



*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**

### **АВТОРЕФЕРАТ**

на 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.**

Дисертационният труд е обсъден на заседание на Катедрен съвет на Катедрата по Фармакология, токсикология и фармакотерапия към Медицински университет „Проф. д-р П. Стоянов“, състояло се на 18.02.2022 година и е насочен за публична защита пред научно жури в състав:

**Вътрешни членове:**

1. Доц. маг.-фарм. Евгени Евгениев Григоров, д. м. – председател (становище)
2. Доц. маг.-фарм. Илия Желев Славов, д. б. (становище)

**Външни членове:**

3. Проф. маг.-фарм. Магдалена Спасова Кондева-Бурдина, д. ф. (рецензия)
4. Проф. маг.-фарм. Златка Димитрова Димитрова, д. ф. н. (становище)
5. Доц. маг.-фарм. Румяна Любомурова Симеонова, д. ф. (рецензия)

**Резервни членове:**

1. Доц. маг.-фарм. Величка Йорданова Андонова, д. ф. – вътрешен член
2. Проф. маг.-фарм. Илко Николаев Гетов, д. ф. – външен член

Дисертационният труд съдържа общо 139 страници, онагледен е с 27 фигури и 14 таблици. Библиографията включва 392 източника, от които 7 на кирилица и 385 на латиница.

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на 29.04.2022 г. от ..... часа в .....

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

## СЪДЪРЖАНИЕ

<b>I.</b>	<b>ВЪВЕДЕНИЕ</b> .....	7
<b>II.</b>	<b>ЦЕЛ И ЗАДАЧИ</b> .....	12
<b>III.</b>	<b>МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ</b> .....	14
1.	Материали .....	14
2.	Експериментални методи .....	16
<b>IV.</b>	<b>РЕЗУЛТАТИ</b> .....	35
1.	Изолиране на ТЕ, КФ и МФ от японски зелен чай Банча .....	35
2.	Качествен и количествен анализ на ТЕ, КФ и МФ, изолирани от зелен чай Банча .....	36
3.	Качествен и количествен анализ на sildenafil в плазмени проби от експериментални животни .....	40
4.	Фармакокинетични проучвания при опитни животни .	41
5.	Разработване на ФБФК модели .....	52
<b>V.</b>	<b>ДИСКУСИЯ</b> .....	54
1.	Изолиране на ТЕ, КФ и МФ от зелен чай Банча .....	55
2.	Качествен и количествен анализ на ТЕ, КФ и МФ, изолирани от зелен чай Банча .....	58
3.	Качествено и количествено определяне на sildenafil в плазмени проби от експериментални животни .....	64
4.	Фармакокинетични проучвания при опитни животни .	66

5.	Разработване на ФБФК модели .....	84
<b>VI.</b>	<b>ИЗВОДИ .....</b>	<b>86</b>
<b>VII.</b>	<b>ПРИНОСИ .....</b>	<b>88</b>
<b>VIII.</b>	<b>СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИТЕ И УЧАСТИЯТА, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД .....</b>	<b>90</b>
<b>IX.</b>	<b>УЧАСТИЕ В НАУЧНИ ПРОЕКТИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД .....</b>	<b>91</b>
<b>X.</b>	<b>БЛАГОДАРНОСТИ .....</b>	<b>92</b>

## ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

<b>БАВ</b>	Биологично активни вещества
<b>ЕГК</b>	Епигалокатехин
<b>ЕГКГ</b>	Епигалокатехин-3-галат
<b>ЕК</b>	Епикатехин
<b>ЕКГ</b>	Епикатехин-3-галат
<b>КФ</b>	Катехинова фракция
<b>МФ</b>	Метилксантинова фракция
<b>СЧТ</b>	Стомашно-чревен тракт
<b>ТЕ</b>	Тотален екстракт
<b>т. т.</b>	Телесно тегло
<b>ФБФК</b>	Физиологично базиран фармакокинетичен
<b>ФДЕ5</b>	Фосфодиестерза тип 5
<b>цГМФ</b>	Цикличен гуанозин монофосфат
<b>ЦНС</b>	Централна нервна система
<b>ЧЕД</b>	Човешка еквивалентна доза
<b>AUC</b>	Площ под кривата
<b>Cl/F</b>	Привиден клирънс
<b>C<sub>max</sub></b>	Максимална плазмена концентрация
<b>CYP450</b>	Цитохром P450
<b>HPLC</b>	Високоэффективна течна хроматография
<b>ICH</b>	Международна конференция по хармонизация
<b>LOQ</b>	Граница на количествено определяне
<b>MATE</b>	Multidrug and toxin extrusion

<b>NO</b>	Азотен оксид
<b>OATP</b>	Органичен анион-транспортиращ полипептид
<b>OCT</b>	Органичен катионен транспортер
<b>PXR</b>	Прегнан X рецептор
<b>P-gp</b>	P-гликопротеин
<b>SD</b>	Стандартно отклонение
<b>T<sub>max</sub></b>	Време за постигане на максимална плазмена концентрация
<b>t<sub>1/2</sub></b>	Плазмен полуживот
<b>UV</b>	Ултравиолетова област на светлината
<b>Vz/F</b>	Привиден обем на разпределение
<b>w/w</b>	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. Чаените листа съдържат голямо разнообразие от биологично активни вещества (БАВ) като полифенолни съединения, полизахариди, алкалоиди, сапонини, свободни мастни киселини, витамини, минерали и други.

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. 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. 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.

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. 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. 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. 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.

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 часните 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. 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. 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 чай, наречен Сенча. 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.

