман ежедневно в състава на кафе, чай или други храни и напитки може да взаимодейства с едновременно прилагани лекарства. Кофеин се метаболизира предимно от ензима CYP1A2 и се използва като пробен субстрат за оценка на активността на този ензим при различни проучвания [55]. Според някои изследвания кофеинът индуцира активността на CYP1A2, а според други е слаб инхибитор на CYP1A2 [168, 324]. Смята се, че фармакокинетичните взаимодействия между кофеин и едновременно прилагани лекарства възникват предимно на ниво метаболизъм с лекарства, които са субстрати, индуктори или инхибитори на CYP1A2 [55, 139]. При едновременен прием на кофеин с лекарства, субстрати на CYP1A2 е възможно да настъпи конкуренция за свързване с ензима. В резултат на това, кофеинът може да насити наличните свързващи места в ензимите и да инхибира метаболизма на други едновременно приети лекарства (някои антипсихотици и антидепресанти, melatonin и други), което вероятно ще доведе до повишаване на плазмените им концентрации [44]. В наше предишно проучване наблюдавахме, че метилксантинови фракции, изолирани от Банча и Пу-ер чаени листа, както и чист кофеин инхибират активността на CYP3A4 *in vitro* [113]. В литературата се съобщава, че кофеинът и кафето потискат CYP3A4, но наличната информация е ограничена [85, 172]. В допълнение, *in vitro* е наблюдавано, че кофеин инхибира метаболизма на dextromethorphan от CYP2D6 [44]. От друга страна, приемът на определени лекарства и компоненти на храни, които взаимодействат с CYP1A2, както и някои вредни навици могат да окажат влияние върху биотрансформацията на кофеин. Известно е, че при тютюнопушене полицикличните ароматни въглеводороди в тютюневия дим индуцират CYP1A2 и ускоряват метаболизма на кофеин, докато еднократният прием на голямо количество алкохол има инхибиращ ефект върху активността на ензима [55, 139]. Освен това, метаболизмът на кофеин се забавя по време на бременност и плазменият му полуживот се удължава, вероятно поради инхибиране на лекарство-метаболизиращите ензими от половите хормони или поради

понижените плазмени нива на албумин по време на бременност, в резултат на което се повишава количеството на свободния кофеин [311, 361]. Повишени плазмени концентрации на кофеин се откриват и при прием на орални контрацептиви [311].

Възможно е взаимодействията с кофеин да възникнат и на други фармакокинетични нива, например по време на резорбцията на определени лекарства в СЧТ. Кофеинът повишава секрецията на стомашен сок и понижава стомашното рН, поради което може да повлияе резорбцията на лекарства слаби бази като midazolam. Същевременно, по-ниските стойности на рН благоприятстват резорбцията на лекарства слаби киселини като acetylsalicylic acid [44, 168]. Освен това, понижаването на стомашното рН може да доведе до по-ниска бионаличност на лекарства, нестабилни при ниско рН, вследствие на тяхното разграждане. Още повече, кофеинът може да взаимодейства с лекарствата чрез образуване на слабо разтворими комплекси и да намали тяхната резорбция и орална бионаличност (например escitalopram). Известно е, че кофеин стимулира стомашното изпразване, в резултат на което лекарствата достигат по-бързо мястото на резорбция в червата и ефектът настъпва по-бързо, а в някои случаи се повишава и оралната бионаличност. Също така, кофеинът повишава гломерулната филтрация и обема на образуваната урина, в резултат на което може да се ускори екскрецията на някои електролити, витамини и лекарства [44]. Има данни от *in vitro* проучвания, според които кофеин индуцира активността на P-gp и би могъл да повлияе чревния ефлукс, разпределението и елиминирането на някои лекарства [26].

Таблица 4. Докладвани взаимодействия между екстракт от зелен чай или негови компоненти и конвенционални лекарства *in vivo*.

Растителен продукт	Лекарство	Предполагам механизъм	Ефект	Проучване	Източник
Екстракт от зелен чай	Simvastatin	Инхибиция на интестиналния метаболизъм на simvastatin от СУРЗА4 и на чревния ефлукс от P-gp	Повишаване на AUC на simvastatin (незначително) и на simvastatinic acid + 22 %;	Клинично	345
			Повишаване на AUC и C _{max} на simvastatin и simvastatinic acid	Предклинично (при опитни животни)	222
ЕГКГ	Rosuvastatin	Инхибиция на OATP1A2 или OATP2B1 в чревните клетки и намаляване на чревната резорбция	Понижаване на AUC на rosuvastatin с 19 % и намаляване на ефективността му	Клинично	162
Екстракт от зелен чай	Atorvastatin	Инхибиция на OATP1A2 в СЧТ и намаляване на чревната резорбция на atorvastatin	Понижаване на C _{max} и AUC на atorvastatin и намаляване на ефективността му	Клинично	5

Екстракт от зелен чай и ЕГКГ	Nadolol	Инхибиция на OATP1A2 транспортера в червата и потискане на чревната резорбция на nadolol	Понижаване на AUC и C_{max} на nadolol и намаляване на ефективността му	Предклинично (при опитни животни); Клинично	223, 224
Екстракт от зелен чай	Tacrolimus	Инхибиция на интестиналния метаболизъм на tacrolimus от CYP3A4 и на чревния ефлукс от P-gp	Двукратно повишаване на плазмените нива на tacrolimus, в сравнение с предишен мониторинг	Докладван случай	330
Екстракт от зелен чай	Warfarin	Екстрактът от зелен чай съдържа витамин К	Клинично значимо понижаване на INR (от 3.79 до 1.37), поради антагонизиране на ефекта на warfarin и повишен риск от тромбоза	Докладван случай	107, 182, 306, 345
Екстракт от зелен чай, стандартизиран спрямо съдържанието на катехини	Digoxin	Инхибиция на чревни транспортери, участващи в резорбцията на digoxin или повишаване на активността на P-gp от епикатехин	Понижаване на AUC на digoxin с 31 % и намаляване на ефективността му	Клинично	163
Екстракт от зелен чай	Фолиева киселина	Инхибиция на чревни транспортери, участващи в резорбцията на фолиева киселина или участие на ефлуксни протеини	Понижаване на C_{max} и AUC на фолиевата киселина	Клинично	19
Екстракт от зелен чай, стандартизиран спрямо съдържанието на катехини	Sildenafil + midazolam	Инхибиция на интестиналния метаболизъм на sildenafil от CYP3A	Повишаване на AUC на sildenafil + 50 %	Клинично	133
Екстракт от зелен чай, стандартизиран спрямо съдържанието на полифеноли	Imatinib	Инхибиция на чревни транспортери, участващи в резорбцията на imatinib или повлияване на	Понижаване на C_{max} и AUC на imatinib и N-desmethylimatinib	Предклинично (при опитни животни)	76

		ефлуксни протеини			
ЕГКГ	Sunitinib	ЕГКГ намалява или забавя резорбцията на sunitinib, поради образуване на комплекс в СЧТ	Понижаване на C_{max} и AUC на sunitinib	Предклинично (при опитни животни)	108
Екстракт от зелен чай и ЕГКГ	Bortezomib	Директно ковалентно взаимодействие между ЕГКГ и bortezomib	Отслабване на противотуморния ефект, поради невъзможност bortezomib да се свърже със своя таргет (протеазомата)	Предклинично (<i>in vitro</i> и <i>in vivo</i>)	119
Екстракт от зелен чай, стандартизиран спрямо съдържанието на катехини и ЕГКГ	Erlotinib, lapatinib	Взаимодействие на фармакокинетично ниво	Понижаване на C_{max} и AUC както на erlotinib, така и на lapatinib	Предклинично (при опитни животни)	202
Екстракт от зелен чай	Hydrochlorothiazide	Инхибиция на ангиотензин-конвертиращия ензим (АСЕ)	Усилване на диурезата, поради повишаване на натриевата екскреция, но се наблюдава намаляване на екскрецията на K^+	Предклинично (при опитни животни)	57
ЕГКГ	Tamoxifen	Инхибиция на СУР3А4-медиацияния метаболизъм на tamoxifen и на чревния ефлукс от Р-gp	Повишаване на AUC и C_{max} на tamoxifen	Предклинично (при опитни животни)	18
ЕГКГ	Калциеви антагонисти (verapamil, diltiazem, nicardipine, amlodipine)	Инхибиция на СУР3А4-медиацияния метаболизъм на калциевите блокери и/или на чревния ефлукс от Р-gp	Повишаване на AUC на изследваните калциеви блокери	Предклинично (при опитни животни)	65, 71, 132, 188
Кофеин	Clozapine	Двете лекарства се метаболизират предимно от СУР1А2, поради което кофеин инхибира метаболизма на	Повишаване на плазмената концентрация на clozapine	Клинично	55

		clozapine			
Кофеин	Acetylsalicylic acid	Повишаване на резорбцията на acetylsalicylic acid, поради понижаване на стомашното рН	Повишаване на бионаличността на acetylsalicylic acid	Клинично	44
Кофеин	Флуорохинолони	Конкуренция за CYP1A2, поради което флуорохинолоните инхибират метаболизма на кофеин	Значително повишаване на AUC, както и намален клирънс на кофеин	Клинично	55
Кофеин	Ketoprofen	Повишаване на степента на резорбция на ketoprofen; предполага се и фармакодинамично взаимодействие	Значително повишаване на AUC и C _{max} на ketoprofen, както и значителни разлики в максималния ефект (E _{max})	Предклинично (при опитни животни)	214

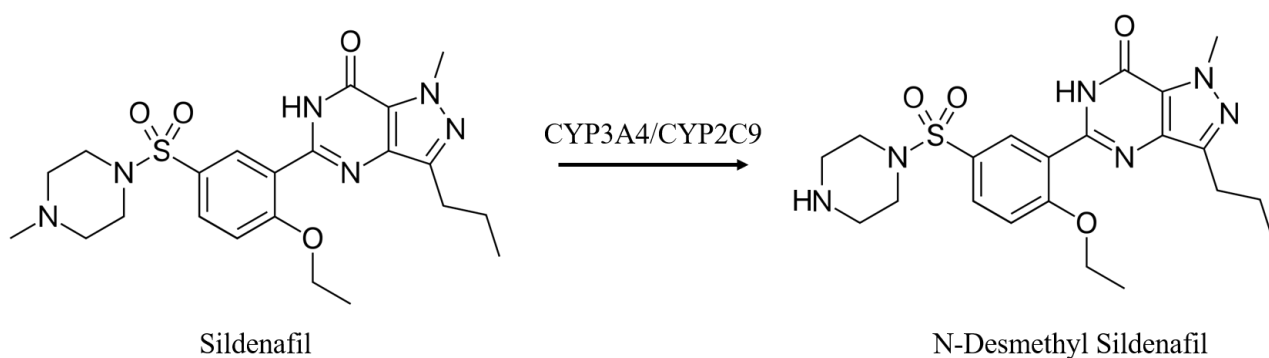
2.6. Взаимодействия между sildenafil и фитопрепарати/храни/напитки

Лекарственото вещество sildenafil спада към групата на селективните инхибитори на ензима ФДЕ5. Той е ефективен в терапията на еректилна дисфункция и белодробна артериална хипертония. Еректилната дисфункция е сравнително често срещан медицински проблем и се смята, че засяга 322 милиона души по света [27, 31]. Белодробната артериална хипертония се определя като рядко срещано заболяване, като честотата му се оценява на 15 до 50 души на милион в Съединените американски щати и Европа [186]. Sildenafil е средство на първи избор в терапията на еректилна дисфункция, а също и един от най-често предписваните и прилагани медикаменти в днешно време. Неговата честа употреба в съчетание с фармакокинетичните му особености са предпоставка за по-висок риск за възникване на лекарствени взаимодействия при едновременно приложение с други лекарства. В допълнение, sildenafil се приема и от мъже без медицински проблем с цел повишаване на сексуалната издръжливост, което може да доведе до неправилно използване на лекарството и повишен риск за нежелани лекарствени реакции, особено ако се прилага едновременно с други медикаменти. Освен това, няколко проучвания показват, че sildenafil е бил незаконно добавен към състава на някои растителни препарати и алкохолни напитки. Възможността да бъде закупен и използван без лекарско предписание и консултация или да бъде приет случайно допълнително задълбочава проблема с неговата ирационална употреба и повишава вероятността за лекарствени взаимодействия, включително взаимодействия с растителни компоненти [31, 251, 297].

2.6.1. Фармакокинетика

Sildenafil се прилага перорално и се резорбира бързо в СЧТ. Въпреки това, лекарството има относително ниска орална бионаличност (~ 40 % при хора), вероятно поради екстензивен

пресистемен метаболизъм (интестинален и чернодробен). Sildenafil се метаболизира главно от CYP3A4 и в по-малка степен от CYP2C9 до активния метаболит N-desmethyl sildenafil [6, 23, 127]. На фигура 3 е представен метаболизмът на sildenafil при хора. Sildenafil се характеризира с висока проникваемост и лесно преминаване през биомембраните. Разтворимостта му в СЧТ е рН-зависима. Той се разтваря добре при рН стойности 1.2 и 4.5, но е слабо разтворим при рН = 6.8, поради което се причислява към лекарствените вещества от клас II, съгласно Биофармацевтичната класификационна система (BCS) за перорални лекарствени продукти с неизменено освобождаване [221]. Според някои проучвания sildenafil е субстрат на P-гр. Предполага се, че ефлуксният транспорт, медиран от този трансмембранен протеин допринася за ниската орална бионаличност на препарата [66, 137, 148]. Sildenafil има плазмен полуживот около 4 часа при хора. Той се подлага на екстензивна тубулна реабсорбция и се елиминира основно под форма на метаболити с фекалиите, а само малка част от дозата се елиминира в непроменен вид с урината [23, 27, 82].



Фигура 3. Метаболизъм на sildenafil до неговия активен метаболит при хора [309].

2.6.2. Механизъм на действие и терапевтично приложение

Sildenafil е селективен инхибитор на ензима ФДЕ5. Този ензим е отговорен за разграждането на цГМФ в гладката мускулатура на кръвоносните съдове. Нивата на цГМФ се повишават под действие на освободения от съдовия ендотел NO, който е познат като ендогенен вазодилататор. Инхибирането на ензима ФДЕ5 води до натрупване на цГМФ, който предизвиква каскада от реакции и води до релаксация на гладката мускулатура, която е причина за вазодилатация. На нивото на корпус кавернозум при мъже, инхибирането на ФДЕ5 води до продължителна ерекция, а в белодробната тъкан се наблюдава разширяване на белодробните артерии. Sildenafil инхибира селективно ФДЕ5 и се прилага за лечение на еректилна дисфункция и белодробна артериална хипертония. Трябва да се отбележи обаче, че ефектът на sildenafil и останалите ФДЕ5 инхибитори при еректилна дисфункция е зависим от NO/цГМФ сигналния път. В допълнение, sildenafil показва и ниска селективност за свързване с ензимите ФДЕ6 и ФДЕ1 [27, 82].

2.6.3. Взаимодействия с лекарства, растителни екстракти и храни

Съгласно Биофармацевтичната класификационна система (BCS) sildenafil спада към лекарствата от Клас II – лекарства с малка разтворимост и висока проникваемост. А както беше споменато по-рано, именно лекарства с висока проникваемост, които се подлагат на метаболизъм често участват в лекарствени взаимодействия. Sildenafil отговаря на тези условия и следователно може да се посочи като лекарство с повишен риск за участие в лекарствени

взаимодействия [221, 259]. В допълнение, поради значителния принос на CYP3A4 в метаболизма на sildenafil, едновременното му приложение с лекарства, храни или билкови екстракти, които повлияват активността на този ензим, може да доведе до възникване на фармакокинетични взаимодействия. Те от своя страна могат да станат причина за повишена токсичност на sildenafil или неуспех на терапията [6]. Известни са взаимодействията между sildenafil и инхибитори на CYP3A4 като макролидните антибиотици, протеазните инхибитори, cimetidine и други, които могат да повишат риска за нежелани ефекти (зачервяване, хипотония, нарушение в цветното зрение, отслабване на зрението, загуба на слух, приапизъм и други) [82, 206]. В таблица 5 са посочени *in vivo* взаимодействия между sildenafil и растителни екстракти, храни или напитки. Възможно е също възникването на фармакодинамични взаимодействия при комбинираното приложение на sildenafil. Добре известно е взаимодействието между селективните ФДЕ5 инхибитори и нитратите. Първите потискат разграждането на цГМФ, а вторите повишават нивата на NO, който пък повишава количеството на цГМФ в клетките. Поради това, при комбинирането им клетъчните нива на цГМФ се повишават допълнително, в резултат на което се наблюдава изразена вазодилатация и съществува риск от тежка хипотония. Едновременното приложение на лекарства от тези групи е противопоказано [82, 164]. В допълнение, в литературата се откриват данни за инхибиция на трансмембранни транспортери (OCT2, OCTN2, MRP4, MATE1) от sildenafil, което също може да стане причина за възникване на взаимодействия [148].

Таблица 5. Докладвани *in vivo* взаимодействия между sildenafil и растителни екстракти, храни или напитки.

	Растителен екстракт/ храна/ напитка	Предполагам механизъм	Ефект	Проучване	Източник
Sildenafil	Екстракт от <i>Epimedium sagittatum</i>	Повлияване на активността на цитохромите и/или на трансмембранни транспортери като P-gp, MRP2 или BCRP	Понижаване на AUC на sildenafil	Предклинично (при опитни животни)	144
Sildenafil	Сок от нар	Инхибиция на интестиналния метаболизъм на sildenafil от CYP3A4	Повишаване на бионаличността на sildenafil	Предклинично (при опитни животни)	206
Sildenafil	Екстракт от <i>Eruca sativa</i>	Повишаване на резорбцията на sildenafil, поради понижаване на стомашното pH или поради инхибиране на P-gp от <i>Eruca sativa</i>	Повишаване на C _{max} и AUC на sildenafil	Предклинично (при опитни животни)	205
Sildenafil	Екстракт от <i>Kaempferia parviflora</i>	Индукция на CYP450 ензимите от екстракта и ускорен метаболизъм на sildenafil	Понижаване на AUC и C _{max} на sildenafil	Предклинично (при опитни животни)	218

Sildenafil	<i>Nigella sativa</i> , <i>Lepidium sativum</i> , <i>Trigonella foenum-graecum</i>	Намаляване на резорбцията на sildenafil от изследваните билки	Понижаване на AUC и C_{max} на sildenafil	Предклинично (при опитни животни)	23
Sildenafil	Сок от лимон, сок от горчив портокал	Инхибиция на интестиналния метаболизъм на sildenafil от CYP3A4 и/или инхибиция на чревния ефлукс от P-gp	Сокът от горчив портокал повишава C_{max} и AUC на sildenafil, докато лимоновият сок не повлиява ФК на sildenafil	Клинично	6
Sildenafil	Сок от грейпфрут	Инхибиция на чревния метаболизъм на sildenafil от CYP3A4	Повишаване на оралната бионаличност на sildenafil	Клинично	6, 20
Sildenafil	Сок от помело	Намалена резорбция поради образуване на комплекси между sildenafil и компоненти на сока от помело или поради повлияване на транспортери (OATPs)	Намалява бионаличността на sildenafil	Клинично	20
Sildenafil	Red Bull®	Индукция на CYP3A4, но се допуска, че взаимодействието може да възниква и на друго фармакокинетично ниво	Понижаване на AUC и C_{max} на sildenafil	Предклинично (при опитни животни)	7
Sildenafil + midazolam	Екстракт от зелен чай	Инхибиция на интестиналния метаболизъм на sildenafil от CYP3A	Повишаване на AUC на sildenafil + 50%	Клинично	133

3. Методи за проучване на лекарствени взаимодействия

Съществуват различни подходи за проучване на лекарствени взаимодействия, които могат да се разделят на *in vitro*, *in vivo* и *in silico* методи [216, 318]. Те включват *in vitro* проучвания на взаимодействията лекарство-ензим; физиологично базирано фармакокинетично моделиране за прогнозиране на фармакокинетични лекарствени взаимодействия (*in silico* метод); експериментални изследвания на влиянието на лекарствените взаимодействия върху серумните концентрации на лекарствата при животни и хора (*in vivo* проучвания); събиране на данни от публикувана литература и от докладвани случаи на нежелани лекарствени реакции; фармакоепидемиологични проучвания на здравните ефекти на потенциални лекарствени взаимодействия и други [135]. Проучванията за потенциала на лекарството да участва в лекарствени взаимодействия започват още в процеса на разработване на нови лекарства. Те се провеждат с цел да се установи как новото лекарствено вещество

повлиява безопасността и/или ефикасността на други лекарствени продукти при едновременно приложение и обратно. Потенциалът за взаимодействия се изследва главно преди пускането на новите лекарства на пазара. Според насоките за изследване на лекарствени взаимодействия на ЕМА е препоръчително да се провеждат както *in vitro*, така и *in vivo* проучвания при хора за охарактеризиране на потенциалните фармакокинетични и фармакодинамични взаимодействия за дадена лекарствена молекула. Изследване за фармакокинетични взаимодействия може да се проведе и при опитни животни, но поради различията между видовете екстраполирането на данните при хора понякога е трудно и неточно. *In vitro* проучванията за фармакокинетични взаимодействия следва да се провеждат с човешки ензими и транспортери [383]. По време на постмаркетинговия контрол оценката на потенциални лекарствени взаимодействия за определено лекарство може да се извърши чрез ретроспективен анализ на данни от популацията, приемала лекарството, от докладвани случаи или вследствие на допълнителни *in vitro* и/или *in vivo* проучвания [318].

In vitro и *in vivo* проучванията обикновено са скъпи, а понякога е невъзможно да бъдат проведени, поради сериозни нежелани ефекти, вследствие на лекарствените взаимодействия. Поради това, през последните години усилено се разработват *in silico* методи, които представляват компютърни изчислителни методи на базата на предварително въведени данни за лекарствените молекули [216]. Те се използват в различни аспекти при откриването и разработването на лекарства като лекарствен дизайн, фармакодинамични и фармакокинетични анализи, включително за предсказване на лекарствени взаимодействия и на потенциалните ефекти от настъпило взаимодействие. Моделите, които най-често се прилагат са във връзка с лекарствения дизайн са количествена структура-активност връзка (QSAR), 3D-QSAR и структура-базирана техники за оптимизация на водещото съединение, а в предклиничните етапи – *in silico* методи за оценка на абсорбция-разпределение-метаболизъм-екскреция и токсичност (ADME/T) и физиологично базирани фармакокинетични (ФБФК) симулации [89, 216, 275, 328, 371].

3.1. Физиологично базиран фармакокинетичен (ФБФК) модел

Физиологично базираният фармакокинетичен (ФБФК) модел представлява математически подход използващ серия от диференциални уравнения, за да може да се прогнозира фармакокинетичното поведение на лекарствените молекули в човешкия и животинския организъм. Този модел представя човешкия организъм като съставен от компартименти, параметризирани въз основа на физиологията на тъканите и органите, включително състав, обем и кръвен поток. Това физиологично описание се интегрира със специфични за лекарствената молекула данни, за да се предскаже фармакокинетиката на лекарствата [3, 220]. ФБФК модел предоставя симулирани криви плазмена концентрация-време на дадено лекарство и неговият/те метаболит/и в плазмата или в определен орган и едновременно с това позволява да се направи оценка на максималните плазмени концентрации, кинетиката на абсорбция и разпределение, както и на елиминирането на лекарството. В някои случаи ФБФК моделите включват интериндивидуалната вариабилност, като по този начин позволяват прогнозиране на вариациите във фармакокинетиката на дадено лекарство при определена популация (детска възраст, старческа възраст, бременни жени и др.), както и при пациенти с нарушена бъбречна и чернодробна функция [275]. В последните години ФБФК модел се предпочита в оценката на риска от лекарствени взаимодействия, поради високата прецизност и точност на симулираните взаимодействия, доближаващи се

максимално до тези наблюдавани в реални условия. Днес ФБФК модели се използват рутинно във фармацевтичните програми за откриване и разработване на нови лекарства и все по-често се приемат от регулаторните органи [156, 261, 274]. Най-голямо значение се отдава на прогнозирането на лекарствени взаимодействия и на фармакокинетичното моделиране при педиатричната популация. В допълнение, през последните години FDA и ЕМА изготвиха документи с насоки за подходящото използване на ФБФК модели и наблюдаваните резултати от ФБФК моделирането все по-често се отразяват в листовките на лекарствата. В допълнение, ЕМА определя ФБФК моделирането като полезен инструмент за оценка на подходящата начална доза при здрави доброволци в хода на клиничните изпитвания [220].

3.2. Конструирание на ФБФК модел

За разлика от конвенционалните фармакокинетични модели, ФБФК модел е съставен от две основни части:

- ❖ анатомична част – съдържа специфични физиологични параметри, които са независими от лекарството и могат да бъдат приложими при всяко едно вещество,
- ❖ индивидуални лекарствени физико-химични параметри – използват се за определяне на фармакокинетичното поведение.

Към първата група спадат системните параметри, които са свързани с физиологичните особености на организма – обем, тегло, скорост на кръвооросяване, наличие на ензими и транспортни системи, генетичен полиморфизъм и др. Необходими лекарствени параметри при изготвянето на модела включват физико-химични свойства (молекулно тегло, рКа, киселинност и базичност на съединението), разтворимост ($\log D$) и пермеабилитет, свързване с кръвни клетки или плазмени протеини и др. Всичките тези данни са налични в днешно време, включително и промените, които настъпват ако органите са засегнати от заболяване или има популационни различия [155]. Лекарствените параметри са получени от най-различни *in silico*, *in vitro* или *in vivo* модели или комбинация от тях [321].

3.3. Софтуер за изготвяне на ФБФК модел

Изготвяне на фармакокинетичен профил на дадено съединение в плазмата и отделните тъкани и органи е възможно след интегриране на алгоритмите и моделните уравнения в специален софтуер. В днешно време се различават два типа софтуерни програми. При едните е необходимо добавяне на уравненията и функциите (NONMEM[®] и MATLAB[®]), докато при другите моделните уравнения са предварително добавени, което улеснява работата с тези платформи (Simcyp[®] и Gastro[®]). В процеса на откриване и разработване на нови лекарства най-широко приложение намират софтуерите Simcyp[®] и Gastro[®] [156, 176].

3.4. Верификация на ФБФК модел

След разработването на модела следва да се провери неговото качество. Тази стъпка трябва да отговори на въпроса дали използваният модел отговаря на поставената цел. Следните критерии или тестове могат да бъдат използвани при оценка на модела:

- ❖ Съпоставяне на резултатите от моделирането с експериментални данни – верифицирането на ФБФК модела има за цел да сравни фармакокинетичните параметри (C_{\max} , T_{\max} , AUC, $t_{1/2}$ и други), наблюдавани при експериментални опити с тези, предсказани чрез разработения модел. Съотношението между експериментално

отчетените и предсказаните средни стойности на C_{max} и на AUC се разглежда като приемливо ако е в заложените интервали.

- ❖ Съпоставяне на ФБФК модели за различни дози от лекарството, за различни видове, специални популации и съединения – кръстосана проверка за валидиране на модела е отчитането на различни дози.
- ❖ Анализ на чувствителността или сценарии с най-добрия и най-лошия изход – за да се оцени несигурността в резултатите от модела се препоръчва да се направи анализ на чувствителността за съответните параметри [176, 291].

3.5. Приложение на ФБФК моделирането

ФБФК моделите намират разнообразно приложение в процеса на разработване на нови лекарства, а и не само. Те могат да бъдат използвани за:

- ❖ Предсказване на фармакокинетичния профил на дадено лекарство в предклинични и клинични изследвания, включително при прием на различни дози и/или при различен път на въвеждане;
- ❖ Определяне на оралната резорбция в зависимост от приема на храна и използваната лекарствена форма;
- ❖ Оценка на експозицията на даден орган след прилагане на определено лекарство;
- ❖ Определяне на първата доза за в процеса на клиничните изпитвания при хора;
- ❖ Предсказване на популационни фармакокинетични характеристики – при педиатрични и гериатрични пациенти, при пациенти с хронични заболявания, при пациенти с различна етническа принадлежност и други;
- ❖ Предсказване на фармакокинетичното поведение на големи молекули;
- ❖ Предсказване на лекарствени взаимодействия.

От всички изброени възможности за приложение на модела, най-широко приложение намира използването му с цел предсказване на лекарствени взаимодействия [331, 375].

ФБФК модели са приложими също за оценка на взаимодействия между конвенционални лекарства и растителни екстракти, които са все по-често срещани в клиничната практика през последните години. За оценка на тези взаимодействия обаче са необходими множество предположения и допускания, свързани с комплексния състав на екстрактите и разнообразието от биологично активни вещества, съдържащи се в тях [9, 114].

В заключение, от изготвения литературен обзор става ясно, че взаимодействията между лекарствени средства и растителни продукти представляват сериозен проблем за клиничната практика в днешно време, предвид все по-широката употреба на природни продукти. Това налага разработването и прилагането на методи за оценка и анализ на потенциалните взаимодействия между определени лекарства (субстрати на цитохромите и/или на трансмембранни транспортери) и фитопрепарати, съдържащи често употребявани растителни екстракти, както и такива, които са показали тенденция за участие във взаимодействия. Съвкупността от няколко различни метода едновременно (*in vitro*, *in silico* и *in vivo*) би осигурила най-пълна представа относно риска за възникване на конкретно взаимодействие. В допълнение, въвеждането на задължителни предклинични и/или клинични изпитвания на хранителните добавки, съдържащи растителни екстракти преди да бъдат регистрирани за продажба ще намали вероятността за взаимодействия с лекарствени средства и ще повиши безопасността на продуктите.

III. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Научните изследвания в дисертационния труд са насочени към по-задълбочено проучване на потенциалните взаимодействия, които биха могли да възникнат при едновременна употреба на различни видове зелен чай и конвенционални лекарства.

1. Цел

Целта на представения дисертационен труд е да се оцени влиянието на метилксантинова фракция, катехинова фракция и цялостен екстракт от японски зелен чай Банча върху фармакокинетиката на sildenafil.

2. Задачи

Във връзка с постигането на поставената цел са заложили следните задачи:

2.1. Получаване на растителни извлеци от японски зелен чай Банча:

- 2.1.1. Получаване на тотален екстракт (ТЕ);
- 2.1.2. Изолиране на катехинова фракция (КФ);
- 2.1.3. Изолиране на метилксантинова фракция (МФ);

2.2. Качествен и количествен анализ на получените екстракти:

- 2.2.1. Качествен и количествен анализ на катехини, галова киселина и кофеин в проби от ТЕ и КФ, получени от японски зелен чай Банча:
 - ❖ Разработване и оптимизиране на обратнофазов HPLC-UV метод за анализ на ЕГКГ, (+)-катехин, галова киселина и кофеин в проби от стандартни разтвори;
 - ❖ Валидиране на течнохроматографския метод;
 - ❖ Апробиране на течнохроматографския метод – анализ на съдържанието на ЕГКГ, (+)-катехин, галова киселина и кофеин в тестови разтвори от ТЕ и КФ.
- 2.2.2. Качествен и количествен анализ на метилксантини (кофеин, теофилин, теобромин) в проби от изолираната МФ от зелен чай Банча.

2.3. Качествено и количествено определяне на sildenafil в състава на плазмени проби от експериментални животни:

- 2.3.1. Разработване и оптимизиране на обратнофазов HPLC-UV метод за анализ на sildenafil в плазмени проби от плъхове;
- 2.3.2. Валидиране на течнохроматографския метод;
- 2.3.3. Разработване на метод за ефективно извличане на sildenafil от плазмени проби;
- 2.3.4. Апробиране на течнохроматографския метод – анализ на плазмени проби от опитни животни, третирани със sildenafil.

2.4. Проучвания при опитни животни за оценка на влиянието на получените екстракти върху фармакокинетиката на sildenafil:

- 2.4.1. Разработване на протокол за провеждане на всеки от опитите с експериментални животни;
- 2.4.2. Провеждане на двата планирани опита по отделно и третиране на опитните животни с използваните субстанции (sildenafil, ketoconazole, ТЕ, КФ и МФ от японски зелен чай Банча);
- 2.4.3. Събиране на плазмени проби от експериментални животни и пробоподготовка;

- 2.4.4. Прилагане на разработения HPLC-UV метод за анализ на sildenafil в плазмени проби от експериментални животни;
- 2.4.5. Анализ и оценка на промените във фармакокинетичните параметри на sildenafil при плъхове след многократно приложение на ТЕ, КФ и МФ от японски зелен чай Банча;
- 2.4.6. Анализ и оценка на промените във фармакокинетичните параметри на sildenafil при плъхове след еднократен прием на МФ, изолирана от японски зелен чай Банча;
- 2.5. Разработване на ФБФК модели за прогнозиране на потенциални взаимодействия между sildenafil и ТЕ, КФ или МФ от зелен чай при хора:**
 - 2.5.1. Конструирание на ФБФК модели на получените екстракти чрез използване на компютърен софтуер Simsur®;
 - 2.5.2. Оценка на потенциалните лекарствени взаимодействия чрез прилагане на механистично-статични и механистично-динамични ФБФК модели.
- 2.6. Статистическа обработка на получените резултати.**

IV. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. Материали

1.1. Използвани химикали и реактиви

- ❖ Японски зелен чай Банча, закупен от местен магазин за билки в град Варна, България. Макроскопски фармакогностичен анализ беше извършен от доц. маг.-фарм. Илия Желев Славов, д.б.
- ❖ Sildenafil citrate (≥ 98 % (HPLC), Sigma-Aldrich GmbH); Ketoconazole (≥ 98 % (HPLC), Sigma-Aldrich GmbH); Caffeine (pharmaceutical secondary standard, certified reference material, Sigma-Aldrich GmbH); Theophylline (pharmaceutical secondary standard, certified reference material, Sigma-Aldrich GmbH); Theobromine (analytical standard, ≥ 99 % (HPLC), Sigma-Aldrich GmbH); Epigallocatechin gallate (pharmaceutical secondary standard, certified reference material, Sigma-Aldrich GmbH); (+)-catechin (analytical standard, ≥ 99 % (HPLC), Sigma-Aldrich GmbH); Gallic acid (certified reference material, Sigma-Aldrich GmbH); Метанол (≥ 99.8 % (HPLC), Fisher Chemicals, UK); Етанол, абсолютен (99.99 % (HPLC), Fisher Chemicals, UK); Сярна киселина (Sigma-Aldrich GmbH); Фосфорна киселина (Sigma-Aldrich GmbH); Хлороформ (Sigma-Aldrich GmbH); Етилацетат (Sigma-Aldrich GmbH); Натриев хидроксид (Sigma-Aldrich GmbH); Бидестилирана вода (получена в лабораторни условия);
- ❖ Sodium carboxymethyl cellulose (Sigma-Aldrich GmbH); Физиологичен разтвор (0.9%, 500 mL, B. Braun Melsungen AG, Germany);

1.2. Използвани лабораторни и медицински консумативи

- ❖ Филтри Nylone white membranes (0.45 μm , d = 47.0 mm, filtraTECH, France);
- ❖ Виалки (кафяво стъкло, 2 мл., ND 8 мм, Thermo Scientific™, USA);
- ❖ Инсърти (200 μL , 02-NV, Thermo Scientific™, USA);
- ❖ Полипропиленова орогастрална сонда за гризачи FTP-18-75 (18ga (pink), 75 mm x 1.2 mm, 30 μL ; Instech Laboratories, Inc., USA);
- ❖ Вакутейнери с EDTA.K3 (Cat.№ 630903, Boen Healthcare Co., Ltd.)

1.3. Използвана апаратура и инструменти

- ❖ Аналитична везна Ohaus Explorer Analytical – със софтуер SmarText™ 2.0 (USA);
- ❖ Дестилатор Gesellschaft für Labortechnik mbH (Germany);
- ❖ Вакуум-изпарител (Büchi Labortechnik, Switzerland)
- ❖ рН метър METTLER TOLEDO, SevenCompact™ S210
- ❖ Сушилня с естествена конвекция (Model ED 56, Binder GmbH, Germany)
- ❖ Пипети Eppendorf 1000 μL и 100 μL ;
- ❖ Вортекс-миксер ZX3 Advanced (Italy);
- ❖ Ултразвукова вана (Advantage Lab, Belgium)
- ❖ Настолна мултифункционална центрофуга Ohaus Frontier FC5706 (USA);
- ❖ Концентрационна системата Stuart SBHCONC/1, снабдена с нагриващ блок Stuart SBH130D/3 (UK);

- ❖ Високоэффективна течнохроматографска система Thermo Scientific UltiMate 3000 Analytical LC System (USA), снабдена с кватернерна помпа (Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000 LPG-3400SD Quaternary Pump, USA), автоматичен инжектор (Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000 Autosampler, USA), вариабилен UV/VIS детектор (Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000 VWD-3100 Variable Wavelength Detector/VWD, USA) и детектор на диодна матрица (Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000 DAD-3000 Diode Array Detectors, USA); Високоэффективната течно-хроматографска система е снабдена със софтуер Thermo Scientific™ Chromeleon™ 7.2 Chromatography Data System software за обработка и анализ на получените резултати;

1.4. Опитни животни

Проучванията са проведени върху 198 бели мъжки плъха от порода Wistar с тегло 220 – 250 g, предоставени от Вивариума към Медицински Университет – Варна. От общия брой животни, 192 плъха са третирани и са участвали във фармакокинетичните проучвания. Останалите 6 животни не са третирани и са използвани за събиране на плазма, която не съдържа лекарствени или други субстанции и след подходяща пробоподготовка се означава като т.нар. празна плазмена проба, необходима за разработване на течнохроматографския метод за анализ на sildenafil в биологични проби. Мъжките плъхове са предпочетени пред женските в настоящата работа, поради опасения, че естралният цикъл може да повлияе на резултатите [213]. Използваните животни са здрави и не са генетично модифицирани. Плъховете са настанени в клетки (по 6 животни във всяка клетка) при стайна температура 23 ± 2 °C в добре проветриво помещение при 12-часов цикъл на светлина/тъмнина със свободен достъп до стандартна гранулирана храна и чиста питейна вода. Влажността на помещението е 50 ± 10 %. Преди началото на опитите животните са аклиматизирани за период от една седмица. С цел да се осигури случайно разпределяне на животните в различните групи са използвани компютърно генерирани произволни числа. Гризачите са третирани по едно и също време и в един и същи ред всеки ден по време на експериментите, за да се сведат до минимум потенциалните объркващи фактори. В допълнение, местоположението на животните по време на експериментите не е променяно. Влошаване на физическото състояние, диспнея и парализа са определени като хуманни крайни точки. Плъховете са наблюдавани два пъти дневно за признаци на здравословни проблеми.

1.5. Компютърен софтуер

За изграждането на ФБФК модели при екстракти от зелен чай, както и за оценка на потенциални лекарствени взаимодействия със субстрати на CYP3A4 (sildenafil) при хора е използван софтуерен симулатор Simsup[®], версия 20.1 (Certara[®] UK Limited), след получаване на годишен лиценз. Програмата разполага с възможност за предсказване на фармакокинетичното поведение на дадено съединение при човек на база на физико-химичните характеристики на съединението или чрез определяне на фармакокинетични параметри в *in vitro* постановки или *in vivo* при опитни животни. Освен това има възможност за изграждане на пълен и минимален дистрибуционен ФБФК модел. Едновременно с това, платформата включва обширни данни за демографски особености, болестни състояния, анатомични, физиологични, генетични и биохимични променливи при различни патологични и физиологични състояния.

2. Експериментални методи

Експерименталната работа е извършена изцяло в Катедрата по Фармакология, токсикология и фармакотерапия към Факултета по Фармация, при Медицински Университет – Варна, с изключение на експериментите с опитни животни, които се провеждат във Вивариума към Университета.

2.1. Методи за екстракция

За целите на експеримента се приготвят тотален екстракт (ТЕ), катехинова фракция (КФ) и метилксантинова фракция (МФ) от японски зелен чай Банча.

2.1.1. Приготвяне на тотален воден екстракт от японски зелен чай Банча

Към 100.0 g неоситнени чаени листа от японски зелен чай Банча се добавя 1.0 L гореща двойно дестилирана вода с температура около 80 °C и се запарва в продължение на 3 минути. Полученият екстракт се прецежда през марля и се изпарява под вакуум чрез вакуум-изпарител до получаване на гъста смолиста маса, която след това се суши в сушилня при температура 25 °C до получаване на сухо вещество. Сухият екстракт се съхранява в хладилник при температура 4 °C. На фигура 4 са представени снимка на чаени листа Банча, както и снимка на получения воден екстракт преди сушенето.



Фигура 4. Снимки на използваните чаени листа Банча и на приготвената инфузия.

2.1.2. Екстрахиране на катехинова фракция от японски зелен чай Банча

Претеглят се 50.0 g изсушени листа от зелен чай Банча, след което се екстрахират със 100.0 mL метанол в продължение на 60 минути и извлекът се изпарява на водна баня. Към получения сух екстракт се добавят 10.0 mL двойно дестилирана вода, натриев хлорид и фосфорна киселина до получаване на рН 3.5. Получената смес след това се поставя в разделителна фуния с 10.0 mL етилацетат и комбинирания етилацетатни екстракти се промиват два пъти с двойно дестилирана вода до неутрална реакция (рН 7.0). Катехиновата фракция се получава след изпаряване на органичния разтворител и се съхранява в хладилник при температура 4 °C.