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. 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. 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 (Р-gp), органични анион- транспортиращи полипептиди (OATP1A2, OATP1B1, OATP1B3, OATP2B1), органични катионни транспортери (OCT1, OCT2) и транспортери, пренасящи множество лекарства и токсини (MATE1, MATE2-K). При опитни животни е установено, че екстрактът от зелен чай, както и ЕГКГ самостоятелно повишават плазмените нива на лекарства субстрати на CYP3A4 и на Р-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. 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. 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*. В литературата също се съобщава, че кофеинът потискат активността на ензима CYP3A4. Освен това, *in vitro* е наблюдавано, че кофеин инхибира метаболизма на dextromethorphan от CYP2D6. 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. 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. В допълнение, sildenafil спада към лекарствените вещества от клас II (малка разтворимост и висока проницаемост), съгласно Биофармацевтичната класификационна система (BCS). В допълнение, има данни, че sildenafil е субстрат на P-гр. Предполага се, че ефлуксният транспорт, медиран от този трансмембранен протеин допринася за ниската орална бионаличност на препарата. Именно лекарства с висока проницаемост, които се подлагат на значителен метаболизъм, какъвто е sildenafil, често участват в лекарствени взаимодействия. 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. Известни са взаимодействията между sildenafil и инхибитори на CYP3A4, които могат да повишат риска за поява на нежелани ефекти. 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.

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 СYP3A4 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. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ**

### **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**

#### **2.1. Получаване на растителни извлекци 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. Конструиране на ФБФК модели на получените екстракти чрез използване на компютърен софтуер Simcyp<sup>®</sup>;
- 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.**

### **III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ**

#### **1. Материали**

##### **1.1. Използвани химикали и реактиви**

- ❖ Японски зелен чай Банча, закупен от местен магазин за билки;
- ❖ Sildenafil citrate ( $\geq 98$  % (HPLC), Sigma-Aldrich GmbH); Ketoconazole ( $\geq 98$  % (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,  $\geq 99$  % (HPLC), Sigma-Aldrich GmbH); Epigallocatechin gallate (pharmaceutical secondary standard, certified reference material, Sigma-Aldrich GmbH); (+)-catechin (analytical standard,  $\geq 99$  % (HPLC), Sigma-Aldrich GmbH); Gallic acid (certified reference material, Sigma-Aldrich GmbH); Метанол ( $\geq 99.8$  % (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); Sodium carboxymethyl cellulose (Sigma-Aldrich GmbH); Физиологичен разтвор (0.9%, 500 mL, B. Braun Melsungen AG, Germany); Би-дестилирана вода (получена в лабораторни условия);

##### **1.2. Използвани лабораторни и медицински консумативи**

- ❖ Филтри Nylon white membranes (0.45  $\mu\text{m}$ , d = 47.0 mm, filtraTECH, France);
- ❖ Виалки (кафяво стъкло, 2 мл., ND 8 мм, Thermo Scientific™, USA);
- ❖ Инсърти (200  $\mu\text{L}$ , 02-NV, Thermo Scientific™, USA);
- ❖ Полипропиленова орогастрална сонда за гризачи FTP-18-75 (18ga, 75 mm x 1.2 mm, 30  $\mu\text{L}$ ; 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 SmartText™ 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 мултифункциона 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 течнохроматографска 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. Плъховете са настанени в клетки (по 6 животни във всяка клетка) при стайна температура  $23 \pm 2$  °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  $50 \pm 10$  %. 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.

### **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 Simcyp<sup>®</sup>, версия 20.1 (Certara<sup>®</sup> UK Limited), след получаване на годишен лиценз. Програмата разполага с възможност за предсказване на фармакокинетичното поведение на дадено съединение при човек и 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, с изключение на опитите с животни, които се провеждат във Вивариума към Медицински Университет – Варна.

### **2.1. Методи за екстракция**

За целите на експеримента се приготвят тотален екстракт (ТЕ), катехинова фракция (КФ) и метилксангинова 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 1 са представени снимка на чаени листа Банча, както и снимка на получения воден екстракт преди сушенето.



**Фигура 1.** 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 комбинираните 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 °С.

### **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 °С.

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

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.
- 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 аналит.

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 течнoхроматографска система Thermo Scientific UltiMate 3000 Analytical LC System. Аналитите 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, а дължината на вълната на UV детектора – 275 nm. Температурата на хроматографската колона и на инжектора се поддържа 20 °C. Общото времетраене на анализа е 25 минути.

#### ❖ 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 течнохроматографския метод**

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

#### ❖ **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 всички проби се центрофугират в продължение на 5 минути при 5000 x g. 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.

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

Течнохроматографският 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. 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  $\mu$ l 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 бидестилирана вода за получаване на концентрации в диапазона от 1.0 – 750.0  $\mu$ g/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  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu$ m), защитена от предколона AQUASIL C18 (10.0 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu$ m) със скорост на потока 0.8 mL/min и UV детекция при 274 nm. Обемът на инжектиране е 20.0  $\mu$ L. 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.

#### ❖ **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. 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  $R^2 = 0.9995$ .

#### ❖ **Пробоподготовка**

Тестовият разтвор на МФ, изолирана 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 pH 8 до получаване на разтвор с крайна концентрация от 2.5 mg/mL. Всички проби се приготвят непосредствено преди анализа и се филтруват 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 МФ 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.
- ❖ 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 предколونا 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 вода в съотношение 85:15%, v/v. Температурата на хроматографската колона и на инжектора се поддържа 25 °C. Времетраенето на анализа е 10 мин.

### **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.

### **2.3.5. Пробоподготовка**

- ❖ Използват се плазмени проби от нетретираны плъхове, 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 привнесения 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 би-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**

Проведени са два отделни експеримента като при първия експеримент sildenafil се прилага след **едноседмично претретиране** на животните с ТЕ, КФ или МФ, изолирани от зелен чай Банча, а във втория експеримент sildenafil се прилага след **еднократен прием** на изолираната МФ.

Опитите с 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 субстанцииите 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).

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. Пресметнато е, че 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.

- **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.

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

Използваните дози на ТЕ от зелен чай Банча (100.0 mg/kg) и на КФ дп (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. 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 получаваме, 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 МФ (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 МФ в доза 5.7 mg/kg е еквивалентна на кофеин в доза 5.0 mg/kg. Съгласно формулата за изчисляване на ЧЕД, 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 животните 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).

Пригответните суспензии имат бял цвят и изглеждат по сходен начин (фиг. 2).

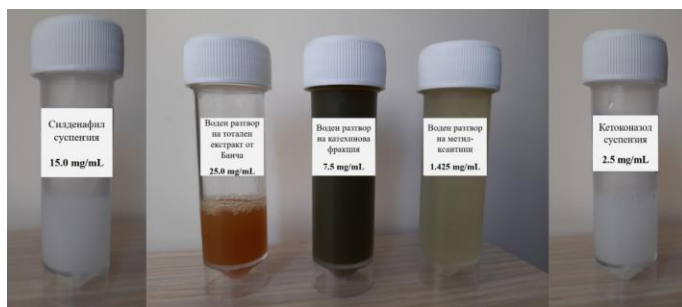
#### ❖ **Приготвяне на суспензия, съдържаща ketoconazole**

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 (фиг. 2). 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 би-дестилирана вода с температура ~ 30 °C и се хомогенизират на вортекс-миксер при 6000 x g в продължение на 30 секунди. МФ се разтваря в гореща би-дестилирана вода (~ 60 °C). Снимки на получените водни разтвори са представени на фигура 2.



**Фигура 2.** Снимки на приготвените суспензии на sildenafil (15.0 mg/mL) и ketoconazole (2.5 mg/mL) и на водните разтвори на ТЕ, КФ и МФ.

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 – червенокафяв за ТЕ, тъмно зелен за КФ и бледо зелен за МФ.

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 3 са представени снимки, показващи как е извършено сондирането на опитните животни.



**Фигура 3.** 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.

#### **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):

- 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 0.5, 1, 3 и 6 часа след приложението на sildenafil.

#### **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. 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, 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  $-80^{\circ}\text{C}$ . Кръвните проби се центрофугират при  $5000 \times g$  за 5 минути при стайна температура, след което плазмата се отделя и се замразява незабавно при  $-20^{\circ}\text{C}$ . Всички плъхове са евтаназирани чрез цервикална дислокация под анестезия с диетилов етер.

#### **2.4.6. Фармакокинетичен анализ**

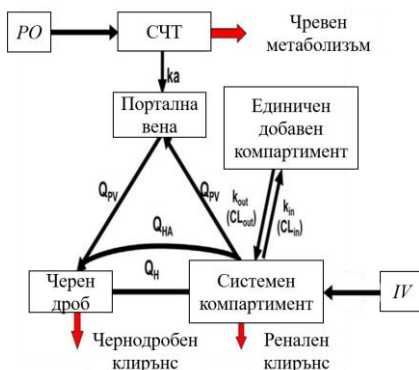
Профилите плазмена концентрация–време на sildenafil са анализирани чрез некомпартиментен анализ с помощта на програмата PKSolver, версия 2.0 (свободно достъпна програма като добавка за Microsoft Excel). Изчислени са следните фармакокинетични параметри: максимална плазмена концентрация ( $C_{\max}$ ), 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 (фигура 4).



**Фигура 4.** 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 ЕКГК 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 СYP3A4. За прогнозиране на

потенциални взаимодействия са използвани необходимите фармакокинетични параметри на sildenafil (лекарство субстрат на ензима CYP3A4), налични в програмата. За положителна контрола е използван класическият инхибитор на CYP3A4 – ketoconazole (също наличен в базата данни на софтуера).

## **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  $\leq 0.05$  (двустранен тест).

## IV. РЕЗУЛТАТИ

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

#### 1.1. Изолиране на тотален екстракт

Полученият тотален екстракт от зелен чай Банча представлява твърда стъкловидна маса с червено-кафяв цвят. Притежава сладникав аромат и е лесно разтворима в хладка вода. На фиг. 5 е представена снимка на екстракта. Полученият добив е 16.37 % (w/w).



**Фигура 5.** 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 6. Изчисленият процентен добив е 3.85 % (w/w).



**Фигура 6.** 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 7 е представена снимка на метилксантиновата фракция. Полученият процентен добив на метилксантини е 0.95 % (w/w).



**Фигура 7.** 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 (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