2.1.3. Екстрахиране на метилксантинова фракция от японски зелен чай Банча

Точно претеглено количество от изсушени чаени листа Банча (50.0 g) се екстрахира под обратен хладник с 250.0 mL гореща двойно дестилирана вода за 60 минути, след което се филтрува през Бюхнерова фуния. Полученият воден екстракт се подкислява с 25%-на сярна киселина (5.0 mL) и се концентрира до половината от първоначалния си обем. След това горещият разтвор се филтрува и се екстрахира четири пъти с по 50.0 mL хлороформ в разделителна фуния като получените хлороформени екстракти се обединяват в стъклена колба. Следва промиване на екстракта от хлороформ (200.0 mL) два пъти с 5%-ен разтвор на натриев хидроксид (50.0 mL) и два пъти с двойно дестилирана вода (50.0 mL). След изпаряване на хлороформа се получава метилксантиновата фракция. Сухата маса се съхранява в хладилник при температура 4 °C.

2.2. Методи за качествено и количествено определяне на метилксантини и катехини в екстракта и фракциите, получени от японски зелен чай Банча

За качествен и количествен анализ на цялостен екстракт от японски зелен чай Банча и на изолираните катехинова и метилксантинова фракция се използва високоефективна течнохроматографска система (HPLC-UV), находяща се в Катедрата по Фармакология, токсикология и фармакотерапия. За анализа на получените растителни извлекци са използвани два течнохроматографски метода, единият от които е разработен и валидиран във връзка с настоящия дисертационен труд.

2.2.1. Течнохроматографски метод за качествено и количествено определяне на епигалокатехин-3-галат, (+)-катехин, галова киселина и кофеин в ТЕ и КФ от зелен чай Банча

С цел изпълнението на поставените в дисертационния труд задачи е разработен селективен и надежден обратнофазов HPLC-UV метод за анализ на ЕГКГ, (+)-катехин, галова киселина и кофеин в проби от растителен произход.

❖ Приготвяне на изходни и работни стандартни разтвори на ЕГКГ, (+)-катехин, галова киселина и кофеин

- Изходните стандартни разтвори на ЕГКГ, (+)-катехин и кофеин се приготвят чрез разтваряне на 50.0 mg от съответните стандартни субстанции в 50.0 mL двойно дестилирана вода. Изходният стандартен разтвор на галовата киселина е приготвен чрез разтваряне на 50.0 mg галова киселина в 50.0 mL метанол, поради ниската ѝ разтворимост във вода.
- Работните стандартни разтвори се получават след последователно разреждане на съответните изходни разтвори с използвания разтворител до получаване на концентрации от 1.0, 10.0, 50.0, 100.0, 150.0 и 200.0 µg/mL за всеки анализ.

Всички стандартни разтвори се приготвят непосредствено преди анализа и се съхраняват в колби от тъмно стъкло при температура 4 °C.

❖ Хроматографски условия

HPLC анализът е извършен с течнохроматографска система Thermo Scientific UltiMate 3000 Analytical LC System. Анализите са разделени на аналитична колона Hypersil GOLD aQ C18 (150.0 x 4.6 mm, 5 µm, Thermo Scientific™), защитена с предколона Hypersil GOLD aQ C18

(10.0 x 4.0 mm, 5 µm, Thermo Scientific™). Подвижната фаза се състои от ацетонитрил/ оцетна киселина/ би-дестилирана вода в съотношение 8:1:91 v/v/v. Елуирането е извършено в изократичен режим със скорост на потока 1.2 mL/min. Обемът на инжектиране е 20.0 µL и дължината на вълната на UV детектора е настроена на 275 nm. Температурата на хроматографската колона и на инжектора се поддържа 20 °C. Общото времетраене на анализа е 25 минути. Системният контрол, събирането на данни и анализът са извършени с помощта на софтуера Thermo Scientific™ Chromeleon™ 7.2 Chromatography Data System.

❖ **Количествено определяне на епигалокатехин-3-галат, (+)-катехин, галова киселина и кофеин в приготвените стандартни разтвори**

Всеки от приготвените стандартни работни разтвори на четирите изследвани вещества (с концентрации в диапазона от 1.0 до 200.0 µg/mL) се анализира шест пъти за конструиране на калибровъчни криви и оценка на линейността на предложения метод. Калибрационните криви се построяват на базата на съотношението между площта и височината на пика от хроматограмите на изследваните стандартни разтвори за всеки аналит. Калибровъчните криви са построени чрез линеен регресионен анализ по метода на най-малките квадрати.

❖ **Валидиране на течнoхроматографския метод**

Получените резултати от качествения и количествения анализ на приготвените работни разтвори на ЕГКГ, (+)-катехин, галова киселина и кофеин се използват за валидиране на течнoхроматографския метод. HPLC-UV методът е валидиран съгласно препоръките на Международната конференция по хармонизация (ICH) Q2(R1) за валидиране на аналитичните процедури: текст и методология [384].

❖ **Пробоподготовка**

Тестовите разтвори на ТЕ и КФ се приготвят поотделно след предварително претегляне на 50.0 mg от всяка субстанция. Претеглените количества се прехвърлят в различни колби от тъмно стъкло с обем от 50.0 mL и се разреждат с двойно дестилирана вода до маркировката. Получените водни разтвори са с крайна концентрация от 1.0 mg/mL. След дегазиране и хомогенизиране в ултразвукова вана в продължение на 10 минути (Advantage Lab, Белгия) всички проби се центрофугират в продължение на 5 минути при 5000 x g (Ohaus, Швейцария). Шест аликвоти от 20.0 µL от всяка проба се инжектират в HPLC системата.

❖ **Качествено и количествено определяне на епигалокатехин-3-галат, (+)-катехин, галова киселина и кофеин в тестовите разтвори на ТЕ и КФ**

Идентификацията на ЕГКГ, (+)-катехин, галова киселина и кофеин се извършва според ултравиолетовия (UV) спектър на поглъщане и времето на задържане на всяко вещество от хроматограмите на стандартните разтвори. Количественият анализ се извършва по метода на абсолютната калибровка на база на построените калибровъчни криви.

2.2.2. Течнoхроматографски метод за качествено и количествено определяне на метилксантини (кофеин, теофилин, теобромин) в МФ от зелен чай Банча

Течнoхроматографският метод за анализ на метилксантини е разработен и валидиран при предишно проучване в Катедрата по Фармакология, токсикология и фармакотерапия и е приложен за анализ на изолираната метилксантинова фракция, използвана за целите на дисертационния труд [113]. Повторно са приготвени и анализирани стандартни разтвори на

кофеин, теофилин и теобромин преди да бъде извършен анализът на метилксантиновата фракция.

❖ **Приготвяне на стандартни изходни и работни разтвори на кофеин, теофилин и теобромин**

- За приготвяне на стандартните разтвори на кофеин, теофилин и теобромин се използва двойно дестилирана вода с рН 8, която е получена чрез прибавяне на 250.0 µl прясно приготвен разтвор на 0.1M NaOH към 500.0 ml двойно дестилирана и филтрирана вода. Стойността на рН на разтвора е отчетена посредством рН-метър. Стандартните изходни разтвори на кофеин (1.0 mg/mL крайна концентрация) и теофилин (1.0 mg/mL крайна концентрация) се приготвят отделно чрез точно претегляне на 50.0 mg от всяко стандартно вещество и последващо разтваряне в 50.0 mL гореща, двойно дестилирана вода (~ 60 °C) с рН 8. Стандартният изходен разтвор на теобромин се приготвя чрез разтваряне на 10.0 mg теобромин в 100.0 mL гореща, двойно дестилирана вода (~ 60 °C) с рН 8 (0.1 mg/mL крайна концентрация).
- Стандартните работни разтвори се приготвят чрез серийни разреждания на всеки стандартен изходен разтвор с би-дестилирана вода за получаване на концентрации в диапазона от 1.0 – 750.0 µg/mL. Всички изходни и работни стандартни разтвори са прясно приготвени непосредствено преди анализа.

❖ **Хроматографски условия**

HPLC анализът е проведен с течнохроматографска система Thermo Scientific UltiMate 3000, оборудвана с променлив UV/Vis детектор. HPLC разделянето се извършва на аналитична колона (Thermo Scientific AQUASIL C18, 150.0 mm × 4.6 mm, 5 µm), защитена от предколونا AQUASIL C18 (10.0 mm × 4.6 mm, 5 µm) със скорост на потока 0.8 mL/min и UV детекция при 274 nm. Обемът на инжектиране е 20.0 µL. Мобилната фаза представлява смес от двойно дестилирана и филтрирана вода с ацетонитрил в съотношение 90:10%, v/v. Анализът е осъществен в изократичен режим с общо времетраене от 12 минути. Температурата на колоната се поддържа 30 °C. Анализът на данните е извършен с помощта на софтуера Thermo Scientific® Chromeleon® 7.2 Chromatography Data System.

❖ **Валидиране на течнохроматографския метод**

HPLC-UV методът е валидиран при неговото разработване съгласно указанията на Международната конференция по хармонизация (ICH) Q2(R1) за валидиране на аналитичните процедури: текст и методология [384]. За всяка стандартна субстанция (кофеин, теофилин и теобромин) е конструирана калибровъчна крива, чрез използване на работни стандартни разтвори с осем различни концентрации в диапазона от 1.0 до 750.0 µg/mL. Докладваният коефициент на корелация е $R^2 = 0.9995$ [113].

❖ **Пробоподготовка**

Тестовият разтвор на метилксантини, изолирани от японски зелен чай Банча се приготвя чрез точно претегляне на 25.0 mg от прахообразната метилксантинова фракция и последващо разтваряне в гореща, двойно дестилирана вода (~ 60 °C) с рН 8 до получаване на разтвор с крайна концентрация от 2.5 mg/mL. Всички проби се приготвят непосредствено преди анализа и се филтрат през мембранен филтър Sartorius RC 0.45 µm преди инжектиране в HPLC системата.

❖ **Качествено и количествено определяне на кофеин, теофилин и теобромин в изолираната МФ**

Идентификацията на кофеин, теофилин и теобромин се извършва според UV спектъра на поглъщане и времето на задържане на съединенията от хроматограмите на стандартните разтвори. Концентрациите на кофеин, теофилин и теобромин в изолираната метилксантинова фракция са изчислени от построените калибровъчни криви.

2.3. Течнохроматографски метод за качествено и количествено определяне на sildenafil в биологични проби от експериментални животни:

2.3.1. Приготвяне на изходни и работни стандартни разтвори на sildenafil

- ❖ Изходен стандартен разтвор на sildenafil (с крайна концентрация 0.05 mg/mL) се приготвя чрез прецизно претегляне на 7.0 mg sildenafil citrate (стандартна субстанция), еквивалентен на 5.0 mg sildenafil (140.45 mg sildenafil citrate са еквивалентни на 100.0 mg sildenafil) и последващо разтваряне в 100.0 mL метанол [359].
- ❖ Работни стандартни разтвори се приготвят чрез серийно разреждане на изходния стандартен разтвор с метанол до получаване на концентрационни нива в диапазона от 5.0 до 100.0 ng/mL.

Всички изходни и работни стандартни разтвори са прясно приготвени непосредствено преди анализа и се съхраняват в хладилник при температура 4 °C.

2.3.2. Хроматографски условия

HPLC анализът е извършен на аналитична колона Thermo science AQUASIL C18 (150.0 mm x 4.6 mm, 5.0 µm), защитена от предколона AQUASIL C18 (10.0 mm x 4.6 mm, 5.0 µm) със скорост на потока 0.6 ml/min и UV детекция при дължина на вълната 228 nm. Обемът на инжектиране е 20.0 µL. Разделянето се извършва в изократичен режим с подвижна фаза, смес от метанол и двойно дестилирана и филтрирана вода в съотношение 85:15%, v/v. Температурата на хроматографската колона и на автоматичния инжектор се поддържа 25 °C. Общото времетраене на анализа е 10 минути. Системният контрол, събирането на данни и последващият анализ са извършени с помощта на софтуера Thermo Scientific™ Chromeleon™ 7.2 Chromatography Data System.

2.3.3. Количествено определяне на sildenafil в приготвените стандартни разтвори

Концентрацията на sildenafil се изчислява от калибровъчната крива по метода на външна стандартизация. Калибровъчната крива е изградена чрез шесткратен анализ на стандартни разтвори на sildenafil при десет различни концентрации в диапазона от 5.0 до 100.0 ng/mL.

2.3.4. Валидиране на течнохроматографския метод

Резултатите от качествения и количествения анализ на приготвените работни разтвори на sildenafil служат за валидиране на течнохроматографския метод. HPLC методът е валидиран съгласно препоръките на Международната конференция по хармонизация (ICH) Q2(R1) за валидиране на аналитичните процедури: текст и методология [384].

2.3.5. Пробоподготовка

- ❖ Използват се плазмени проби от нетретирани плъхове (т.нар. празни плазмени проби), към които се привнасят предварително приготвени работни стандартни разтвори на sildenafil с концентрации в диапазона от 5.0 до 100.0 ng/mL. Всяка от пробите се приготвя чрез прибавяне на 100.0 µL стандартен разтвор на sildenafil с различна концентрация към 100.0 µL плъша плазма. Всички проби се хомогенизират на вортекс-миксер при 6000 rpm в продължение на 30 секунди. Така приготвените плазмени проби се подлагат на последваща процедура за извличане на привнесеня аналит.
- ❖ За екстрахиране на sildenafil от плазмени проби е използвана техниката на протеинна преципитация. Аликвоти от 100.0 µL плазма се поставят отделно в стъклени епруветки с обем в 10.0 mL и винтова капачка. След това всяка от тях се третира с 1.0 mL от преципитиращия агент (метанол) и се разбърква на вортекс миксер при 6000 x g за 30 секунди. Получените утайки се втвърдяват чрез центрофугиране при 5000 x g в продължение на 5 минути. Впоследствие, всеки супернатант се прехвърля в чиста стъклена епруветка с обем 10.0 mL и винтова капачка. Към всяка от утайките се добавя по 300.0 µL метанол. След това последните се разбъркват отново при 6000 x g в продължение на 30 секунди и се центрофугират при 5000 x g за 5 минути. Вторият супернатант се комбинира с първия и получените проби се изпаряват до сух остатък под азотен поток при температура 40 °C. Сухите остатъци се разтварят в 200.0 µL двойно дестилирана вода, разбъркват се на вортекс-миксер в продължение на 30 секунди и се центрофугират при 5000 x g за 5 минути. След това 20.0 µL от всеки супернатант се инжектира в HPLC-UV системата.

2.3.6. Качествено и количествено определяне на sildenafil в биологични проби

Качественият анализ на sildenafil в плазмените проби се извършва според UV спектъра на поглъщане и времето на задържане на аналита от хроматограмите на стандартните разтвори. Определянето на количественото съдържание на sildenafil в изследваните плазмени проби се извършва въз основа на построената калибрационна крива.

2.4. Фармакокинетични проучвания при опитни животни

За оценка на фармакокинетиката на sildenafil при плъхове при едновременно приложение с ТЕ, КФ и МФ от японски зелен чай Банча са проведени два отделни експеримента. При първия експеримент sildenafil се прилага след едноседмично претретирание на животните с цялостен екстракт, катехинова и метилксантинова фракция, изолирани от посочения вид зелен чай. Във втория експеримент, sildenafil се прилага след еднократен прием на изолираната метилксантинова фракция.

Експериментите с опитни животни са проведени в съответствие с националните (Наредба № 20 от 01.11.2012 г. за минималните изисквания за защита и хуманно отношение към опитните животни и изискванията към обектите за използването, отглеждането и/или доставката им) и международни изисквания за защита и хуманно отношение към лабораторните животни, определени с Директива 2010/63/EU на Европейския парламент и на Съвета от 22 септември 2010 година относно защитата на животните, използвани за научни цели. Извършените експериментални процедури са одобрени и от Българската агенция по безопасност на храните към Министерство на земеделието (разрешително с регистрационен № 175 валидно до 15.09.2022 г.).

2.4.1. Определяне на големината на дозата на всяка от използваните субстанции

Изборът на дозата, която да бъде приложена за всяко от използваните вещества (sildenafil, ketoconazole, ТЕ, КФ, МФ) в двата експеримента е направен въз основа на проучване на литературата относно използваните дози на sildenafil, ketoconazole, екстракт от зелен чай, ЕГКГ и кофеин при предклинични опити, а за някои от субстанциите е използвана и формулата за изчисляване на човешката еквивалентна доза (ЧЕД), която има следния вид:

$$\text{ЧЕД (mg/kg)} = \text{ДПЕЖ (mg/kg)} \times (\text{ТТЕЖ (kg)} \div \text{ТТЧ (kg)})^{0.33},$$

където:

ЧЕД – човешка еквивалентна доза (mg/kg)

ДПЕЖ – доза, приложена при експерименталното животно (mg/kg)

ТТЕЖ – телесно тегло на експерименталното животно (kg)

ТТЧ – телесно тегло на човек (kg) [390].

Дозите на всички използвани субстанции в двата експеримента са изчислени в mg/kg телесно тегло (т. т.).

- Определяне на дозата на sildenafil в двата експеримента

При първия експеримент, който има за цел да оцени влиянието на многократния прием на ТЕ, КФ и МФ от зелен чай Банча върху фармакокинетичните параметри на sildenafil при плъхове е избрана доза на sildenafil, равна на 2.5 mg/kg. Изборът е направен на база на данни от литературата за проведени фармакокинетични опити при плъхове, както и чрез използване на формулата за изчисляване на ЧЕД. Във формулата бяха заместени следните стойности:

$$\text{ДПЕЖ} = 2.5 \text{ mg/kg}$$

$$\text{ТТЕЖ} = 250.0 \text{ mg (0.250 kg)}$$

$$\text{ТТЧ} = 70.0 \text{ kg,}$$

при което се получава:

$$\text{ЧЕД}_{\text{SILDENAFIL}} \text{ (mg/kg)} = 2.5 \text{ (mg/kg)} \times [0.250 \text{ (kg)} \div 70 \text{ (kg)}]^{0.33}$$

$$\text{ЧЕД}_{\text{SILDENAFIL}} \text{ (mg/kg)} = 2.5 \text{ (mg/kg)} \times 0.1558$$

$$\text{ЧЕД}_{\text{SILDENAFIL}} \text{ (mg/kg)} = 0.39 \text{ mg/kg (т. т.)}$$

Следователно, еднократна доза sildenafil от 2.5 mg/kg при плъхове е еквивалента на дозата от 0.39 mg/kg или около 27.0 mg при хора (за пациент с тегло 70.0 kg).

Във втория експеримент е приложена дозата от 60.0 mg/kg sildenafil, въз основа на проучената литература, както и на токсикологични изследвания. Това е най-високата доза sildenafil, приложена перорално при плъхове, която не води до токсични ефекти [4].

- Определяне на дозата на ketoconazole

При двата опита е използвана дозата от 10.0 mg/kg кетоконазол. Той е използван като положителна контрола в проучванията, поради добре познатият му инхибиращ ефект върху активността на цитохромите [355].

- Определяне на дозите на ТЕ, КФ и МФ от зелен чай Банча

Използваните дози на цялостния екстракт от зелен чай Банча (100.0 mg/kg) и на катехините (30.0 mg/kg) са подбрани след внимателно проучване на научната литература относно прилаганите дози на екстракт от зелен чай и ЕГКГ в експериментални изследвания при плъхове [58, 76, 196]. В допълнение са изчислени ЧЕД на ЕГКГ и кофеин след прилагане

на 100.0 mg/kg ТЕ и 30.0 mg/kg КФ от Банча при плъхове. След извършване на необходимите изчисления, получаваме че 100.0 mg/kg ТЕ осигуряват 4.12 mg/kg ЕГКГ и 4.19 mg/kg кофеин, докато 30.0 mg/kg от КФ са еквивалентни на 5.0 mg/kg ЕГКГ и 0.8 mg/kg кофеин. Следователно, след заместване във формулата за изчисляване на ЧЕД се получава:

❖ За ТЕ от зелен чай Банча

$$\text{ЧЕД}_{\text{ЕГКГ}} (\text{mg/kg}) = 4.12 (\text{mg/kg}) \times [0.250 (\text{kg}) \div 70 (\text{kg})]^{0.33}$$

$$\text{ЧЕД}_{\text{ЕГКГ}} (\text{mg/kg}) = 4.12 (\text{mg/kg}) \times 0.1558$$

$$\text{ЧЕД}_{\text{ЕГКГ}} (\text{mg/kg}) = 0.64 \text{ mg/kg}$$

$$\text{ЧЕД}_{\text{КОФЕИН}} (\text{mg/kg}) = 4.19 (\text{mg/kg}) \times [0.250 (\text{kg}) \div 70 (\text{kg})]^{0.33}$$

$$\text{ЧЕД}_{\text{КОФЕИН}} (\text{mg/kg}) = 4.19 (\text{mg/kg}) \times 0.1558$$

$$\text{ЧЕД}_{\text{КОФЕИН}} (\text{mg/kg}) = 0.65 \text{ mg/kg}$$

❖ За КФ от зелен чай Банча

$$\text{ЧЕД}_{\text{ЕГКГ}} (\text{mg/kg}) = 5.0 (\text{mg/kg}) \times [0.250 (\text{kg}) \div 70 (\text{kg})]^{0.33}$$

$$\text{ЧЕД}_{\text{ЕГКГ}} (\text{mg/kg}) = 5.0 (\text{mg/kg}) \times 0.1558$$

$$\text{ЧЕД}_{\text{ЕГКГ}} (\text{mg/kg}) = 0.78 \text{ mg/kg}$$

$$\text{ЧЕД}_{\text{КОФЕИН}} (\text{mg/kg}) = 0.8 (\text{mg/kg}) \times [0.250 (\text{kg}) \div 70 (\text{kg})]^{0.33}$$

$$\text{ЧЕД}_{\text{КОФЕИН}} (\text{mg/kg}) = 0.8 (\text{mg/kg}) \times 0.1558$$

$$\text{ЧЕД}_{\text{КОФЕИН}} (\text{mg/kg}) = 0.1311 \text{ mg/kg}$$

На база на получените резултати можем да обобщим, че количеството ЕГКГ и кофеин, което плъховете получават след прием на 100.0 mg/kg ТЕ от Банча се равнява на ЧЕД от ~ 45.0 mg ЕГКГ и ~ 46.0 mg кофеин. Такива количества ЕГКГ и кофеин могат да се приемат с чаша чай, приготвен в домашни условия. Количеството ЕГКГ и кофеин след прием на 30.0 mg/kg КФ при плъхове е еквивалентно на ЧЕД от ~ 54.0 mg ЕГКГ и 8.7 mg кофеин.

Дозата на метилксантиновата фракция (5.7 mg/kg) е избрана след преглед на литературата относно използваните дози на кофеин при плъхове, тъй като кофеинът е основният компонент в изолираната фракция. Едновременно с това е използвана и формулата за изчисляване на ЧЕД. Приложената метилксантинова фракция в доза 5.7 mg/kg е еквивалентна на кофеин в доза 5.0 mg/kg. Съгласно формулата за изчисляване на ЧЕД, след заместване се получава:

$$\text{ЧЕД}_{\text{КОФЕИН}} (\text{mg/kg}) = 5.0 (\text{mg/kg}) \times [0.250 (\text{kg}) \div 70 (\text{kg})]^{0.33}$$

$$\text{ЧЕД}_{\text{КОФЕИН}} (\text{mg/kg}) = 5.0 (\text{mg/kg}) \times 0.1558$$

$$\text{ЧЕД}_{\text{КОФЕИН}} (\text{mg/kg}) = 0.78 \text{ mg/kg}$$

Следователно, еднократната доза кофеин, която плъховете получават след прием на 5.7 mg/kg МФ се равнява на еднократна доза от 0.78 mg/kg кофеин при човек или приблизително 54.0 mg кофеин (за човек с тегло 70 kg). При двата експеримента е използвана една и съща доза от метилксантиновата фракция.

2.4.2. Приготвяне на разтвори/суспензии за перорално приложение при опитните животни

Всички използвани вещества са разтворени или суспендирани преди приложението им при експерименталните животни. Под форма на суспензии се прилагат sildenafil и

ketoconazole, докато растителните извлеци се разтварят във вода. При първия опит, ТЕ, КФ и МФ, изолирани от чаени листа Банча се прилагат два пъти дневно в продължение на 7 дни преди приема на sildenafil. За целта на експеримента разтворите на използваните растителни субстанции се приготвят всеки ден непосредствено преди първия прием за деня, в количество, необходимо за третиранията през целия ден. През деня разтворите се съхраняват в хладилник при температура 4 °C и се темперират преди следващото прилагане при животните. Суспензиите, съдържащи sildenafil и ketoconazole са пряко приготвени непосредствено преди прилагането им при плъховете. Във втория експеримент на животните се дава еднократна доза от МФ, чиито воден разтвор също се приготвя непосредствено преди прилагането му.

Всички разтвори/суспензии на използваните вещества са прилагани на експерименталните животни в количество, изчислено според телесното им тегло, така че всички животни да получат една и съща доза в mg/kg т. т. от съответното лекарство и/или растителна субстанция.

❖ **Приготвяне на суспензии, съдържащи sildenafil**

За приготвяне на суспензии за всеки един от експериментите, първоначално се приготвя 1%-ен воден разтвор на натриева карбоксиметил целулоза чрез разтваряне на 2.0 g натриева карбоксиметил целулоза в 200.0 mL би-дестилирана вода. След приготвяне разтворът се съхранява в хладилник за няколко часа до получаване на вискозен разтвор, след което се използва за приготвяне на суспензии за третиране на опитните животни.

- Първи опит – оценка на влиянието на многократното приложение на ТЕ, КФ и МФ от зелен чай Банча

В определено количество от получения 1%-ен разтвор на натриева карбоксиметил целулоза се суспендира предварително претегленият sildenafil citrate (стандартна субстанция) до получаване на суспензия с концентрация на sildenafil 0.625 mg/mL. От получената суспензия всяко животно получава количество, еквивалентно на 2.5 mg/kg (т. т.) sildenafil (около 1.0 mL).

- Втори опит – оценка на влиянието на еднократното приложение на МФ от зелен чай Банча

В определено количество от получения 1%-ен разтвор на натриева карбоксиметил целулоза се суспендира предварително претегленият sildenafil citrate (стандартна субстанция) до получаване на суспензия с концентрация на sildenafil 15.0 mg/mL. От получената суспензия на всяко експериментално животно се прилага количество, еквивалентно на 60.0 mg/kg (т. т.) sildenafil (около 1.0 mL).

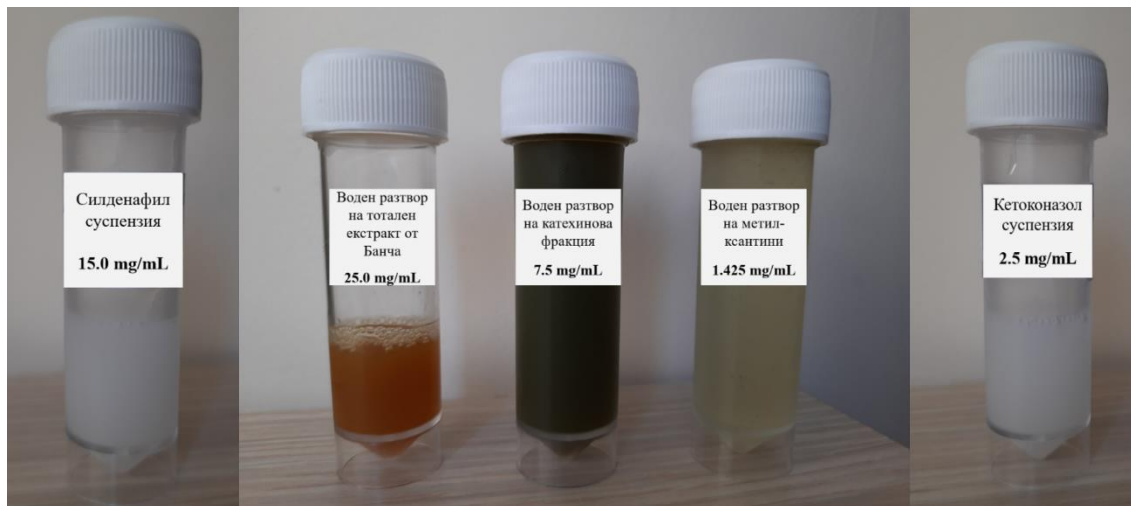
Приготвените суспензии имат бял цвят и изглеждат по сходен начин. Снимка на суспензия, съдържаща sildenafil (15.0 mg/mL) е показана на фигура 5.

❖ **Приготвяне на суспензия, съдържаща ketoconazole**

Предварително претегленият ketoconazole (стандартна субстанция) се суспендира в определено количество 1%-ен разтвор на натриева карбоксиметилцелулоза до получаване на суспензия с крайна концентрация на ketoconazole от 2.5 mg/mL. На всяко животно се прилага определено количество от така приготвената суспензия, което осигурява дозата от 10.0 mg/kg (т. т.) ketoconazole. На фигура 5 е представена снимка на приготвената суспензия. При двата опита се приготвя суспензия на кетоконазол по описания метод.

❖ Приготвяне на водни разтвори на ТЕ, КФ и МФ от зелен чай Банча

Предварително претеглените сухи субстанции от ТЕ и КФ се разтварят в двойно дестилирана вода с температура ~ 30 °С и последващо хомогенизиране на вортекс-миксер при 6000 x g в продължение на 30 секунди. МФ се разтваря в гореща двойно дестилирана вода с температура ~ 60 °С. Получените водни разтвори са с крайна концентрация от 25.0 mg/mL за ТЕ от зелен чай Банча, 7.5 mg/mL за КФ и 1.425 mg/mL за МФ. След приготвяне се получават разтвори с характерен цвят – червено-кафяв за тоталния екстракт, тъмно зелен за катехиновата фракция и бледо зелен за метилксантиновата фракция. Представителни снимки на получените водни разтвори са представени на фигура 5.



Фигура 5. Снимки на приготвените суспензии на sildenafil (15.0 mg/mL) и ketoconazole (2.5 mg/mL) в 1%-ен воден разтвор на натриева карбоксиметилцелулоза и на водните разтвори на ТЕ, КФ и МФ, използвани за третиране на експерименталните животни.

При двата експеримента, преди прилагането на sildenafil животните са оставени без храна за една нощ (около 12 часа), но със свободен достъп до чиста питейна вода. Приготвените разтвори и суспензии се прилагат чрез оро-гастрална сонда за гризачи. На фигура 6 са представени снимки, показващи как е извършено сондирането на опитните животни.



Фигура 6. Снимки на опитни животни, които са третирани с изследваните субстанции по време на фармакокинетичните проучвания.

2.4.3. Проучване на фармакокинетиката на sildenafil след многократно приложение на ТЕ, КФ и МФ от зелен чай Банча

Всички експериментални процедури се извършват два пъти дневно в интервалите между 8 и 10 часа сутринта и между 16 и 17 часа след обяд. Плъховете са разделени на случаен принцип в пет групи (по 24 животни във всяка група ($n = 24$), от които по 6 животни на времева точка, за да се осигури статистическа значимост на получените резултати):

- Група 1 (контролна група) – всеки плъх получава по 1.0 mL физиологичен разтвор два пъти дневно в продължение на 7 последователни дни. На 8-ия ден сутринта всички животни получават по 1.0 mL физиологичен разтвор и определено количество sildenafil, еквивалентно на доза 2.5 mg/kg (около 1.0 mL от приготвената суспензия), 30 минути след приложението на физиологичен разтвор.
- Група 2 (положителна контролна група) – всяко животно получава по 1.0 mL физиологичен разтвор два пъти дневно в продължение на 7 последователни дни. На 8-ия ден сутринта всички получават 10.0 mg/kg ketoconazole (около 1.0 mL от приготвената суспензия) и 2.5 mg/kg sildenafil, 30 минути след приложението на ketoconazole.
- Група 3 (тотален екстракт от зелен чай) – всеки плъх получава по 100.0 mg/kg воден разтвор на ТЕ от зелен чай Банча два пъти дневно (по около 1.0 mL на всеки прием) в продължение на 7 последователни дни. На 8-мия ден сутринта всички животни получават по 100.0 mg/kg воден разтвор от екстракта, а 30 минути по-късно получават и по 2.5 mg/kg sildenafil.
- Група 4 (катехинова фракция) – всеки плъх получава определено количество от водния разтвор на КФ, еквивалентно на доза от 30.0 mg/kg два пъти дневно (по около 1.0 mL на всеки прием) в продължение на 7 последователни дни. На 8-мия ден сутринта всички животни получават по 30.0 mg/kg катехини и по 2.5 mg/kg sildenafil, 30 минути след приложението на КФ.
- Група 5 (метилксантинова фракция) – всяко животно получава по 5.7 mg/kg воден разтвор на МФ два пъти дневно (по около 1.0 mL на всеки прием) в продължение на 7 последователни дни. На 8-мия ден сутринта всички плъхове получават по 5.7 mg/kg от водния разтвор на МФ и по 2.5 mg/kg sildenafil, 30 минути след приложението на метилксантини.

Кръвни проби са взети в следните времеви точки: 0.5, 1, 2 и 3 часа след приложението на sildenafil. Всички плъхове са евтаназирани на 8-ия ден от началото на опита след събиране на необходимите проби.

2.4.4. Проучване на фармакокинетиката на sildenafil след еднократно приложение на МФ от зелен чай Банча

Плъховете са разделени на случаен принцип в три групи ($n = 24$, от които по 6 животни на времева точка, за да се осигури статистическа значимост на получените резултати):

- Група 1 (контролна група) – всеки плъх получава определено количество от прясно приготвената суспензия на sildenafil, еквивалентно на 60.0 mg/kg (около 1.0 mL от приготвената суспензия).
- Група 2 (положителна контролна група) – всеки плъх получава по 10.0 mg/kg ketoconazole (около 1.0 mL от приготвената суспензия) и по 60.0 mg/kg sildenafil, 30 минути след приема на ketoconazole.

- Група 3 (метилксантинова фракция) – всяко животно получава по 5.7 mg/kg воден разтвор от екстрахираната МФ (около 1.0 mL) и по 60.0 mg/kg sildenafil, 30 минути след приема на метилксантини.

Всички вещества са приложени еднократно, перорално. Взети са кръвни проби в следните времеви точки: 0.5, 1, 3 и 6 часа след приложението на sildenafil, след което плъховете са евтаназирани.

2.4.5. Пробовземане и пробообработка

В края на двата експеримента е събрана кръв от подезичната вена на всяко животно. Тази техника за събиране на кръв е избрана, поради това, че е лесна за изпълнение и е по-малко стресираща за животните [134]. Кръвта се взема в точно определени времеви точки за определяне на профила плазмена концентрация-време на sildenafil. Кръвните проби от всяко опитно животно се събират поотделно във вакутейнери с антикоагулант EDTA.K3, предназначени за отделяне на плазма. След събиране на необходимото количество кръв, незабавно се отстраняват черният дроб и бъбреците на всички плъхове и се промиват с ледено студен физиологичен разтвор. Органите се отделят за последващ анализ на концентрацията на sildenafil в тъканите и се замразяват при $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Кръвните проби се центрофугират при 5000 x g за 5 минути при стайна температура, след което плазмата се отделя и се замразява незабавно при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Всички плъхове са евтаназирани чрез цервикална дислокация под анестезия с диетилов етер. Определените хуманни крайни точки не са достигнати в нито един от проведените експерименти.

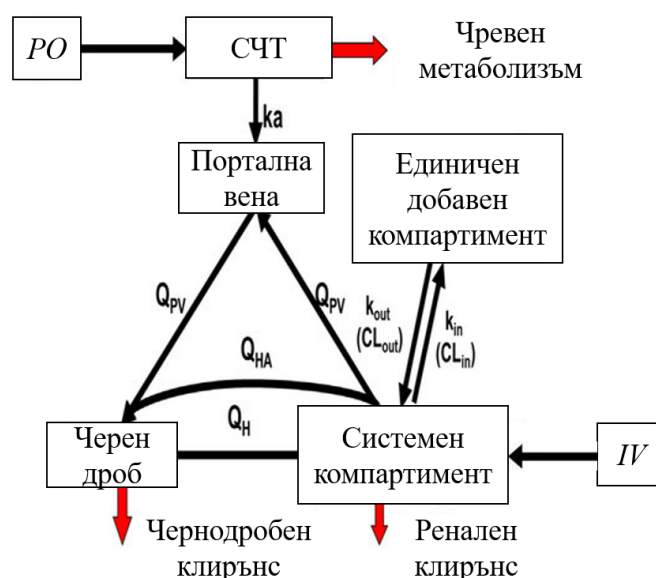
2.4.6. Фармакокинетичен анализ

Профилите плазмена концентрация–време на sildenafil са анализирани чрез некомпартиментен анализ с помощта на програмата PKSolver, версия 2.0 (свободно достъпна програма като добавка за Microsoft Excel) [367]. Изчислени са следните фармакокинетични параметри: максимална плазмена концентрация (C_{\max}), време за достигане на максималната плазмена концентрация (T_{\max}), площ под кривата от време нула до последната измерена концентрация (AUC_{0-t}), площ под кривата от време нула до безкрайност (AUC_{0-inf}), привиден обем на разпределение (V_z/F) и привиден клирънс (Cl/F). Стойностите на C_{\max} и T_{\max} са получени директно от кривите плазмена концентрация–време. Стойностите на AUC_{0-t} и AUC_{0-inf} са определени чрез линейния трапецовиден метод за измерените стойности и чрез последващо екстраполиране до безкрайност за изчисляване на AUC_{0-inf} .

2.5. ФБФК модели за предсказване на потенциални взаимодействия между sildenafil и ТЕ, КФ и МФ от зелен чай Банча при хора

За симулациите, описани в настоящия дисертационен труд е предпочетено изследване върху виртуална популация от здрави доброволци, мъже на възраст от 60 до 65 години (10 групи по 10 човека).

За целите на изследването са използвани механистично-статичен и механистично-динамичен ФБФК модел. При последният е приложен минимален ФБФК модел с единичен добавен компартимент, както е илюстрирано на фигура 7.



Фигура 7. Минимален ФБФК модел с единичен добавен компартимент. Q_H , Q_{PV} и Q_{HA} са кръвни потоци съответно в черния дроб, порталната вена и чернодробната артерия; k_{in} и k_{out} са скоростни константи от първи ред; IV и PO са съответно интравенозни и орални пътища на приложение; k_a е скоростна константа на абсорбция от първи ред.

За изготвяне на ФБФК модели на изолираните катехинова и метилксантинова фракция от зелен чай Банча, ние се ръководихме от това, че основните доказани от нас компоненти в тях са съответно ЕГКГ в КФ и кофеин в МФ. Поради това, са направени предположения, че фармакокинетичното поведение на тези фракции би било подобно на техните основни компоненти. За ЕКГК е използвана наличната информация за физикохимичните и фармакокинетичните свойства в световната база данни, докато за кофеин са използвани данните, налични в софтуерната програма и определената от нас в предишни изследвания инхибиторна константа върху СУР3А4. Данните за изграждане на моделите на КФ и МФ са представени съответно в таблица 6 и 7. За прогнозиране на потенциални взаимодействия са използвани необходимите фармакокинетични параметри на sildenafil (лекарство субстрат на ензима СУР3А4), налични в програмата. За положителна контрола е използван класическият инхибитор на СУР3А4 – ketoconazole (също наличен в базата данни на софтуера).

Таблица 6. Физико-химични и фармакокинетични параметри, използвани за изграждане на ФБФК модел при катехиновата фракция.

Параметри	КФ	Референция/Коментар
MW – молекулно тегло	458.4	PubChem/ За изготвяне на модела е прието, че стойността е същата като тази на ЕКГК
LogP – логаритмична стойност на октанол/вода разпределителния коефициент	1.98	Стойност, предсказана от структурата [179]/ За изготвяне на модела е прието, че стойността е същата като тази на ЕКГК
pKa	7.75	Стойност, предсказана от софтуер [179]/ За изготвяне на модела е прието, че стойността е същата като тази на ЕКГК
f_{u,p} – фракция, несвързана в плазмата	0.14	Стойност, предсказана от софтуера, на база QSAR/ За изготвяне на модела е прието, че стойността е същата като тази на ЕКГК
V/P – разпределение кръв/плазма	0.91	Стойност, предсказана чрез <i>in silico</i> методи [263]/ За изготвяне на модела е прието, че стойността е същата като тази на ЕКГК

fa – фракция, абсорбирана от СЧТ	0.2	Стойност, определена при приложение върху хора [40]/ За изготвяне на модела е прието, че стойността е същата като тази на ЕГКГ
Vss – обем на разпределение в стационарно състояние (L/kg)	0.70	Стойност, предсказана от софтуера/ За изготвяне на модела е прието, че стойността е същата като тази на ЕГКГ
CLp.o. – перорален клирънс (L/h)	44.62	Параметър, определен от Zhu и съавт. при плъхове и преизчислен при хора [372, 373]/ За изготвяне на модела е прието, че стойността е същата като тази на ЕГКГ
CLr – ренален клирънс (L/h)	0.04	Параметър, определен от Zhu и съавт. при плъхове и преизчислен при хора [372, 373]/ За изготвяне на модела е прието, че стойността е същата като тази на ЕГКГ
Ki – стойност на инхибиция на CYP3A4 (μM)	13	Инхибиране на човешки CYPs от ЕГКГ, определено чрез окисляване на класически субстрати [238]/ За изготвяне на модела е прието, че стойностите са същите като тези на ЕГКГ
Ki – стойност на инхибиция на CYP1A2 (μM)	9.5	
Ki – стойност на инхибиция на CYP2C9 (μM)	18	

Таблица 7. Физико-химични и фармакокинетични параметри, използвани за изграждане на ФБФК модел при метилксантиновата фракция.