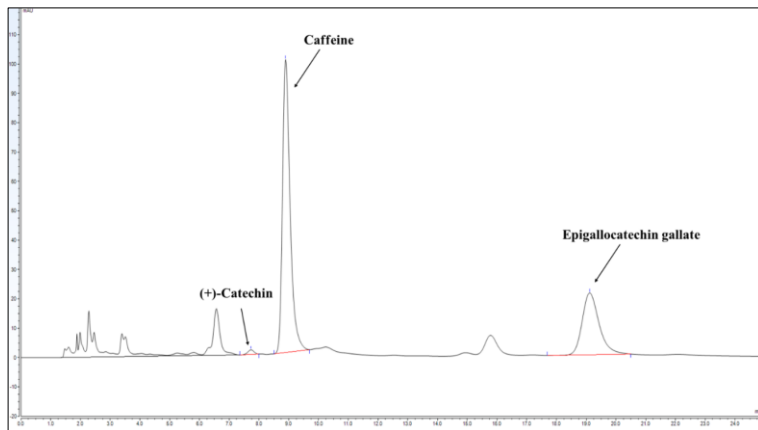
Разработеният метод е приложен за качествено и количествено определяне на ЕГКГ, (+)-катехин, галова киселина и кофеин в ТЕ и КФ от зелен чай Банча. В цялостния екстракт се откриват еквивалентни количества ЕГКГ и кофеин и значително по-ниско количество (+)-катехин. В КФ се откриват и четирите съединения, като в най-голямо количество е ЕГКГ, както се очакваше. Резултатите са показани в таблици 1 и 2, а хроматограмите на ТЕ и на КФ са представени съответно на фигури 8 и 9. 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 1.** Изчислени концентрации на ЕГКГ, (+)-катехин и кофеин в изследвания воден разтвор на тотален екстракт от зелен чай Банча (1.0 mg/mL).

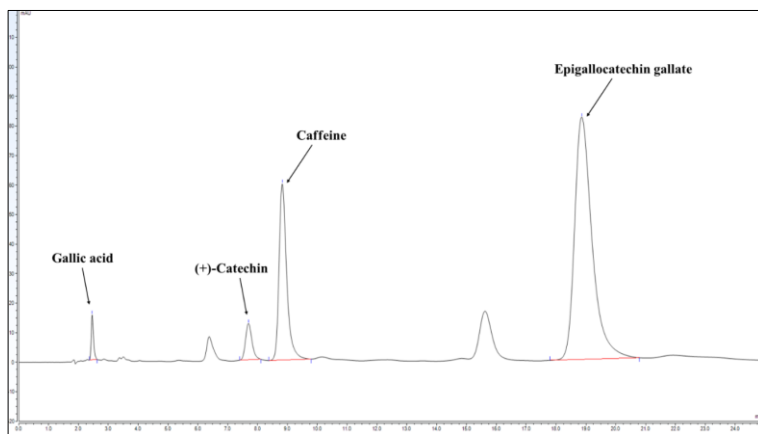
	Концентрация, $\mu\text{g/mL}$	Концентрация, % $\pm$ SD
ЕГКГ	41.2	4.12 % $\pm$ 0.44
(+)-катехин	2.6	0.26 % $\pm$ 0.28
кофеин	41.9	4.19 % $\pm$ 0.14

**Таблица 2.** 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 8.** Хроматограма на изследвания воден разтвор на ТЕ от Банча (1.0 mg/mL).



**Фигура 9.** Хроматограма на проба от КФ (1.0 mg/mL).

## 2.2. Анализ на изолираната метилксантинова фракция

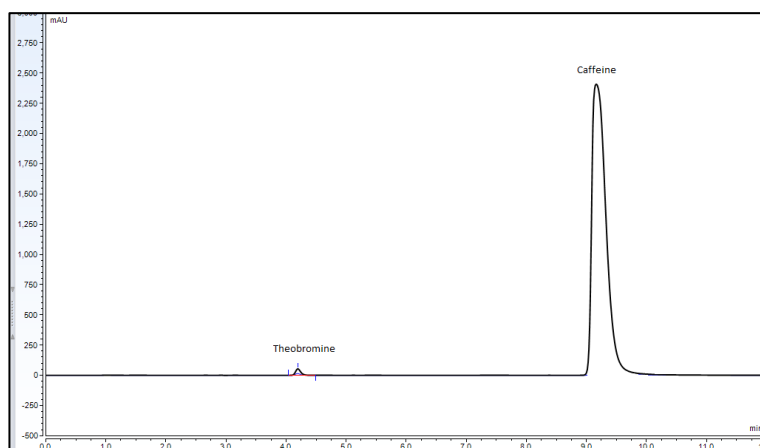
Изолираната МФ е анализирана чрез разработен по-рано HPLC-UV метод за качествено и количество определяне на кофеин, теофилин и теобромин. Изолираната фракция съдържа голямо количество кофеин и значително по-ниско количество теобромин, докато теофилин не се

открива. Резултатите са показани в таблица 3, а на фигура 10 е представена хроматограма на МФ, изолирани от Банча чаени листа. Съгласно получените резултати изчислихме, че 1.0 g изсушени чаени листа Банча съдържа 8.34 mg кофеин и 0.009 mg теобромин.

**Таблица 3.** 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, $\% \pm \text{SD}$
кофеин	2193.5	$87.74 \pm 0.83$
теофилин	-	-
теобромин	2.3756	$0.095 \pm 0.02$

- под границата на количествено определяне



**Фигура 10.** 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. Проведеният течнхроматографски анализ потвърди високото съдържание на кофеин в метилксантиновата фракция, докато ЕГКГ, (+)-катехин и галова киселина не са детектирани.

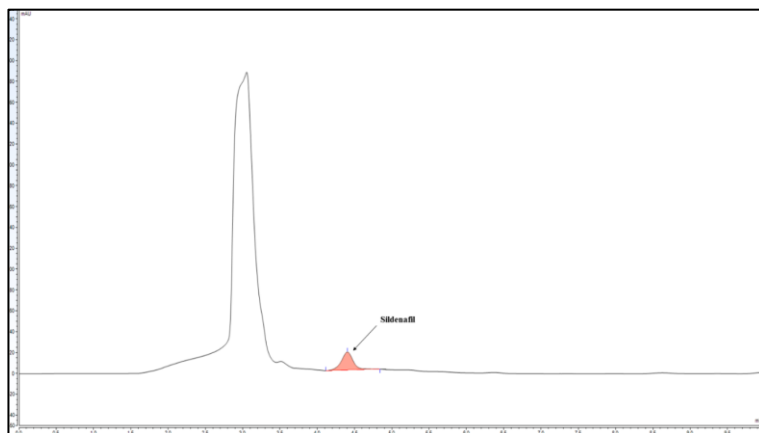
### 3. Качествен и количествен анализ на sildenafil в плазмени проби от експериментални животни

#### 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. 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  $\geq 93.0\%$  извличане на sildenafil при всички използвани концентрации ( $\pm 1.89\%$  за пробите, към които е добавен sildenafil). В допълнение, не са елуирани други компоненти във времето на задържане на анализа, което доказва пригодността на техниката за пробоподготовка. Хроматограма на тестови образец е показана на фигура 11.



**Фигура 11.** 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, както и едновременното приложение на еднократна доза метилксантини със sildenafil оказва влияние върху фармакокинетиката на лекарството 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  $15.96 \pm 2.45$  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**

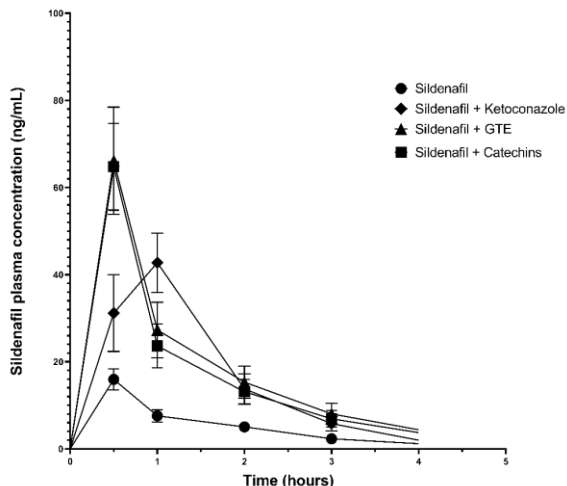
При прием на sildenafil след многократното приложение на ТЕ и КФ от зелен чай Банча при плъхове се наблюдават значителни промени във фармакокинетичните параметри на sildenafil. На таблица 4 са представени основните фармакокинетични параметри на sildenafil, изчислени за всяка група, а на фигура 12 са 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, както и значително понижаване на

обема на разпределение ( $V_z/F$ ) и намаляване на клирънса ( $Cl/F$ ), в сравнение с контролната група. Не е наблюдавана промяна във времето за достигане на максимална плазмена концентрация на sildenafil ( $T_{max} = 0.5$  h). Наблюдаваните стойности на  $C_{max}$ ,  $AUC_{0-3}$  и  $AUC_{0-inf}$ ,  $V_z/F$  и  $Cl/F$  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 13, 14 и 15 са представени сравнителни графики на посочените фармакокинетични параметри в различните групи. Също така, 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.

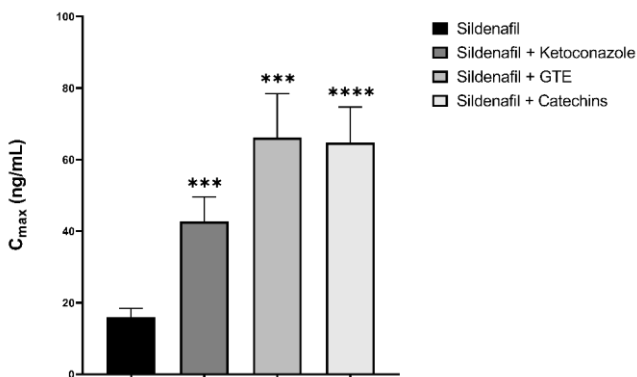
**Таблица 4.** Фармакокинетични параметри на sildenafil след еднократна перорална доза от 2.5 mg/kg при плъхове самостоятелно, в комбинация с еднократна доза ketoconazole и след предварително третиране на животните с ТЕ или с КФ от Банча

Фармако-кинетичен 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 ***
$V_z/F$ (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 ***

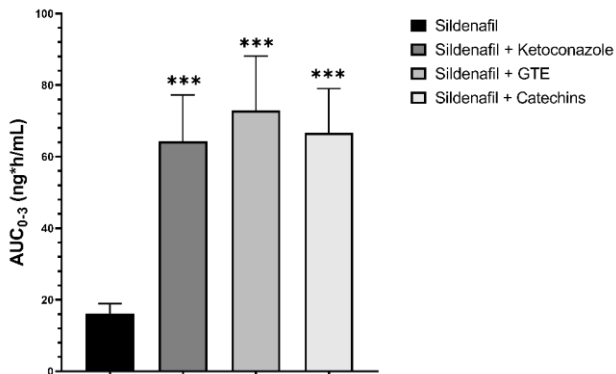
Стойностите са представени като средна стойност ± SD, n=24. \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ , в сравнение с контролната група.



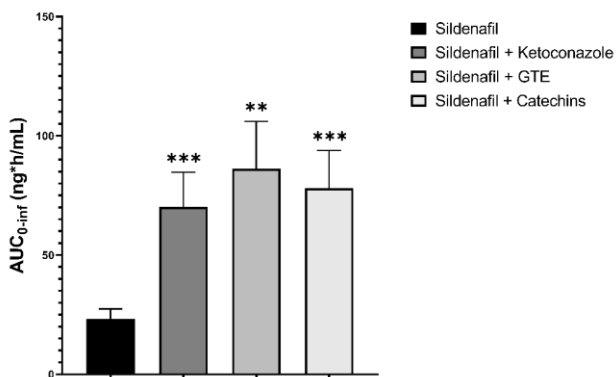
**Фигура 12.** Крива плазмена концентрация-време (средна стойност  $\pm$  SD) на sildenafil след еднократна перорална доза от 2.5 mg/kg при пълхове самостоятелно, в комбинация с еднократна доза ketoconazole и след многократен прием на ТЕ или КФ от Банча.