Параметри	МФ	Референция/Коментар
MW – молекулно тегло	194.194	PubChem/ За изготвяне на модела е прието, че стойността е същата като тази на кофеин
LogP – логаритмична стойност на октанол/вода разпределителния коефициент	-0,07	Стойност, предсказана от структурата/ За изготвяне на модела е прието, че стойността е същата като тази на кофеин
pKa	1.05	Стойност, предсказана от структурата/ За изготвяне на модела е прието, че стойността е същата като тази на кофеин
fu,p – фракция, несвързана в плазмата	0.68	Стойност, налична в софтуера (получена от клинични изследвания)/ За изготвяне на модела е прието, че стойността е същата като тази на кофеин
V/P – разпределение кръв/плазма	0.977	Стойност, налична в софтуера (получена от клинични изследвания)/ За изготвяне на модела е прието, че стойността е същата като тази на кофеин
fa – фракция, абсорбирана от СЧТ	1	Стойност, налична в софтуера (получена от клинични изследвания)/ За изготвяне на модела е прието, че стойността е същата като тази на кофеин
Vss – обем на разпределение в стационарно състояние (L/kg)	0.45	Параметър, калкулиран чрез подходящо изчисление/ За изготвяне на модела е прието, че стойността е същата като тази на кофеин
CLp.o. – перорален клирънс (L/h)	5.6	Параметър, калкулиран чрез подходящо изчисление/ За изготвяне на модела е прието, че стойността е същата като тази на кофеин
CLr – ренален клирънс (L/h)	0.038	Параметър, изчислен от информация за други параметри/ За изготвяне на модела е прието, че стойността е същата като тази на кофеин
Ki – стойност на инхибиция на CYP3A4 ($\mu\text{M/L}$)	3295.673	Определена с помощта на rhCYP3A4 <i>in vitro</i> / Приет е обратим конкурентен механизъм на инхибицията

2.6. Методи за статистически анализ

Статистическият анализ е извършен с помощта на GraphPad Prism, версия 9.2.0 (332). Резултатите са изразени като средна стойност \pm стандартно отклонение (SD). Статистическите сравнения между изчислените фармакокинетичните параметри за различните групи в двата експеримента са извършени с помощта на дисперсионен анализ (ANOVA), последван от тест на Dunnett. За статистически значима се приема p -стойност ≤ 0.05 (двустранен тест).

V. РЕЗУЛТАТИ

1. Изолиране на ТЕ, КФ и МФ от японски зелен чай Банча

1.1. Изолиране на тотален екстракт

Полученият тотален екстракт от японски зелен чай Банча представлява твърда стъкловидна маса с червено-кафяв цвят. Притежава сладникав аромат и е лесно разтворима в хладка вода. На фиг. 8 е представена снимка на екстракта. Полученият добив е 16.37 % (w/w).



Фигура 8. Снимка на получения цялостен екстракт от зелен чай Банча.

1.2. Изолиране на катехини

Изолираната катехинова фракция представлява твърда маса с тъмно зелен до черен цвят. Не притежава характерна миризма и се разтваря в хладка би-дестилирана вода след интензивно разклащане. Снимка на получената фракция е представена на фигура 9. Изчисленият процентен добив е 3.85 % (w/w).



Фигура 9. Снимка на изолираната катехинова фракция.

1.3. Изолиране на метилксантини

Изолираната МФ има светъл жълто-зелен цвят и специфична миризма. Разтваря се много бързо в гореща вода. На фигура 10 е представена снимка на метилксантиновата фракция. Полученият процентен добив на метилксантини е 0.95 % (w/w).



Фигура 10. Снимка на изолираната метилксантинова фракция.

2. Качествен и количествен анализ на ТЕ, КФ и МФ, изолирани от зелен чай Банча

2.1. Анализ на цялостен екстракт от Банча и на изолираната катехинова фракция

2.1.1. Валидиране на метода

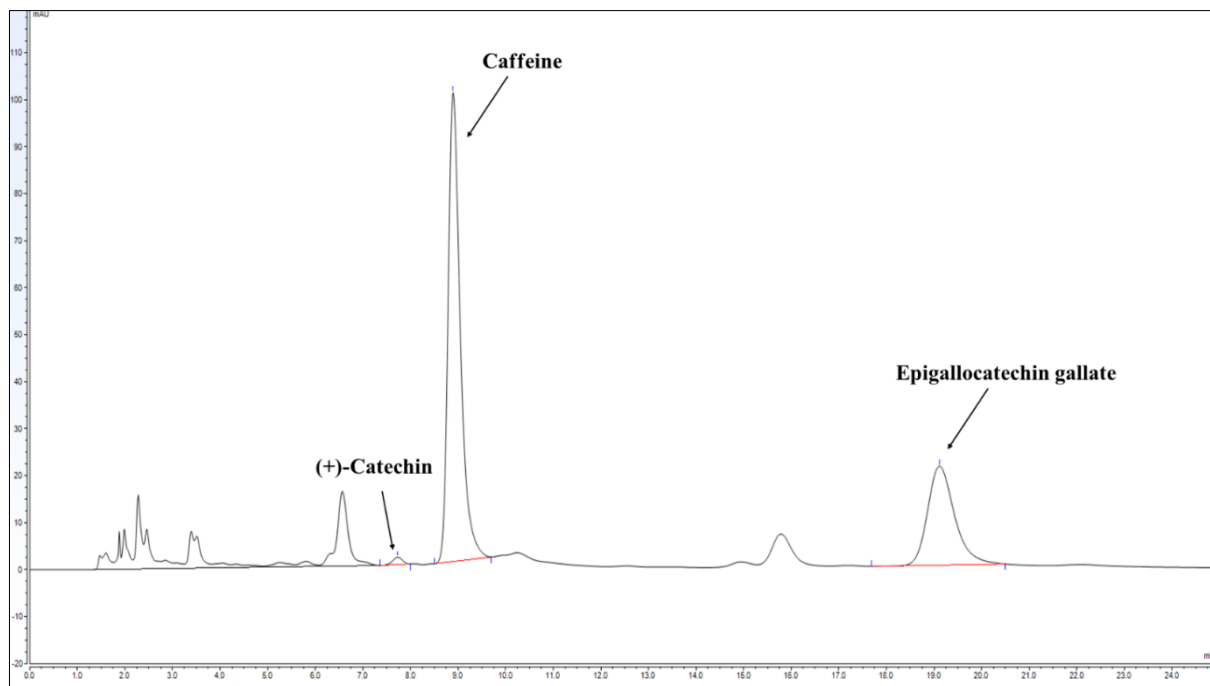
Във връзка с представения дисертационен труд е разработен и валидиран надежден HPLC-UV метод за анализ на ЕГКГ, (+)-катехин, галова киселина и кофеин. Доказана е способността на аналитичната процедура да възпроизвежда резултати, които са пряко пропорционални на количеството на изследваните стандартни субстанции. За четирите вещества е оценена линейност в диапазона от 1.0 до 200.0 $\mu\text{g/mL}$. Във всички случаи коефициентът на корелация (R^2) е по-голям или равен на 0.9998. Границите на количествено определяне (Limit of quantification, LOQ) на ЕГКГ, (+)-катехин, галова киселина и кофеин са определени чрез серийно разреждане на стандартния разтвор с най-ниска концентрация (1.0 $\mu\text{g/mL}$), участващ в конструирането на съответната калибровъчна крива. В резултат на това са установени стойности на LOQ от 0.50, 0.30, 0.03 и 0.01 $\mu\text{g/mL}$, съответно.

2.1.2. HPLC-UV анализ на цялостния екстракт и на катехиновата фракция

Разработеният метод е приложен за качествено и количествено определяне на ЕГКГ, (+)-катехин, галова киселина и кофеин в тотален екстракт от зелен чай Банча и в изолираната катехинова фракция. В тоталния екстракт се откриват еквивалентни количества ЕГКГ и кофеин и значително по-ниско количество (+)-катехин. Във времето на задържане на галовата киселина се елуират и други съединения, поради което не можем да потвърдим нейното качествено и количествено съдържание. В катехиновата фракция се откриват и четирите съединения, като в най-голямо количество е ЕГКГ, както се очакваше. Резултатите са показани в таблици 8 и 9, а хроматограмите на ТЕ и на КФ са представени съответно на фигури 11 и 12. На база на получените резултати от анализа на цялостния екстракт изчислихме, че 1.0 g изсушени чаени листа съдържа 6.86 mg кофеин, 6.74 mg ЕГКГ и 0.43 mg (+)-катехин, а съгласно анализа на КФ пресметнахме, че 1.0 g изсушени чаени листа съдържа 6.46 mg ЕГКГ, 0.78 mg (+)-катехин, 0.07 mg галова киселина и 1.03 mg кофеин.

Таблица 8. Изчислени концентрации на ЕГКГ, (+)-катехин и кофеин в изследвания воден разтвор на тотален екстракт от зелен чай Банча (1.0 mg/mL).

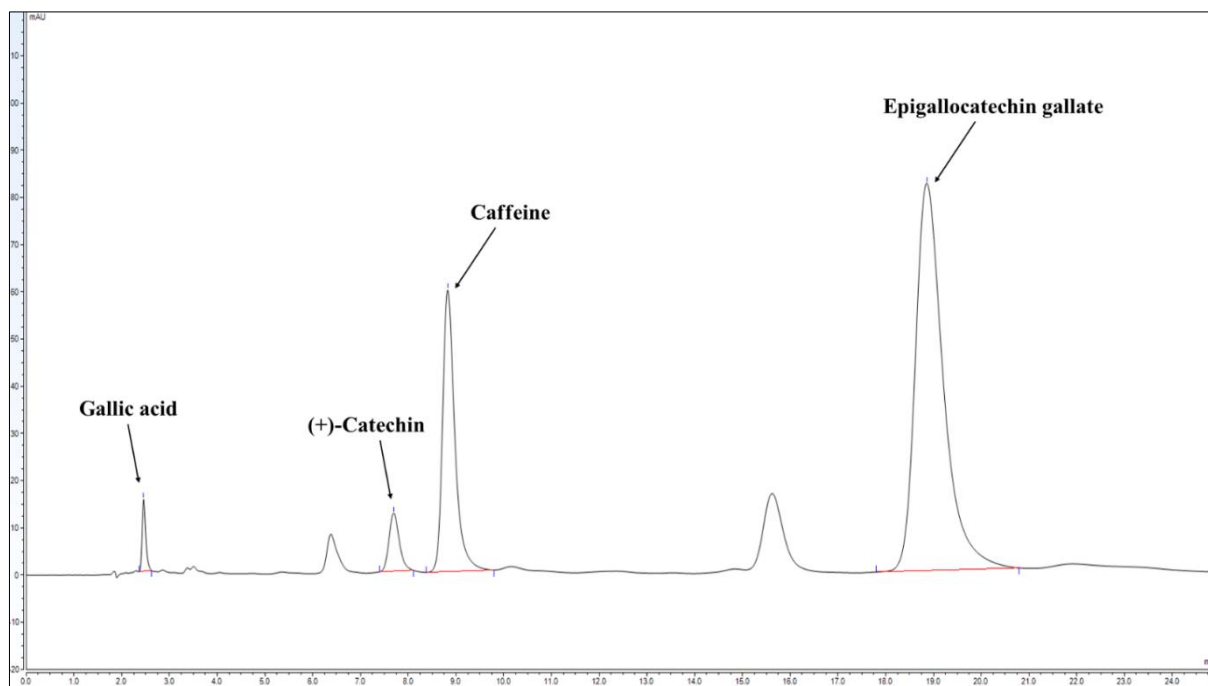
	Концентрация, $\mu\text{g/mL}$	Концентрация, % \pm SD
ЕГКГ	41.2	4.12 % \pm 0.44
(+)-катехин	2.6	0.26 % \pm 0.28
кофеин	41.9	4.19 % \pm 0.14



Фигура 11. Хроматограма на изследвания воден разтвор на ТЕ от Банча (1.0 mg/mL).

Таблица 9. Изчислени концентрации на ЕГКГ, (+)-катехин, галова киселина и кофеин в изследвания воден разтвор на КФ (1.0 mg/mL).

	Концентрация, $\mu\text{g/mL}$	Концентрация, % \pm SD
ЕГКГ	167.8	16.78 \pm 0.54
(+)-катехин	20.2	2.02 \pm 0.37
галова киселина	1.7	0.17 \pm 0.24
кофеин	26.7	2.67 \pm 0.19



Фигура 12. Хроматограма на проба от КФ (1.0 mg/mL).

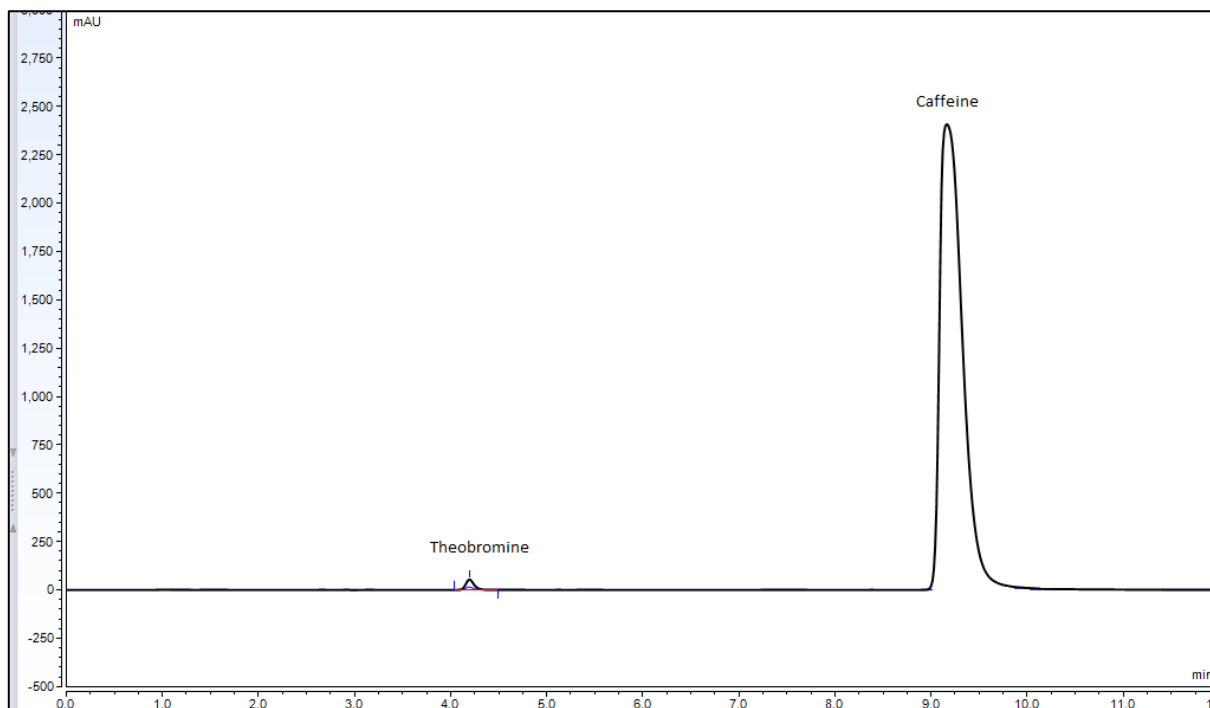
2.2. Анализ на изолираната метилксантинова фракция

Изолираната МФ е анализирана чрез разработен по-рано HPLC-UV метод за качествено и количество определяне на кофеин, теофилин и теобромин. Изолираната фракция съдържа голямо количество кофеин и значително по-ниско количество теобромин, докато теофилин не се открива. Резултатите са показани в таблица 10, а на фигура 13 е представена хроматограма на МФ, изолирани от Банча чаени листа. Съгласно получените резултати изчислим, че 1.0 g изсушени чаени листа Банча съдържа 8.34 mg кофеин и 0.009 mg теобромин.

Таблица 10. Изчислени концентрации на кофеин, теофилин и теобромин в изследвания воден разтвор на МФ с концентрация 2.5 mg/mL.

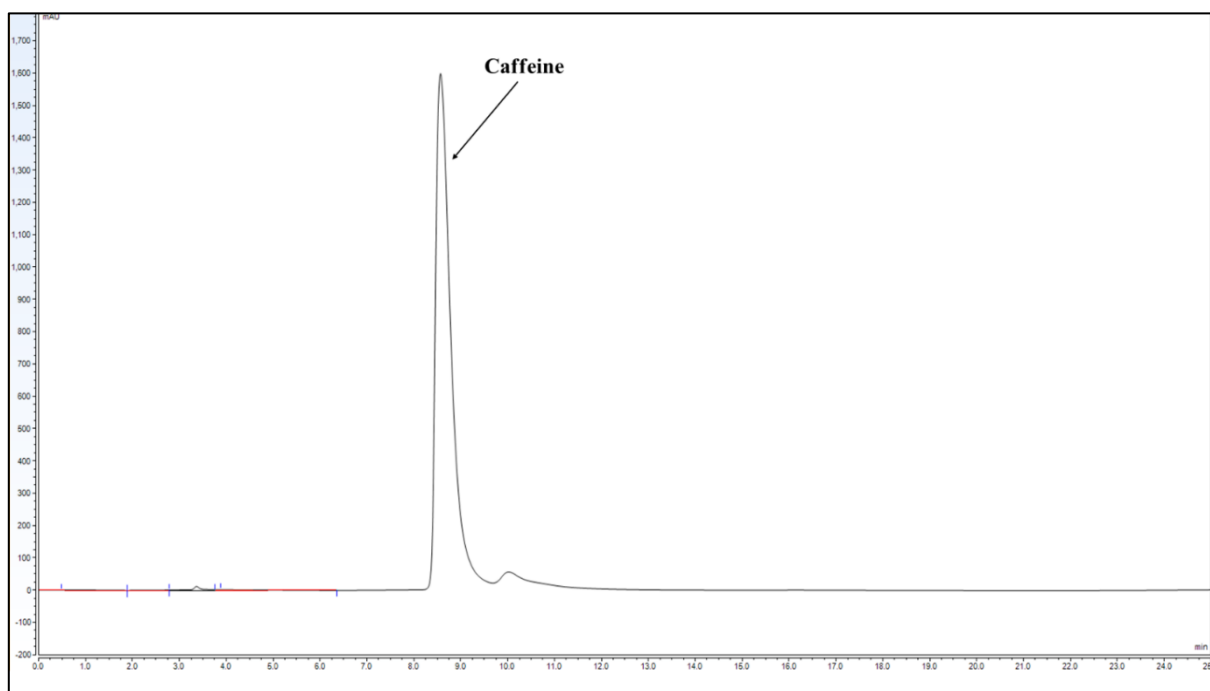
	Концентрация, $\mu\text{g/mL}$	Концентрация, % \pm SD
кофеин	2193.5	87.74 \pm 0.83
теофилин	-	-
теобромин	2.3756	0.095 \pm 0.02

- под границата на количествено определяне



Фигура 13. Хроматограма на проба от МФ (2.5 mg/mL).

Разработеният HPLC-UV метод за определяне на ЕГКГ, (+)-катехин, галова киселина и кофеин е приложен и за определяне съдържанието на катехини в изолираната МФ. За целта, повторно е извършена екстракция на Банча чаени листа с идентични състав, произход и срок на годност. Екстракцията е извършена по описания метод и е определен процентен добив на метилксантини в размер от 0.93% (w/w). Тестовите разтвори са приготвени по описания начин. Проведеният течнохроматографски анализ потвърди високото съдържание на кофеин в метилксантиновата фракция ($81.03\% \pm 0.72$). От друга страна, не са детектирани катехини (ЕГКГ, (+)-катехин) и галова киселина. На фиг. 14 е показана хроматограма на проба от МФ.



Фигура 14. Хроматограма на проба от МФ (1.0 mg/mL).

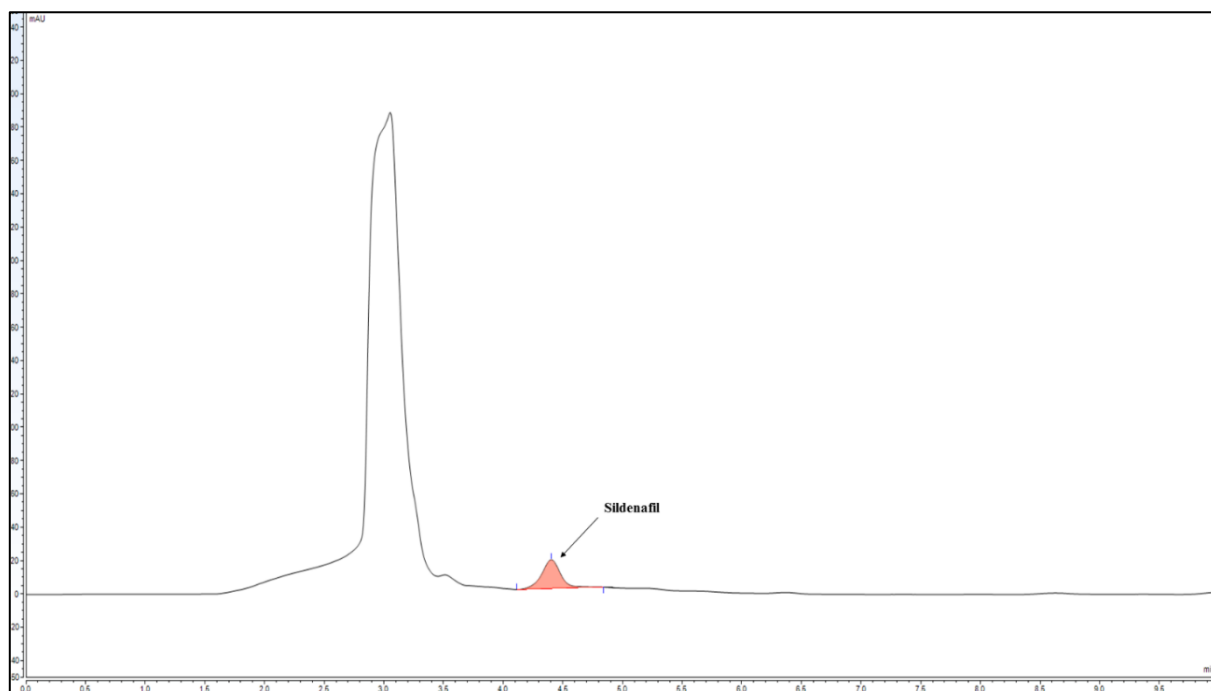
3. Качествен и количествен анализ на sildenafil в плазмени проби от експериментални животни

3.1. Валидиране на метода

За целта на дисертационния труд е разработен и приложен валидиран HPLC-UV метод за качествен и количествен анализ на sildenafil в плазма от плъхове. Наблюдаваната точност и прецизност отговарят на критериите на ICH [384]. Линейността на метода се потвърждава от коефициента на корелация ($R^2 > 0.998$). В допълнение, постигната е висока чувствителност на метода като LOQ на sildenafil е 5.0 ng/mL.

3.2. HPLC-UV анализ на биологични проби, съдържащи sildenafil

Предложеният метод за протеинна преципитация осигурява $\geq 93.0\%$ възстановяване на sildenafil при всички използвани концентрации ($\pm 1.89\%$ за пробите, към които е добавен sildenafil). В допълнение, не са елуирани интерфериращи ендогенни или екзогенни компоненти във времето на задържане на анализа, което още веднъж доказва пригодността на техниката за пробоподготовка. Представителна хроматограма на тестови образец е показана на фигура 15.



Фигура 15. Представителна хроматограма на плазмена проба от плъх, получена след еднократно перорално приложение на sildenafil (2.5 mg/kg)

4. Фармакокинетични проучвания при опитни животни

Многократният прием на ТЕ, КФ или МФ от японски зелен чай Банча оказва влияние върху фармакокинетиката на sildenafil при плъхове. В допълнение, едновременното приложение на еднократна доза метилксантини със sildenafil също води до значителна промяна в плазмените му концентрации. Интересен е обаче фактът, че еднократното и многократно приложение на метилксантини оказва различен ефект върху фармакокинетичните показатели на sildenafil при плъхове.

4.1. Проучване на фармакокинетиката на sildenafil след многократно приложение на ТЕ, КФ и МФ от зелен чай Банча

Измерената максимална плазмена концентрация на sildenafil (C_{max}) след еднократна перорална доза от 2.5 mg/kg при плъхове е 15.96 ± 2.45 ng/mL, плазменият полуживот ($t_{1/2}$) е средно 0.98 часа (0.91 – 1.02), а T_{max} е 0.5 часа. В група 2 след едновременното приложение на sildenafil и ketoconazole (ензимен инхибитор) се наблюдава повишаване на C_{max} ($p < 0.001$), AUC_{0-3} ($p < 0.001$) и AUC_{0-inf} ($p < 0.001$) на sildenafil, както и увеличаване на времето за достигане на максимална плазмена концентрация ($T_{max} = 1$ h). С цел по-лесното интерпретиране на резултатите, както и сравняване на влиянието на еднократното и многократно приложение на МФ върху фармакокинетиката на sildenafil, резултатите от многократното приложение на ТЕ и КФ са разгледани отделно от тези след многократен прием на МФ.

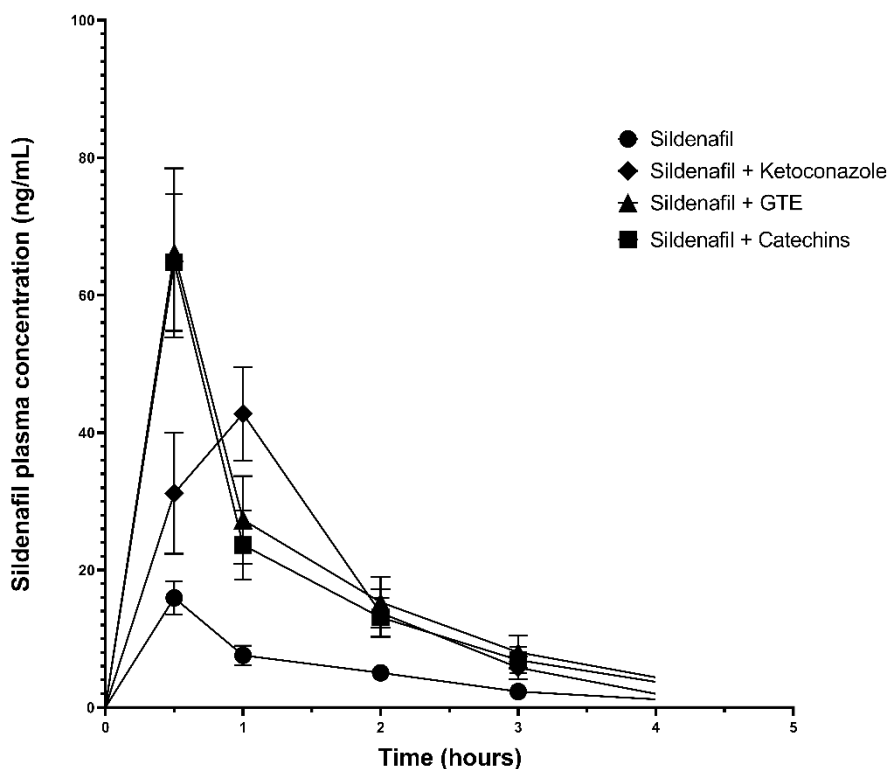
4.1.1. Влияние на многократното приложение на ТЕ и КФ от зелен чай Банча върху фармакокинетиката на sildenafil при плъхове

При прием на sildenafil след многократното приложение на цялостен екстракт и на катехини от зелен чай Банча при плъхове се наблюдават значителни промени във фармакокинетичните параметри на sildenafil. На таблица 11 са представени основните фармакокинетични параметри на sildenafil, изчислени за всяка група, а на фигура 16 са показани кривите плазмена концентрация-време на sildenafil при самостоятелно и комбинирано приложение. Когато sildenafil се прилага след многократно претретиране на животните с ТЕ или КФ от японски зелен чай Банча се наблюдава статистически значимо повишаване на стойностите на C_{max} ($p < 0.001$ за ТЕ; $p < 0.0001$ за КФ), AUC_{0-3} ($p < 0.001$) и AUC_{0-inf} ($p < 0.01$ за ТЕ; $p < 0.001$ за КФ) на sildenafil. Не е наблюдавана промяна във времето за достигане на максимална плазмена концентрация на sildenafil при едновременно приложение с цялостния екстракт и катехините ($T_{max} = 0.5$ h). Наблюдаваните стойности на C_{max} , AUC_{0-3} и AUC_{0-inf} на sildenafil, приложен след многократно предварително третиране на животните с ТЕ и КФ са близки до тези, наблюдавани при едновременно приложение на sildenafil с ketoconazole (повишаване на C_{max} , AUC_{0-3} и AUC_{0-inf} с над 100 % в сравнение с контролната група). На фигури 17, 18 и 19 са представени сравнителни графики на посочените фармакокинетични параметри в различните групи. Водният екстракт от Банча и КФ, подобно на ketoconazole показват значително понижаване на обема на разпределение (V_z/F) и намаляване на клирънса (Cl/F) на sildenafil, в сравнение с групата, която е приела единствено sildenafil. Не се наблюдава съществена промяна в плазмения полуживот ($t_{1/2}$) и средното време за престой в организма (MRT) на sildenafil при животните, които са приемали многократно ТЕ и КФ от зелен чай Банча.

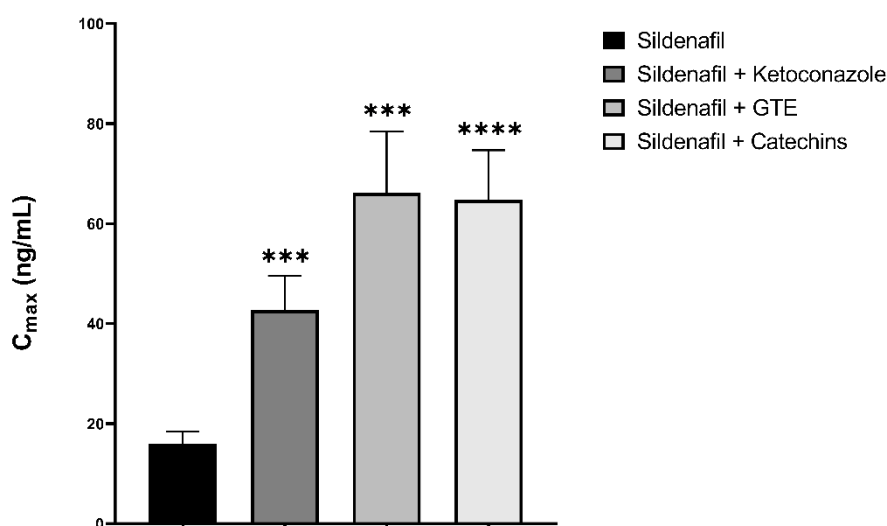
Таблица 11. Фармакокинетични параметри на sildenafil след еднократна перорална доза от 2.5 mg/kg при плъхове самостоятелно, в комбинация с еднократна доза ketoconazole и след предварително третиране на животните с ТЕ или с КФ от Банча

Фармакокинетичен параметър	Sildenafil (контролна група)	Sildenafil + ketoconazole	Sildenafil + ТЕ от зелен чай Банча	Sildenafil + КФ от зелен чай Банча
C _{max} (ng/mL)	15.96 ± 2.45	42.75 ± 6.81 ***	66.15 ± 12.30 ***	64.74 ± 9.95 ****
T _{max} (h)	0.5	1	0.5	0.5
AUC ₀₋₃ (ng*h/mL)	16.20 ± 2.73	64.31 ± 12.92 ***	72.90 ± 15.20 ***	66.66 ± 12.33 ***
AUC _{0-inf} (ng*h/mL)	23.28 ± 4.17	70.20 ± 14.59 ***	86.23 ± 19.84 **	77.99 ± 15.93 ***
Vz/F (L/kg)	0.15 ± 0.02	0.04 ± 0.01 ****	0.05 ± 0.01 ****	0.05 ± 0.01 ****
Cl/F ((mg/kg)/(ng/ml)/h)	0.11 ± 0.02	0.04 ± 0.01 ***	0.03 ± 0.01 ****	0.03 ± 0.01 ***

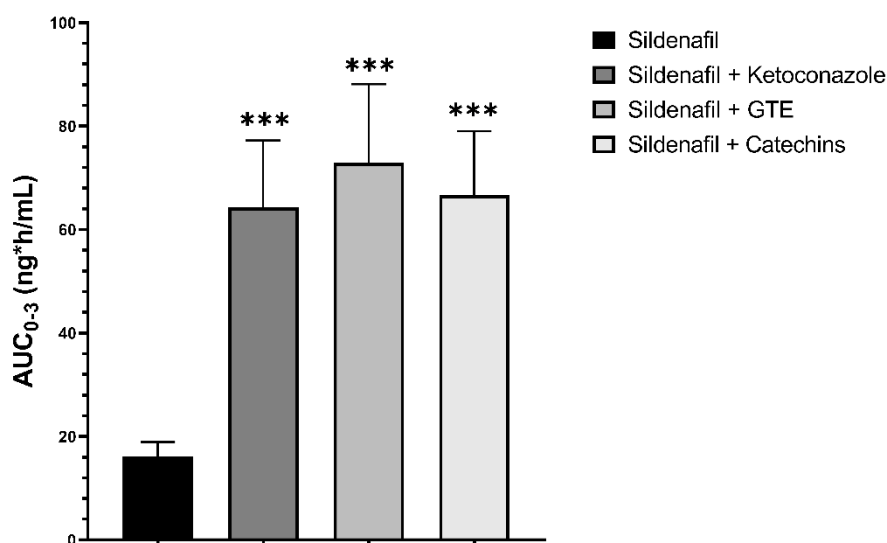
Стойностите са представени като средна стойност ± SD, n=24. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, в сравнение с контролната група.



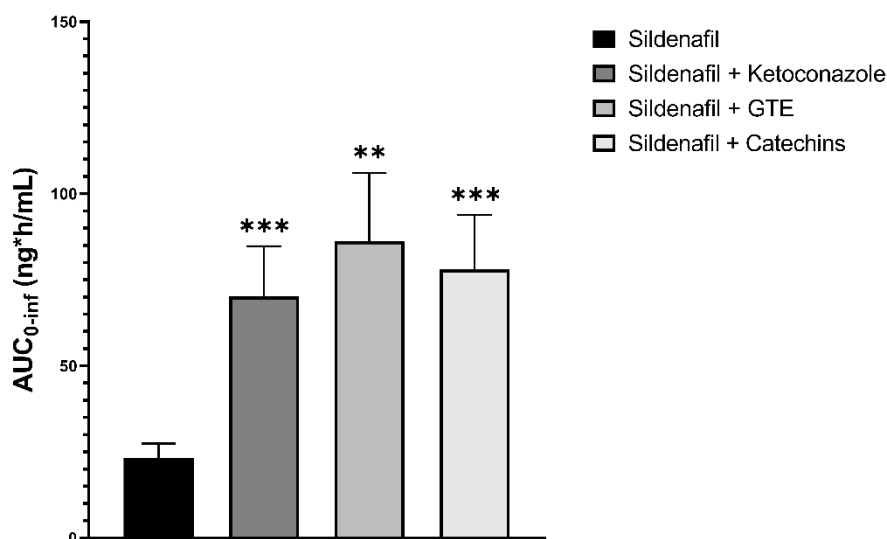
Фигура 16. Крива плазмена концентрация-време (средна стойност ± SD) на sildenafil след еднократна перорална доза от 2.5 mg/kg при плъхове самостоятелно, в комбинация с еднократна доза ketoconazole и след многократен прием на ТЕ или КФ от Банча.



Фигура 17. Максимална плазмена концентрация (C_{max}) на sildenafil при самостоятелно приложение (2.5 mg/kg), в присъствието на ketoconazole или след предварително многократно третиране с ТЕ или КФ при плъхове. Стойностите са представени като средна стойност \pm SD, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$, в сравнение с контролната група.



Фигура 18. Площ под кривата плазмена концентрация-време от време нула до последната измерена стойност (AUC_{0-3}) на sildenafil, приложен самостоятелно (2.5 mg/kg), в комбинация с ketoconazole или след многократен прием на ТЕ или КФ при плъхове. Стойностите са представени като средна стойност \pm SD, *** $p \leq 0.001$, в сравнение с контролната група.



Фигура 19. Площ под кривата плазмена концентрация-време от време нула до безкрайност (AUC_{0-inf}) на sildenafil, приложен самостоятелно (2.5 mg/kg), в комбинация с ketoconazole или след многократен прием на ТЕ или КФ при плъхове. Стойностите са представени като средна стойност \pm SD, ** $p < 0.01$, *** $p \leq 0.001$, в сравнение с контролната група.

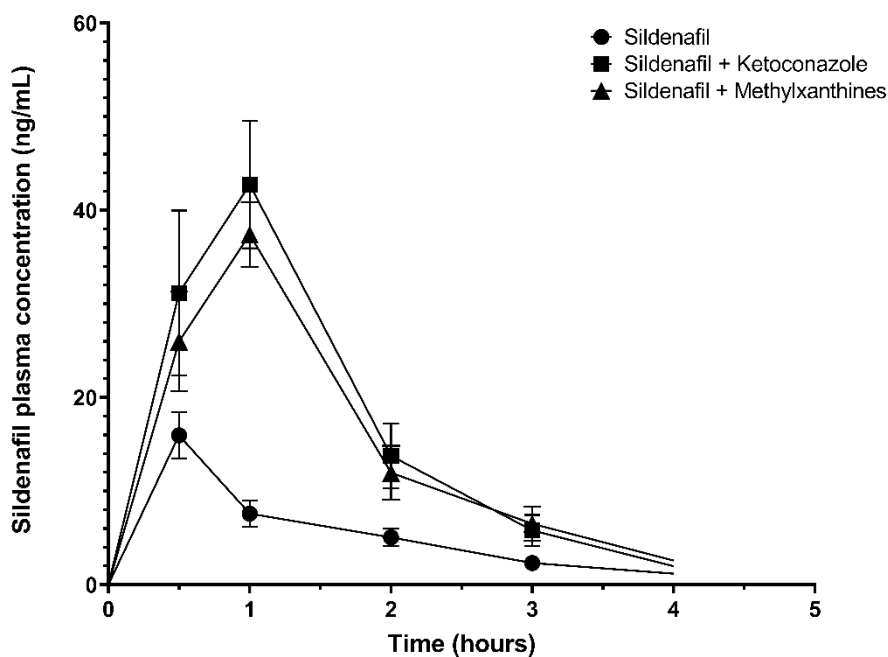
4.1.2. Влияние на многократното приложение на МФ, изолирана от зелен чай Банча върху фармакокинетиката на sildenafil при плъхове

Кривите плазмена концентрация-време на sildenafil при самостоятелно приложение, след приложение с ketoconazole или след многократни дози метилксантини са показани на фиг. 20. Приложението на sildenafil след предварително третиране с МФ от зелен чай Банча при плъхове води до статистически значимо увеличаване на C_{max} ($p < 0.0001$), AUC_{0-3} ($p < 0.0001$) и AUC_{0-inf} ($p < 0.001$). В допълнение, метилксантините забавят времето за достигане на максимална плазмена концентрация на sildenafil ($T_{max} = 1$ h) и намаляват плазмения му полуживот ($t_{1/2} = 0.77$ часа (0.67-0.93), $p < 0.01$). Основните фармакокинетични параметри на sildenafil във всяка група са показани в таблица 12. Наблюдаваните стойности на C_{max} , AUC_{0-3} и AUC_{0-inf} на sildenafil след предварително третиране с МФ са близки до тези, наблюдавани след едновременно приложение на sildenafil с ketoconazole (увеличение с над 100% в сравнение с контролната група). Фиг. 21, 22 и 23 представят сравнение на C_{max} , AUC_{0-3} и AUC_{0-inf} на sildenafil между групи 1, 2 и 5. Както метилксантините, така и ketoconazole водят до значително намаляване на V_z/F и Cl/F в сравнение с групата, в която sildenafil се прилага самостоятелно. Метилксантините не водят до значима промяна в средното време за престой (MRT) на sildenafil в организма на плъховете.