**Фигура 13.** 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 пълхове. Стойностите са представени като средна стойност  $\pm$  SD, \*\*\*  $p \leq 0.001$ , \*\*\*\*  $p \leq 0.0001$ , в сравнение с контролната група.



**Фигура 14.** 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 15.** 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

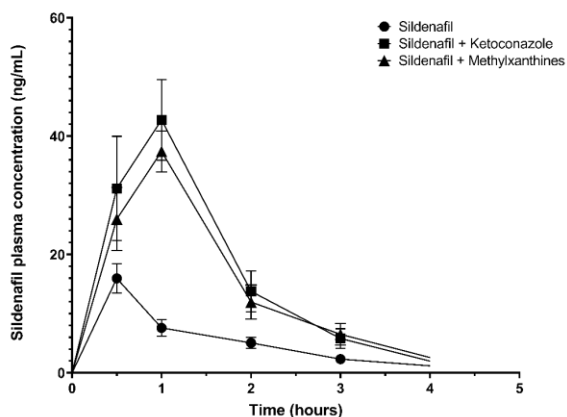
Кривите плазмена концентрация-време на sildenafil при самостоятелно приложение, след приложение с ketoconazole или след многократни дози метилксантини са показани на фиг. 16. Приложението на sildenafil след предварително третиране с МФ от зелен чай Банча при плъхове води до статистически значимо увеличаване на  $C_{max}$  ( $p < 0.0001$ ),  $AUC_{0-3}$  ( $p < 0.0001$ ) и  $AUC_{0-inf}$  ( $p < 0.001$ ) и намаляване на  $Vz/F$  и  $Cl/F$ , в сравнение с контролната група. 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 5. Наблюдаваните стойности на  $C_{max}$ ,  $AUC_{0-3}$  и  $AUC_{0-inf}$ ,  $Vz/F$  и  $Cl/F$  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. 17, 18 и 19 представят сравнение на  $C_{max}$ ,  $AUC_{0-3}$  и  $AUC_{0-inf}$  на sildenafil между групи 1, 2 и 5. Метилксантините не водят до значима промяна в средното време за престой (MRT) на sildenafil в организма на плъховете.

**Таблица 5.** 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

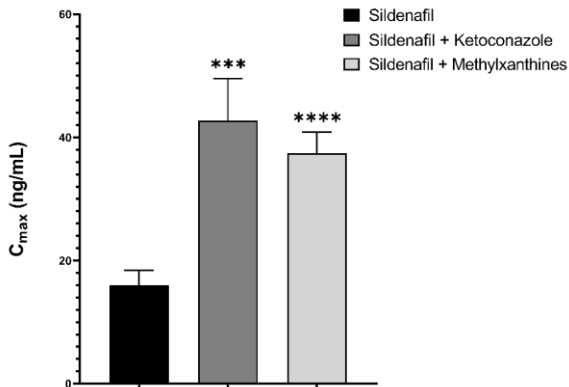
Фармако-кинетичен параметър	Sildenafil (контролна група)	Sildenafil + ketoconazole	Sildenafil + МФ от зелен чай Банча
$C_{max}$ (ng/mL)	15.96 ± 2.45	42.75 ± 6.81 ***	37.42 ± 3.44 ****
$T_{max}$ (h)	0.5	1	1

AUC <sub>0-3</sub> (ng*h/mL)	16.20 ± 2.73	64.31 ± 12.92 ***	56.27 ± 8.83 ****
AUC <sub>0-inf</sub> (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 ***

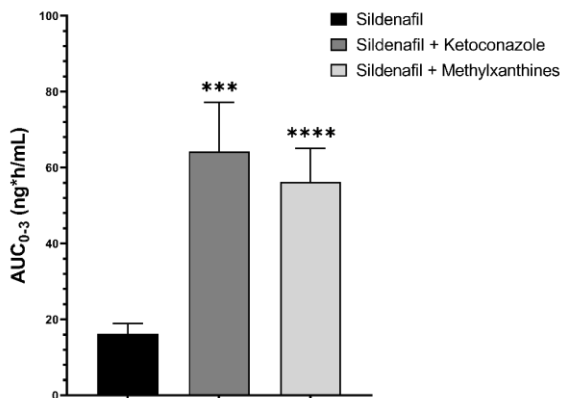
Стойностите са представени като средна стойност ± SD, n=24. \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ , в сравнение с контролната група.



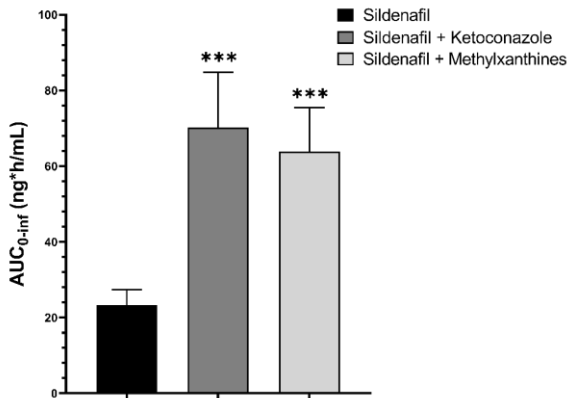
**Фигура 16.** Крива плазмена концентрация-време (средна стойност ± SD) на sildenafil след еднократна перорална доза от 2.5 mg/kg при плъхове самостоятелно, в комбинация с еднократна доза ketoconazole или след предварително третиране на животните с МФ от зелен чай Банча