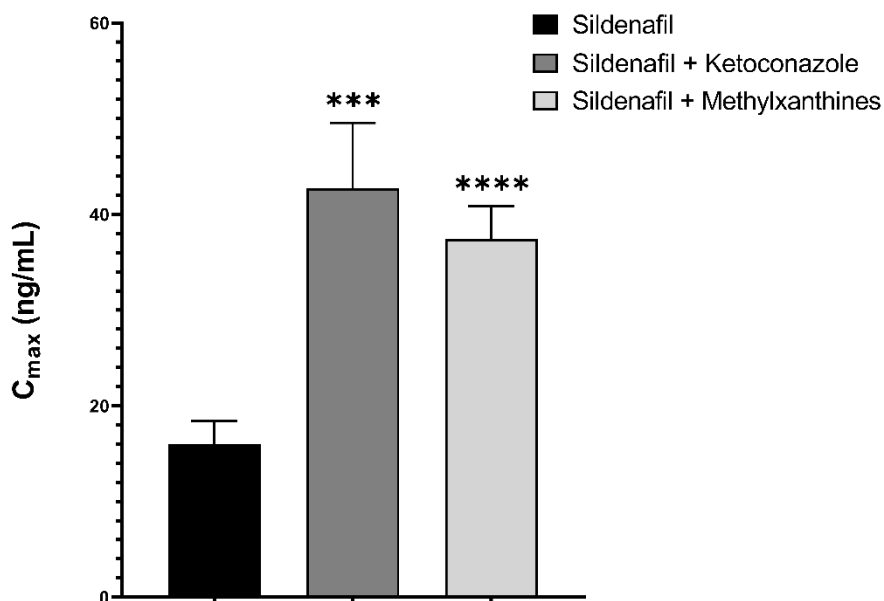
Таблица 12. Фармакокинетични параметри на sildenafil след еднократна перорална доза от 2.5 mg/kg при плъхове самостоятелно, в комбинация с еднократна доза ketoconazole или след предварително третиране на животните с МФ от зелен чай Банча

Фармакокинетичен параметър	Sildenafil (контролна група)	Sildenafil + ketoconazole	Sildenafil + МФ от зелен чай Банча
C _{max} (ng/mL)	15.96 ± 2.45	42.75 ± 6.81 ***	37.42 ± 3.44 ****
T _{max} (h)	0.5	1	1
AUC ₀₋₃ (ng*h/mL)	16.20 ± 2.73	64.31 ± 12.92 ***	56.27 ± 8.83 ****
AUC _{0-inf} (ng*h/mL)	23.28 ± 4.17	70.20 ± 14.59 ***	63.91 ± 11.56 ***
Vz/F (L/kg)	0.15 ± 0.02	0.04 ± 0.01 ****	0.05 ± 0.004 ***
Cl/F ((mg/kg)/(ng/ml)/h)	0.11 ± 0.02	0.04 ± 0.01 ***	0.04 ± 0.01 ***

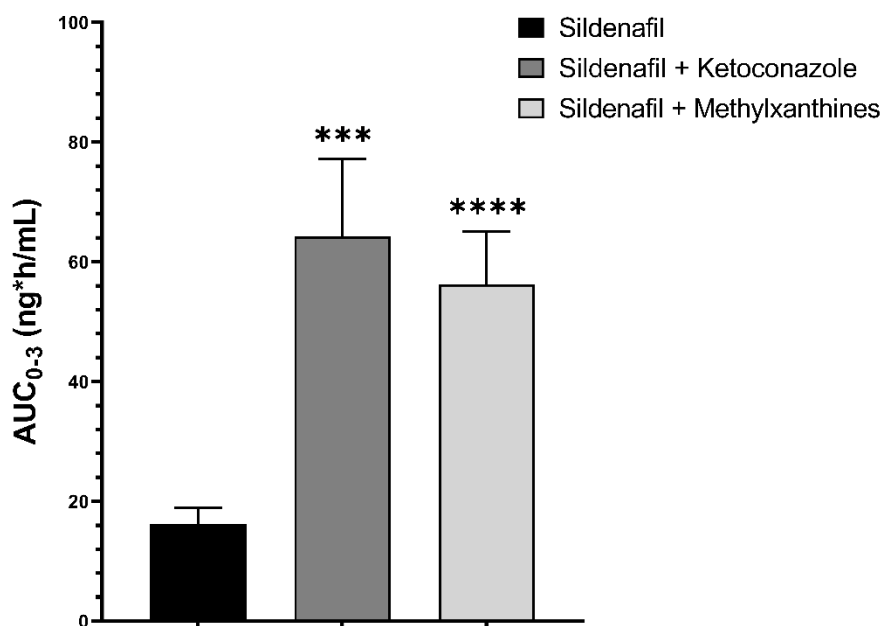
Стойностите са представени като средна стойност ± SD, n=24. *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, в сравнение с контролната група.



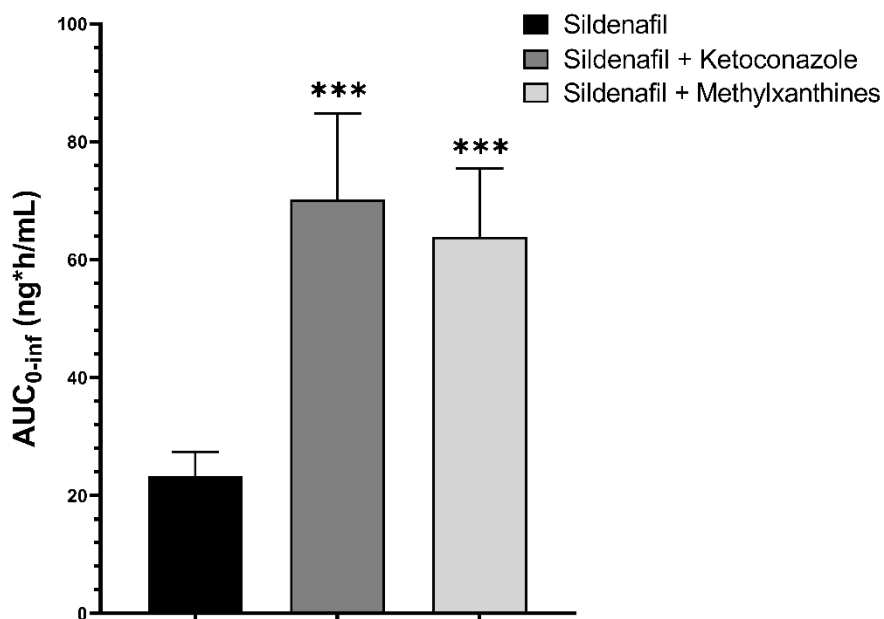
Фигура 20. Крива плазмена концентрация-време (средна стойност ± SD) на sildenafil след еднократна перорална доза от 2.5 mg/kg при плъхове самостоятелно, в комбинация с еднократна доза ketoconazole или след предварително третиране на животните с МФ от зелен чай Банча



Фигура 21. Максимална плазмена концентрация (C_{\max}) на sildenafil самостоятелно (2.5 mg/kg), в присъствието на ketoconazole или след предварително многократно третиране с метилксантини при плъхове. Стойностите са представени като средна стойност \pm SD, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$, в сравнение с контролната група.



Фигура 22. Площ под кривата плазмена концентрация-време от време нула до последната измерена стойност (AUC_{0-3}) на sildenafil, приложен самостоятелно (2.5 mg/kg), в комбинация с ketoconazole или след многократен прием на метилксантини при плъхове. Стойностите са представени като средна стойност \pm SD, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$, в сравнение с контролната група.



Фигура 23. Площ под кривата плазмена концентрация-време от време нула до безкрайност (AUC_{0-inf}) на sildenafil, приложен самостоятелно (2.5 mg/kg), в комбинация с ketoconazole или след многократен прием на метилксантини при плъхове. Стойностите са представени като средна стойност \pm SD, *** $p \leq 0.001$, в сравнение с контролната група.

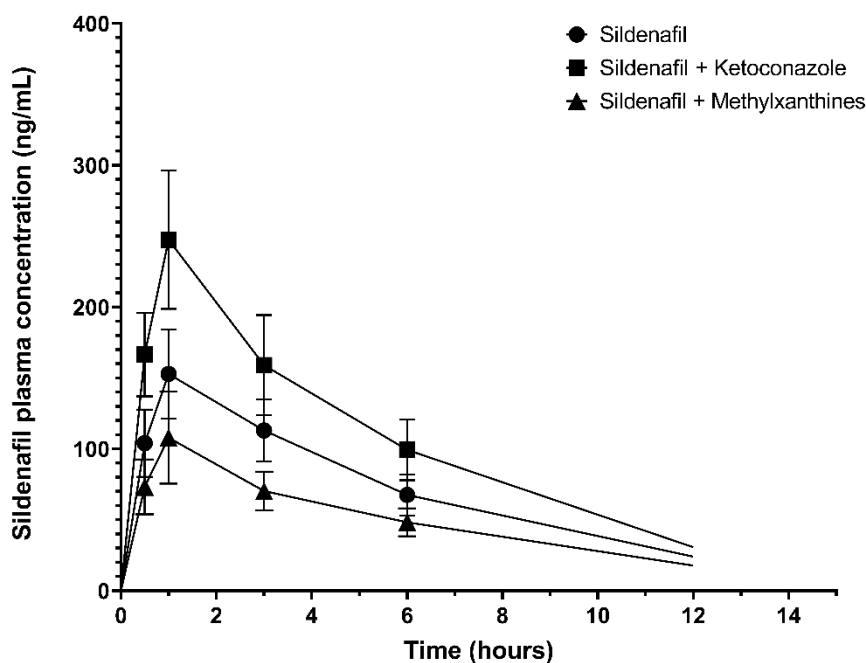
4.2. Проучване на фармакокинетиката на sildenafil след еднократно приложение на МФ от зелен чай Банча

Едновременната употреба на sildenafil с еднократна перорална доза метилксантини от зелен чай Банча (5.7 mg/kg) показва промени в някои от фармакокинетичните параметри на sildenafil, в сравнение с групата, в която sildenafil се прилага самостоятелно. Когато sildenafil се прилага едновременно с ketoconazole се наблюдава значително повишаване на плазмените му концентрации, в сравнение с контролната група. Кривите плазмена концентрация-време на sildenafil при самостоятелно приложение и след приложение на ketoconazole или МФ от зелен чай Банча са показани на фиг. 24. След прием на sildenafil самостоятелно в доза 60.0 mg/kg средната максимална плазмена концентрация (C_{max}) е 152.82 ± 31.41 ng/mL. Основните фармакокинетични параметри на sildenafil във всяка група са представени в таблица 13. Пероралното приложение на sildenafil с еднократна доза метилксантини води до понижаване на C_{max} (29.44%), AUC_{0-6} (33.06%) и AUC_{0-inf} (29.60%), в сравнение с контролната група. Намалването на C_{max} не е статистически значимо ($p > 0.05$), за разлика от намалването на AUC_{0-6} и AUC_{0-inf} ($p < 0.05$). След едновременно приложение на sildenafil с кетоконазол се наблюдава значително увеличаване на C_{max} ($p < 0.01$), AUC_{0-6} и AUC_{0-inf} ($p < 0.05$), в сравнение с група 1. Стойностите на C_{max} , AUC_{0-6} и AUC_{0-inf} на sildenafil са повишени съответно с 61.97%, 49.84% и 43.45%. Стойностите на T_{max} са еднакви във всички групи (1 h). Не са открити статистически значими разлики в стойностите на клирънса (Cl/F), плазмения полуживот ($t_{1/2}$) и средното време за престой в организма (MRT) на sildenafil между трите групи. Стойността на V_z/F на sildenafil е повишена в групата, която приема МФ и понижена, в групата, която е получила ketoconazole, в сравнение с контролната група. Разликите в C_{max} , AUC_{0-6} и AUC_{0-inf} на sildenafil между групите са показани на фиг. 25, 26 и 27 съответно.

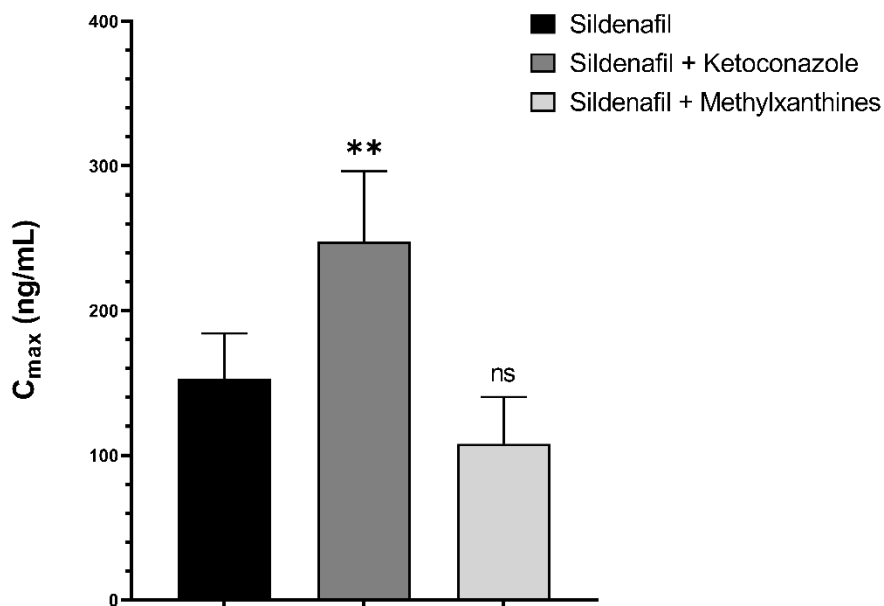
Таблица 13. Фармакокинетични параметри на sildenafil след еднократна перорална доза от 60.0 mg/kg при плъхове самостоятелно и в комбинация с еднократна доза ketoconazole или МФ от зелен чай Банча

Фармакокинетичен параметър	Sildenafil (контролна група)	Sildenafil + ketoconazole	Sildenafil + МФ от зелен чай Банча
C _{max} (ng/mL)	152.82 ± 31.41	247.53 ± 48.80 **	107.83 ± 32.42
T _{max} (h)	1	1	1
AUC ₀₋₆ (ng*h/mL)	626.83 ± 125.77	939.23 ± 190.64 *	419.60 ± 97.31 *
AUC _{0-inf} (ng*h/mL)	1042.94 ± 227.53	1496.11 ± 332.03 *	734.20 ± 145.33 *
Vz/F (L/kg)	0.37 ± 0.08	0.23 ± 0.06 *	0.55 ± 0.13 *
Cl/F ((mg/kg)/(ng/ml)/h)	0.06 ± 0.02	0.04 ± 0.01	0.09 ± 0.02

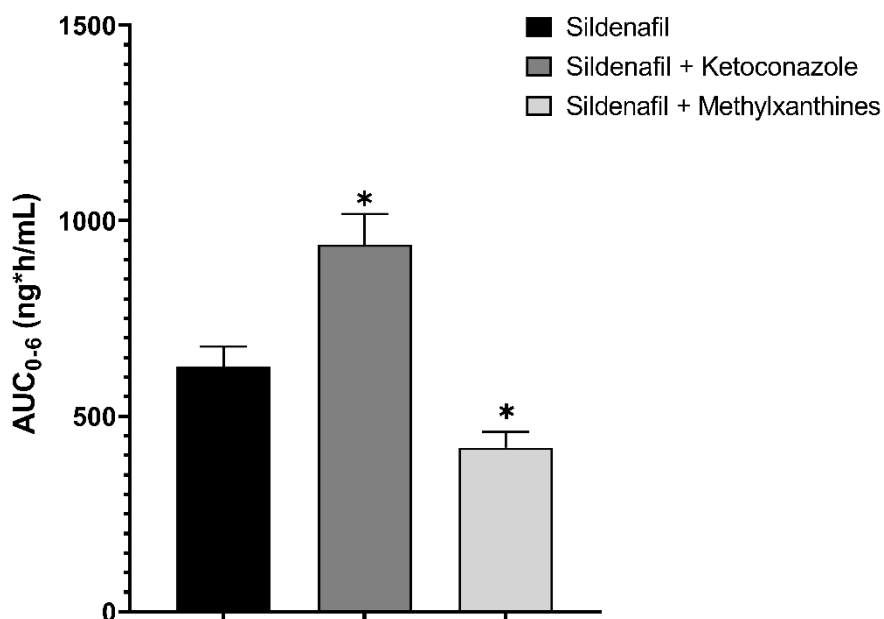
Стойностите са представени като средна стойност ± SD, n=24. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, в сравнение с контролната група.



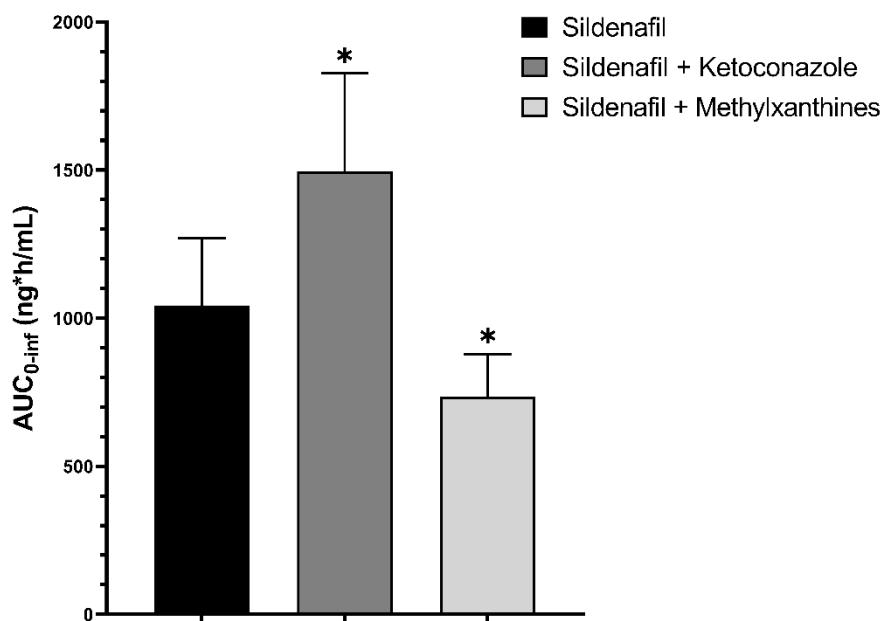
Фигура 24. Крива плазмена концентрация-време (средна стойност ± SD) на sildenafil след еднократна перорална доза от 60.0 mg/kg при плъхове самостоятелно и в комбинация с еднократна доза ketoconazole или МФ от зелен чай Банча.



Фигура 25. Максимална плазмена концентрация (C_{max}) на sildenafil самостоятелно (60.0 mg/kg) и в присъствието на ketoconazole или МФ от зелен чай Банча при плъхове. Стойностите са представени като средна стойност \pm SD, ** $p \leq 0.01$, ns – незначителна промяна, в сравнение с контролната група.



Фигура 26. Площ под кривата плазмена концентрация-време от време нула до последната измерена стойност (AUC_{0-6}) на sildenafil, приложен самостоятелно (60.0 mg/kg) и в комбинация с ketoconazole или метилксантини при плъхове. Стойностите са представени като средна стойност \pm SD, * $p \leq 0.05$, в сравнение с контролната група.



Фигура 27. Площ под кривата плазмена концентрация-време от време нула до безкрайност (AUC_{0-inf}) на sildenafil, приложен самостоятелно (60.0 mg/kg) и в комбинация с ketoconazole или метилксантини при плъхове. Стойностите са представени като средна стойност \pm SD, * $p \leq 0.05$, в сравнение с контролната група.

5. Разработване на ФБФК модели

Проведени са 10 опита с по десет субекта или общо 100 анализирани виртуални проби. За положителна контрола е използван ketoconazole, в еднократна перорална доза от 100.0 mg. Симулирани са следните опитни постановки:

- ❖ Приложение на субстрата (sildenafil) в еднократна перорална доза от 50.0 mg, 30 минути след приложението на еднократна доза ketoconazole (100.0 mg);
- ❖ Приложение на субстрата (sildenafil) в еднократна перорална доза от 50.0 mg, 30 минути след приложението на еднократна доза от КФ (400.0 или 600.0 mg);
- ❖ Приложение на субстрата (sildenafil) в еднократна перорална доза от 50.0 mg, 30 минути след приложението на еднократна доза от МФ (250.0 или 500.0 mg);
- ❖ Приложение на субстрата (sildenafil) в еднократна перорална доза от 50.0 mg, 30 минути след еднократно приложение на КФ (400.0 mg) и МФ (250.0 mg) едновременно.
- ❖ Приложение на субстрата (sildenafil) в еднократна перорална доза от 50.0 mg, 30 минути след еднократно приложение на КФ (400.0 mg) и МФ (500.0 mg) едновременно.
- ❖ Приложение на субстрата (sildenafil) в еднократна перорална доза от 50.0 mg, 30 минути след еднократно приложение на КФ (600.0 mg) и МФ (250.0 mg) едновременно.
- ❖ Приложение на субстрата (sildenafil) в еднократна перорална доза от 50.0 mg, 30 минути след еднократно приложение на КФ (600.0 mg) и МФ (500.0 mg) едновременно.

Резултатите от проведените симулации са представени в таблица 14.

Таблица 14. Промени в съотношението между стойностите на AUC и в съотношенията на C_{max} и AUC в присъствие и отсъствие на инхибитор, чрез използването на статичен и динамичен модел, симулирани с помощта на Simcyp® софтуер.

Sildenafil 50.0 mg +	AUCR Механистично- статичен модел	$C_{max}R/AUCR$ Механистично- динамичен модел
Ketoconazole 100.0 mg	7.61 (4.38-14.77)	2.78±0.92/ 4.93±2.09
КФ 400.0 mg	1.10 (1.03-1.20)	1.02±0.01/ 1.03±0.01
КФ 600.0 mg	1.14 (1.05-1.28)	1.03±0.01/ 1.04±0.01
МФ 250.0 mg	1.03 (1.01-1.05)	1.01±0.01/ 1.01±0.01
МФ 500.0 mg	1.05 (1.03-1.11)	1.01±0.01/ 1.02±0.01
КФ 400.0 mg/ МФ 250.0 mg	1.12 (1.05-1.22)	1.03±0.01/ 1.04±0.01
КФ 400.0 mg/ МФ 500.0 mg	1.15 (1.06-1.25)	1.04±0.01/ 1.04±0.01
КФ 600.0 mg/ МФ 250.0 mg	1.17 (1.07-1.31)	1.04±0.01/ 1.05±0.01
КФ 600.0 mg/ МФ 500.0 mg	1.19 (1.08-1.33)	1.05±0.01/ 1.06±0.01

Проведените симулации с механистично-статичния модел показаха умерен риск за възникване на взаимодействия при едновременно приложение на sildenafil с КФ в дози 400.0 и 600.0 mg. Комбинираното приложение на sildenafil и МФ (250.0 mg) показва нисък риск, докато при по-високата доза – 500.0 mg, при някои от виртуалната популация е отчетен умерен риск от лекарствени взаимодействия. Едновременното приложение на sildenafil с КФ и МФ във всичките симулирани дози – КФ 400.0 mg/ МФ 250.0 mg; КФ 400.0 mg/ МФ 500.0 mg; КФ 600.0 mg/ МФ 250.0 mg и КФ 600.0 mg/ МФ 500.0 mg, е регистрирано сумиране на ефектите по отношение на AUCR, но въпреки това все още се отнасят към тези с умерен риск от лекарствени взаимодействия. Проведените симулации с механистично-динамичния ФБФК модел показаха нисък риск за възникване на взаимодействия между sildenafil и КФ или МФ дори в най-високите симулирани дози, както при самостоятелно, така и при комбинирано приложение. За верифицирането на симулационния модел е използван класическия инхибитор на CYP3A4 – ketoconazole.

VI. ДИСКУСИЯ

Взаимодействията между лекарствени средства и растителни екстракти могат да бъдат потенциално опасни и да доведат до сериозни нежелани ефекти. Потенциалът на лекарствените вещества да участват в лекарствени взаимодействия се проучва преди да бъдат регистрирани за употреба, но при хранителните добавки, съдържащи растителни екстракти няма такава практика. Поради честата употреба на лекарствени средства и фитопрепарати през последните години е необходимо да се провеждат по-задълбочени предклинични и/или клинични изпитвания, които да оценят вероятността за възникване на клинично значими взаимодействия при едновременен прием на определени конвенционални лекарства и ежедневно употребявани растителни екстракти и/или техни компоненти. По този начин могат да бъдат предвидени и избегнати някои взаимодействия, а това ще доведе до повишаване на безопасността на пациентите при прием на фитопрепарати. Трябва да се има предвид обаче, че лекарствените взаимодействия, които са наблюдавани *in vitro* или са предсказани чрез компютърни софтуери не винаги водят до клинична изява *in vivo*. Освен това, някои взаимодействия наблюдавани при опитни животни също не се потвърждават при хора, вероятно поради различия между видовете и съответно различия във фармакокинетиката на лекарствата, в резултат на което екстраполирането на данни от опитни животни не винаги е точно [78]. Потвърждаването на конкретно взаимодействие налага провеждане на изследвания при различни условия и чрез използване на различни методи, включително проучване за потенциални фармакокинетични и фармакодинамични взаимодействия при хора, ако е приложимо. Единствено така може да се добие пълна представа за влиянието на настъпилото взаимодействие върху терапевтичния ефект и/или безопасността на лекарствата. В допълнение, разработването на ФБФК модел може да се използва успешно за предсказване на лекарствени взаимодействия и да насочи изследвателите към организиране и провеждане на последващи *in vivo* проучвания. Едновременно с разширяване на познанията относно потенциала на фитопрепаратите и техните БАВ да взаимодействат с лекарствени средства, се налага и по-задълбочено проучване на състава на растителните екстракти, които се включват в състава на фитопрепарати, с цел по-надеждно установяване на тяхната ефикасност и безопасност.

Настоящият дисертационен труд има за цел да изследва и да оцени потенциалните взаимодействия, които могат да възникнат при едновременно приложение на sildenafil и екстракт, изолиран от японски зелен чай Банча или негови биологично активни компоненти (катехини и метилксантини). От изготвения литературен обзор стана ясно, че голяма част от проучванията, в които се прилага екстракт от зелен чай не се посочва конкретният вид зелен чай, който е използван за приготвяне на екстракта, а някои автори използват готови растителни екстракти, които се предлагат на пазара. При различните видове зелен чай, а така също и при различните екстракционни условия, се наблюдават вариации в качествения и количествен състав, което би могло да повлияе тяхната ефикасност и/или безопасност [112, 166]. В литературата се откриват публикации, в които се анализира и сравнява качествено и количествено съдържание на БАВ между различни видове чай, произведени в една и съща страна или от различни страни по света, както и епидемиологични проучвания, които търсят корелация между консумацията на зелен чай и риска за развитие на някои заболявания [50, 103, 143, 149, 167, 203, 239, 276]. Вследствие на изготвения литературен обзор, прави впечатление, че някои видове японски зелен чай, например Сенча и Матча са по-добре проучени, в сравнение с други като зеленият чай Банча. В научната литература през

последните години се открива ограничена информация относно състава и полезните ефекти на японския зелен чай Банча, въпреки, че е доста популярен сред японското население, а вероятно и в други части на света. Това налага обстойно проучване на качествено и количествено съдържание на този вид зелен чай, а също оценка на терапевтичния му потенциал *in vivo* и на потенциала да участва във взаимодействия с лекарствени средства, предвид докладваните различия в съдържанието на БАВ, в сравнение с други видове зелен чай. В предишно проучване изследвахме ефекта на МФ, изолирана от японски зелен чай Банча при лекарствено-индуцирана кардиотоксичност и нефротоксичност, в резултат на което беше наблюдаван кардиопротективен и нефропротективен ефект, доказан биохимично и хистологично. Също така е изследвана *in vitro* антиоксидантната активност на изолираната МФ чрез два различни метода (DPPH и ABTS радикал-свързваща активност) и е установено, че метилксантините проявяват значителна антиоксидантна активност [266]. Следователно, ползите за здравето, както и потенциалните рискове, свързани с редовната консумация на японски зелен чай Банча трябва да бъдат изяснени, поради честата му употреба и нарастващата популярност на различните видове зелен чай в световен мащаб [53, 149]. Именно поради тази причина избрахме чаените листа Банча за целта на настоящата работа.

За осъществяване на поставената цел е необходимо първо да се екстрахират биологично активните компоненти от чаени листа. След внимателно обмисляне и планиране на експерименталния дизайн на проучванията при опитни животни, решихме да приготвим и използваме три растителни извлека – ТЕ, КФ и МФ от японски зелен чай Банча. Тоталният екстракт съдържа целият комплекс от БАВ, които се откриват в зеления чай, докато с изолирането на катехиновата и метилксантиновата фракция се цели екстрахиране предимно съответно на катехини и метилксантини. Това са двете основни групи БАВ, съдържащи се в зеления чай, с основни представители ЕГКГ от групата на катехините и кофеин от метилксантините. По този начин бихме могли да оценим дали наблюдаваните ефекти при приложение на цялостния екстракт от зелен чай се дължат главно на катехините или на метилксантините. След приготвяне на растителните извлекци е необходимо да се извърши качествено и количествено определяне на биологично активните вещества във всеки един от тях.

1. Изолиране на ТЕ, КФ и МФ от зелен чай Банча

Физикохимичните свойства на основните БАВ – катехини и метилксантини, както и практическият ни опит със зеления чай Банча, доведоха до избора на вече доказани екстракционни процедури.

1.1. Изолиране на ТЕ от зелен чай Банча

Изолирането на цялостния екстракт от японски зелен чай Банча е проведено така, че максимално да се доближава до приготвянето на чай в домашни условия. Зеленият чай обикновено се приготвя чрез запарване на чаените листа с гореща вода (80–90 °C) за период от 3-4 минути [277]. Поради това, като екстрагент е използвана гореща двойно дестилирана вода с температура ~ 80 °C, а продължителността на инфузията е 3 минути. Приложен е методът за екстракция, описан от Chakraborty и съавт. (2014), но са направени някои промени. Спазено е съотношението между количеството на чаените листа и екстрагента (100.0 g чаени листа към 1.0 L гореща вода), както и последващото филтруване и изпаряване под вакуум до получаване на гъста лепкава маса. Времето за инфузия е намалено от 10 на 3 минути и получената гъста маса се подлага на допълнително сушене в сушилна до получаване на твърда

и суха маса [57]. Установено е, че температурата на водата и времето на инфузия оказват значително влияние върху ефективността на екстракцията на БАВ като полифеноли и метилксантини, като голяма част от съдържащите се ЕГКГ и кофеин се извличат от листата при температура на водата 80 °С. В допълнение, може да се наблюдават различия в скоростта на екстракция и съответно съдържанието на БАВ при инфузия на насипните чаени листа в сравнение с прахообразна субстанция [174, 277]. По отношение на времето за екстракция, някои проучвания показват, че общото количество на екстрахираните полифеноли се повишава с увеличаване на времето на инфузия (≥ 10 минути), но същевременно се увеличават стипчивостта и горчивината, влияещи върху органолептичните свойства на чаената напитка [174, 254]. При проучване, проведено с японски зелен чай Банча също е установено, че с увеличаването на времето на запарване на чаените листа (от 5 до 30 минути) се екстрахира по-голямо количество полифеноли, но същевременно се извличат и повече танини, които обикновено са причина за неприятен стипчив вкус на приготвения чай [112]. Същевременно, с увеличаване на времето на инфузия и при високи температури, катехините могат да претърпят химични промени като епимеризация, при което епикатехините се превръщат в съответните катехини. Установено е, че ЕГКГ епимеризира в ГКГ при температури над 85 °С. За разлика от катехините, кофеинът притежава стабилна молекула, която е лесно разтворима в гореща вода и концентрацията му в чаената напитка е сравнително стабилна. В допълнение, Saklar и сътрудници (2015) съобщават, че най-голямо количество ЕГКГ и кофеин се екстрахират при температура на водата около 85 °С при инфузия с продължителност 3 минути [277]. Въпреки данните, за екстрахиране на по-голямо количество БАВ при по-продължително време на инфузията, считаме, че сме избрали оптимални условия за извличане на максимално количество ЕГКГ и кофеин от чаените листа Банча. Освен това в литературата се откриват данни, според които приготвените чаени напитки е възможно да съдържат множество токсични елементи като алуминий, арсен, олово, кадмий, манган и други [49, 286]. Съобщава се, че продължителното запарване на чаените листа е свързано с екстрахиране на по-големи количества токсични метали, като най-ниска концентрация на споменатите токсични съединения се открива в напитките, приготвени вследствие на 3 минутна инфузия на чаените листа. Поради това, се препоръчва при приготвянето на зелен чай да се избягва запарването на листата за повече от 3 минути [286]. Също така е установено, че средното количество на алуминий и някои тежки метали, като манган, олово, кадмий, арсен, живак и хром е по-високо в зрелите чаени листа, в сравнение с младите листа [365]. Тези резултати подкрепят предимствата на 3-минутната инфузия, предвид използването на зрели чаени листа в настоящото проучване. Допълнителното сушене на екстракта в сушилня е извършено при температура 25 °С до получаване на твърда суха маса, предвид нестабилността на съдържащите се катехини [352].

В заключение можем да кажем, че полученият от нас процентен добив на БАВ (16.37% w/w) след извличането на тоталния екстракт е по-нисък от този, докладван от Chakraborty и съавт. (2014) (24.76% w/w), чийто метод за екстракция сме приложили. Това вероятно се дължи на използването на зелен чай Банча, по-краткото време на инфузията, на кисването на чаените листа без предварително оситняване, както и на допълнителното сушене на екстракта до получаване на сухо вещество.

1.2. Изолиране на КФ от зелен чай Банча

За получаване на КФ е приложен методът, предложен от Георгиев, Илиев и Желев (2015) [109]. Използването на етилацетат за извличане на катехините от водната среда е познат похват, който се прилага и от други автори. Ключово значение за повишаване на процентния добив има подкисляването на екстракта с фосфорна киселина, с което се повишава стабилността на катехините [67, 153].

1.3. Изолиране на МФ от зелен чай Банча

Изолирането на МФ е извършено съгласно метода, докладван от Георгиев, Илиев и Желев (2015) [110]. Използването на хлороформ в процеса на екстракция на метилксантини се счита за един от най-подходящите методи за извличане на тези съединения от растителни екстракти. Кофеин, теофилин и теобромин преминават в хлороформения екстракт, докато други БАВ, като катехините остават във водната фаза [153].

2. Качествен и количествен анализ на ТЕ, КФ и МФ, изолирани от зелен чай Банча

Въпреки големия брой HPLC методи за анализ на напитки от зелен чай, протоколите за анализ на зелен чай Банча към днешна дата са крайно недостатъчни [50, 103, 143, 167, 239, 276]. Във връзка с това сме разработили и валидирали два течнохроматографски метода, които в последствие са приложени за извършване на качествено и количествено определяне на изолираните растителни извлекци.

2.1. Течнохроматографски анализ на ТЕ и КФ от зелен чай Банча

2.1.1. Разработване на HPLC-UV метод

Предвид планираните от нас *in vivo* изследвания с изолираните растителни извлекци е разработен лесно изпълним и екологосъобразен метод за едновременно определяне на ЕГКГ, (+)-катехин, галова киселина и кофеин. Тъй като се предполага, че качеството и антиоксидантният потенциал на зеления чай са свързани със съдържанието на катехини, количественото определяне на ЕГКГ в ТЕ и КФ от Банча е от съществено значение за последващите фармакологични проучвания. Очаква се ЕГКГ да е в най-висока концентрация в ТЕ и в КФ, тъй като е доминиращият катехин в чаените листа [166, 236]. Освен това, разработеният метод ще послужи и за анализ на метилксантиновата фракция за да се установи дали и тя съдържа катехини, в частност ЕГКГ. Същевременно, с настоящият метод ще се определи качествено и количествено съдържание на кофеин в ТЕ и КФ. Като цяло, количественото съдържание на кофеин е сравнително стабилно и остава непроменено в процеса на обработка на чаените листа, въпреки че някои микроорганизми могат да стимулират разграждането му [369]. Поради това, важен приоритет на настоящата работа е осигуряването на стабилността на четирите анализа, особено на ЕГКГ. Както беше споменато, катехините и особено ЕГКГ са нестабилни съединения и лесно се разграждат под действието на светлина, както и при определени стойности на рН и на температурата на околната среда [94]. Поради тази причина някои автори препоръчват добавянето на стабилизатори като аскорбинова киселина към пробите. От друга страна, прегледът на литературата показва, че при подобни хроматографски условия има тенденция аскорбиновата киселина да се елуира в началото на хроматограмата, близо до галовата киселина, поради което нейното използване в настоящата работа не е удачно [94]. За да се избегне добавяне на аскорбинова киселина, която може да компрометира идентифицирането на галовата киселина са избрани определени

щадящи условия за анализ и съхранение на пробите, с цел да се гарантира стабилността на ЕГКГ. Ефективността на хроматографските условия е потвърдена чрез анализ на серия проби за качествен контрол. Разбира се, важноста на подхода за добавяне на стабилизатори не трябва да се изключва в случаите, когато разграждането на ЕГКГ е неизбежно (например при биоанализ) [73, 376].

Оптимизирането на HPLC метода, разработен от Fernando и Soysa (2016) позволи едновременното и точно количествено определяне на четирите БАВ в проби от зелен чай Банча. В докладвания метод е използван вътрешен стандарт, който може да се елуира заедно с някои от компонентите на пробата (теофилин, катехини и др.) [98]. Поради тази причина за количествено определяне в настоящото изследване е използван методът на стандартната добавка, с цел да се сведат до минимум матричните ефекти, които биха могли да попречат на сигналите за измерване на анализите. Вследствие на приложените модификации е постигната по-висока чувствителност на метода. Това се потвърждава от определените LOQ стойности на ЕГКГ, (+)-катехин, галова киселина и кофеин, независимо от по-малкия обем на инжектиране. Като се имат предвид целите на настоящото изследване, постигнатата чувствителност може да се счита за напълно достатъчна. Като още по-значим принос на настоящата работа може да се отбележи способността за качествено и количествено определяне на (+)-катехин – аналит, който не е включен в работата на Fernando и Soysa (2016) [98]. В допълнение, предложеният метод би могъл да се приеме като подходящ за анализ и на други видове зелен чай, в които се очаква съдържанието на четирите вещества.

2.1.2. Съдържание на БАВ

Вследствие на проведения течнохроматографски анализ на ТЕ от зелен чай Банча изчислихме, че 1.0 g изсушени чаени листа Банча съдържа 6.74 mg ЕГКГ, 0.43 mg (+)-катехин и 6.86 mg кофеин. В допълнение, процентното съдържание на ЕГКГ, (+)-катехин и кофеин в приготвения воден екстракт е съответно 0.674%, 0.043% и 0.686 %. Следователно, можем да предположим, че чаша зелен чай, приготвен от 3.0 g чаени листа Банча ще съдържа приблизително 20.0 mg ЕГКГ, 1.0 mg (+)-катехин и 20.0 mg кофеин. От анализа на изолираната катехинова фракция изчисляваме, че 1.0 g изсушени чаени листа Банча съдържа 6.46 mg ЕГКГ, 0.78 mg (+)-катехин, 0.07 mg галова киселина и 1.03 mg кофеин, което отговаря на процентно съдържание съответно 0.646%, 0.078%, 0.007% и 0.103%. Получените стойности са по-ниски от средното количествено съдържание на катехини, включително ЕГКГ и на кофеин в екстракти от зелен чай, което се докладва в литературата [47, 304, 314]. Нашето проучване потвърждава резултатите, докладвани и от други автори относно по-ниското съдържание на катехини и кофеин в японски зелен чай Банча [50, 167, 236]. По-ниското съдържание на катехини в Банча вероятно допринася и за по-ниската антиоксидантна активност, която е наблюдавана от Kodama и съавт. (2010) [167].

Възможните причини за по-ниското количествено съдържание на ЕГКГ и кофеин в чаените листа Банча са няколко. Обработката на чаените листа (пастьоризация, стерилизация и други), както и тяхното съхранение могат да доведат до промяна в структурата на чаените полифеноли, включително катехините и да намалят количественото им съдържание в готовия продукт [53]. Също така, в различните проучвания се използват различни методи на екстракция на чаените листа (различни екстрагенти, различна продължителност на инфузията, различна температура на водата при приготвяне на воден екстракт и др.), което оказва влияние върху процентния добив на БАВ [83]. Трябва да се има предвид, че при приготвяне на воден

екстракт, използването на вода с висока температура ($> 85\text{ }^{\circ}\text{C}$) в съчетание с продължителна инфузия може да доведе до разграждане на част от съдържащите се катехини, включително ЕГКГ. Все пак, методиката на екстрахиране на БАВ от чаени листа чрез използване на гореща вода се прилага в редица проучвания с различни видове зелен чай и вероятно не е основната причина за по-ниското съдържание на катехини в зеления чай Банча [68, 102, 303]. Освен това, екстрахирането на кофеин от чаените листа е по-ефективно, ако се използва гореща вода, отколкото студена [125]. Използването на гореща вода при запарването на чаените листа вероятно също може да допринесе за разграждане на част от съдържащите се катехини, които са чувствителни към високи температури и висока стойност на рН на разтвора [342]. Както беше споменато, катехините, включително ЕГКГ са най-стабилни при кисело рН, но нестабилни при неутрална или алкална стойност на рН [364]. Същевременно рН на питейната вода, която се използва за приготвяне на чай в домашни условия е в диапазона между 6.5 и 8.5, докато рН на двойно-дестилираната вода, използвана в настоящата работа е ~ 7.0 и е установена посредством измерване с рН метър [392]. Следователно, има сериозни основания да се предполага, че при процеса на приготвяне на чаената напитка в домашни или лабораторни условия, е възможно да се промени структурата на част от съдържащите се катехини. В допълнение, както беше споменато оситнеността на чаените листа оказва влияние върху скоростта на извличане и съответно съдържанието на БАВ, както при приготвяне на екстракти в лабораторни условия, така и при приготвяне на чай в домашни условия [174]. Според нас, основно значение за по-ниските концентрации на катехини и кофеин в зеления чай Банча има периодът на събиране на чаените листа. Както беше споменато, зеленият чай Банча се получава от листа, които се берат в края на лятото и/или началото на есента, когато са по-зрели и с по-големи размери. Установено е, че количественото съдържание на БАВ (катехини, кофеин и L-теанин) в чаените листа варира през различните сезони. Gong и съавт. (2020) докладват, че най-високо съдържание на катехини се открива през лятото (юни месец), в сравнение с пролетта (април) и есента (септември). Предполага се, че това се дължи на повечето слънчева светлина през летните месеци, която има ключова роля за биосинтезата на катехини. През всички сезони съдържанието на ЕГКГ е най-високо, в сравнение с останалите катехини. Количеството на L-теанин е най-високо през пролетта, а по отношение на количеството на кофеин, не се наблюдава значима разлика през различните сезони [120]. Други проучвания обаче съобщават, че количеството на кофеин е по-високо в по-младите листа, отколкото в по-зрелите [125, 161, 162, 163, 180]. Освен това, се съобщава, че географското местоположение също оказва съществено влияние върху общото съдържание на катехини в чаените листа, което подчертава въздействието на околната среда върху количеството на образуваните БАВ [253]. Друг важен фактор, който обуславя различия в съдържанието на БАВ е съхранението на чаените листа след тяхното събиране и обработка. Наблюдавано е, че при съхранение на зеления чай при ниска температура ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$), катехините и кофеинът запазват структурата си в продължение на 8 седмици, а катехините не претърпяват значително разграждане за период от 6 месеца. При температура на съхранение около $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ обаче, количественото съдържание на катехини намалява значително, като количеството на ЕГКГ намалява с 68% след период на съхранение от 90 дни [61]. Изглежда, че оптималната температура на съхранение на зеленият чай е около $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, но продуктите, съдържащи зелен чай, които се предлагат в билковите магазини, дрогерии и аптеките не се съхраняват при хладилни условия. Следователно, продължителното съхранение на чаените листа при стайна температура (около $25\text{ }^{\circ}\text{C}$) е свързано с постепенно намаляване на количеството на БАВ. Това

отново повдига въпроса за ефективността и безопасността на чаените продукти, които се предлагат на пазара и подхранва опасенията, че консумацията на зелен чай може да не доведе до полезните ефекти, които очакваме. Същевременно, възможно е да се използват различни методи за приготвяне на екстрактите от зелен чай, включени в състава на фитопрепарати, което води вероятно до големи различия в количественото съдържание на катехини в крайните продукти. Липсата на стандартизация на екстрактите в някои от предлаганите на пазара хранителни добавки, допълнително задълбочава опасенията относно тяхната ефикасност и безопасност, които са пряко свързани с качествения и количествения състав на включения екстракт [53].

В заключение можем да кажем, че редица фактори оказват влияние върху количественото съдържание на БАВ в листата от зелен чай. Следователно състава на различните видове зелен чай, които се предлагат в търговската мрежа може да варира в значителни граници. Поради това, би било удачно количественото съдържание на БАВ (тотално катехиново съдържание, кофеин, L-теанин) да бъде изследвано преди пакетирането на чаените листа и посочено върху опаковката, за да бъдат информирани потребителите относно състава на закупения продукт. Високото съдържание на катехини обикновено се свързва с високо качество на чая, но е причина и за горчив или стипчив вкус, който не се харесва на всички потребители [13]. Съдържанието на кофеин също може да окаже влияние върху избора на определен вид зелен чай, особено ако чаената напитка се консумира във вечерните часове. В такъв случай ще е удачен приемът на зелен чай с ниско съдържание на кофеин, какъвто е японският зелен чай Банча.

2.2. Течнохроматографски анализ на МФ от зелен чай Банча

2.2.1. HPLC-UV методи за анализ

За качествено и количествено определяне на метилксантини (кофеин, теофилин и теобромин) в изолираната МФ се прилага разработеният по-рано от нас чувствителен течнохроматографски метод. В процеса на разработване на метода са изпробвани различни подвижни фази и е установено, че най-добро разделяне на анализите се наблюдава в изократичен режим при използване на мобилна фаза, съставена от 90 % H₂O/ 10 % ацетонитрил [113]. В процеса на пробоподготовка се използва гореща би-дестилирана вода (~ 80 °C) с алкално рН за приготвяне на стандартните разтвори и тестовите проби от изолираната МФ, поради по-ниската разтворимост на метилксантините в студена вода. Кофеинът е лесно разтворим в гореща вода (1:2). Разтворимостта на теофилин и теобромин се повишава при използване на гореща вода, но е значително по-ниска от тази на кофеин. Тези съединения се разтварят добре в алкални разтвори [28]. Поради това, като разтворител е избрана гореща двойно дестилирана вода с рН 8, в която се очаква да се разтворят добре и трите метилксантинови производни.

Впоследствие е повторен методът за екстракция на метилксантини, с цел получената метилксантинова фракция да бъде анализирана и чрез течнохроматографския метод за определяне на ЕГКГ, (+)-катехин, галова киселина и кофеин. Този анализ е проведен главно с цел да се установи дали МФ съдържа катехини (ЕГКГ и (+)-катехин), които биха могли да компрометират резултатите от опитите с експериментални животни, понеже има данни, че катехините повлияват фармакокинетиката, на лекарства, субстрати на CYP3A4, какъвто е sildenafil [6, 18].

2.2.2. Съдържание на БАВ

Вследствие на проведеното качествено и количествено определяне на кофеин, теофилин и теобромин в изолираната метилксантинова фракция е установено, че кофеинът е доминиращият метилксантин в изолираната метилксантинова фракция и представлява $87.74\% \pm 0.83$ от нейния състав. Открит е теобромин в много ниско количество ($0.095\% \pm 0.02$), докато теофилин не се детектира, вероятно поради това, че концентрацията му в пробите е под LOQ. На база на тези резултати изчислихме, че 1.0 g изсушени чаени листа съдържа 8.34 mg кофеин и 0.009 mg теобромин, което съответства на 0.834% кофеин и 0.0009% теобромин. Получените от нас резултати относно съдържанието на отделните метилксантини в зеления чай съвпадат с докладваните от други автори и потвърждават, че кофеинът е основният метилксантин в чаените листа [231, 279, 369].

Резултатите от течнохроматографския анализ на повторно изолираната метилксантинова фракция потвърдиха високото съдържание на кофеин ($81.03\% \pm 0.72$), докато ЕГКГ, (+)-катехин и галова киселина не се откриват в изследваните тестови разтвори. В допълнение, като се има предвид използваната процедура за извличане на метилксантиновата фракция също не се очаква наличието на катехини в състава. Методът за изолиране на МФ включва екстракция на чаените листа с двойно дестилирана вода, а впоследствие с хлороформ. Както беше споменато, това е един от най-подходящите методи за извличане на кофеин и други метилксантини, които преминават в хлороформения екстракт, докато катехините остават във водната среда [153]. Наблюдава се известна разлика в процентното съдържание на кофеин в двете изолирани метилксантинови фракции ($87.74\% \pm 0.83$ и $81.03\% \pm 0.72$). Отклонението в аналитичния добив е очаквано, предвид независимото провеждане на екстракционните процедури. Въпреки това, и в двата случая е постигнат сходен добив на метилксантини от чаените листа (0.95% и 0.93% W/W) с преобладаващо количествено съдържание на кофеин.

В заключение, високото количествено съдържание на метилксантини, в частност кофеин в изолираните метилксантинови фракции потвърждава ефикасността на приложения метод за екстракция на кофеин, теофилин и теобромин от чаени листа. Същевременно, не се откриват катехини в изолираната фракция. Следователно, с описаната екстракционна процедура се постига добро разделяне на двете основни групи БАВ в зеления чай – метилксантини и катехини.

3. Качествено и количествено определяне на sildenafil в плазмени проби от експериментални животни

С цел да се изследва фармакокинетиката на sildenafil при плъхове след самостоятелно и комбинирано приложение е разработен лесен за изпълнение и екологичен HPLC-UV метод.

3.1. Пробоподготовка

Процесът на пробоподготовка има много важно значение за точното количественото определяне на съдържащите се в кръвната проба съединения. Приложеният метод за екстракция би следвало да осигури възможно най-висок процентен добив на sildenafil citrate. В повечето от прегледаните литературни източници се прилагат методите на течно-течна екстракция или твърдофазна екстракция за извличане на изследваното вещество от кръвна плазма. Тези методи са по-трудоемки и отнемат повече време. Ето защо, в настоящата работа е разработен протокол за екстракция на sildenafil citrate от плазмени проби, базиран на метода

протеинна преципитация. Въпреки че не превъзхожда по капацитет на пречистване твърдофазната екстракция, протеинната преципитация е високоефективна, лесна за изпълнение и не изисква употребата на специфични лабораторни консумативи [101]. В подкрепа на използвания подход е липсата на съелуирани компоненти в анализираните проби. Като преципитиращ агент е избран метанол, поради това, че не взаимодейства със sildenafil citrate и е сравнително безопасен за работа. По този начин е получен процентен добив на sildenafil citrate, надвишаващ 93.0 %.

3.2. Течнохроматографски анализ

С цел да се разработи и оптимизира течнохроматографски метод за анализ на sildenafil е извършен обстоен преглед на литературата, относно прилаганите хроматографски методи за качествено и количествено определяне на целевия аналит в биологични проби [21, 74, 205, 206, 218, 293, 302]. Отделните автори провеждат анализа при скорост на потока в диапазона от 0.3 mL/min до 1.3 mL/min. Използваните дължини на вълната също варират: 220 nm, 230 nm, 234 nm, 292 nm и други. По отношение на състава на мобилните фази, повечето автори използват подвижна фаза, съдържаща метанол и/или ацетонитрил, самостоятелно или в различно съотношение с вода, със или без агент за регулиране на рН.

Във връзка с оптимизирането на разработвания метод са изпробвани различни хроматографски условия (скорост на потока, състав на подвижната фаза, дължина на вълната и други). В условията на настоящия експеримент, най-отчетлив хроматографски пик на sildenafil citrate е наблюдаван при дължина на вълната 228 nm, подвижна фаза в състав метанол/ двойно дестилирана вода в съотношение 85:15% и скорост на потока 0.6 mL/min. Избраната температура на колоната е 25 °C, както при повечето докладвани методи за анализ на sildenafil. В допълнение, постигнато е сравнително кратко времетраене на анализа (10.0 минути). Разработеният метод е с висока чувствителност, което се потвърждава от LOQ на sildenafil (5.0 ng/mL). Постигането на висока чувствителност на метода е от съществено значение предвид ниските концентрации на sildenafil, които се откриват в плазмата на мъжки плъхове [7, 333].

На база получените резултати, считаме, че представените процедури за пробоподготовка и анализ са ефективни и лесни за изпълнение, поради което могат да бъдат успешни имплементирани в рутинния анализ на биологични проби, съдържащи sildenafil.

4. Фармакокинетични проучвания при опитни животни

В днешно време много билки, напитки и хранителни добавки се използват ежедневно във физиологични дози за профилактика и/или лечение на заболявания. Доказано е, че някои от тях могат да инхибират или индуцират активността на CYP450 ензимите *in vitro* и *in vivo*. Следователно, биха могли да възникнат клинично значими взаимодействия, ако се прилагат едновременно с определени лекарства [233]. Както беше споменато, биотрансформацията на лекарства от ензима CYP3A4 е основният метаболитен път за повече от половината от предлаганите на пазара медикаменти. Следователно, при лекарствата субстрати на този ензим се очаква най-висок риск за възникване на лекарствени взаимодействия, когато се приемат едновременно с други лекарства, храни, напитки или фитопрепарати [300].

Зеленият чай и кафето са едни от най-популярните и ежедневно консумирани напитки в световен мащаб. Същевременно, има данни, че и двете напитки могат да окажат влияние върху фармакокинетиката на някои едновременно прилагани лекарства [44, 313]. Както зеленият чай, така и кафето съдържат разнообразие от биоактивни съединения, включително

метилксантини, главно кофеин, който притежава определени фармакологични ефекти [279]. Освен кофеин, зеленият чай съдържа и полифеноли, от които катехините се приемат за основни носители на биологичната му активност [34]. В допълнение, екстракт от зелен чай, както и съдържащите се в него ЕГКГ и кофеин се предлагат и под форма на хранителни добавки.

Кофеинът се метаболизира главно от ензима CYP1A2 при хора и едновременната му употреба със субстрати на CYP1A2 може да доведе до инхибиране на тяхната биотрансформация и повишен риск от нежелани лекарствени реакции [44]. Съобщава се също, че кофеинът е субстрат на CYP3A4, но наличната информация за потенциалните взаимодействия между кофеин и лекарства, които се метаболизират предимно от CYP3A4 е твърде ограничена [141]. В предишно проучване наблюдавахме, че МФ, изолирана от зелен чай Банча показва силна инхибиция на активността на CYP3A4 *in vitro*, докато чистият кофеин също инхибира активността на ензима, но по-слабо. За оценка на *in vitro* потенциала на МФ от зелен чай Банча и на чист кофеин да инхибират активността на CYP3A4 е използван специален кит Vivid® CYP3A4 Green Screening Kit, на база рекомбинантен човешки изоензим. Използвани са различни концентрации на МФ и кофеин в диапазона от 10.0 mg/mL до 0.3125 mg/mL, получени чрез серийно разреждане. При проведения HPLC-UV анализ е установено, че в използваните концентрации от МФ се съдържа съответно 8.8 mg/mL до 0.275 mg/mL кофеин. Като позитивна контрола е използван ketoconazole (10.0 µM). В резултат от проведеното изследване, наблюдавахме, че МФ в концентрация 10.0 mg/mL инхибира активността на ензима CYP3A4 със 72 %, докато чистият кофеин показва по-слаба инхибиция (приблизително 60 %). Още повече, процентната инхибиция на активността на ензима от МФ е близка до тази, наблюдавана при ketoconazole. Предвид получените резултати, според нас наблюдаваният инхибиторен ефект не се дължи единствено на съдържащия се кофеин, а вероятно и на други компоненти, съдържащи се в МФ, като е възможно и взаимно потенциране на ефектите на някои съединения. В допълнение, *in vitro* е изследван и инхибиращият ефект на МФ върху активността на ензима CYP2C9, но е наблюдавана незначителна инхибираща активност на метилксантините [113]. Kovacic и сътрудници (2009) също съобщават, че кофеинът инхибира CYP3A4 [172]. Същевременно, Dresser и сътрудници (2017) докладват, че екстракти от кафени зърна с различна степен на изпичане потискат активността на CYP3A4 *in vitro*, но *in vivo* само при един от участниците в експеримента се наблюдава слабо повишаване на C_{max} и AUC на felodipine, използван като субстрат за CYP3A4. Поради това, авторите заключават, че кафето не повлиява съществено фармакокинетиката на felodipin при хора, въпреки малкият брой участници в експеримента. Те не дискутират и компонентите, които са отговорни за наблюдаваните ефекти [85]. Това налага провеждането на допълнителни проучвания на потенциалните взаимодействия между метилксантините и кофеина със субстрати на CYP3A4, предвид резултатите от докладваните *in vitro* изпитвания.

Проведени са редица проучвания за да се установи влиянието на екстракта от зелен чай и/или ЕГКГ върху активността на лекарство-метаболизиращите ензими и трансмембранните транспортери. Повечето *in vitro* проучвания съобщават за инхибиция на лекарството-метаболизиращите ензими и някои транспортни протеини. Въпреки това, наблюдаваните резултати при опитни животни и хора са противоречиви, поради което се налагат допълнителни проучвания в тази посока. За да се предвидят по-точно потенциалните взаимодействия между зеления чай и/или неговите основни компоненти с едновременно

приемани лекарства е необходимо да се провеждат повече *in vivo* проучвания, както при опитни животни, така и при хора.

Инхибиторът на ФДЕ5 sildenafil е използван в настоящата работа като лекарствено вещество, чиято фармакокинетика да бъде проследена и анализирана при експериментални животни. Изборът е направен въз основа на това, че sildenafil е лекарство, което крие сравнително висок риск за участие в лекарствени взаимодействия, предвид значителната му биотрансформация от цитохромите и най-вече СУР3А4. Също така се предполага, че може да е субстрат на трансмембранни транспортери. Освен това, sildenafil често се употребява без предварителна консултация с лекар, вероятно поради това, че пациентите изпитват неудобство да обсъждат сексуални проблеми с личните си лекари [157]. Това съответно е предпоставка за едновременен прием на sildenafil с други медикаменти и/или растителни препарати и допълнително повишава риска от възникване взаимодействия. Все пак, лекарствените взаимодействия са по-предвидими, тъй като в процеса на разработване на лекарствата се проучват тяхната фармакокинетика и фармакодинамика и се оценява потенциалът им за участие в лекарствени взаимодействия като лекарство-жертва или лекарство-извършител. Същевременно в литературата се откриват сравнително малко проучвания, които изследват и оценяват потенциалните взаимодействия между sildenafil и храни, напитки и хранителни добавки, съдържащи един или няколко растителни екстракта, поради което е необходимо да се проведат повече изследвания в тази насока, предвид широката употреба на sildenafil и фармакокинетичният му профил.

Вследствие на резултатите, докладвани от *in vitro* и *in vivo* проучвания относно ефекта на зеления чай и неговите основни компоненти върху фармакокинетиката на други лекарства, както и наблюдаваният от нас инхибиторен ефект на МФ върху активността на СУР3А4, предполагаме, че е възможно възникване на фармакокинетично взаимодействие при едновременен прием на sildenafil с ТЕ, КФ и МФ от зелен чай Банча. От друга страна, sildenafil е селективен инхибитор на ФДЕ5, а кофеин е неселективен инхибитор на фосфодиестеразите. Същевременно, има данни, че кофеинът подобрява еректилната функция при диабетни плъхове, вероятно вследствие на инхибицията на фосфодиестеразите. Lopez и сътрудници (2015) съобщават, че приемът на кофеин в количество колкото в 2-3 чаши кафе (170-375 mg/дневно) намалява риска за еректилна дисфункция при мъже, включително такива с повишено телесно тегло, затлъстяване или хипертония, но не и при мъже с диабет. Следователно, кофеинът би могъл да потенцира ефекта на други лекарства, използвани в терапията на еректилна дисфункция, въпреки че епидемиологичните проучвания показват противоречиви резултати [199, 357]. В допълнение, Chen и съавт. (2017) докладват, че ЕГКГ дозо-зависимо подобрява еректилната функция при възрастни плъхове, чрез регулиране на PRMT1/DDAH/ADMA/NOS метаболитни пътища, включително повлияване на NO/цГМФ сигналния път, в резултат на което повишава продукцията на NO и нивата на цГМФ в корпус кавернозум [62]. В друго проучване, проведено от Rai и сътрудници (2020) се наблюдава значително подобрене на сексуалните и поведенчески параметри при мъжки плъхове след приложение на (+)-катехин. Според авторите е възможно ефектът да се дължи на установените *in silico* агонизъм на D₂-рецептори и инхибиране на ФДЕ5 [267]. Следователно, има сериозни основания да се предположи, че при едновременното приложение на sildenafil със зелен чай, екстракти от зелен чай, ЕГКГ и кофеин има вероятност да възникнат както фармакокинетични, така и фармакодинамични взаимодействия.

Към момента в литературата се открива информация за едно проучване, в което се изследва влиянието на воден екстракт от зелен чай върху фармакокинетиката на sildenafil при здрави мъже доброволци [133]. Макар и различни източници да съобщават, че се наблюдава взаимодействие между зеления чай и sildenafil се оказва, че всички цитират едно и също проучване. Negazy и сътрудници (2014) провеждат изследването при здрави мъже, които разделят в две групи. Доброволците в едната група приемат еднократно 250.0 mL вода, а в другата – 250.0 mL прясно приготвен екстракт от 2.0 g зелен чай, след което всички участници приемат перорално по една таблетка sildenafil (50.0 mg) и една таблетка midazolam (7.5 mg) едновременно. Наблюдава се повишаване на AUC_{0-inf} и C_{max} на sildenafil с около 30 %, когато се прилага след прием на зелен чай. Също така, зеленият чай удължава елиминационния полуживот на sildenafil с около 36 %. Според авторите повишената бионаличност на sildenafil след прием на зелен чай е възможно да се дължи на катехините, които могат да променят спонтанната активност на тънките черва или да окажат влияние върху активността на трансмембранни транспортери. Използваният зелен чай е предварително пакетирани (2.0 g) и според производителя съдържа 3.0 g катехини/ 100.0 g зелен чай [133]. Следователно в приготвения екстракт от зелен чай, които са получили участниците в проучването се съдържат не повече от 60.0 mg катехини. Липсва обаче информация относно приготвянето на самия екстракт (температура на водата, продължителност на инфузията и други), както и провеждане на качествен и количествен анализ на приготвения екстракт. В допълнение, в посоченото проучване sildenafil е приет едновременно с midazolam, като пробно лекарство за активността на CYP3A4. Трябва да се има предвид обаче, че е възможно midazolam да е оказал влияние върху наблюдаваните резултати и да компенсира в известна степен промяната в плазмените нива на sildenafil след приема на екстракт от зелен чай, тъй като и двете лекарства се метаболизират предимно от CYP3A4. Тези опасения се споделят и от други автори [345].

Поради тази причина, проведените от нас опити имат за цел да оценят влиянието на ТЕ, КФ и МФ от зелен чай Банча върху фармакокинетиката на sildenafil, приложен самостоятелно без пробно лекарство за активността на CYP3A4. При първия опит изолираните ТЕ, КФ и МФ от Банча се прилагат многократно преди приема на sildenafil, а във втория се прилага единствено МФ еднократно. И при двата опита са наблюдавани промени във фармакокинетичните параметри на sildenafil при едновременното му приложение с ketoconazole – добре познат инхибитор на ензима CYP3A4, който се използва в настоящата работа като положителна контрола [210].

4.1. Приготвяне на разтвори/суспензии за приложение при опитни животни при двата опита

Всички използвани субстанции се прилагат перорално под форма на разтвори и суспензии с помощта на орогаstralна сонда за гризачи. Изборът за приготвяне на разтвор или суспензия зависи от разтворимостта на лекарствените и растителни вещества във вода. Sildenafil е слабо разтворим във вода, поради което в лекарствените форми се включва неговата цитратна сол – sildenafil citrate, който е с по-добра разтворимост във вода (4.1 mg/mL) [283]. При опитните животни sildenafil се прилага под форма на разтвор и суспензия, които се получават след разтваряне/суспендиране на sildenafil citrate в 1%-ен воден разтвор на натриева карбоксиметилцелулоза. Приготвените разтвор и суспензия са с крайна концентрация на sildenafil съответно 0.625 mg/mL и 15.0 mg/mL. В първия случай цитратната сол на sildenafil ще се разтвори добре във вода, но във втория няма да се разтвори напълно и ще се образува

суспензия, предвид докладваната разтворимост на sildenafil citrate във вода (4.1 mg/mL). Поради бързото утаяване на частиците на лекарственото вещество във водната суспензия и риск от прилагане на различна доза sildenafil при експерименталните животни, решихме да приготвим и използваме 1.0 %-ен воден разтвор на натриева карбоксиметилцелулоза. Това съединение представлява високомолекулен целулозен полимер, който се разтваря във вода и образува вискозни колоидни разтвори [198]. Водни разтвори на натриева карбоксиметилцелулоза с концентрация 0.5 % до 2.0 % се използват за суспендиране на лекарствени и растителни субстанции в редица проучвания, поради повишаване на вискозитета на разтвора и значително по-бавното утаяване на частиците [38, 138, 144, 335]. В концентрация от 0.1% до 1.0%, натриевата карбоксиметилцелулоза се използва именно като средство, повишаващо вискозитета на лекарствени форми за перорално или локално приложение, в които се суспендират лекарствени вещества [211]. За целта, приготвихме водни разтвори с различна концентрация на натриева карбоксиметилцелулоза (0.5%, 1.0% и 2.0%), от които избрахме 1.0 %-ят разтвор, поради постигане на оптимален вискозитет, позволяващ приложение чрез орогаstralна сонда и същевременно бавно преципитиране на суспендираните вещества. С цел провеждане на експериментите при еднакви условия, 1.0 %-ят воден разтвор на натриева карбоксиметилцелулоза е използван като носител на sildenafil и при двата опита.

Противогъбичният препарат ketoconazole има много малка разтворимост във вода, поради което също се прилага при опитните животни под формата на суспензия в 1%-ен воден разтвор на натриева карбоксиметилцелулоза [298]. Този метод за перорално приложение на ketoconazole при плъхове се докладва и от други автори [355].

Изолираните ТЕ, КФ и МФ се разтварят добре във вода, поради което се прилагат под форма на водни разтвори. Цялостният екстракт и катехиновата фракция се разтварят в хладка вода и впоследствие се хомогенизират на вортекс-миксер за да се разтворят напълно. По този начин се избягва използването на гореща вода, при което има риск от допълнително разграждане на част от съдържащите се катехини. Метилксантиновата фракция се разтваря в гореща двойно дестилирана вода, предвид по-ниската разтворимост на кофеин и останалите метилксантини в студена вода.

4.2. Влияние на многократното приложение на ТЕ, КФ и МФ върху фармакокинетиката на sildenafil

При това проучване sildenafil се прилага при мъжки плъхове след предварително едноседмично третиране с ТЕ, КФ и МФ, изолирани от Банча два пъти дневно. Приложението на растителните субстанции се извършва сутрин и след обяд, с цел да се имитира ежедневния прием на зелен чай. Изборът на двукратно дневно приложение на растителните извлекци е направен въз основа на данните от прегледа на систематични обзори и мета-анализи относно полезните ефекти, свързани с консумацията на зелен чай, според които най-голямо намаляване на риска от редица здравни проблеми (обща смъртност, сърдечна смърт, исхемична болест на сърцето, инсулт и захарен диабет тип 2) се наблюдава при прием на две до три чаши зелен чай дневно [358]. Изчислените фармакокинетични параметри на sildenafil след комбинирано приложение са сравнени с тези след самостоятелно приложение, както и след едновременен прием с ketoconazole.

4.2.1. Определяне на използваните дози в настоящия опит

Дозата на sildenafil (2.5 mg/kg) е избрана след преглед на литературата и същевременно използване на формулата за изчисляване на ЧЕД, според която дозата от 2.5 mg/kg sildenafil при плъхове е еквивалентна на еднократна доза от приблизително 27.0 mg при човек. Тази доза е много близка до най-ниската доза на sildenafil, която се прилага при хора (25.0 mg) и се препоръчва като начална доза, особено ако пациентът приема и други лекарства, за които са докладвани или се очакват взаимодействия при едновременен прием със sildenafil или субстрати на CYP3A4 (CYP3A4 инхибитори; алфа-блокери) [386].

Цялостният екстракт е прилаган в еднократна доза от 100.0 mg/kg, която осигурява ЕГКГ и кофеин в дози съответно 4.12 mg/kg и 4.19 mg/kg. Дозата на прилагания цялостен екстракт е в съответствие с дозите, използвани в други фармакокинетични проучвания. Използваната доза от КФ (30.0 mg/kg) е подбрана така, че да бъде еквивалента на доза от 5.0 mg/kg ЕГКГ, основното съединение в тази фракция, както и най-активният катехин [58, 76, 196]. Трябва да се отбележи, че докладваните в литературата дози на екстракта от зелен чай и ЕГКГ, които се прилагат при различни проучвания варират в много широки граници. В допълнение, след изчисляване на ЧЕД на ЕГКГ и кофеин, които животните приемат чрез ТЕ, става ясно, че дозата, която сме избрали да приложим от ТЕ при плъхове осигурява такива количества на ЕГКГ и кофеин, които човек може да приеме с чаша чай (приблизително 45 mg ЕГКГ и 46 mg кофеин). Съответно, с приемът на КФ, експерименталните животни получават 5.0 mg/kg ЕГКГ и 0.8 mg/kg кофеин, което е еквивалентно на дозата от приблизително 54.0 mg ЕГКГ и 8.7 mg кофеин при хора [279].

Еднократната доза кофеин, която плъховете получават след прием на 5.7 mg/kg от МФ се равнява на ЧЕД от приблизително 54.0 mg кофеин (за човек с тегло 70 kg). Такова количество кофеин човек може да си набави след прием на чаша чай, поради което е избрана именно такава доза на метилксантините (5.7 mg/kg), осигуряваща 5.0 mg/kg кофеин при плъхове [279].

Дозата на ketoconazole (10.0 mg/kg) е избрана след проучване на литературни източници относно използването на лекарството във фармакокинетични проучвания при плъхове [355].

4.2.2. Промени във фармакокинетиката на sildenafil при многократно приложение на ТЕ и КФ от зелен чай Банча

В настоящия опит, след прилагане на sildenafil в доза 2.5 mg/kg при плъхове е наблюдавана сравнително ниска плазмена концентрация на лекарството ($C_{max} = 15.96 \pm 2.45$ ng/mL). Близки стойности на C_{max} обаче се докладват и от други автори след приложение на sildenafil при мъжки плъхове, поради значително по-слабата резорбция при тях [7]. Приемът на sildenafil след многократно третиране на животните с ТЕ и КФ от японски зелен чай Банча води до статистически значимо повишаване на C_{max} , AUC_{0-3} и AUC_{0-inf} и намаляване на обема на разпределение и клирънса на sildenafil, като получените стойности на посочените фармакокинетични параметри са близки до тези, след едновременно приложение на sildenafil с ketoconazole. Повишените плазмени концентрации на sildenafil едновременно с липсата на промяна във времето за достигане на максимална плазмена концентрация на лекарството при едновременно приложение с ТЕ и КФ ($T_{max} = 0.5$ h) предполага евентуално увеличаване на степента на резорбция на sildenafil, но не и на скоростта на резорбция. Поради това не се очаква забавяне в началото на действието на sildenafil след многократен прием на зелен чай Банча.

Също така, не се отчита съществена промяна в плазмения полуживот на sildenafil след прием на ТЕ и КФ от Банча, поради което можем да предположим, че наблюдаваните ефекти не се дължат на повлияване на екскрецията на sildenafil. Повишената бионаличност на sildenafil може да се обясни с повишаване на резорбцията му и/или инхибиране на метаболизма му, вследствие на потискане на активността на ензима CYP3A4 в чревните епителни клетки, който е отговорен за пресистемния метаболизъм на sildenafil на това ниво [6]. Възможно е да се постига инхибиция и на CYP2C9, която да допринесе за наблюдаваните резултати, но не се очаква това да е основната причина, тъй като е установено, че инхибитори на CYP2C9 не повлияват съществено фармакокинетиката на sildenafil при едновременно приложение [386]. В допълнение, главно CYP3A изоформите медираат пресистемния метаболизъм на лекарствата в чревните и чернодробни клетки след перорално приложение, а както споменахме по-рано sildenafil се подлага на значителен first-pass метаболизъм, който е причина за оралната му бионаличност [300, 312]. Предвид големия брой проучвания, които съобщават, че катехините инхибират активността на лекарство-метаболизиращите ензими, можем да предположим, че наблюдаваните ефекти се дължат именно на тези съединения и по-специално на ЕГКГ, който преобладава в ТЕ и КФ. Според някои автори, съдържащите се в зеления чай катехини е по-вероятно да инхибират лекарство-метаболизиращите ензими в чревните клетки, отколкото в хепатоцитите, поради слабата им резорбция и ниска орална бионаличност. Плазмените концентрации на катехините, които се постигат след перорално приложение са значително по-ниски от концентрациите, използвани в редица *in vitro* проучвания, което подкрепя теорията, че концентрацията им в червата е значително по-висока и вероятно това е мястото, където оказват ефект върху активността на цитохромите [51, 69, 222]. Плазмените концентрации на ЕГКГ са пропорционални на приложената доза, но показват висока интериндивидуална вариабилност при проучвания сред здрави доброволци. В допълнение, при проучвания, изследващи ежедневното прилагане на ЕГКГ или екстракт от зелен чай в продължение на до две седмици, почти не се открива натрупване на катехини в кръвната плазма [285]. Следователно, можем да заключим, че инхибирането на CYP3A4 в чревните клетки от катехините намалява пресистемния метаболизъм на sildenafil в чревната стена и обяснява повишената му бионаличност след прием на ТЕ или КФ от зелен чай Банча. Същевременно, според Ikarashi и съавт. (2017) пероралният прием храна, съдържаща 1.5% ЕГКГ води до намалена експресия на CYP3A ензими в черния дроб на мишки. Авторите на проучването предполагат, че ефектът на ЕГКГ върху цитохромите е индиректен, тъй като при перитонеално приложение на ЕГКГ (20.0 mg/kg) не се наблюдава съществена промяна в експресията на CYP3A в хепатоцитите. Авторите обясняват наблюдаваните ефекти с потискащия ефект на ЕГКГ върху растежа на бактерии от род *Clostridium*, част от нормалната бактериална флора, които участват в производството на вторични жлъчни киселини (литохолева киселина, дезоксихолева киселина). При перорален прием на ЕГКГ се наблюдават много ниски концентрации на литохолева и дезоксихолева киселина в дебелото черво на мишки. Тези вторични жлъчни киселини са лиганди за PXR рецептора, който участва в регулиране на експресията на цитохромите и P-gp. Авторите предполагат, че намалените концентрации на литохолева и дезоксихолева киселина в червата ще доведат до по-ниска концентрация на тези жлъчни киселини и в черния дроб, в резултат на което се потиска нуклеарната транслокация на PXR рецептора и се намалява експресията на CYP3A ензими в черния дроб [146].

Докладва се също, че катехините инхибират активността на някои трансмембранни транспортери като OATP1A2, OATP1B1, OATP1B3, OATP2B1, OAT1, OAT2, MATE1, MATE2-K и P-gp, в резултат на което могат да окажат влияние върху резорбцията, разпределението, метаболизма и/или екскрецията на лекарствата [18, 148, 165, 245, 285]. Същевременно, има данни, че sildenafil е субстрат на P-gp и има вероятност ефлуксият транспорт, медиран от този протеин да допринася за ниската орална бионаличност на препарата [66, 137, 148]. Следователно, повишената орална бионаличност на sildenafil след прием на ТЕ и КФ от зелен чай Банча е възможно в известна степен да се дължи на инхибиране на активността на P-gp в чревните клетки, в резултат на което да се намалява чревния ефлукс на sildenafil и да се повиши степента на резорбция. Все пак, поради значително намаления клирънс на sildenafil при едновременен прием с ТЕ и КФ считаме, че повишаването на степента на резорбция на sildenafil не е основната причина за наблюдаваното нарастване в плазмената концентрация на лекарството.

Получените от нас резултати са в съответствие с докладваните от Negazy и сътрудници (2014). Все пак, резултатите не могат да бъдат сравнявани, тъй като проучванията са проведени при различни биологични видове, при различен режим на дозиране на зеления чай, както и прием на зелен чай с различно съдържание на БАВ. Също така, получените резултати са в съответствие с тези, публикувани от други автори относно влиянието на екстракта от зелен чай и/или ЕГКГ върху фармакокинетиката на лекарства, субстрати на CYP3A4 при плъхове. Misaka и съавт. (2013) съобщават, че екстракт от зелен чай (400.0 mg/kg) повишава AUC_{0-6} и C_{max} на simvastatin при плъхове, вероятно поради потискане на интестиналния му метаболизъм от CYP3A4 и на чревния ефлукс от P-gp [222]. При няколко проучвания се наблюдава повишаване на бионаличността на калциеви блокери и tamoxifen след прием на ЕГКГ при плъхове, като се предполага отново инхибиция на чревния метаболизъм на лекарствата от CYP3A4 и/или на чревния ефлукс от P-gp [18, 65, 71, 132, 188]. В допълнение, в цитираните проучвания, при които се проследява фармакокинетиката на verapamil, diltiazem и nicardipine при плъхове, прилаганите дози на ЕГКГ са в диапазона от 1.0 до 10.0 mg/kg и са близки до дозата на ЕГКГ, която получават експерименталните животни чрез приложението на ТЕ и КФ от зелен чай Банча в настоящата работа.

Влиянието на многократното приложение на зелен чай върху фармакокинетиката на simvastatin е изследвано и в две проучвания при здрави доброволци, като крайният резултат е повишаване на AUC_{0-6} на активния метаболит на simvastatin (simvastatinic acid), но незначително повишаване на AUC_{0-6} на simvastatin. Въпреки това са наблюдавани големи вариации във фармакокинетиката на simvastatin при отделните индивиди и при двете проучвания. Предположенията на авторите относно механизма, по който възниква взаимодействието са потискане на CYP3A4-медириания интестинален метаболизъм и/или на чревния ефлукс от P-gp [345]. Още повече, докладван е случай на двукратно повишаване на плазмените концентрации на tacrolimus след прием на зелен чай при пациент с бъбречна трансплантация, но авторите не уточняват количеството на зелен чай, което е приемано, нито неговият състав [330, 345]. Същевременно, Abdelkawy и сътрудници (2020) съобщават, че екстрактът от зелен чай понижава бионаличността на atorvastatin, лекарство субстрат на CYP3A4, при хора. Вероятната причина според авторите е инхибиция на OATP1A2 транспортера в СЧТ и намаляване на чревната резорбция на atorvastatin [5]. Редица проучвания докладват, че се наблюдава понижаване на оралната бионаличност на определени медикаменти (nadolol, rosuvastatin, imatinib, digoxin и други) след прием на екстракт от зелен

чай и/или ЕГКГ и посочват като най-вероятна причина инхибирането на транспортни протеини от SLC- или ABC-суперфамилията, които вземат участие в резорбцията на лекарствата [76, 162, 163, 223, 224]. От друга страна, в резултат на едновременната употреба на тирозин киназния инхибитор sunitinib, субстрат на CYP3A4 с ЕГКГ се понижава плазмената концентрация на противотуморния препарат. Авторите на проучването предполагат, че се образува комплекс между двете съединения, в резултат на което се намалява степента на резорбция на sunitinib [108].

В заключение, за изясняване на механизма, отговорен за наблюдаваните взаимодействия са необходими допълнителни изследвания. На база на знанията, с които разполагаме към момента относно докладваната инхибиция на катехините върху активността на CYP3A4 и P-gp, както и участието на тези протеини съответно в метаболизма и чревния ефлукс на sildenafil, предполагаме, че най-вероятната причина за повишената плазмена концентрация на sildenafil при плъхове е инхибиране на активността на CYP3A4 в чревните клетки и/или на чревния ефлукс от P-gp. Още повече, съдържанието на ЕГКГ, смятан за най-активният катехин, в ТЕ и КФ е много близко, както и наблюдаваните промени в стойностите на фармакокинетичните параметри на sildenafil в двете групи също са близки.

4.2.3. Промени във фармакокинетиката на sildenafil при многократно приложение на МФ от зелен чай Банча

Изолираната МФ съдържа предимно кофеин, поради което приемаме, че той е основното активно вещество, отговорно за наблюдаваните ефекти. При ежедневното приложение на напитки, съдържащи кофеин се постигат по-високи плазмени концентрации на кофеин, отколкото при еднократен прием и се наблюдава натрупване на неговия основен фармакологично активен метаболит (параксантин), който вероятно допринася за фармакологичните ефекти на кофеин, както и за развитието на толеранс и синдром на отнемането [81, 147].

Метилксантиновата фракция, приложена многократно преди приема на sildenafil води до повишаване на C_{max} , AUC_{0-3} и AUC_{0-inf} на sildenafil и намалява Vz/F и Cl/F , в сравнение с групата, която приема единствено sildenafil. Стойностите на фармакокинетичните параметри на sildenafil в групата, която приема МФ са близки до тези, наблюдавани след приложение на ketoconazole. Наблюдаваните резултати могат да се обяснят с инхибиране на CYP450 ензимите, участващи в метаболизма на sildenafil и са в съответствие с наблюдаваната *in vitro* инхибиция на CYP3A4 от МФ, изолирана от зелен чай Банча. Биотрансформацията на sildenafil при мъжки плъхове се медуира главно от CYP3A4 и CYP2C11 [194, 341]. Същевременно се съобщава, че ензимите CYP1A2, CYP2C11 и CYP3A4 участват в метаболизма на кофеин при плъхове [169, 170]. В допълнение, кофеинът се подлага на сходни метаболитни процеси при хора и гризачи, но въпреки това има някои количествени разлики по отношение на метаболитите, които се получават. При хора, кофеинът се подлага основно на N-деметиране до параксантин, теобромин и теофилин, като много малка част от дозата се подлага на C-8 хидроксиране (около 6 %). При гризачи около 40 % от приетия кофеин се подлага на C-8 хидроксиране до триметилкови производни, а също основните продукти от N-деметирането са теофилин и теобромин [52]. Предвид участието на едни и същи лекарство-метаболизиращи ензими в метаболизма на sildenafil и кофеин, който преобладава в приложената МФ е възможно двете лекарствени вещества да се конкурират за един и същ ензим (CYP3A4 и/или CYP2C11), а това може да доведе до потискане на биотрансформацията

на sildenafil. В литературата има данни, че екстрактът от зелен чай, както и катехините инхибират активността на CYP3A4, CYP2D6, P-gp, органичните анионни транспортери и други, но се открива твърде малко информация за въздействието на метилксантините върху тези ензими и транспортери [18, 165]. Едно проучване съобщава, че екстракт от зелен чай без съдържание на кофеин е малко вероятно да повлияе фармакокинетиката на лекарства субстрати на CYP3A4 и CYP2D6, което подкрепя предположението, че кофеинът може да модулира активността на CYP3A4, както и да допринесе за докладваната инхибиция на цитохромите от екстракта от зелен чай [246].