**Фигура 17.** 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 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 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 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 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  $C_{max}$  ( $p < 0.01$ ),  $AUC_{0-6}$  и  $AUC_{0-inf}$  ( $p < 0.05$ ) на лекарството, 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. 20. След прием на sildenafil самостоятелно в доза 60.0 mg/kg средната максимална плазмена концентрация ( $C_{max}$ ) е  $152.82 \pm 31.41$  ng/mL. Основните фармакокинетични параметри на sildenafil във всяка група са представени в таблица 6. 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

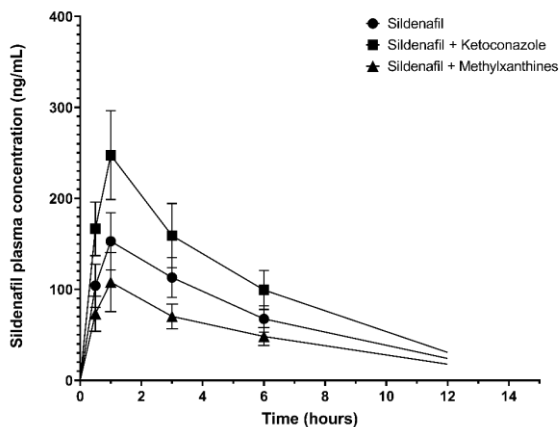


от намаляването на  $AUC_{0-6}$  и  $AUC_{0-inf}$  ( $p < 0.05$ ). Стойностите на  $C_{max}$ ,  $AUC_{0-6}$  и  $AUC_{0-inf}$  на sildenafil са повишени съответно с 61.97%, 49.84% и 43.45%. Стойностите на  $T_{max}$  са еднакви във всички групи (1 h). Не са открити статистически значими разлики в стойностите на клирънс ( $Cl/F$ ), плазмения полуживот ( $t_{1/2}$ ) и средното време за престой в организма (MRT) на sildenafil между трите групи. Стойността на  $Vz/F$  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. 21, 22 и 23 съответно.

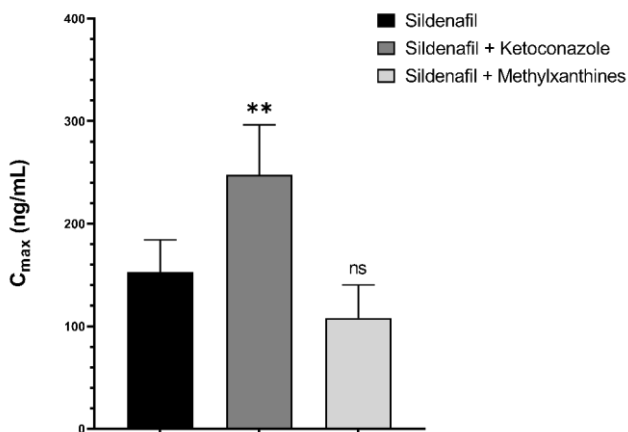
**Таблица 6.** Фармакокинетични параметри на sildenafil след еднократна перорална доза от 60.0 mg/kg при плъхове самостоятелно и в комбинация с еднократна доза ketoconazole или МФ от зелен чай Банча

Фармако-кинетичен 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

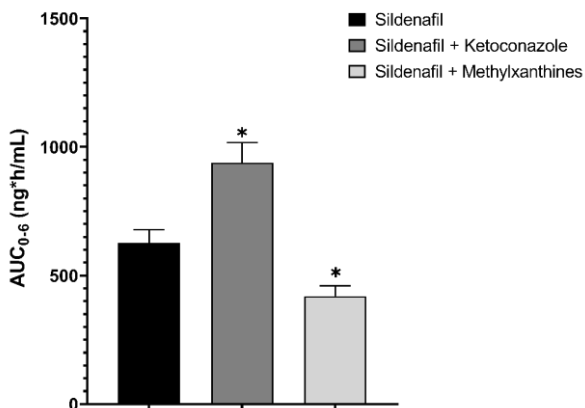
Стойностите са представени като средна стойност ± SD, n=24. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , в сравнение с контролната група.



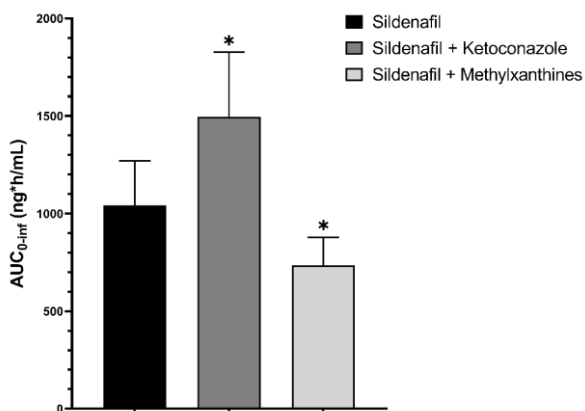
**Фигура 20.** Крива плазмена концентрация-време (средна стойност  $\pm$  SD) на sildenafil след еднократна перорална доза от 60.0 mg/kg при плъхове самостоятелно и в комбинация с еднократна доза ketoconazole или МФ от зелен чай Банча.



**Фигура 21.** 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 22.** 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 23.** 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 7.

**Таблица 7.** 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.

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

Проведените симулации с механистично-статичния модел показаха умерен риск за възникване на взаимодействия при прием 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.

## V. ДИСКУСИЯ

Взаимодействията между лекарствени средства и растителни екстракти могат да бъдат потенциално опасни и да доведат до сериозни нежелани ефекти. Поради честата употреба на медикаменти 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. 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.