Друго възможно обяснение за повишените плазмени нива на sildenafil е потискане на активността на трансмембранни транспортери, участващи в резорбцията му. Както беше споменато, има данни, че sildenafil е субстрат на P-gp. Кофеин обаче не е субстрат на P-gp, поради което не се очаква да взаимодейства с него и да инхибира активността му [288]. В допълнение, повишаването на степента на резорбция на sildenafil също може да доведе до повишена орална бионаличност, но предвид наблюдаваните промени в клирънса не считаме, че това е основната причина за наблюдаваните ефекти.

Метилксантините водят и до увеличаване на T_{max} на sildenafil, което вероятно е свързано с намаляване на скоростта на резорбция на sildenafil. Получените резултати са в съответствие с публикуваните данни от Halim и сътрудници (2013), които разработват орално дезинтегриращи се таблетки, съдържащи sildenafil citrate, с цел постигане на по-висока бионаличност и намаляване на T_{max} на sildenafil. След избора на подходящ състав на лекарствената форма, авторите прибавят и кофеин, с което целят да се избегне понижаването на кръвното налягане след прием на sildenafil. Те изследват фармакокинетиката на произведените дезинтегриращи таблетки, съдържащи sildenafil или sildenafil плюс кофеин след еднократен прием при шест здрави доброволци като сравняват изчислените фармакокинетичните параметри на sildenafil с тези, след прием на търговския продукт за перорално приложение Viagra[®]. От публикуваните резултати прави впечатление, че след прием на лекарствена форма, съдържаща sildenafil плюс кофеин се отчита малко по-висока стойност на T_{max} (0.88 ± 0.12), в сравнение с тази, изчислена след прием на таблетка, съдържаща единствено sildenafil citrate (0.63 ± 0.10) [131]. Удължаването на T_{max} би могло да се обясни с образуване на комплекс между sildenafil и кофеин или друг компонент, съдържащ се в изолираната МФ, както и чрез забавяне на стомашното изпразване, което обикновено води до забавяне на резорбцията на лекарствата. Кофеинът може да намали резорбцията на лекарствата, чрез комплексообразуване предимно с лекарствени вещества, притежаващи киселинни свойства чрез образуване на водородни връзки или дипол-дипол взаимодействия. В настоящия опит обаче вероятността за образуване на комплекс е малка, предвид наблюдаваните промени в останалите фармакокинетични параметри на sildenafil (C_{max} , AUC, Cl/F). По отношение на стомашното изпразване, има данни, че кафето ускорява стомашното изпразване и може да повиши скоростта на резорбция на лекарствата. В клинично проучване е установено, че кофеинът повишава бионаличността на felodipine, като авторите предполагат, че това може да се дължи на повишаване на скоростта на изпразване на стомаха [44]. Същевременно, Gounaris и съавт. (2020) наблюдават, че при новородени кофеин значително забавя времето за изпразване на стомаха [123]. Забавяне в стомашното изпразване под действие на кофеин е наблюдавано и при новородени плъхове [343]. Откриват се редица проучвания, които изследват ефекта на кафето върху СЧТ, но информацията относно ефекта на кофеина върху стомашното изпразване е ограничена. Следователно, промяната в скоростта

на изпразване на стомаха под действие на кофеин не може да се изключи като вероятна причина за удължаване на T_{max} на sildenafil в проведения експеримент.

В заключение, на база на изчислените фармакокинетични параметри на sildenafil след едновременно приложение с МФ, изолирана от зелен чай Банча при плъхове, считаме че най-вероятната причина за повишените плазмени нива на лекарството е модулиране на лекарство-метаболизиращите ензими, участващи в биотрансформацията на sildenafil при плъхове.

4.3. Влияние на еднократния прием на МФ от зелен чай Банча върху фармакокинетиката на sildenafil

По време на опита животните приемат еднократни дози от приложените субстанции през 30-минутен интервал от време. Експериментът е проведен с цел да се оцени влиянието на еднократна доза метилксантини, изолирани от Банча върху фармакокинетичните параметри на sildenafil. Ketoconazole отново е използван като положителна контрола.

4.3.1. Определяне на използваните дози в настоящия експеримент

При този експеримент sildenafil е приложен в по-висока доза, поради значително по-ниската орална бионаличност, по-кратък плазмен полуживот и по-висок метаболитен клирънс при мъжки плъхове в сравнение с хора. Оралната бионаличност при мъжки плъхове е ~ 15 %, докато при хора е около 40 %. Дозата от 60.0 mg/kg е максималната безопасна доза на sildenafil при плъхове, определена в токсикологични проучвания. Тази доза е предпочетена с цел да се постигнат по-високи плазмени концентрации, които могат да бъдат открити и проследени, предвид сравнително ниските плазмени концентрации на sildenafil, които бяха детектирани в предходния опит [4, 333].

Кетоконазол и метилксантиновата фракция са приложени като еднократни дози от съответно 10.0 mg/kg и 5.7 mg/kg т. т., подобно на предишния опит.

4.3.2. Промени във фармакокинетиката на sildenafil при еднократно приложение на МФ от зелен чай Банча

Фармакокинетичните параметри на sildenafil след едновременен прием с метилксантини са сравнени с тези, наблюдавани след самостоятелно приложение на sildenafil и след едновременната му употреба с ketoconazole. Еднократната доза от МФ води до незначително намаляване на C_{max} на sildenafil и до статистически значимо намаляване на AUC_{0-6} и AUC_{0-inf} , в сравнение с контролната група. Еднократният прием на ketoconazole води до статистически значимо увеличаване на C_{max} , AUC_{0-6} и AUC_{0-inf} на sildenafil, както се очакваше и беше докладвано по-рано [287]. Наблюдаваното понижаване в плазмените нива на sildenafil може да се дължи на няколко причини. Възможно е степента на резорбция на sildenafil да е намалена под действие на МФ и по-специално от съдържащия се кофеин. Кофеинът стимулира секрецията на стомашен сок с висока киселинност и намалява стомашното рН, което може да повлияе резорбцията на лекарства слаби бази, като например midazolam [44, 154]. Същевременно, sildenafil се прилага под формата на sildenafil citrate, който представлява слаба база, поради което има вероятност неговата резорбция да бъде намалена при понижаване на стомашното рН, подобно на midazolam [16]. От друга страна, както беше споменато, разтворимостта на sildenafil citrate в СЧТ е рН зависима, следователно може да варира, вследствие на промени в стомашната киселинност. Намалените стойности на АУС и C_{max} , едновременно с ускоряване на клирънса на sildenafil сочат за евентуално влияние на МФ върху процеса на елиминиране на sildenafil. Възможна причина за по-ниската орална

бионаличност на лекарството е ензимната индукция. Съобщава се, че кофеин може да индуцира експресията на CYP1A2 и сулфотрансферазите при плъхове [327, 341, 370]. От друга страна, няма налични данни за въздействието на тези ензими върху метаболизма на sildenafil. Следователно няма основание да се счита, че наблюдаваните резултати се дължат на индукция на лекарство-метаболизиращите ензими. Освен това, както беше споменато, индукцията на лекарство-метаболизиращите ензими е процес, който обикновено се реализира след продължителен прием на веществото-индуктор, за разлика от инхибицията. От друга страна, sildenafil е лекарство, което се метаболизира почти изцяло в черния дроб. Следователно, намалената плазмена концентрация на sildenafil може да се обясни с фактът, че кофеин повишава сърдечната честота и кръвното налягане и може също да увеличи сърдечния дебит, което води до повишен приток на кръв към черния дроб, а това е предпоставка за ускорена биотрансформация на лекарствата [356]. Sildenafil е лекарство с междинен към висок коефициент на екстракция, следователно неговият клирънс ще се увеличи с повишаването на чернодробния кръвоток и следователно плазмените му концентрации ще се понижат [215]. Получените от нас резултати са в съответствие с тези, докладвани от Abdulla и сътрудници (2018), които проучват влиянието на еднократен прием от енергийната напитка Red Bull® върху фармакокинетиката на sildenafil при плъхове. Авторите наблюдават значително намаляване на плазмените нива на sildenafil, когато е приложен едновременно с Red Bull®. Едни от основните съставки на тази енергийна напитка са кофеин и таурин. Според авторите на проучването, взаимодействието може да възникне на всяко фармакокинетично ниво, но има голяма вероятност да се дължи на ускорен метаболизъм на sildenafil от таурин, за който има данни, че индуцира активността на CYP3A4 и/или кофеин, който повишава чернодробния кръвоток [7]. Предположението за индукция на цитохромите от таурин обаче е в противоречие с наличната информация, относно времето, необходимо за да се повиши експресията на лекарство-метаболизиращите ензими, тъй като в проучването енергийната напитка е приета единствено два пъти – на предния ден преди проучването и в деня на проучването, едновременно със sildenafil. В допълнение, кофеинът повишава гломерулното налягане и може да доведе до повишена бъбречна екскреция на лекарствата [44].

Възможно ограничение на проведените опити може да бъде вариабилността във фармакокинетиката на лекарствата между хора и плъхове [237, 319, 337]. Въпреки потенциалните разлики между видовете, се съобщава, че плъховете са подходящ модел за изследване на фармакокинетиката на sildenafil, чиято биотрансформация се осъществява главно от CYP3A и CYP2C изоформите при хора и плъхове. Изоформите на тези ензими са много сходни при двата вида и показват повече от 70 % хомоложност. Освен това, основният метаболит на sildenafil е един и същ при хора и при плъхове [35, 293]. Следователно, получените резултати трябва да се вземат предвид, когато се обмисля едновременното приложение на sildenafil със зелен чай, кафе, фитопрепарати, съдържащи екстракт от зелен чай, ЕГКГ или кофеин.

В обобщение, наблюдавани са взаимодействия при плъхове, когато sildenafil се прилага след продължителен прием на ТЕ, КФ и МФ от японски зелен чай Банча, както и когато sildenafil се приема след еднократна доза МФ. Според нас, наблюдаваните промени във фармакокинетичните параметри на sildenafil се дължат главно на действието на ЕГКГ, съдържащ се в ТЕ и КФ и на кофеин, който е основният компонент в МФ. Не може да се изключи и възможността кофеин да допринася за ефектите, наблюдавани при прием на ТЕ и КФ от Банча и sildenafil, както и потенциалното влияние на други компоненти, съдържащи се

в ТЕ, КФ и МФ. В допълнение, наблюдаваните промени в C_{max} , AUC_{0-t} и AUC_{0-inf} на sildenafil показват, че продължителността на приема на метилксантини и по-специално кофеин може да бъде от съществено значение за фармакокинетиката на лекарството. Необходими са обаче допълнителни *in vivo* проучвания, за да се изясни механизмът, лежащ в основата на наблюдаваните взаимодействия, както и да се оцени рискът от настъпване на описаните взаимодействия при хора. Освен това, при проведените от нас опити се проследява промяната във фармакокинетиката на еднократна доза sildenafil, а трябва да се има предвид, че sildenafil в някои случаи се дозира ежедневно за продължителен период от време. Следователно, трябва да се проучи и възможността за потенциални взаимодействия, когато и sildenafil и зеленият чай/ кафе/ екстракт от зелен чай се приемат многократно. В заключение, на база на натрупаните към момента знания се препоръчва да се избягва едновременната употреба на sildenafil с напитки като зелен чай и кафе, както и с фитопрепарати, които съдържат големи количества екстракт от зелен чай, ЕГКГ и кофеин.

5. Разработване на ФБФК модели

Разработването на ФБФК модели при растителни екстракти е от изключителна трудност и представлява огромно предизвикателство за изследователите. Причините за това са, че тези екстракти съдържат много голям набор от БАВ (понякога повече от 200), които могат да взаимодействат помежду си и/или с други едновременно прилагани лекарства, както фармакокинетично, така и фармакодинамично [1]. Идеята да предприемем това предизвикателство беше, да оценим риска за потенциални взаимодействия между sildenafil и екстракти от зелен чай при хора. При проведените симулации са използвани високи дози от КФ и МФ, които могат да се набавят с прием на хранителни добавки, съдържащи съответно катехини и метилксантини, но не и с чаша чай. Употребата на катехини и кофеин под форма на фитопрепарати е широко разпространена, поради множеството им полезни ефекти, които бяха разгледани по-горе. Симулациите са проведени при виртуална популация от здрави доброволци, мъже на възраст от 60 до 65 години, тъй като употребата на sildenafil е по-честа сред мъжете на тази възраст във връзка с основната му индикация – еректилна дисфункция [234]. При проведените симулации са използвани механистично-статичен и механистично-динамичен минимален ФБФК модели, които са вградени в Simsur® софтуера.

Консенсус приет, през 2001 година, определя отнасянето на лекарствените взаимодействия към три групи, според съотношението между стойностите на AUC на лекарството (AUCR) в присъствие и отсъствие на инхибитор:

- ❖ $AUCR > 2$ – висок риск от лекарствени взаимодействия;
- ❖ $1.1 < AUCR < 2$ – умерен риск от лекарствени взаимодействия;
- ❖ $AUCR < 1.1$ – нисък риск от лекарствени взаимодействия [322].

Въз основа на този консенсус, резултатите от механистично-статичните симулации при самостоятелното приложение на КФ и при приложение на комбинации от КФ и МФ показват умерен риск от лекарствени взаимодействия. Причините за това са, че при статичните модели се отчита възможно най-лошият сценарий – вземат се най-високите постижими стойности на плазмени концентрации при симулираните взаимодействия, без да се отчитат динамичните промени в тях. Много често, поради това, се стига до надценяване на възможен риск от лекарствени взаимодействия [260, 280]. Все пак, трябва да се има предвид, че при конструиране на тези модели са направени множество допускания и са използвани фармакокинетичните параметри на ЕГКГ и кофеин, като основни представители съответно на

КФ и МФ. Както знаем обаче, тези фракции съдържат и други компоненти, които също биха могли да допринесат за възникване на взаимодействия, а в случая не са взети предвид.

Установяването на умерен риск (чрез механистично-статичния модел) за поява на взаимодействие при едновременен прием на sildenafil с КФ или с комбинация от КФ и МФ посредством проведените симулации, едновременно с резултатите от проучванията при опитни животни, налагат прилагането им с повишено внимание при пациентите и внимателното им мониториране за избягване на сериозни нежелани лекарствени реакции. Провеждането на допълнителни изследвания *in vivo* ще допринесе за изясняване на механизмите, отговорни за наблюдаваните взаимодействия.

VII. ИЗВОДИ

В резултат от проведените изследвания в настоящия дисертационен труд могат да бъдат направени следните изводи:

1. Изолиране на ТЕ, КФ и МФ от японски зелен чай Банча

- ❖ Чрез приложените методи за екстракция на ТЕ, КФ и МФ е постигнат задоволителен процентен добив, предвид вида на използваните чаени листа и докладваното по-ниско съдържание на БАВ.

2. Качествено и количествено определяне на изолираните ТЕ, КФ и МФ от японски зелен чай Банча

- ❖ Изолираният ТЕ от зелен чай Банча съдържа по-малко количество ЕГКГ и кофеин, в сравнение с други видове зелен чай.
- ❖ Разработеният метод за определяне на ЕГКГ, (+)-катехин, галова киселина и кофеин би могъл да се приеме като подходящ за анализ и на други видове зелен чай, в които се очаква съдържанието на четирите вещества.
- ❖ Чрез приложените методи за екстракция на КФ и МФ се постига по-високо процентно съдържание съответно на катехини и метилксантини в получените фракции, в сравнение с тоталния воден екстракт от зелен чай Банча.

3. Качествено и количествено определяне на sildenafil в биологични проби

- ❖ Разработеният течнохроматографски метод за анализ на sildenafil се характеризира с висока аналитична надеждност и чувствителност.
- ❖ Методът на протеинна преципитация е подходящ за екстрахиране на sildenafil от плазмени проби, като извлича над 93.0 % от съдържания се sildenafil.
- ❖ Представеният HPLC-UV метод, както и методът за пробоподготовка чрез протеинна преципитация могат да бъдат използвани в рутинната практика за качествено и количествено определяне на sildenafil в плазмени проби.

4. Фармакокинетични проучвания при опитни животни

- ❖ Екстрактът от зелен чай Банча оказва съществено влияние върху фармакокинетиката на sildenafil при плъхове, въпреки по-ниското съдържание на катехини и кофеин, в сравнение с други видове зелен чай.
- ❖ При **многократно** приложение на ТЕ или КФ от зелен чай Банча се наблюдава повишаване на плазмените концентрации на sildenafil при плъхове.
- ❖ В зависимост от продължителността на приложение на МФ, изолирана от зелен чай Банча се наблюдават различни промени във фармакокинетичните параметри на sildenafil при плъхове – при **еднократно** приложение е установено понижаване на плазмените концентрации на лекарството, а при **многократно** приложение се отчита увеличаване на плазмените нива.

5. Разработване на ФБФК модели

- ❖ При прием на sildenafil едновременно с екстракт от зелен чай, ЕГКГ или кофеин съществува известен риск за възникване на фармакокинетично взаимодействие при

хора. Необходимо е да се проведат допълнителни проучвания за оценка на потенциалните взаимодействия между sildenafil и зелен чай при хора, както и да се изяснят механизмите, отговорни за възникването им.

- ❖ На база на натрупаните към момента знания се препоръчва едновременната употреба на екстракт от зелен чай, ЕГКГ или кофеин със sildenafil, както и с други субстрати на СУР3А4 да се извършва след консултиране и мониториране на пациентите за поява на потенциални взаимодействия.

VIII. ПРИНОСИ

ПРИНОСИ С ОРИГИНАЛЕН ХАРАКТЕР:

- ❖ За пръв път в България са изолирани и анализирани ТЕ, КФ и МФ от японски зелен чай Банча.
- ❖ За пръв път е проведено фармакокинетично проучване и е доказано влиянието на **многократното** приложение на ТЕ, КФ и МФ от японски зелен чай Банча върху плазмените концентрации на sildenafil при експериментални животни, с цел оценка на потенциални взаимодействия.
- ❖ За пръв път е проведено фармакокинетично проучване и е доказано влиянието на **еднократното** приложение на МФ от японски зелен чай Банча върху плазмените концентрации на sildenafil при експериментални животни, с цел оценка на потенциални взаимодействия.
- ❖ За пръв път са разработени и приложени статичен и динамичен ФБФК модели за предсказване на потенциални взаимодействия между sildenafil и КФ или МФ от зелен чай, както самостоятелно, така и при комбинирано приложение, при хора.

ПРИНОСИ С НАУЧНО-ПРИЛОЖЕН ХАРАКТЕР:

- ❖ Разработен и валидиран е селективен и надежден HPLC-UV метод за качествено и количествено определяне на ЕГКГ, (+)-катехин, галова киселина и кофеин в проби от японски зелен чай Банча. Предложеният аналитичен подход може да бъде използван при анализа на други видове чай, както и на други растителни екстракти, в които се предполага, че се съдържат посочените съединения.
- ❖ Разработен и валидиран е чувствителен и надежден HPLC-UV метод за качествено и количествено определяне на sildenafil в плазмени проби от експериментални животни. Предложеният аналитичен метод може да бъде използван при анализа на sildenafil в здравни заведения или други институции, където се провежда анализ на лекарствени средства в биологични проби.

ПРИНОСИ С ПОТВЪРДИТЕЛЕН ХАРАКТЕР:

- ❖ Потвърдено е по-ниското количествено съдържание на ЕГКГ и кофеин в зеления чай Банча.
- ❖ Потвърдена е ефикасността на протеинната преципитация в подготовката на плазмени проби от експериментални животни, третиран с sildenafil.

IX. СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИТЕ И УЧАСТИЯТА, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

ПУБЛИКАЦИИ В НАУЧНИ СПИСАНИЯ

1. **Radeva-Ilieva M**, Stoeva S, Hvarchanova N, Zhelev I, Georgiev KD. Influence of methylxanthines isolated from Banча green tea on the pharmacokinetics of sildenafil in rats. *DARU J. Pharm. Sci.* 2022 Feb. doi:10.1007/s40199-022-00433-z (IF: 3.117)
2. **Radeva-Ilieva MP**, Georgiev KD, Hvarchanova NR, et al. Protective effect of methylxanthine fractions isolated from Banча tea leaves against doxorubicin-induced cardio- and nephrotoxicities in rats. *Biomed Res Int.* 2020 Aug; 2020: 4018412. doi:10.1155/2020/4018412 (IF: 2.276)
3. **Радева-Илиева М**, Георгиев К. Приложение на физиологично-базирания фармакокинетичен (ФБФК) модел в предсказването на лекарствени взаимодействия. *Годишник по болнична фармация.* 2020 Окт; 6(1): 25-32.

УЧАСТИЯ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД, ПРЕДСТАВЕНИ НА НАЦИОНАЛНИ И МЕЖДУНАРОДНИ ФОРУМИ

1. **Radeva-Ilieva, M.**, Georgiev, K. Potential drug-drug and herb-drug interactions of PDE5 inhibitors. 11-th South-East European Conference on Chemotherapy, Infections and Cancer and 31st Annual Assembly of the International Medical Association Bulgaria (IMAB), 28-31 October 2021 (poster)
2. Михалев, К., **Радева-Илиева, М.**, Стоева, С., Хвърчанова, Н., Желев, И., Георгиев, К. Литературен обзор на потенциалните взаимодействия между зелен чай и лекарства. Седми Варненски Фармацевтичен Бизнес Форум, 22-23 Октомври 2021 (постер)
3. Кирилова, С., **Радева-Илиева, М.**, Стоева, С., Хвърчанова, Н., Желев, И., Георгиев, К. HPLC-UV анализ на различни екстракти от зелен чай Банча. Седми Варненски Фармацевтичен Бизнес Форум, 22-23 Октомври 2021 (постер)

X. УЧАСТИЕ В НАУЧНИ ПРОЕКТИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

- 1.** „Фармакологично проучване на метилксантинова фракция, изолирана от зелен чай“, 2020 г. – днес
Научен ръководител на проекта: Доц. Калоян Георгиев, д.ф.н.
Институционално финансиране: Фонд „Наука“ към Медицински Университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“, гр. Варна
- 2.** „Проучване на лекарствени взаимодействия на ниво биотрансформация“, 2016 г. – 2019 г.
Научен ръководител на проекта: Доц. Калоян Георгиев, д.ф.н.
Институционално финансиране: Фонд „Наука“ към Медицински Университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“, гр. Варна

XI. БИБЛИОГРАФИЯ

1. Георгиев КД. *Идентификация, анализ и оценка на фармакокинетични и фармакодинамични лекарствени взаимодействия*. [Дисертационен труд]. Варна, България: Университетско издателство, Медицински университет – Варна; 2019.
2. Гетова ВИ. *Регулаторни и практически аспекти на участието на пациентите в проследяването на лекарствената безопасност* [Дисертационен труд]. Пловдив, България: Университетско издателство, Медицински университет – Пловдив; 2018.
3. Радева-Илиева М, Георгиев К. Приложение на физиологично-базирания фармакокинетичен (ФБФК) модел в предсказването на лекарствени взаимодействия. *Годишник по болнична фармация*. 2020 Окт; 6(1): 25-32.
4. Abbott D, Comby P, Charuel C, et al. Preclinical safety profile of sildenafil. *Int J Impot Res*. 2004 Dec; 16(6): 498-504. doi:10.1038/sj.ijir.3901232
5. Abdelkawy KS, Abdelaziz RM, Abdelmageed AM, Donia AM, El-Khodary NM. Effects of Green tea extract on atorvastatin pharmacokinetics in healthy volunteers. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*. 2020 Jun; 45(3): 351-360. doi:10.1007/s13318-020-00608-6
6. Abdelkawy KS, Donia AM, Turner RB, Elbarbry F. Effects of lemon and seville orange juices on the pharmacokinetic properties of sildenafil in healthy subjects. *Drugs R D*. 2016 Sep; 16(3): 271-278. doi:10.1007/s40268-016-0140-1
7. Abdulla M, Mallah E, Abu Dayyih W, et al. Influence of energy drinks on pharmacokinetic parameters of sildenafil in rats. *Biomedical and Pharmacology Journal*. 2018 Aug; 11: 1317-28. doi:10.13005/bpj/1494
8. Abo-Salem E, Fowler JC, Attari M, et al. Antibiotic-induced cardiac arrhythmias. *Cardiovasc Ther*. 2014 Feb; 32(1): 19-25. doi:10.1111/1755-5922.12054
9. Adiwidjaja J, Boddy AV, McLachlan AJ. Physiologically based pharmacokinetic modelling of hyperforin to predict drug interactions with St John's Wort. *Clin Pharmacokinet*. 2019 Jul; 58(7): 911-926. doi:10.1007/s40262-019-00736-6
10. Agbabiaka TB, Wider B, Watson LK, Goodman C. Concurrent use of prescription drugs and herbal medicinal products in older adults: A Systematic Review. *Drugs Aging*. 2017 Dec; 34(12): 891-905. doi:10.1007/s40266-017-0501-7
11. Agbabiaka TB, Wider B, Watson LK, Goodman C. Concurrent use of prescription drugs and herbal medicinal products in older adults: a systematic review protocol. *Syst Rev*. 2016 Apr; 5: 65. doi: 10.1186/s13643-016-0244-2
12. Ahmad A, Singhal U, Hossain MM, Islam N, Rizvi I. The role of the endogenous antioxidant enzymes and malondialdehyde in essential hypertension. *J Clin Diagn Res*. 2013 Jun; 7(6): 987-990. doi:10.7860/JCDR/2013/5829.3091
13. Ahmed S, Griffin TS, Kraner D, et al. Environmental factors variably impact tea secondary metabolites in the context of climate change. *Front Plant Sci*. 2019 Aug; 10: 939. doi:10.3389/fpls.2019.00939
14. Ai Z, Liu S, Qu F, Zhang H, Chen Y, Ni D. Effect of stereochemical configuration on the transport and metabolism of catechins from Green tea across caco-2 monolayers. *Molecules*. 2019 Mar; 24(6): 1185. doi:10.3390/molecules24061185
15. Aidman E, Balin M, Johnson K, et al. Caffeine may disrupt the impact of real-time drowsiness on cognitive performance: a double-blind, placebo-controlled small-sample study. *Scientific reports*. 2021 Feb; 11(1): 4027. doi:10.1038/s41598-021-83504-6

16. Akula P, PK L. Effect of pH on weakly acidic and basic model drugs and determination of their ex vivo transdermal permeation routes. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2018 Jul; 54(2). doi:10.1590/s2175-97902018000200070
17. Al Reef T, Ghanem E. Caffeine: Well-known as psychotropic substance, but little as immunomodulator. *Immunobiology*. 2018 Dec; 223(12): 818-825. doi:10.1016/j.imbio.2018.08.011
18. Albassam AA, Markowitz JS. An appraisal of drug-drug interactions with Green tea (*Camellia sinensis*). *Planta Med*. 2017 Apr; 83(6): 496-508. doi:10.1055/s-0043-100934
19. Alemdaroglu NC, Dietz U, Wolfram S, Spahn-Langguth H, Langguth P. Influence of green and black tea on folic acid pharmacokinetics in healthy volunteers: potential risk of diminished folic acid bioavailability. *Biopharm Drug Dispos*. 2008 Sep; 29(6): 335-348. doi:10.1002/bdd.617
20. Al-Ghazawi MA, Tutunji MS, AbuRuz SM. The effects of pummelo juice on pharmacokinetics of sildenafil in healthy adult male Jordanian volunteers. *Eur J Clin Pharmacol*. 2010 Feb; 66(2): 159-163. doi:10.1007/s00228-009-0738-0
21. Al-Hroub H, Alkhawaja B, Alkhawaja E, Arafat T. Sensitive and rapid HPLC-UV method with back-extraction step for the determination of sildenafil in human plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2016 Jan; 1009-1010: 1-6. doi:10.1016/j.jchromb.2015.11.059
22. Ali Y, Shams T, Wang K, et al. The involvement of human organic anion transporting polypeptides (OATPs) in drug-herb/food interactions. *Chin Med*. 2020 Jul; 15: 71. doi:10.1186/s13020-020-00351-9
23. Al-Mohizea AM, Ahad A, El-Maghraby GM, Al-Jenoobi FI, AlKharfy KM, Al-Suwayeh SA. Effects of *Nigella sativa*, *Lepidium sativum* and *Trigonella foenum-graecum* on sildenafil disposition in beagle dogs. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*. 2015 Jun; 40(2): 219-224. doi:10.1007/s13318-014-0199-4
24. Altaf F, Wu S, Kasim V. Role of fibrinolytic enzymes in anti-thrombosis therapy. *Front Mol Biosci*. 2021 May; 8: 680397. doi:10.3389/fmolb.2021.680397
25. Amadi CN, Mgbahurike AA. Selected food/herb-drug interactions: Mechanisms and clinical relevance. *Am J Ther*. 2018 Jul/Aug; 25(4): e423-e433. doi:10.1097/MJT.0000000000000705
26. Amadi CN, Nwachukwu WI. The effects of oral administration of *Cola nitida* on the pharmacokinetic profile of metoclopramide in rabbits. *BMC Pharmacol Toxicol*. 2020 Jan; 21(1): 4. doi:10.1186/s40360-019-0379-6
27. Andersson KE. PDE5 inhibitors - pharmacology and clinical applications 20 years after sildenafil discovery. *Br J Pharmacol*. 2018 Jul; 175(13): 2554-2565. doi:10.1111/bph.14205
28. Andreeva EY, Dimitrenko SG, Zolotov YA. Methylxanthines: Properties and determination in various objects. *Russian Chemical Reviews*. 2012 May; 81(5): 397-414. doi:10.1070/RC2012v081n05ABEH004220
29. Arji G, Safdari R, Rezaeizadeh H, Abbassian A, Mokhtaran M, Hossein Ayati M. A systematic literature review and classification of knowledge discovery in traditional medicine. *Comput Methods Programs Biomed*. 2019 Jan; 168: 39-57. doi:10.1016/j.cmpb.2018.10.017
30. Arnaud MJ. Pharmacokinetics and metabolism of natural methylxanthines in animal and man. *Handb Exp Pharmacol*. 2011; (200): 33-91. doi:10.1007/978-3-642-13443-2_3

31. Atsbeha BW, Kebede BT, Birhanu BS, Yimenu DK, Belay WS, Demeke CA. The weekend drug; Recreational use of sildenafil citrate and concomitant factors: A cross-sectional study. *Front Med (Lausanne)*. 2021 Aug; 8: 665247. doi:10.3389/fmed.2021.665247
32. Awortwe C, Bouic PJ, Masimirembwa CM, Rosenkranz B. Inhibition of major drug metabolizing CYPs by common herbal medicines used by HIV/AIDS patients in Africa--implications for herb-drug interactions. *Drug Metab Lett*. 2014 Jul; 7(2): 83-95. doi:10.2174/1872312808666140129123210
33. Awortwe C, Bruckmueller H, Cascorbi I. Interaction of herbal products with prescribed medications: A systematic review and meta-analysis. *Pharmacol Res*. 2019 Mar; 141: 397-408. doi:10.1016/j.phrs.2019.01.028
34. Azambuja JH, Mancuso RI, Via FID, Torello CO, Saad STO. Protective effect of green tea and epigallocatechin-3-gallate in a LPS-induced systemic inflammation model. *J Nutr Biochem*. 2022 Mar; 101: 108920. doi:10.1016/j.jnutbio.2021.108920
35. Bae SH, Bae SK, Lee MG. Effect of hepatic CYP inhibitors on the metabolism of sildenafil and formation of its metabolite, N-desmethylsildenafil, in rats in vitro and in vivo. *J Pharm Pharmacol*. 2009 Dec; 61(12): 1637-1642. doi:10.1211/jpp/61.12.0008
36. Bag S, Mondal A, Majumder A, Banik A. Tea and its phytochemicals: Hidden health benefits & modulation of signaling cascade by phytochemicals. *Food Chemistry*. 2021 Sep; 371: 131098. doi:10.1016/j.foodchem.2021.131098.
37. Bailey DG, Dresser G, Arnold JM. Grapefruit-medication interactions: forbidden fruit or avoidable consequences?. *CMAJ*. 2013 Mar; 185(4): 309-316. doi:10.1503/cmaj.120951
38. Bao S, Zhao L, Liu Y, Cong T, Cheng Z, Li Z. The effect of metal copper on fracture healing in chicken. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi*. 2002 Dec; 36(7): 538-542.
39. Barcelos RP, Lima FD, Carvalho NR, Bresciani G, Royes LF. Caffeine effects on systemic metabolism, oxidative-inflammatory pathways, and exercise performance. *Nutr Res*. 2020 Aug; 80: 1-17. doi:10.1016/j.nutres.2020.05.005
40. Bartosikova L, Necas J. Epigallocatechin gallate: a review. *Veterinarni Medicina*. 2018 Jul, 63(10): 443-467. doi:10.17221/31/2018-VETMED
41. Basheer L, Kerem Z. Interactions between CYP3A4 and Dietary Polyphenols. *Oxid Med Cell Longev*. 2015 Jun; 2015: 854015. doi:10.1155/2015/854015
42. Batista C, Jesus NR, Silva CM, Silva TP, Campos MG. Herb-drug interactions: An insight into cardiovascular diseases based on case reports. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem*. 2017; 14(3): 142-149. doi:10.2174/1871525714666161007154234
43. Batista MN, Carneiro BM, Braga AC, Rahal P. Caffeine inhibits hepatitis C virus replication in vitro. *Arch Virol*. 2015 Feb; 160(2): 399-407. doi:10.1007/s00705-014-2302-1
44. Belayneh A, Molla F. The effect of coffee on pharmacokinetic properties of drugs: A review. *BioMed Research International*. 2020 Jul; 2020: 7909703. doi:10.1155/2020/7909703
45. Bimonte S, Forte CA, Cuomo M, Esposito G, Cascella M, Cuomo A. An overview on the potential roles of EGCG in the treatment of COVID-19 infection. *Drug Des Devel Ther*. 2021 Oct; 15: 4447-4454. doi:10.2147/DDDT.S314666
46. Borea PA, Gessi S, Merighi S, Vincenzi F, Varani K. Pharmacology of adenosine receptors: The state of the art. *Physiol Rev*. 2018 Jul; 98(3): 1591-1625. doi:10.1152/physrev.00049.2017

47. Boros K, Jedlinszki N, Csupor D. Theanine and caffeine content of infusions prepared from commercial tea samples. *Pharmacogn Mag.* 2016 Jan-Mar; 12(45): 75-79. doi:10.4103/0973-1296.176061
48. Briguglio M, Hrelia S, Malaguti M, et al. Food bioactive compounds and their interference in drug pharmacokinetic/pharmacodynamic profiles. *Pharmaceutics.* 2018 Dec; 10(4): 277. doi:10.3390/pharmaceutics10040277
49. Brzezicha-Cirocka J, Grembecka M, Szefer P. Monitoring of essential and heavy metals in green tea from different geographical origins. *Environ Monit Assess.* 2016 Mar; 188(3): 183. doi:10.1007/s10661-016-5157-y
50. Burana-osot J, Yanpaisan W. Catechins and caffeine contents of green tea commercialized in Thailand. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Sciences.* 2012; 22(22): 17.
51. Cai ZY, Li XM, Liang JP, et al. Bioavailability of tea catechins and its improvement. *Molecules.* 2018 Sep; 23(9): 2346. doi:10.3390/molecules23092346
52. Camandola S, Plick N, Mattson MP. Impact of coffee and cacao purine metabolites on neuroplasticity and neurodegenerative disease. *Neurochem Res.* 2019 Jan; 44(1): 214-227. doi:10.1007/s11064-018-2492-0
53. Candela L, Formato M, Crescente G, Piccolella S, Pacifico S. Coumaroyl flavonol glycosides and more in marketed Green teas: An intrinsic value beyond much-lauded catechins. *Molecules.* 2020 Apr; 25(8): 1765. doi:10.3390/molecules25081765
54. Carpenter M, Berry H, Pelletier AL. Clinically relevant drug-drug interactions in primary care. *American family physician.* 2019 May; 99(9): 558–564.
55. Carrillo JA, Benitez J. Clinically significant pharmacokinetic interactions between dietary caffeine and medications. *Clin Pharmacokinet.* 2000 Aug; 39(2): 127-153. doi:10.2165/00003088-200039020-00004
56. Cerbin-Koczorowska M, Waszyk-Nowaczyk M, Bakun P, Goslinski T, Koczorowski T. Current view on Green tea catechins formulations, their interactions with selected drugs, and prospective applications for various health conditions. *Applied Sciences.* 2021 May; 11(11): 4905. doi:10.3390/app11114905
57. Chakraborty M, Kamath JV, Bhattacharjee A. Potential interaction of Green tea extract with hydrochlorothiazide on diuretic activity in rats. *Int Sch Res Notices.* 2014 Nov; 2014: 273908. doi:10.1155/2014/273908
58. Chakraborty M, Kamath JV, Bhattacharjee A. Potential interaction of Green tea extract with hydrochlorothiazide against doxorubicin-induced myocardial damage. *J Ayurveda Integr Med.* 2015 Jul-Sep; 6(3): 187-193. doi:10.4103/0975-9476.146555
59. Chakrawarti L, Agrawal R, Dang S, Gupta S, Gabrani R. Therapeutic effects of EGCG: a patent review. *Expert Opin Ther Pat.* 2016 Aug; 26(8): 907-916. doi:10.1080/13543776.2016.1203419
60. Chang EH, Huang J, Lin Z, Brown AC. Catechin-mediated restructuring of a bacterial toxin inhibits activity. *Biochim Biophys Acta Gen Subj.* 2019 Jan; 1863(1): 191-198. doi:10.1016/j.bbagen.2018.10.011
61. Chang MY, Lin YY, Chang YC, et al. Effects of infusion and storage on antioxidant activity and total phenolic content of Black tea. *Appl. Sci.* 2020 Apr; 10(8): 2685. doi:10.3390/app10082685

62. Chen D, Zhang KQ, Li B, Sun DQ, Zhang H, Fu Q. Epigallocatechin-3-gallate ameliorates erectile function in aged rats via regulation of PRMT1/DDAH/ADMA/NOS metabolism pathway. *Asian J Androl.* 2017 May-Jun; 19(3): 291-297. doi:10.4103/1008-682X.178486
63. Chen J, Luo X, Qiu H, Mackey V, Sun L, Ouyang X. Drug discovery and drug marketing with the critical roles of modern administration. *Am J Transl Res.* 2018 Dec; 10(12): 4302-4312.
64. Cheng YY, Hsieh CH, Tsai TH. Concurrent administration of anticancer chemotherapy drug and herbal medicine on the perspective of pharmacokinetics. *J Food Drug Anal.* 2018 Apr; 26(2S): S88-S95. doi:10.1016/j.jfda.2018.01.003
65. Choi JS, Burm JP. Effects of oral epigallocatechin gallate on the pharmacokinetics of nicardipine in rats. *Arch Pharm Res.* 2009 Dec; 32(12): 1721-1725. doi:10.1007/s12272-009-2209-7
66. Choi MK, Song IS. Characterization of efflux transport of the PDE5 inhibitors, vardenafil and sildenafil. *J Pharm Pharmacol.* 2012 Aug; 64(8): 1074-1083. doi:10.1111/j.2042-7158.2012.01498.x
67. Choung MG, Lee MS. Optimal extraction conditions for simultaneous determination of catechins and caffeine in green tea leaves. *Food Sci Biotechnol.* 2011 Apr; 20(2): 327-333. doi:10.1007/s10068-011-0046-1
68. Chowdhury P, Barooah AK. Tea bioactive modulate innate immunity: In perception to COVID-19 pandemic. *Front Immunol.* 2020 Oct; 11: 590716. doi:10.3389/fimmu.2020.590716
69. Chu KO, Pang CC. Pharmacokinetics and disposition of Green tea catechins. In: Malangu N, editor. *Pharmacokinetics and adverse effects of drugs – mechanisms and risks factors* [Internet]. London: IntechOpen; 2018 May [cited 2021 Dec 16]. Available from: <https://www.intechopen.com/chapters/60659> doi: 10.5772/intechopen.74190
70. Chua YT, Ang XL, Zhong XM, Khoo KS. Interaction between warfarin and Chinese herbal medicines. *Singapore Med J.* 2015 Jan; 56(1): 11-18. doi:10.11622/smedj.2015004
71. Chung JH, Choi DH, Choi JS. Effects of oral epigallocatechin gallate on the oral pharmacokinetics of verapamil in rats. *Biopharm Drug Dispos.* 2009 Mar; 30(2): 90-93. doi:10.1002/bdd.644
72. Cicero AFG, Fogacci F, Banach M. Red yeast rice for hypercholesterolemia. *Methodist Debaquey Cardiovasc J.* 2019 Jul-Sep; 15(3): 192-199. doi:10.14797/mdcj-15-3-192
73. Clarke KA, Dew TP, Watson RE, et al. High performance liquid chromatography tandem mass spectrometry dual extraction method for identification of green tea catechin metabolites excreted in human urine. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2014 Dec; 972: 29-37. doi:10.1016/j.jchromb.2014.09.035
74. Dahshan HE, Helal MA, Mostafa SM, Elgawish MS. Development and validation of an HPLC-UV method for simultaneous determination of sildenafil and tramadol in biological fluids: Application to drug-drug interaction study. *J Pharm Biomed Anal.* 2019 May; 168: 201-208. doi:10.1016/j.jpba.2019.02.025
75. Daniel R, Marusich E, Argyris E, Zhao RY, Skalka AM, Pomerantz RJ. Caffeine inhibits human immunodeficiency virus type 1 transduction of nondividing cells. *J Virol.* 2005 Feb; 79(4): 2058-2065. doi:10.1128/JVI.79.4.2058-2065.2005
76. Darweesh RS, El-Elimat T, Zayed A, et al. The effect of grape seed and green tea extracts on the pharmacokinetics of imatinib and its main metabolite, N-desmethyl imatinib, in rats. *BMC Pharmacol Toxicol.* 2020 Nov; 21(1): 77. doi:10.1186/s40360-020-00456-9

77. Das B, Ramasubbu SK, Kumar B, Rawat VS. Top 20 drug - drug interactions, polypharmacy and analysis of the nature of risk factors due to QT interval prolonging drug use in elderly psychiatry outpatients. *J Family Med Prim Care*. 2020 Dec; 9(12): 6023-6040. doi:10.4103/jfmprc.jfmprc_1060_20
78. Das S, Behera SK, Xavier AS, Dharanipragada S, Selvarajan S. Are drug-drug interactions a real clinical concern?. *Perspect Clin Res*. 2019 Apr-Jun; 10(2): 62-66. doi:10.4103/picr.PICR_55_18
79. de Oliveira LM, Diel JDAC, Nunes A, da Silva Dal Pizzol T. Prevalence of drug interactions in hospitalised elderly patients: a systematic review. *Eur J Hosp Pharm*. 2021 Jan; 28(1): 4-9. doi:10.1136/ejhpharm-2019-002111
80. Deodhar M, Al Rihani SB, Arwood MJ, et al. Mechanisms of CYP450 Inhibition: Understanding Drug-Drug Interactions Due to Mechanism-Based Inhibition in Clinical Practice. *Pharmaceutics*. 2020 Sep; 12(9): 846. doi:10.3390/pharmaceutics12090846
81. dePaula J, Farah A. Caffeine Consumption through Coffee: Content in the Beverage, Metabolism, Health Benefits and Risks. *Beverages*. 2019 Jun; 5(2): 37. <https://doi.org/10.3390/beverages5020037>
82. Dhaliwal A, Gupta M. *PDE5 Inhibitors*. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan [updated 2021 Jun 25; cited 2021 Nov 24]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK549843/>
83. Dhanani T, Shah S, Gajbhiye NA, Kumar S. Effect of extraction methods on yield, phytochemical constituents and antioxidant activity of *Withania somnifera*. *Arabian Journal of Chemistry*. 2017 Feb; 10(1): S1193-S1199. doi:10.1016/j.arabjc.2013.02.015
84. Di Minno A, Frigerio B, Spadarella G, et al. Old and new oral anticoagulants: Food, herbal medicines and drug interactions. *Blood Rev*. 2017 Jul; 31(4): 193-203. doi:10.1016/j.blre.2017.02.001
85. Dresser GK, Urquhart BL, Proniuk J, et al. Coffee inhibition of CYP3A4 in vitro was not translated to a grapefruit-like pharmacokinetic interaction clinically. *Pharmacol Res Perspect*. 2017 Oct; 5(5): e00346. doi:10.1002/prp2.346
86. Dybro AM, Damkier P, Rasmussen TB, Hellfritsch M. Statin-associated rhabdomyolysis triggered by drug-drug interaction with itraconazole. *BMJ Case Rep*. 2016 Sep; 2016: bcr2016216457. doi:10.1136/bcr-2016-216457
87. EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS), Younes M, Aggett P, et al. Scientific opinion on the safety of green tea catechins. *EFSA journal*. 2018 Apr; 16(4): 5239. doi: 10.2903/j.efsa.2018.5239
88. Eisvand F, Razavi BM, Hosseinzadeh H. The effects of *Ginkgo biloba* on metabolic syndrome: A review. *Phytother Res*. 2020 Aug; 34(8): 1798-1811. doi:10.1002/ptr.6646
89. Ekins S, Mestres J, Testa B. In silico pharmacology for drug discovery: methods for virtual ligand screening and profiling. *Br J Pharmacol*. 2007 Sep; 152(1): 9-20. doi:10.1038/sj.bjp.0707305
90. Eljaaly K, Alshehri S, Bhattacharjee S, Al-Tawfiq JA, Patanwala AE. Contraindicated drug-drug interactions associated with oral antimicrobial agents prescribed in the ambulatory care setting in the United States. *Clin Microbiol Infect*. 2019 May; 25(5): 620-622. doi:10.1016/j.cmi.2018.08.002

91. Elzupir AO. Caffeine and caffeine-containing pharmaceuticals as promising inhibitors for 3-chymotrypsin-like protease of SARS-CoV-2. *J Biomol Struct Dyn*. 2020 Oct; 1-8. doi:10.1080/07391102.2020.1835732
92. Enioutina EY, Salis ER, Job KM, Gubarev MI, Krepkova LV, Sherwin CM. Herbal medicines: challenges in the modern world. Part 5. status and current directions of complementary and alternative herbal medicine worldwide. *Expert Rev Clin Pharmacol*. 2017 Mar; 10(3): 327-338. doi:10.1080/17512433.2017.1268917
93. Evans J, Richards JR, Battisti AS. *Caffeine*. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan [updated 2021 Jul 19; cited 2021 Nov 3]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK519490/>
94. Fangueiro JF, Parra A, Silva AM, et al. Validation of a high performance liquid chromatography method for the stabilization of epigallocatechin gallate. *Int J Pharm*. 2014 Nov; 475(1-2): 181-190. doi:10.1016/j.ijpharm.2014.08.053
95. Fasinu PS, Rapp GK. Herbal interaction with chemotherapeutic drugs-a focus on clinically significant findings. *Front Oncol*. 2019 Dec; 9: 1356. doi:10.3389/fonc.2019.01356
96. Faudone G, Arifi S, Merk D. The medicinal chemistry of caffeine. *J Med Chem*. 2021 Jun; 64(11): 7156-7178. doi:10.1021/acs.jmedchem.1c00261
97. Federico A, Dallio M, Loguercio C. Silymarin/silybin and chronic liver disease: a marriage of many years. *Molecules*. 2017 Jan; 22(2): 191. doi:10.3390/molecules22020191
98. Fernando CD, Soysa P. Simple isocratic method for simultaneous determination of caffeine and catechins in tea products by HPLC. *Springerplus*. 2016 Jul; 5(1): 970. doi:10.1186/s40064-016-2672-9
99. Fiani B, Zhu L, Musch BL, et al. The neurophysiology of caffeine as a central nervous system stimulant and the resultant effects on cognitive function. *Cureus*. 2021 May; 13(5): e15032. doi:10.7759/cureus.15032
100. Foy M, Sperati CJ, Lucas GM, Estrella MM. Drug interactions and antiretroviral drug monitoring. *Curr HIV/AIDS Rep*. 2014 Sep; 11(3): 212-222. doi:10.1007/s11904-014-0212-1
101. French D. Advances in clinical mass spectrometry. *Adv Clin Chem*. 2017 Feb; 79: 153-198. doi:10.1016/bs.acc.2016.09.003
102. Fujioka K, Iwamoto T, Shima H, et al. The powdering process with a set of ceramic mills for Green tea promoted catechin extraction and the ROS inhibition effect. *Molecules*. 2016 Apr; 21(4): 474. doi:10.3390/molecules21040474
103. Funabashi M, Ohta K. Flavonoid-rich secondary metabolites in naturally grown Green tea are correlated with a higher shift of the consumers' excise level. *J Food Sci Nutr*. 2020 Apr; 6: 063. doi:10.24966/FSN-1076/100063
104. Gahr M. Koffein, das am häufigsten konsumierte Psychostimulans: eine narrative Übersichtsarbeit [Caffeine, the most frequently consumed psychostimulant: a narrative review article]. *Fortschr Neurol Psychiatr*. 2020 May; 88(5): 318-330. doi:10.1055/a-0985-4236
105. Gao Y, Wei Y, Wang Y, Gao F, Chen Z. Lycium barbarum: A traditional Chinese herb and a promising anti-aging agent. *Aging Dis*. 2017 Dec; 8(6): 778-791. doi:10.14336/AD.2017.0725
106. Garrison DA, Talebi Z, Eisenmann ED, Sparreboom A, Baker SD. Role of OATP1B1 and OATP1B3 in drug-drug interactions mediated by tyrosine kinase inhibitors. *Pharmaceutics*. 2020 Sep; 12(9): 856. doi:10.3390/pharmaceutics12090856

107. Ge B, Zhang Z, Zuo Z. Updates on the clinical evidenced herb-warfarin interactions. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2014 Mar; 2014: 957362. doi:10.1155/2014/957362
108. Ge J, Tan BX, Chen Y, et al. Interaction of green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate with sunitinib: potential risk of diminished sunitinib bioavailability. *J Mol Med (Berl)*. 2011 Jun; 89(6): 595-602. doi:10.1007/s00109-011-0737-3
109. Georgiev K, Iliev I, Jelev I. Antitumor effects of Pu-erh tea catechins in human cancer cell lines and evaluation of combination effects with Oxaliplatin. *World J. Pharm. Res.* 2015; 4(6): 438–444.
110. Georgiev K, Iliev I, Jelev I. Evaluation of antitumor effect of methylxanthine fraction isolated from Pu-erh tea. *World J. Pharm. Res.* 2015; 4(7): 2236-2242.
111. Georgiev K, Radeva-Ilieva M. In vitro inhibitions of CYP2C9 and CYP3A4 by fractions isolated from Goji berry (*Lycium barbarum*) fruits. *Scripta Scientifica Pharmaceutica*. 2019 Oct; 6(1): 26-30. doi:10.14748/ssp.v6i1.6038
112. Georgiev K, Zhelev I, Georgieva S. Total phenolic compounds and tannins content of Bancha green tea (*Camellia Sinensis*) depending on extraction conditions. *Scripta Scientifica Pharmaceutica*. 2014; 1(1): 48-51. doi:10.14748/ssp.v1i1.605
113. Georgiev KD, Radeva-Ilieva M, Stoeva S, Zhelev I. Isolation, analysis and in vitro assessment of CYP3A4 inhibition by methylxanthines extracted from Pu-erh and Bancha tea leaves. *Sci Rep*. 2019 Sep; 9(1): 13941. doi:10.1038/s41598-019-50468-7
114. Georgiev KD. Study of Herbal-Drug Interactions (HDIs) using in silico methods – mission (im)possible. *Arch Phar & Pharmacol Res*. 2019 Mar; 2(3): 2019. doi: 10.33552/APPR.2019.02.000540.
115. Ghosh R, Chakraborty A, Biswas A, Chowdhuri S. Evaluation of green tea polyphenols as novel corona virus (SARS CoV-2) main protease (Mpro) inhibitors - an *in silico* docking and molecular dynamics simulation study. *J Biomol Struct Dyn*. 2021 Aug; 39(12): 4362-4374. doi:10.1080/07391102.2020.1779818
116. Glaeser H. Importance of P-glycoprotein for drug-drug interactions. *Handb Exp Pharmacol*. 2011; (201): 285-297. doi:10.1007/978-3-642-14541-4_7
117. Goebel J, Chmielewski J, Hrycyna CA. The roles of the human ATP-binding cassette transporters P-glycoprotein and ABCG2 in multidrug resistance in cancer and at endogenous sites: future opportunities for structure-based drug design of inhibitors. *Cancer Drug Resist*. 2021 Aug; 4: 784-804. doi:10.20517/cdr.2021.19
118. Goey AK, Mooiman KD, Beijnen JH, Schellens JH, Meijerman I. Relevance of in vitro and clinical data for predicting CYP3A4-mediated herb-drug interactions in cancer patients. *Cancer Treat Rev*. 2013 Nov; 39(7): 773-783. doi:10.1016/j.ctrv.2012.12.008
119. Golden EB, Lam PY, Kardosh A, et al. Green tea polyphenols block the anticancer effects of bortezomib and other boronic acid-based proteasome inhibitors. *Blood*. 2009 Jun; 113(23): 5927-5937. doi:10.1182/blood-2008-07-171389
120. Gong AD, Lian SB, Wu NN, et al. Integrated transcriptomics and metabolomics analysis of catechins, caffeine and theanine biosynthesis in tea plant (*Camellia sinensis*) over the course of seasons. *BMC Plant Biol*. 2020 Jun; 20: 294. doi:10.1186/s12870-020-02443-y
121. Gopal J, Muthu M, Paul D, Kim DH, Chun S. Bactericidal activity of green tea extracts: the importance of catechin containing nano particles. *Scientific reports*. 2016 Jan; 6: 19710. doi:10.1038/srep19710

122. Gottwalt B, Tadi P. *Methylxanthines*. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan [updated 2021 Sep 29; cited 2021 Nov 3]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559165/>
123. Gounaris AK, Grivea IN, Baltogianni M, et al. Caffeine and gastric emptying time in very preterm neonates. *J Clin Med*. 2020 Jun; 9(6): 1676. doi:10.3390/jcm9061676
124. Govindarajan R, Tejas V, Pushpangadan P. High-performance liquid chromatography (HPLC) as a tool for standardization of complex herbal drugs. *J AOAC Int*. 2019 Jul; 102(4): 986-992. doi:10.5740/jaoacint.18-0378
125. Gramza-Michałowska A. Caffeine in tea *Camellia sinensis*--content, absorption, benefits and risks of consumption. *J Nutr Health Aging*. 2014 Feb; 18(2): 143-149. doi:10.1007/s12603-013-0404-1
126. Granja A, Pinheiro M, Reis S. Epigallocatechin gallate nanodelivery systems for cancer therapy. *Nutrients*. 2016 May; 8(5): 307. doi:10.3390/nu8050307
127. Graziano S, Montana A, Zaami S, et al. Sildenafil-associated hepatotoxicity: a review of the literature. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2017 Mar; 21(1 Suppl): 17-22.
128. Greenblatt DJ. Mechanisms and consequences of drug-drug interactions. *Clin Pharmacol Drug Dev*. 2017 Mar; 6(2): 118-124. doi:10.1002/cpdd.339
129. Grgic J, Trexler ET, Lazinica B, Pedisic Z. (2018). Effects of caffeine intake on muscle strength and power: a systematic review and meta-analysis. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*. 2018 Mar; 15: 11. doi:10.1186/s12970-018-0216-0
130. Guo H, Fu MX, Wu DT, et al. Structural characteristics of crude polysaccharides from 12 selected chinese teas, and their antioxidant and anti-diabetic activities. *Antioxidants (Basel)*. 2021 Sep; 10(10): 1562. doi:10.3390/antiox10101562
131. Halim ASA, El-Nabarawi MA, Refaai EKI. Formulation of new sildenafil citrate-caffeine orally disintegrating tablets: in vitro and in vivo evaluation. *Journal of Pharmaceutical Research and Opinion*. 2013 Sep; 3(8): 46 - 63.
132. Han X, Zhang H, Hao H, Li H, Guo X, Zhang D. Effect of epigallocatechin-3-gallate on the pharmacokinetics of amlodipine in rats. *Xenobiotica*. 2019 Aug; 49(8): 970-974. doi:10.1080/00498254.2018.1519732
133. Hegazy SK. The effect of Green tea on sildenafil pharmacokinetics in Egyptian healthy volunteers. *British journal of pharmaceutical research*. 2014 Jan; 4: 289-300. doi:10.9734/BJPR/2014/6905
134. Heimann M, Käsermann HP, Pfister R, Roth DR, Bürki K. Blood collection from the sublingual vein in mice and hamsters: a suitable alternative to retrobulbar technique that provides large volumes and minimizes tissue damage. *Lab Anim*. 2009 Jul; 43(3): 255-260. doi:10.1258/la.2008.007073
135. Hennessy S, Leonard CE, Gagne JJ, et al. Pharmacoepidemiologic methods for studying the health effects of drug-drug interactions. *Clin Pharmacol Ther*. 2016 Jan; 99(1): 92-100. doi:10.1002/cpt.277
136. Henning SM, Choo JJ, Heber D. Nongallated compared with gallated flavan-3-ols in green and black tea are more bioavailable. *J Nutr*. 2008 Aug; 138(8): 1529S-1534S. doi:10.1093/jn/138.8.1529S
137. Higashi H, Watanabe N, Tamura R, Taguchi M. In vitro P-glycoprotein-mediated transport of tadalafil: A comparison with sildenafil. *Biol Pharm Bull*. 2017 May; 40(8): 1314-1319. doi:10.1248/bpb.b17-00278

138. Hladon T, Cwiertnia, B. Analysis of physico-chemical interactions of cellulose ethers and ibuprofen in suspensions. *Acta poloniae pharmaceutica – Drug research*. 1998; 55(5): 359-364.
139. Hladun O, Papaseit E, Martín S, et al. Interaction of energy drinks with prescription medication and drugs of abuse. *Pharmaceutics*. 2021 Sep; 13(10): 1532. doi:10.3390/pharmaceutics13101532
140. Hochman J, Tang C, Prueksaritanont T. Drug-drug interactions related to altered absorption and plasma protein binding: theoretical and regulatory considerations, and an industry perspective. *J Pharm Sci*. 2015 Mar; 104(3): 916-929. doi:10.1002/jps.24306
141. Hodges RE, Minich DM. Modulation of metabolic detoxification pathways using foods and food-derived components: A scientific review with clinical application. *J Nutr Metab*. 2015 Jun; 2015: 760689. doi:10.1155/2015/760689
142. Hoesel B, Schmid JA. The complexity of NF- κ B signaling in inflammation and cancer. *Molecular cancer*. 2013 Aug; 12: 86. doi:10.1186/1476-4598-12-86
143. Horie M, Nara K, Sugino S, Umeno A, Yoshida Y. Comparison of antioxidant activities among four kinds of Japanese traditional fermented tea. *Food Sci Nutr*. 2016 Nov; 5(3): 639-645. doi:10.1002/fsn3.442
144. Hsueh TY, Wu YT, Lin LC, Chiu AW, Lin CH, Tsai TH. Herb-drug interaction of Epimedium sagittatum (Sieb. et Zucc.) maxim extract on the pharmacokinetics of sildenafil in rats. *Molecules*. 2013 Jun; 18(6): 7323-7335. doi:10.3390/molecules18067323
145. Huang J, Wang Y, Xie Z, Zhou Y, Zhang Y, Wan X. The anti-obesity effects of green tea in human intervention and basic molecular studies. *Eur J Clin Nutr*. 2014 Oct; 68(10): 1075-1087. doi:10.1038/ejcn.2014.143
146. Ikarashi N, Ogawa S, Hirobe R, et al. Epigallocatechin gallate induces a hepatospecific decrease in the CYP3A expression level by altering intestinal flora. *Eur J Pharm Sci*. 2017 Mar; 100: 211-218. doi:10.1016/j.ejps.2017.01.022
147. Institute of Medicine (US) Committee on Military Nutrition Research. *Caffeine for the Sustainment of Mental Task Performance: Formulations for Military Operations* [Internet]. Washington (DC): National Academies Press (US); 2001. 2, Pharmacology of Caffeine. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK223808/>
148. Ivanyuk A, Livio F, Biollaz J, Buclin T. Renal drug transporters and drug interactions. *Clin Pharmacokinet*. 2017 Aug; 56(8): 825-892. doi:10.1007/s40262-017-0506-8
149. Iwasaki M, Inoue M, Sasazuki S, et al. Green tea drinking and subsequent risk of breast cancer in a population-based cohort of Japanese women. *Breast Cancer Res*. 2010 Oct; 12(5): R88. doi:10.1186/bcr2756
150. Jancova P, Anzenbacher P, Anzenbacherova E. Phase II drug metabolizing enzymes. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2010 Jun; 154(2): 103-116. doi:10.5507/bp.2010.017
151. Janitschke D, Lauer AA, Bachmann CM, Grimm HS, Hartmann T, Grimm MOW. Methylxanthines and neurodegenerative diseases: An update. *Nutrients*. 2021 Feb; 13(3): 803. doi:10.3390/nu13030803
152. Jilani TN, Preuss CV, Sharma S. *Theophylline*. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan [updated 2021 Aug 31; cited 2021 Nov 3]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK519024/>

153. Jin Y, Jin CH, Row KH. Separation of catechin compounds from different teas. *Biotechnol J*. 2006 Feb; 1(2): 209-213. doi:10.1002/biot.200500019
154. Jo JH, Kim SJ, Nam WS, Seung EJ, Lee S. Decreased absorption of midazolam in the stomach due to low pH induced by co-administration of Banha-sasim-tang. *Environ Health Toxicol*. 2016 Aug; 31: e2016016. doi:10.5620/eht.e2016016
155. Jones H, Rowland-Yeo K. Basic concepts in physiologically based pharmacokinetic modeling in drug discovery and development. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol*. 2013 Aug; 2(8): e63. doi:10.1038/psp.2013.41
156. Jones HM, Chen Y, Gibson C, et al. Physiologically based pharmacokinetic modeling in drug discovery and development: a pharmaceutical industry perspective. *Clin Pharmacol Ther*. 2015 Mar; 97(3): 247-262. doi:10.1002/cpt.37
157. Jones MJ. Internet-based prescription of sildenafil: a 2104-patient series. *J Med Internet Res*. 2001 Jan-Mar; 3(1): E2. doi:10.2196/jmir.3.1.e2
158. Kamel A, Harriman S. Inhibition of cytochrome P450 enzymes and biochemical aspects of mechanism-based inactivation (MBI). *Drug Discov Today Technol*. 2013; 10(1): e177-e189. doi:10.1016/j.ddtec.2012.09.011
159. Khalatbary AR, Khademi E. The green tea polyphenolic catechin epigallocatechin gallate and neuroprotection. *Nutr Neurosci*. 2020 Apr; 23(4): 281-294. doi:10.1080/1028415X.2018.1500124
160. Khan N, Mukhtar H. Tea polyphenols in promotion of human health. *Nutrients*. 2018 Dec; 11(1): 39. doi:10.3390/nu11010039
161. Kim J, Park J, Lim K. Nutrition supplements to stimulate lipolysis: A review in relation to endurance exercise capacity. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 2016 Jul; 62(3): 141-161. doi:10.3177/jnsv.62.141
162. Kim TE, Ha N, Kim Y, et al. Effect of epigallocatechin-3-gallate, major ingredient of green tea, on the pharmacokinetics of rosuvastatin in healthy volunteers. *Drug Des Devel Ther*. 2017 May; 11: 1409-1416. doi:10.2147/DDDT.S130050
163. Kim TE, Shin KH, Park JE, et al. Effect of green tea catechins on the pharmacokinetics of digoxin in humans. *Drug Des Devel Ther*. 2018 Jul; 12: 2139-2147. doi:10.2147/DDDT.S148257
164. Kloner RA, Goggin P, Goldstein I, et al. A new perspective on the nitrate-phosphodiesterase type 5 inhibitor interaction. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 2018 Sep; 23(5): 375-386. doi:10.1177/1074248418771896
165. Knop J, Misaka S, Singer K, et al. Inhibitory effects of Green tea and (-)-epigallocatechin gallate on transport by OATP1B1, OATP1B3, OCT1, OCT2, MATE1, MATE2-K and P-glycoprotein. *PLoS One*. 2015 Oct; 10(10): e0139370. doi:10.1371/journal.pone.0139370
166. Koch W, Kukula-Koch W, Komsta Ł, Marzec Z, Szwerc W, Główniak K. Green tea quality evaluation based on its catechins and metals composition in combination with chemometric analysis. *Molecules*. 2018 Jul; 23(7): 1689. doi:10.3390/molecules23071689
167. Kodama DH, Gonçalves AE, Lajolo FM, Genovese MI. Flavonoids, total phenolics and antioxidant capacity: comparison between commercial green tea preparations. *Food Science and Technology International*. 2010 Oct-Dec; 30: 1077-1082. doi:10.1590/S0101-20612010000400037
168. Koller D, Vaitsekhovich V, Mba CE, et al. Effective quantification of 11 tyrosine kinase inhibitors and caffeine in human plasma by validated LC-MS/MS method with potent

- phospholipids clean-up procedure. Application to therapeutic drug monitoring. *Talanta*. 2020 Feb; 208: 120450. doi:10.1016/j.talanta.2019.120450
169. Kot M, Daniel WA. Effect of cytochrome P450 (CYP) inducers on caffeine metabolism in the rat. *Pharmacol Rep*. 2007 May-Jun; 59(3): 296-305.
 170. Kot M, Daniel WA. Relative contribution of rat cytochrome P450 isoforms to the metabolism of caffeine: the pathway and concentration dependence. *Biochem Pharmacol*. 2008 Apr; 75(7): 1538-1549. doi:10.1016/j.bcp.2007.12.017
 171. Kot M, Daniel WA. The relative contribution of human cytochrome P450 isoforms to the four caffeine oxidation pathways: an in vitro comparative study with cDNA-expressed P450s including CYP2C isoforms. *Biochem Pharmacol*. 2008 Aug; 76(4): 543-551. doi:10.1016/j.bcp.2008.05.025
 172. Kovacic S, Vuković S, Kocijan-Lovko S, Seferović M. Combination of fluvoxamine and analgesics can cause serotonin syndrome. *European Journal of Psychiatry*. 2009 Mar; 23(1): 47-51. doi:10.4321/S0213-61632009000100005
 173. Kovács EG, Alatshan A, Budai MM, Czimmerer Z, Bíró E, Benkő S. Caffeine has different immunomodulatory effect on the cytokine expression and NLRP3 inflammasome function in various human macrophage subpopulations. *Nutrients*. 2021 Jul; 13(7): 2409. doi:10.3390/nu13072409
 174. Kowalska J, Marzec A, Domian E, et al. influence of tea brewing parameters on the antioxidant potential of infusions and extracts depending on the degree of processing of the leaves of *Camellia sinensis*. *Molecules*. 2021 Aug; 26(16): 4773. doi:10.3390/molecules26164773
 175. Krahe J, Krahe MA, Naumovski N. The implications of post-harvest storage time and temperature on the phytochemical composition and quality of japanese-styled Green tea grown in australia: A food loss and waste recovery opportunity. *Beverages*. 2021 May; 7(2): 25. doi:10.3390/beverages7020025
 176. Kuepfer L, Niederalt C, Wendl T, et al. Applied concepts in PBPK modeling: How to build a PBPK/PD model. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol*. 2016 Oct; 5(10): 516-531. doi:10.1002/psp4.12134
 177. Kwon Y. Use of saw palmetto (*Serenoa repens*) extract for benign prostatic hyperplasia. *Food Sci Biotechnol*. 2019 Apr; 28(6): 1599-1606. doi:10.1007/s10068-019-00605-9
 178. Lakshmi SP, Reddy AT, Kodihela LD, Varadacharyulu NC. The tea catechin epigallocatechin gallate inhibits NF- κ B-mediated transcriptional activation by covalent modification. *Arch Biochem Biophys*. 2020 Nov; 695: 108620. doi:10.1016/j.abb.2020.108620
 179. Law FCP, Yao M, Bi HC, Lam S. Physiologically based pharmacokinetic modeling of tea catechin mixture in rats and humans. *Pharmacol Res Perspect*. 2017 Apr; 5(3): e00305. doi:10.1002/prp2.305
 180. Lee LS, Kim SH, Kim YB, Kim YC. Quantitative analysis of major constituents in green tea with different plucking periods and their antioxidant activity. *Molecules*. 2014 Jul; 19(7): 9173-9186. doi:10.3390/molecules19079173
 181. Lee YH, Jang YH, Kim YS, Kim J, Seong BL. Evaluation of green tea extract as a safe personal hygiene against viral infections. *J Biol Eng*. 2018 Jan; 12: 1. doi:10.1186/s13036-017-0092-1

182. Leite PM, Martins MAP, Castilho RO. Review on mechanisms and interactions in concomitant use of herbs and warfarin therapy. *Biomed Pharmacother.* 2016 Oct; 83: 14-21. doi:10.1016/j.biopha.2016.06.012
183. Lepist EI, Ray AS. Beyond drug-drug interactions: effects of transporter inhibition on endobiotics, nutrients and toxins. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2017 Oct; 13(10): 1075-1087. doi:10.1080/17425255.2017.1372425
184. Létinier L, Ferreira A, Marceron A, et al. Spontaneous reports of serious adverse drug reactions resulting from drug-drug interactions: An analysis from the French pharmacovigilance database. *Front Pharmacol.* 2021 Mar; 11: 624562. doi:10.3389/fphar.2020.624562
185. Levêque D, Lemachatti J, Nivoix Y, et al. Mécanismes des interactions médicamenteuses d'origine pharmacocinétique [Mechanisms of pharmacokinetic drug-drug interactions]. *Rev Med Interne.* 2010 Feb; 31(2): 170-179. doi:10.1016/j.revmed.2009.07.009
186. Levine DJ. Pulmonary arterial hypertension: updates in epidemiology and evaluation of patients. *Am J Manag Care.* 2021 Mar; 27(3 Suppl): S35-S41. doi:10.37765/ajmc.2021.88609
187. Li B, Zhao B, Liu Y, et al. Herb-drug enzyme-mediated interactions and the associated experimental methods: a review. *J Tradit Chin Med.* 2016 Jun; 36(3): 392-408. doi:10.1016/s0254-6272(16)30054-1
188. Li C, Choi JS. Effects of epigallocatechin gallate on the bioavailability and pharmacokinetics of diltiazem in rats. *Pharmazie.* 2008 Nov; 63(11): 815-818.
189. Li Q, Qiu Z, Wang Y, et al. Tea polyphenols alleviate hydrogen peroxide-induced oxidative stress damage through the Mst/Nrf2 axis and the Keap1/Nrf2/HO-1 pathway in murine RAW264.7 cells. *Exp Ther Med.* 2021 Dec; 22(6): 1473. doi:10.3892/etm.2021.10908
190. Li TT, An JX, Xu JY, Tuo BG. Overview of organic anion transporters and organic anion transporter polypeptides and their roles in the liver. *World J Clin Cases.* 2019 Dec; 7(23): 3915-3933. doi:10.12998/wjcc.v7.i23.3915
191. Li X, Wang W, Hou L, et al. Does tea extract supplementation benefit metabolic syndrome and obesity? A systematic review and meta-analysis. *Clin Nutr.* 2020 Apr; 39(4): 1049-1058. doi:10.1016/j.clnu.2019.05.019
192. Li Y, Meng Q, Yang M, et al. Current trends in drug metabolism and pharmacokinetics. *Acta Pharm Sin B.* 2019 Nov; 9(6): 1113-1144. doi:10.1016/j.apsb.2019.10.001
193. Liczbiński P, Bukowska B. Tea and coffee polyphenols and their biological properties based on the latest *in vitro* investigations. *Ind Crops Prod.* 2022 Jan; 175: 114265. doi:10.1016/j.indcrop.2021.114265
194. Lin YK, Sheu MT, Tzen TZ, Ho HO. Biotransformation of sildenafil in the male rat: evaluation of drug interactions with testosterone and carbamazepine. *Drug Dev Ind Pharm.* 2008 Nov; 34(11): 1219-1226. doi:10.1080/03639040802005032
195. Lipton RB, Diener HC, Robbins MS, Garas SY, Patel K. Caffeine in the management of patients with headache. *J Headache Pain.* 2017 Oct; 18(1): 107. doi:10.1186/s10194-017-0806-2
196. Liu S, Yang L, Mu S, Fu Q. Epigallocatechin-3-gallate ameliorates glucocorticoid-induced osteoporosis of rats *in vivo* and *in vitro*. *Front Pharmacol.* 2018 May; 9: 447. doi:10.3389/fphar.2018.00447
197. Liu Z, Bruins ME, de Bruijn, WJC. et al. A comparison of the phenolic composition of old and young tea leaves reveals a decrease in flavanols and phenolic acids and an increase in

- flavonols upon tea leaf maturation. *J. Food Compos. Anal.* 2020 Mar; 86: 103385. doi: 10.1016/j.jfca.2019.103385
198. Lopez CG, Rogers SE, Colby RH, Graham P, Cabral JT. Structure of sodium carboxymethyl cellulose aqueous solutions: A static and rheology study. *Journal of polymer science. Part B, Polymer physics.* 2015 Apr; 53(7): 492–501. doi:10.1002/polb.23657
 199. Lopez DS, Wang R, Tsilidis KK, et al. Role of caffeine intake on erectile dysfunction in US men: results from NHANES 2001-2004. *PLoS One.* 2015 Apr; 10(4): e0123547. doi:10.1371/journal.pone.0123547
 200. Lorenzo JM, Munekata PES. Phenolic compounds of green tea: Health benefits and technological application in food. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine.* 2016 Aug; 6(8): 709-719. doi:10.1016/j.apjtb.2016.06.010.
 201. Ma ZF, Zhang H, Teh SS, et al. Goji berries as a potential natural antioxidant medicine: An insight into their molecular mechanisms of action. *Oxid Med Cell Longev.* 2019 Jan; 2019: 2437397. doi:10.1155/2019/2437397
 202. Maher HM, Alzoman NZ, Shehata SM, Abahussain AO. UPLC-ESI-MS/MS study of the effect of green tea extract on the oral bioavailability of erlotinib and lapatinib in rats: Potential risk of pharmacokinetic interaction. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2017 Apr; 1049-1050: 30-40. doi:10.1016/j.jchromb.2017.02.029
 203. Makiuchi T, Sobue T, Kitamura T, et al. Association between green tea/coffee consumption and biliary tract cancer: A population-based cohort study in Japan. *Cancer Sci.* 2016 Jan; 107(1): 76-83. doi:10.1111/cas.12843
 204. Malki MA, Pearson ER. Drug-drug-gene interactions and adverse drug reactions. *Pharmacogenomics J.* 2020 Jun; 20(3): 355-366. doi:10.1038/s41397-019-0122-0
 205. Mallah E, Saleh S, Rayyan WA, et al. The influence of *Eruca sativa* (Arugula) on pharmacokinetics of Sildenafil in rats. *Neuro Endocrinol Lett.* 2017 Aug; 38(4): 295-300.
 206. Mallah E, Walid S, Rayyan W, et al. Dose-dependent synergistic effect of Pomegranate juice on the bioavailability of sildenafil in rats by using HPLC method. *Latin American Journal of Pharmacy.* 2016 Jan; 35(6): 1277-84.
 207. Manayi A, Vazirian M, Saeidnia S. Echinacea purpurea: Pharmacology, phytochemistry and analysis methods. *Pharmacogn Rev.* 2015 Jan-Jun; 9(17): 63-72. doi:10.4103/0973-7847.156353
 208. Mancini E, Beglinger C, Drewe J, Zanchi D, Lang UE, Borgwardt S. Green tea effects on cognition, mood and human brain function: A systematic review. *Phytomedicine.* 2017 Oct; 34: 26-37. doi:10.1016/j.phymed.2017.07.008
 209. Mandel SA, Amit T, Kalfon L, Reznichenko L, Youdim MB. Targeting multiple neurodegenerative diseases etiologies with multimodal-acting green tea catechins. *J Nutr.* 2008 Aug; 138(8): 1578S-1583S. doi:10.1093/jn/138.8.1578S
 210. Mandlekar SV, Rose AV, Cornelius G, et al. Development of an in vivo rat screen model to predict pharmacokinetic interactions of CYP3A4 substrates. *Xenobiotica.* 2007 Sep; 37(9): 923-942. doi:10.1080/00498250701570269
 211. Marques-Marinho FD, Vianna-Soares CD. Cellulose and its derivatives use in the pharmaceutical compounding practice. In: de Tv, Godbout L, editors. *Cellulose - medical, pharmaceutical and electronic applications* [Internet]. London: IntechOpen; 2013 Aug [cited 2021 Dec 07]. Available from: <https://www.intechopen.com/chapters/45627> doi:10.5772/56637

212. Mason P. Important drug-nutrient interactions. *Proc Nutr Soc.* 2010 Nov; 69(4): 551-557. doi:10.1017/S0029665110001576
213. Mauvais-Jarvis F, Arnold AP, Reue K. A guide for the design of pre-clinical studies on sex differences in metabolism. *Cell Metab.* 2017 Jun; 25(6): 1216-1230. doi:10.1016/j.cmet.2017.04.033
214. Medina-López R, Vara-Gama N, Soria-Arteche O, Moreno-Rocha LA, López-Muñoz FJ. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of (S)-ketoprofen co-administered with caffeine: A preclinical study in arthritic rats. *Pharmaceutics.* 2018 Jan; 10(1): 20. doi:10.3390/pharmaceutics10010020
215. Mehrotra N, Gupta M, Kovar A, Meibohm B. The role of pharmacokinetics and pharmacodynamics in phosphodiesterase-5 inhibitor therapy. *Int J Impot Res.* 2007 May-Jun; 19(3): 253-264. doi:10.1038/sj.ijir.3901522
216. Mei S, Zhang K. A machine learning framework for predicting drug–drug interactions. *Sci Rep.* 2021 Sep; 11: 17619. doi:10.1038/s41598-021-97193-8
217. Meissner G. The structural basis of ryanodine receptor ion channel function. *J Gen Physiol.* 2017 Dec; 149(12): 1065-1089. doi:10.1085/jgp.201711878
218. Mekjaruskul C, Sripanidkulchai B. Pharmacokinetic interaction between *Kaempferia parviflora* extract and sildenafil in rats. *J Nat Med.* 2015 Apr; 69(2): 224-231. doi:10.1007/s11418-014-0882-4
219. Mhatre S, Srivastava T, Naik S, Patravale V. Antiviral activity of green tea and black tea polyphenols in prophylaxis and treatment of COVID-19: A review. *Phytomedicine.* 2021 May; 85: 153286. doi:10.1016/j.phymed.2020.153286
220. Miller NA, Reddy MB, Heikkinen AT, Lukacova V, Parrott N. Physiologically based pharmacokinetic modelling for first-in-human predictions: An updated model building strategy illustrated with challenging industry case studies. *Clin Pharmacokinet.* 2019 Jun; 58(6): 727-746. doi:10.1007/s40262-019-00741-9
221. Miranda C, Pérez-Rodríguez Z, Hernández-Armengol R, Quiñones-García Y, Betancourt-Purón T, Cabrera-Pérez MÁ. Biowaiver or bioequivalence: Ambiguity in sildenafil citrate BCS classification. *AAPS PharmSciTech.* 2018 May; 19(4): 1693-1698. doi:10.1208/s12249-018-0982-7
222. Misaka S, Kawabe K, Onoue S, et al. Green tea extract affects the cytochrome P450 3A activity and pharmacokinetics of simvastatin in rats. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2013 Dec; 28(6): 514-518. doi:10.2133/dmpk.dmpk-13-nt-006
223. Misaka S, Miyazaki N, Fukushima T, Yamada S, Kimura J. Effects of green tea extract and (-)-epigallocatechin-3-gallate on pharmacokinetics of nadolol in rats. *Phytomedicine.* 2013 Nov; 20(14): 1247-1250. doi:10.1016/j.phymed.2013.07.003
224. Misaka S, Yatabe J, Müller F, et al. Green tea ingestion greatly reduces plasma concentrations of nadolol in healthy subjects. *Clin Pharmacol Ther.* 2014 Apr; 95(4): 432-438. doi:10.1038/clpt.2013.241
225. Mitchell L, MacFarlane PM. Mechanistic actions of oxygen and methylxanthines on respiratory neural control and for the treatment of neonatal apnea. *Respir Physiol Neurobiol.* 2020 Feb; 273: 103318. doi:10.1016/j.resp.2019.103318
226. Mitchell S, Vargas J, Hoffmann A. Signaling via the NFκB system. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.* 2016 May; 8(3): 227-241. doi:10.1002/wsbm.1331

227. Miyoshi N, Tanabe H, Suzuki T, Saeki K, Hara Y. Applications of a standardized Green tea catechin preparation for viral warts and human papilloma virus-related and unrelated cancers. *Molecules*. 2020 Jun; 25(11): 2588. doi:10.3390/molecules25112588
228. Mohammadi S, Heidarizadeh M, Entesari M, et al. *In silico* investigation on the inhibiting role of nicotine/caffeine by blocking the S protein of SARS-CoV-2 versus ACE2 receptor. *Microorganisms*. 2020 Oct; 8(10): 1600. doi:10.3390/microorganisms8101600
229. Mohutsky MA, Romeike A, Meador V, Lee WM, Fowler J, Francke-Carroll S. Hepatic drug-metabolizing enzyme induction and implications for preclinical and clinical risk assessment. *Toxicol Pathol*. 2010 Aug; 38(5): 799-809. doi:10.1177/0192623310375099
230. Monji F, Al-Mahmood Siddiquee A, Hashemian F. Can pentoxifylline and similar xanthine derivatives find a niche in COVID-19 therapeutic strategies? A ray of hope in the midst of the pandemic. *Eur J Pharmacol*. 2020 Nov; 887: 173561. doi:10.1016/j.ejphar.2020.173561
231. Monteiro JP, Alves MG, Oliveira PF, Silva BM. Structure-bioactivity relationships of methylxanthines: Trying to make sense of all the promises and the drawbacks. *Molecules*. 2016 Jul; 21(8): 974. doi:10.3390/molecules21080974
232. Morris ME, Rodriguez-Cruz V, Felmlee MA. SLC and ABC transporters: Expression, localization, and species differences at the blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers. *AAPS J*. 2017 Sep; 19(5): 1317-1331. doi:10.1208/s12248-017-0110-8
233. Mouly S, Lloret-Linares C, Sellier PO, Sene D, Bergmann JF. Is the clinical relevance of drug-food and drug-herb interactions limited to grapefruit juice and Saint-John's Wort?. *Pharmacol Res*. 2017 Apr; 118: 82-92. doi:10.1016/j.phrs.2016.09.038
234. Mulhall JP, Luo X, Zou KH, Stecher V, Galaznik A. Relationship between age and erectile dysfunction diagnosis or treatment using real-world observational data in the USA. *Int J Clin Pract*. 2016 Dec; 70(12): 1012-1018. doi:10.1111/ijcp.12908
235. Murayama M, Tsujimoto K, Uozaki M, et al. Effect of caffeine on the multiplication of DNA and RNA viruses. *Mol Med Rep*. 2008 Mar-Apr; 1(2): 251-255.
236. Musial C, Kuban-Jankowska A, Gorska-Ponikowska M. Beneficial properties of Green tea catechins. *Int J Mol Sci*. 2020 Mar; 21(5): 1744. doi:10.3390/ijms21051744
237. Musther H, Olivares-Morales A, Hatley OJ, Liu B, Rostami Hodjegan A. Animal versus human oral drug bioavailability: Do they correlate?. *Eur J Pharm Sci*. 2014 Jun; 57(100): 280-291. doi:10.1016/j.ejps.2013.08.018
238. Muto S, Fujita K, Yamazaki Y, Kamataki T. Inhibition by green tea catechins of metabolic activation of procarcinogens by human cytochrome P450. *Mutat Res*. 2001 Aug; 479(1-2): 197-206. doi:10.1016/s0027-5107(01)00204-4
239. Nakayama H, Nakazono Y, Yakashiro I, et al. HPLC and HPLC-TOFMS analyses of post-fermented teas in Japan. *Japanese Journal of Food Chemistry and Safety*. 2015 Aug; 22: 94-99. doi:10.18891/jjfc.22.2_94
240. Nehlig A. Interindividual differences in caffeine metabolism and factors driving caffeine consumption. *Pharmacol Rev*. 2018 Apr; 70(2): 384-411. doi:10.1124/pr.117.014407
241. Nguyen T, Alzahrani T. *Ginkgo Biloba*. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan [updated 2021 Jul 9; cited 2021 Sep 20]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK541024/>
242. Nicolussi S, Drewe J, Butterweck V, Meyer Zu Schwabedissen HE. Clinical relevance of St. John's wort drug interactions revisited. *Br J Pharmacol*. 2020 Mar; 177(6): 1212-1226. doi:10.1111/bph.14936

243. Niu J, Straubinger RM, Mager DE. Pharmacodynamic drug-drug interactions. *Clin Pharmacol Ther.* 2019 Jun; 105(6): 1395-1406. doi:10.1002/cpt.1434
244. Nowaczewska M, Wiciński M, Kaźmierczak W. The ambiguous role of caffeine in migraine headache: From trigger to treatment. *Nutrients.* 2020 Jul; 12(8): 2259. doi:10.3390/nu12082259
245. Obaidat A, Roth M, Hagenbuch B. The expression and function of organic anion transporting polypeptides in normal tissues and in cancer. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2012 Feb; 52: 135-151. doi:10.1146/annurev-pharmtox-010510-100556
246. Oga EF, Sekine S, Shitara Y, Horie T. Pharmacokinetic herb-drug interactions: Insight into mechanisms and consequences. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 2016 Apr; 41(2): 93-108. doi:10.1007/s13318-015-0296-z
247. Ogawa R, Echizen H. Clinically significant drug interactions with antacids: an update. *Drugs.* 2011 Oct; 71(14): 1839-1864. doi:10.2165/11593990-000000000-00000
248. Ohishi T, Goto S, Monira P, Isemura M, Nakamura Y. Anti-inflammatory action of Green tea. *Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem.* 2016 Sep; 15(2): 74-90. doi:10.2174/1871523015666160915154443
249. Oketch-Rabah HA, Roe AL, Rider CV, et al. United States Pharmacopeia (USP) comprehensive review of the hepatotoxicity of green tea extracts. *Toxicol Rep.* 2020 Feb; 7: 386-402. doi:10.1016/j.toxrep.2020.02.008
250. Olkkola KT, Ahonen J. Midazolam and other benzodiazepines. *Handb Exp Pharmacol.* 2008; (182): 335-360. doi:10.1007/978-3-540-74806-9_16
251. Ouranidis A, Tsiaxerli A, Vardaka E, et al. Sildenafil 4.0-integrated synthetic chemistry, formulation and analytical strategies effecting immense therapeutic and societal impact in the fourth industrial era. *Pharmaceuticals (Basel).* 2021 Apr; 14(4): 365. doi:10.3390/ph14040365
252. Padda IS, Tripp J. *Phosphodiesterase Inhibitors.* In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan [updated 2021 Jun 15; cited Nov 15]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559276/>
253. Paiva L, Rego C, Lima E, Marccone M, Baptista J. Comparative analysis of the polyphenols, caffeine, and antioxidant activities of Green tea, White tea, and flowers from Azorean *Camellia sinensis* varieties affected by different harvested and processing conditions. *Antioxidants (Basel).* 2021 Jan; 10(2): 183. doi:10.3390/antiox10020183
254. Pal S, Ghosh D, Dey S, Saha C. Effect of infusion time and consecutive brewing on antioxidant status of black tea infusion. *Int. J. Tea Sci.* 2013 Oct; 9(SI 2–3): 65–68.
255. Palleria C, Di Paolo A, Giofrè C, et al. Pharmacokinetic drug-drug interaction and their implication in clinical management. *J Res Med Sci.* 2013 Jul; 18(7): 601-610.
256. Parcheta M, Świsłocka R, Orzechowska S, Akimowicz M, Choińska R, Lewandowski W. Recent developments in effective antioxidants: The structure and antioxidant properties. *Materials (Basel).* 2021 Apr; 14(8): 1984. doi:10.3390/ma14081984
257. Patel S, Rauf A. Adaptogenic herb ginseng (Panax) as medical food: Status quo and future prospects. *Biomed Pharmacother.* 2017 Jan; 85: 120-127. doi:10.1016/j.biopha.2016.11.112
258. Peluso I, Serafini M. Antioxidants from black and green tea: from dietary modulation of oxidative stress to pharmacological mechanisms. *Br J Pharmacol.* 2017 Jun; 174(11): 1195-1208. doi:10.1111/bph.13649

259. Peng Y, Cheng Z, Xie F. Evaluation of pharmacokinetic drug-drug interactions: A review of the mechanisms, in vitro and in silico approaches. *Metabolites*. 2021 Jan; 11(2): 75. doi:10.3390/metabo11020075
260. Perdaems N, Blasco H, Vinson C, et al. Predictions of metabolic drug-drug interactions using physiologically based modelling: Two cytochrome P450 3A4 substrates coadministered with ketoconazole or verapamil. *Clin Pharmacokinet*. 2010 Apr; 49(4): 239-258. doi:10.2165/11318130-000000000-00000
261. Peters SA, Ungell AL, Dolgos H. Physiologically based pharmacokinetic (PBPK) modeling and simulation: applications in lead optimization. *Curr Opin Drug Discov Devel*. 2009 Jul; 12(4): 509-518.
262. Pickering C, Kiely J. What should we do about habitual caffeine use in athletes?. *Sports Med*. 2019 Jun; 49(6): 833-842. doi:10.1007/s40279-018-0980-7
263. Poulin P, Krishnan K. An algorithm for predicting tissue: blood partition coefficients of organic chemicals from n-octanol: water partition coefficient data. *J Toxicol Environ Health*. 1995 Sep; 46(1): 117-129. doi:10.1080/15287399509532021
264. Prasanth MI, Sivamaruthi BS, Chaiyasut C, Tencomnao T. A review of the role of Green tea (*Camellia sinensis*) in antiphotaging, stress resistance, neuroprotection, and autophagy. *Nutrients*. 2019 Feb; 11(2): 474. doi:10.3390/nu11020474
265. Purnell B, Murugan M, Jani R, Boison D. The good, the bad, and the deadly: Adenosinergic mechanisms underlying sudden unexpected death in epilepsy. *Front Neurosci*. 2021 Jul; 15: 708304. doi:10.3389/fnins.2021.708304
266. Radeva-Ilieva MP, Georgiev KD, Hvarchanova NR, et al. Protective effect of methylxanthine fractions isolated from *Banacha* tea leaves against doxorubicin-induced cardio- and nephrotoxicities in rats. *Biomed Res Int*. 2020 Aug; 2020: 4018412. doi:10.1155/2020/4018412
267. Rai A, Gill M, Kinra M, et al. Assessment of preclinical effect of (+)-catechin hydrate on sexual function: An in silico and in vivo study. *Andrologia*. 2020 Nov; 52(10): e13737. doi:10.1111/and.13737
268. Rashidinejad A, Boostani S, Babazadeh A, et al. Opportunities and challenges for the nanodelivery of green tea catechins in functional foods. *Food Res Int*. 2021 Apr; 142: 110186. doi:10.1016/j.foodres.2021.110186
269. Reygaert WC. Green tea catechins: Their use in treating and preventing infectious diseases. *Biomed Res Int*. 2018 Jul; 2018: 9105261. doi:10.1155/2018/9105261
270. Rocha A, Bolin AP, Cardoso CA, Otton R. Green tea extract activates AMPK and ameliorates white adipose tissue metabolic dysfunction induced by obesity. *Eur J Nutr*. 2016 Oct; 55(7): 2231-2244. doi:10.1007/s00394-015-1033-8
271. Rodak K, Kokot I, Kratz EM. Caffeine as a factor influencing the functioning of the human body-friend or foe?. *Nutrients*. 2021 Sep; 13(9): 3088. doi:10.3390/nu13093088
272. Rojano-Ortega D. Regular, but not acute, green tea supplementation increases total antioxidant status and reduces exercise-induced oxidative stress: a systematic review. *Nutr Res*. 2021 Oct; 94: 34-43. doi:10.1016/j.nutres.2021.08.004
273. Rosen C, Taran C, Hanna M, et al. Caffeine citrate for apnea of prematurity-one dose does not fit all a prospective study. *J Perinatol*. 2021 Sep; 41(9): 2292-2297. doi:10.1038/s41372-021-01172-w

274. Rowland M, Peck C, Tucker G. Physiologically-based pharmacokinetics in drug development and regulatory science. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2011 Feb; 51: 45-73. doi:10.1146/annurev-pharmtox-010510-100540
275. Sager JE, Yu J, Ragueneau-Majlessi I, Isoherranen N. Physiologically based pharmacokinetic (PBPK) modeling and simulation approaches: A systematic review of published models, applications, and model verification. *Drug Metab Dispos*. 2015 Nov; 43(11): 1823-1837. doi:10.1124/dmd.115.065920
276. Sakata I, Ikeuchi M, Maruyama I, Okuda T. Quantitative analysis of (-)-epigallocatechin gallate in tea leaves by high-performance liquid chromatography. *Yakugaku Zasshi*. 1991 Dec; 111(12): 790-793. doi:10.1248/yakushi1947.111.12_790
277. Saklar S, Ertas E, Ozdemir IS, Karadeniz B. Effects of different brewing conditions on catechin content and sensory acceptance in Turkish green tea infusions. *J Food Sci Technol*. 2015 Oct; 52(10): 6639-6646. doi:10.1007/s13197-015-1746-y
278. Samardžić I, Marinović I, Kuča N, Vrca VB. Potential clinically significant drug-drug interactions in prescribed pharmacotherapy in an outpatient setting. *Pharmazie*. 2021 Aug; 76(8): 390-395. doi:10.1691/ph.2021.1561
279. Sanchez JM. Methylxanthine content in commonly consumed foods in Spain and determination of its intake during consumption. *Foods*. 2017 Dec; 6(12): 109. doi:10.3390/foods6120109
280. Sangana R, Gu H, Chun DY, Einolf HJ. Evaluation of clinical drug interaction potential of clofazimine using static and dynamic modeling approaches. *Drug Metab Dispos*. 2018 Jan; 46(1): 26-32. doi:10.1124/dmd.117.077834
281. Saputra EC, Huang L, Chen Y, Tucker-Kellogg L. Combination therapy and the evolution of resistance: The theoretical merits of synergism and antagonism in cancer. *Cancer Res*. 2018 May; 78(9): 2419-2431. doi:10.1158/0008-5472.CAN-17-1201
282. Satoh T, Fujisawa H, Nakamura A, Takahashi N, Watanabe K. Inhibitory effects of eight Green tea catechins on cytochrome P450 1A2, 2C9, 2D6, and 3A4 activities. *J Pharm Pharm Sci*. 2016 Apr-Jun; 19(2): 188-197. doi:10.18433/J3MS5C
283. Sawatdee S, Atipairin A, Sae Yoon A, et al. Oral bioavailability and pharmacokinetics of sildenafil citrate dry foam tablets in rats. *Cogent Medicine*. 2018 Aug; 5(1): 1510821. doi:10.1080/2331205X.2018.1510821
284. Schneider-Rayman M, Steinberg D, Sionov RV, Friedman M, Shalish M. Effect of epigallocatechin gallate on dental biofilm of *Streptococcus mutans*: An in vitro study. *BMC Oral Health*. 2021 Sep; 21(1): 447. doi:10.1186/s12903-021-01798-4
285. Scholl C, Lepper A, Lehr T, et al. Population nutrkinetics of green tea extract. *PLoS One*. 2018 Feb; 13(2): e0193074. doi:10.1371/journal.pone.0193074
286. Schwalfenberg G, Genuis SJ, Rodushkin I. The benefits and risks of consuming brewed tea: beware of toxic element contamination. *J Toxicol*. 2013 Oct; 2013: 370460. doi:10.1155/2013/370460
287. Schwartz BG, Kloner RA. Drug interactions with phosphodiesterase-5 inhibitors used for the treatment of erectile dysfunction or pulmonary hypertension. *Circulation*. 2010 Jul; 122(1): 88-95. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.110.944603
288. Seeland S, Treiber A, Hafner M, Huwyler J. On-line identification of P-glycoprotein substrates by monitoring of extracellular acidification and respiration rates in living cells.

- Biochimica et biophysica acta*. 2011 Jul; 1808(7), 1827-1831. doi:10.1016/j.bbamem.2011.03.003
289. Sharifi-Rad M, Anil Kumar NV, Zucca P, et al. Lifestyle, oxidative stress, and antioxidants: Back and forth in the pathophysiology of chronic diseases. *Front Physiol*. 2020 Jul; 11: 694. doi:10.3389/fphys.2020.00694
 290. Sharifi-Rad M, Pezzani R, Redaelli M, et al. Preclinical pharmacological activities of epigallocatechin-3-gallate in signaling pathways: An update on cancer. *Molecules*. 2020 Jan; 25(3): 467. doi:10.3390/molecules25030467
 291. Shebley M, Sandhu P, Emami Riedmaier A, et al. Physiologically based pharmacokinetic model qualification and reporting procedures for regulatory submissions: A consortium perspective. *Clin Pharmacol Ther*. 2018 Jul; 104(1): 88-110. doi:10.1002/cpt.1013
 292. Shen HY, Chen JF. Adenosine A(2A) receptors in psychopharmacology: modulators of behavior, mood and cognition. *Curr Neuropharmacol*. 2009 Sep; 7(3): 195-206. doi:10.2174/157015909789152191
 293. Shin HS, Bae SK, Lee MG. Pharmacokinetics of sildenafil after intravenous and oral administration in rats: hepatic and intestinal first-pass effects. *Int J Pharm*. 2006 Aug; 320(1-2): 64-70. doi:10.1016/j.ijpharm.2006.04.005
 294. Sicouri S, Antzelevitch C. Sudden cardiac death secondary to antidepressant and antipsychotic drugs. *Expert Opin Drug Saf*. 2008 Mar; 7(2): 181-194. doi:10.1517/14740338.7.2.181
 295. Singh BN, Shankar S, Srivastava RK. Green tea catechin, epigallocatechin-3-gallate (EGCG): mechanisms, perspectives and clinical applications. *Biochem Pharmacol*. 2011 Dec; 82(12): 1807-1821. doi:10.1016/j.bcp.2011.07.093
 296. Singh K, Tarapcsák S, Gyöngy Z, et al. Effects of polyphenols on P-Glycoprotein (ABCB1) activity. *Pharmaceutics*. 2021 Dec; 13(12): 2062. doi:10.3390/pharmaceutics13122062
 297. Socała K, Nieoczym D, Wyska E, Wlaź P. Effect of sildenafil on the activity of some antidepressant drugs and electroconvulsive shock treatment in the forced swim test in mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2017 Apr; 390(4): 339-349. doi:10.1007/s00210-016-1334-3
 298. Sodeifian G, Sajadian SA, Razmimanesh F, Hazaveie SM. Solubility of ketoconazole (antifungal drug) in SC-CO₂ for binary and ternary systems: measurements and empirical correlations. *Sci Rep*. 2021 Apr; 11(1): 7546. doi:10.1038/s41598-021-87243-6
 299. Soleymani S, Bahramsoltani R, Rahimi R, Abdollahi M. Clinical risks of St John's Wort (*Hypericum perforatum*) co-administration. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2017 Oct; 13(10): 1047-1062. doi:10.1080/17425255.2017.1378342
 300. Song Y, Li C, Liu G, et al. Drug-metabolizing cytochrome P450 enzymes have multifarious influences on treatment outcomes. *Clin Pharmacokinet*. 2021 May; 60(5): 585-601. doi:10.1007/s40262-021-01001-5
 301. Stockwell J, Jakova E, Cayabyab FS. Adenosine A1 and A2A receptors in the brain: Current research and their role in neurodegeneration. *Molecules*. 2017 Apr; 22(4): 676. doi:10.3390/molecules22040676
 302. Strach B, Wyska E, Pocięcha K, Krupa A, Jachowicz R. Sensitive and precise HPLC method with back-extraction clean-up step for the determination of sildenafil in rat plasma and its application to a pharmacokinetic study. *Biomed Chromatogr*. 2015 Oct; 29(10): 1559-1566. doi:10.1002/bmc.3459

303. Sun H, Chen Y, Cheng M, Zhang X, Zheng X, Zhang Z. The modulatory effect of polyphenols from green tea, oolong tea and black tea on human intestinal microbiota in vitro. *J Food Sci Technol*. 2018 Jan; 55(1): 399-407. doi:10.1007/s13197-017-2951-7
304. Tadesse A, Hymete A, Bekhit AA, Mohammed SF. Quantification of total polyphenols, catechin, caffeine, L-theanine, determination of antioxidant activity and effect on antileishmanial drugs of ethiopian tea leaves extracts. *Pharmacognosy Res*. 2015 Jun; 7(Suppl 1): S7-S14. doi:10.4103/0974-8490.157991
305. Tallei TE, Fatimawali, Niode NJ, et al. A comprehensive review of the potential use of Green tea polyphenols in the management of COVID-19. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*. 2021 Dec; 7170736. doi:10.1155/2021/7170736
306. Tan CSS, Lee SWH. Warfarin and food, herbal or dietary supplement interactions: A systematic review. *Br J Clin Pharmacol*. 2021 Feb; 87(2): 352-374. doi:10.1111/bcp.14404
307. Tan WSD, Liao W, Zhou S, Wong WSF. Is there a future for andrographolide to be an anti-inflammatory drug? Deciphering its major mechanisms of action. *Biochem Pharmacol*. 2017 Sep; 139: 71-81. doi:10.1016/j.bcp.2017.03.024
308. Tang GY, Meng X, Gan RY, et al. Health functions and related molecular mechanisms of tea components: an update review. *Int J Mol Sci*. 2019 Dec; 20(24): 6196. doi:10.3390/ijms20246196
309. Tang PF, Zheng X, Hu XX, et al. Functional measurement of CYP2C9 and CYP3A4 allelic polymorphism on sildenafil metabolism. *Drug Des Devel Ther*. 2020 Nov; 14: 5129-5141. doi:10.2147/DDDT.S268796
310. Teixeira AM, Sousa C. A Review on the biological activity of Camellia species. *Molecules*. 2021 Apr; 26(8): 2178. doi:10.3390/molecules26082178
311. Temple JL, Bernard C, Lipshultz SE, Czachor JD, Westphal JA, Mestre MA. The safety of ingested caffeine: A comprehensive review. *Front Psychiatry*. 2017 May; 8: 80. doi:10.3389/fpsy.2017.00080
312. Teo YL, Ho HK, Chan A. Metabolism-related pharmacokinetic drug-drug interactions with tyrosine kinase inhibitors: current understanding, challenges and recommendations. *Br J Clin Pharmacol*. 2015 Feb; 79(2): 241-253. doi:10.1111/bcp.12496
313. Teschke R, Xuan TD. How can green tea polyphenols affect drug metabolism and should we be concerned?. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2019 Nov; 15(12): 989-991. doi:10.1080/17425255.2019.1697228
314. Tfouni SA, Camara MM, Kamikata K, Gomes FM, Furlani RP. Caffeine in teas: levels, transference to infusion and estimated intake. *Food Science and Technology International*. 2018 Jan; 38: 661-666. doi:10.1590/1678-457X.12217
315. Thorn CF, Aklillu E, McDonagh EM, Klein TE, Altman RB. PharmGKB summary: caffeine pathway. *Pharmacogenet Genomics*. 2012 May; 22(5): 389-395. doi:10.1097/FPC.0b013e3283505d5e
316. Thornfeldt CR. Therapeutic herbs confirmed by evidence-based medicine. *Clin Dermatol*. 2018 May-Jun; 36(3): 289-298. doi:10.1016/j.clindermatol.2018.03.003
317. Tisdale JE. Drug-induced QT interval prolongation and torsades de pointes: Role of the pharmacist in risk assessment, prevention and management. *Can Pharm J (Ott)*. 2016 May; 149(3): 139-152. doi:10.1177/1715163516641136

318. Tornio A, Filppula AM, Niemi M, Backman JT. Clinical studies on drug-drug interactions involving metabolism and transport: Methodology, pitfalls, and interpretation. *Clin Pharmacol Ther.* 2019 Jun; 105(6): 1345-1361. doi:10.1002/cpt.1435
319. Toutain PL, Ferran A, Bousquet-Mélou A. Species differences in pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Handb Exp Pharmacol.* 2010 Feb; (199): 19-48. doi:10.1007/978-3-642-10324-7_2
320. Truong VL, Jeong WS. Cellular defensive mechanisms of tea polyphenols: Structure-activity relationship. *Int J Mol Sci.* 2021 Aug; 22(17): 9109. doi:10.3390/ijms22179109
321. Tsamandouras N, Rostami-Hodjegan A, Aarons L. Combining the 'bottom up' and 'top down' approaches in pharmacokinetic modelling: fitting PBPK models to observed clinical data. *Br J Clin Pharmacol.* 2015 Jan; 79(1): 48-55. doi:10.1111/bcp.12234
322. Tucker GT, Houston JB, Huang SM. Optimizing drug development: strategies to assess drug metabolism/transporter interaction potential--towards a consensus. *Br J Clin Pharmacol.* 2001 Jul; 52(1): 107-117. doi:10.1046/j.0306-5251.2001.temp.1441.x
323. Turnbull D, Rodricks JV, Mariano GF, Chowdhury F. Caffeine and cardiovascular health. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2017 Oct; 89: 165-185. doi:10.1016/j.yrtph.2017.07.025
324. Urry E, Jetter A, Landolt HP. Assessment of CYP1A2 enzyme activity in relation to type-2 diabetes and habitual caffeine intake. *Nutr Metab (Lond).* 2016 Oct; 13: 66. doi:10.1186/s12986-016-0126-6
325. van Calker D, Biber K, Domschke K, Serchov T. The role of adenosine receptors in mood and anxiety disorders. *J Neurochem.* 2019 Oct; 151(1): 11-27. doi:10.1111/jnc.14841
326. van Koert RR, Bauer PR, Schuitema I, Sander JW, Visser GH. Caffeine and seizures: A systematic review and quantitative analysis. *Epilepsy Behav.* 2018 Mar; 80: 37-47. doi:10.1016/j.yebeh.2017.11.003
327. Vaynshteyn D, Jeong H. Caffeine induces CYP1A2 expression in rat hepatocytes but not in human hepatocytes. *Drug Metab Lett.* 2012 Jun; 6(2): 116-119.
328. Verma J, Khedkar VM, Coutinho EC. 3D-QSAR in drug design--a review. *Curr Top Med Chem.* 2010; 10(1): 95-115. doi:10.2174/156802610790232260
329. Vinayagam S, Sattu K. SARS-CoV-2 and coagulation disorders in different organs. *Life Sci.* 2020 Nov; 260: 118431. doi:10.1016/j.lfs.2020.118431
330. Vischini G, Niscola P, Stefoni A, Farneti F. Increased plasma levels of tacrolimus after ingestion of green tea. *Am J Kidney Dis.* 2011 Aug; 58(2): 329. doi:10.1053/j.ajkd.2011.05.013
331. Wagner C, Zhao P, Pan Y, et al. Application of Physiologically Based Pharmacokinetic (PBPK) modeling to support dose selection: Report of an FDA public workshop on PBPK. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol.* 2015 Apr; 4(4): 226-230. doi:10.1002/psp4.33
332. Wakamatsu M, Yamanouchi H, Sahara H, et al. Catechin and caffeine contents in green tea at different harvest periods and their metabolism in miniature swine. *Food Sci Nutr.* 2019 Jul; 7(8): 2769-2778. doi:10.1002/fsn3.1143
333. Walker DK, Ackland MJ, James GC, et al. Pharmacokinetics and metabolism of sildenafil in mouse, rat, rabbit, dog and man. *Xenobiotica.* 1999 Mar; 29(3): 297-310. doi:10.1080/004982599238687

334. Wan J, Feng M, Pan W, et al. Inhibitory effects of six types of tea on aging and high-fat diet-related amyloid formation activities. *Antioxidants (Basel)*. 2021 Sep; 10(10): 1513. doi:10.3390/antiox10101513
335. Wang J, Wang G, Quan X, et al. Fluconazole-induced long QT syndrome via impaired human ether-a-go-go-related gene (hERG) protein trafficking in rabbits. *Europace*. 2017 Jul; 19(7): 1244-1249. doi:10.1093/europace/euw091
336. Wang KL, Li ZQ, Cao ZY, et al. Effects of ginkgolide A, B and K on platelet aggregation. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 2017 Dec; 42(24): 4722-4726. doi:10.19540/j.cnki.cjcmm.2017.0207
337. Wang L, Prasad B, Salphati L, et al. Interspecies variability in expression of hepatobiliary transporters across human, dog, monkey, and rat as determined by quantitative proteomics. *Drug Metab Dispos*. 2015 Mar; 43(3): 367-374. doi:10.1124/dmd.114.061580
338. Wang Y, Bahar MA, Jansen AME, et al. Improving antibacterial prescribing safety in the management of COPD exacerbations: systematic review of observational and clinical studies on potential drug interactions associated with frequently prescribed antibacterials among COPD patients. *J Antimicrob Chemother*. 2019 Oct; 74(10): 2848-2864. doi:10.1093/jac/dkz221
339. Wang YS, Zhu H, Li H, Li Y, Zhao B, Jin YH. Ginsenoside compound K inhibits nuclear factor-kappa B by targeting Annexin A2. *J Ginseng Res*. 2019 Jul; 43(3): 452-459. doi:10.1016/j.jgr.2018.04.002
340. Wang ZY, Chen M, Zhu LL, et al. Pharmacokinetic drug interactions with clopidogrel: updated review and risk management in combination therapy. *Ther Clin Risk Manag*. 2015 Mar; 11: 449-467. doi:10.2147/TCRM.S80437
341. Warrington JS, Von Moltke LL, Shader RI, Greenblatt DJ. In vitro biotransformation of sildenafil (Viagra) in the male rat: the role of CYP2C11. *Drug Metab Dispos*. 2002 Jun; 30(6): 655-657. doi:10.1124/dmd.30.6.655
342. Watanabe Y, Okayasu T, Idenoue K, Adachi S. Degradation kinetics of catechin in aqueous solution in the presence of ascorbic acid or octanoyl ascorbate. *Japan Journal of Food Engineering*. 2009 Jun; 10(2): 117-124. doi:10.11301/jsfe.10.117
343. Welsh C, Pan J, Belik J. Caffeine impairs gastrointestinal function in newborn rats. *Pediatr Res*. 2015 Jul; 78(1): 24-28. doi:10.1038/pr.2015.65
344. Weng Y, Yao J, Sparks S, Wang KY. Nattokinase: An oral antithrombotic agent for the prevention of cardiovascular disease. *Int J Mol Sci*. 2017 Feb; 18(3): 523. doi:10.3390/ijms18030523
345. Werba JP, Misaka S, Giroli MG, et al. Update of green tea interactions with cardiovascular drugs and putative mechanisms. *J Food Drug Anal*. 2018 Apr; 26(2S): S72-S77. doi:10.1016/j.jfda.2018.01.008
346. Wu M, Brown AC. Applications of catechins in the treatment of bacterial infections. *Pathogens*. 2021 May; 10(5): 546. doi:10.3390/pathogens10050546
347. Wu Q, Liu L, Miron A, Klímová B, Wan D, Kuča K. The antioxidant, immunomodulatory, and anti-inflammatory activities of Spirulina: an overview. *Arch Toxicol*. 2016 Aug; 90(8): 1817-1840. doi:10.1007/s00204-016-1744-5
348. Wu W, Bush KT, Nigam SK. Key role for the organic anion transporters, OAT1 and OAT3, in the in vivo handling of uremic toxins and solutes. *Sci Rep*. 2017 Jul; 7(1) :4939. doi:10.1038/s41598-017-04949-2

349. Xing L, Zhang H, Qi R, Tsao R, Mine Y. Recent advances in the understanding of the health benefits and molecular mechanisms associated with Green tea polyphenols. *J Agric Food Chem*. 2019 Jan; 67(4): 1029-1043. doi:10.1021/acs.jafc.8b06146
350. Xu DP, Li Y, Meng X, et al. Natural antioxidants in foods and medicinal plants: Extraction, assessment and resources. *Int J Mol Sci*. 2017 Jan; 18(1): 96. doi:10.3390/ijms18010096
351. Xu J, Xu Z, Zheng W. A review of the antiviral role of Green tea catechins. *Molecules*. 2017 Aug; 22(8): 1337. doi:10.3390/molecules22081337
352. Xu YQ, Yu P, Zhou W. Combined effect of pH and temperature on the stability and antioxidant capacity of epigallocatechin gallate (EGCG) in aqueous system. *Journal of Food Engineering*. 2019 Jun; 250: 46-54. doi:10.1016/j.jfoodeng.2019.01.016
353. Yan Z, Zhong Y, Duan Y, et al. Antioxidant mechanism of tea polyphenols and its impact on health benefits. *Animal Nutrition*. 2020 Jun; 6(2): 115-123. doi:10.1016/j.aninu.2020.01.001
354. Yang CS, Zhang J, Zhang L, Huang J, Wang Y. Mechanisms of body weight reduction and metabolic syndrome alleviation by tea. *Mol Nutr Food Res*. 2016 Jan; 60(1): 160-174. doi:10.1002/mnfr.201500428
355. Yang L, Yan C, Zhang F, et al. Effects of ketoconazole on cyclophosphamide metabolism: evaluation of CYP3A4 inhibition effect using the in vitro and in vivo models. *Exp Anim*. 2018 Feb; 67(1): 71-82. doi:10.1538/expanim.17-0048
356. Yang L, Yu X, Zhang Y, Liu N, Xue X, Fu J. Encephalopathy in preterm infants: Advances in neuroprotection with caffeine. *Front Pediatr*. 2021 Oct; 9: 724161. doi:10.3389/fped.2021.724161
357. Yang R, Wang J, Chen Y, Sun Z, Wang R, Dai Y. Effect of caffeine on erectile function via up-regulating cavernous cyclic guanosine monophosphate in diabetic rats. *J Androl*. 2008 Sep-Oct; 29(5): 586-591. doi:10.2164/jandrol.107.004721
358. Yi M, Wu X, Zhuang W, et al. Tea consumption and health outcomes: Umbrella review of meta-analyses of observational studies in humans. *Mol Nutr Food Res*. 2019 Aug; 63(16): e1900389. doi:10.1002/mnfr.201900389
359. Yoo H, Cho SM, Choi YW, et al. Comparison of pharmacokinetic characteristics of sildenafil citrate chewable tablets and film-coated tablets in healthy male subjects. *Transl Clin Pharmacol*. 2017 Sep; 25(3): 153-156. doi:10.12793/tcp.2017.25.3.153
360. Yu J, Ritchie TK, Zhou Z, Ragueneau-Majlessi I. Key findings from preclinical and clinical drug interaction studies presented in new drug and biological license applications approved by the Food and drug administration in 2014. *Drug Metab Dispos*. 2016 Jan; 44(1): 83-101. doi:10.1124/dmd.115.066720
361. Yu T, Campbell SC, Stockmann C, et al. Pregnancy-induced changes in the pharmacokinetics of caffeine and its metabolites. *J Clin Pharmacol*. 2016 May; 56(5): 590-596. doi:10.1002/jcph.632
362. Yuan F, Dong H, Fang K, Gong J, Lu F. Effects of green tea on lipid metabolism in overweight or obese people: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Mol Nutr Food Res*. 2018 Jan; 62(1): 10.1002/mnfr.201601122. doi:10.1002/mnfr.201601122
363. Yuan H, Ma Q, Ye L, Piao G. The traditional medicine and modern medicine from natural products. *Molecules*. 2016 Apr; 21(5): 559. doi:10.3390/molecules21050559
364. Zeng J, Xu H, Cai Y, et al. The effect of ultrasound, oxygen and sunlight on the stability of (-)-epigallocatechin gallate. *Molecules*. 2018 Sep; 23(9): 2394. doi:10.3390/molecules23092394

365. Zhang J, Yang R, Chen R, Peng Y, Wen X, Gao L. Accumulation of heavy metals in tea leaves and potential health risk assessment: A case study from Puan county, Guizhou province, China. *Int J Environ Res Public Health*. 2018 Jan; 15(1): 133. doi:10.3390/ijerph15010133
366. Zhang L, Zhang YD, Zhao P, Huang SM. Predicting drug-drug interactions: an FDA perspective. *AAPS J*. 2009 Jun; 11(2): 300-306. doi:10.1208/s12248-009-9106-3
367. Zhang Y, Huo M, Zhou J, Xie S. PKSolver: An add-in program for pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis in Microsoft Excel. *Comput Methods Programs Biomed*. 2010 Sep; 99(3): 306-314. doi:10.1016/j.cmpb.2010.01.007
368. Zhao CN, Tang GY, Cao SY, et al. Phenolic profiles and antioxidant activities of 30 tea infusions from Green, Black, Oolong, White, Yellow and Dark teas. *Antioxidants (Basel)*. 2019 Jul; 8(7): 215. doi:10.3390/antiox8070215
369. Zhou B, Ma C, Xia T, et al. Isolation, characterization and application of theophylline-degrading *Aspergillus* fungi. *Microb Cell Fact*. 2020 Mar; 19(1): 72. doi:10.1186/s12934-020-01333-0
370. Zhou T, Chen Y, Huang C, Chen G. (2012). Caffeine induction of sulfotransferases in rat liver and intestine. *Journal of applied toxicology*. 2012 Oct; 32(10): 804–809. doi:10.1002/jat.1698
371. Zhou W, Wang Y, Lu A, Zhang G. Systems pharmacology in small molecular drug discovery. *Int J Mol Sci*. 2016 Feb; 17(2): 246. doi:10.3390/ijms17020246
372. Zhu M, Chen Y, Li RC. Oral absorption and bioavailability of tea catechins. *Planta Med*. 2000 Jun; 66(5): 444-447. doi:10.1055/s-2000-8599
373. Zhu M, Chen Y, Li RC. Pharmacokinetics and system linearity of tea catechins in rat. *Xenobiotica*. 2001 Jan; 31(1): 51-60. doi:10.1080/00498250010024988
374. Zhu, N., Hou, J. & Yang, N. Network pharmacology integrated with experimental validation revealed the anti-inflammatory effects of *Andrographis paniculata*. *Sci Rep*. 2021 May; 11(1): 9752. doi:10.1038/s41598-021-89257-6
375. Zhuang X, Lu C. PBPK modeling and simulation in drug research and development. *Acta Pharm Sin B*. 2016 Sep; 6(5): 430-440. doi:10.1016/j.apsb.2016.04.004
376. Zimmermann BF, Papagiannopoulos M, Brachmann S, Lorenz M, Stangl V, Galensa R. A shortcut from plasma to chromatographic analysis: straightforward and fast sample preparation for analysis of green tea catechins in human plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2009 Mar; 877(8-9): 823-826. doi:10.1016/j.jchromb.2009.01.013
377. Българска Агенция по Безопасност на Храните. *Закон за храните*. [Internet]. [last updated 2020 Jul 21, cited 2021 Oct 16] Available from: https://www.bfsa.bg/userfiles/files/Zakoni/ZAKON_za_hranite.pdf
378. Изпълнителна Агенция по Лекарствата. *Кратка характеристика на продукта*. [Internet]. [cited 2021 Nov 22] Available from: <https://www.bda.bg/images/stories/documents/bdias/2020-06-22-119759.pdf>
379. Министерство на Здравеопазването. *Закон за лекарствените продукти в хуманната медицина*. [Internet]. [last updated 2020 Jul 28, cited 2021 Oct 11] Available from: https://www.mh.government.bg/media/filer_public/2020/10/05/zakon_za_lekarstvenite_produkti_v_humannata_medicina.pdf
380. Българска Агенция по Безопасност на Храните. *НАРЕДБА № 47 от 28.12.2004 г. за изискванията към хранителните добавки*. [Internet]. [last updated 2010 Nov 16, cited 2021 Oct 16] Available from:

https://www.bfsa.bg/userfiles/files/KH/Doc/NAREDBA_47_ot_28122004_g_za_iziskvaniqt_a_kym_hranitelnite_dobavki_Zagl_izm_DV_br_44_ot_2007_g.pdf

381. COVID-19 Treatment Guidelines Panel. *Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Treatment Guidelines*. National Institutes of Health. [Internet]. [cited 2022 01 31]. Available from: <https://www.covid19treatmentguidelines.nih.gov/>
382. European Medicines Agency. *Covid-19 treatments*. [Internet]. [cited 2022 Jan 01]. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/overview/public-health-threats/coronavirus-disease-covid-19/treatments-vaccines/covid-19-treatments>
383. European Medicines Agency. *Guideline on the investigation of drug interactions*. [Internet]. CPMP/EWP/560/95/Rev. 1 Corr. 2 [last updated 2015 Jun 03, cited 2021 Dec 20]. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-investigation-drug-interactions-revision-1_en.pdf
384. European Medicines Agency. *ICH. Topic Q2 (R1) Validation of analytical procedures: Text and methodology (CPMP/ ICH/ 381/ 95)*. [Internet]. [last updated 1995 Jun 01, cited 2021 Aug 17]. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-2-r1-validation-analytical-procedures-text-methodology-step-5_en.pdf
385. European Medicines Agency. *Summary of product characteristics*. [Internet]. [cited 2021 Nov 10] Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/referral/sandimmun-neoral-article-30-referral-annex-iii_en.pdf
386. European Medicines Agency. *Summary of product characteristics*. [Internet]. [cited 2021 Nov 20] Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/viagra-epar-product-information_en.pdf
387. Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER). *Clinical Drug Interaction Studies — Cytochrome P450 Enzyme- and Transporter-Mediated Drug Interactions Guidance for Industry*. [Internet]. [last updated 2020 Jan 23, cited 2021 Dec 20]. Available from: <https://www.fda.gov/media/134581/download>
388. Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER). *In Vitro Drug Interaction Studies — Cytochrome P450 Enzyme- and Transporter-Mediated Drug Interactions Guidance for Industry*. [Internet]. [last updated 2020 Jan 23, cited 2021 Dec 20]. Available from: <https://www.fda.gov/media/134582/download>
389. Food and Drug Administration. *Full prescribing information*. [Internet]. [cited 2021 Nov 20] Available from: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2008/021902s017lbl.pdf
390. Food and Drug Administration. *Guidance for Industry: Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers*. [Internet]. [last updated 2005 Jul, cited 2021 Nov 3] Available from: <https://www.fda.gov/media/72309/download>
391. World Health Organisation. *Annex 1, WHO guidelines for selecting marker substances of herbal origin for quality control of herbal medicines*. [Internet]. [last updated 2017, cited 2021 Sep 8]. Available from: https://www.who.int/traditional-complementary-integrative-medicine/publications/trs1003_annex1.pdf
392. World Health Organization. *pH in drinking-water*. Revised background document for development of WHO guidelines for drinking-water quality. [Internet]. [cited 2021 Dec 1]. Available from:

https://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/chemicals/ph_revised_2007_clean_version.pdf

XII. БЛАГОДАРНОСТИ

Изказвам искрени благодарности към научния си ръководител доц. Калоян Георгиев за насоките и безрезервната помощ при изготвянето на настоящия дисертационен труд.

Благодаря на колегите от Катедра „Фармакология, токсикология и фармакотерапия“ и по-специално на гл. ас. Станила Стоева и гл. ас. Надежда Хвърчанова за подкрепата и оказаната помощ при провеждане на експерименталните изследвания.

Благодаря на доц. Илия Желев за оказаната помощ и напътствията при прилагане на методите за екстракция!

Благодаря на семейството си за обичта, търпението и подкрепата!