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). 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. 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. 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 КФ и МФ 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 цялостен екстракт от зелен чай се дължат главно на катехините или на метилксантините. След приготвяне на растителните извлеци 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**

За изолиране на трите растителни извлека са използвани 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. 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 сушилня до получаване на твърда и суха маса. 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 °C. 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. По отношение на времето за екстракция, някои проучвания показват, че общото количество на екстрахираните полифеноли се повишава с увеличаване на времето на инфузия ( $\geq 10$  минути), но същевременно се увеличават стипчивостта и горчивината, влияещи върху органолептичните свойства на чаената напитка. 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. 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 °C. 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 °C при инфузия с продължителност 3 минути. 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. 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. 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. 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 °C до получаване на твърда суха маса, предвид нестабилността на съдържащите се катехини.

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. Изолване на КФ от зелен чай Банча**

За получаване на КФ е приложен методът, предложен от Георгиев, Илиев и Желев (2015). 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.

### **1.3. Изолиране на МФ от зелен чай Банча**

Изолирането на МФ е извършено съгласно метода, докладван от Георгиев, Илиев и Желев (2015). 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.

## **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. 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 часните листа. 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 часните листа, въпреки че някои микроорганизми могат да стимулират разграждането му. 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. 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. 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).

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.). 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). 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. Нашето проучване потвърждава резултатите, докладвани и от други автори относно по-ниското съдържание на катехини и кофеин в японски зелен чай Банча. По-ниското съдържание на катехини в Банча вероятно допринася и за по-ниската антиоксидантна активност, която е наблюдавана от Kodama и съавт. (2010).

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. 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. 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. Освен това, екстрахирането на кофеин от чаените листа е по-ефективно, ако се използва гореща вода, отколкото студена. 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. Както беше споменато, катехините, включително ЕГКГ са най-стабилни при кисело рН, но нестабилни при неутрална или алкална стойност на рН. 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  $\sim 7.0$  и е установена посредством измерване с рН метър. 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. 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. Други проучвания обаче съобщават, че количеството на кофеин е по-високо в по-младите листа, отколкото в по-зрелите. 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. 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 °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 °C обаче, количественото съдържание на катехини намалява значително, като количеството на ЕГКГ намалява с 68% след период на съхранение от 90 дни. Изглежда, че оптималната температура на съхранение на зеленият чай е около 4 °C, но продуктите, съдържащи зелен чай, които се предлагат в билковите магазини, дрогериите и аптеките не се съхраняват при хладилни условия. Следователно, продължителното съхранение на чаените листа при стайна температура (около 25 °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.

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. 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 % H<sub>2</sub>O/ 10 % ацетонитрил. 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. 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 МФ е 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.

### **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.

В заключение, високото количествено съдържание на метилксантини, в частност кофеин в МФ потвърждава ефикасността на приложния 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**

### **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. В подкрепа на използвания подход е липсата на съелуирани компоненти в анализиранияте 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 анализ в биологични проби. 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 пльхове.

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. 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.

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. Както зеленият чай, така и кафето съдържат разнообразие от биоактивни съединения, включително метилксантини, главно кофеин, който притежава определени фармакологични ефекти. Освен кофеин, зеленият чай съдържа и полифеноли, от които катехините се приемат за основни носители на биологичната му активност. 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. 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. 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  $\mu$ M). 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. Kovacic и сътрудници (2009) също съобщават, че кофеинът инхибира CYP3A4. 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. 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 лекарство-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 СYP3A4. 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. 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 СYP3A4, 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. 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. В друго проучване, проведено от Rai и сътрудници (2020) се наблюдава значително подобрение 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 D<sub>2</sub>-рецептори и инхибиране на ФДЕ5. 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. Макар и различни източници да съобщават, че се наблюдава взаимодействие между зеления чай и sildenafil се оказва, че всички цитират едно и също проучване. Negazu 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  $AUC_{0-\infty}$  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 пакетиран (2.0 g) и според производителя съдържа 3.0 g катехини/ 100.0 g зелен чай. 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.

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.

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

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 добра разтворимост във вода (4.1 mg/mL). 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. Пригответените 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. 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. 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. За целта, пригответихме 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 орогастрална 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. Този метод за перорално приложение на ketoconazole при плъхове се докладва и от други автори.

Изолираните ТЕ, КФ и МФ се разтварят добре във вода, поради което се прилагат под форма на водни разтвори. Цялостният екстракт и КФ 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. МФ 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 ежедневиия 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 ползните 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. 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).

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. 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.

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.

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

#### **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.

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. 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. В допълнение, главно CYP3A изоформите медиират 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. 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. 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. Следователно, можем да заключим, че инхибирането на СYP3A4 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 СYP3A 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 СYP3A 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 СYP3A ензими в черния дроб.

Докладва се също, че катехините инхибират активността на някои трансмембранни транспортери като OATP1A2, OATP1B1,

ОАТР1В3, ОАТР2В1, ОСТ1, ОСТ2, МАТЕ1, МАТЕ2-К и Р-гр, в резултат на което могат да окажат влияние върху резорбцията, разпределението, метаболизма и/или екскрецията на лекарствата. Същевременно, има данни, че sildenafil е субстрат на Р-гр и има вероятност ефлуксният транспорт, медиран от този протеин да допринася за ниската орална бионаличност на препарата. 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 Р-гр 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 СYP3A4 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 СYP3A4 и на чревния ефлукс от Р-гр. 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 СYP3A4 и/или на чревния ефлукс от Р-гр. В допълнение, в цитираните проучвания, при които се проследява фармакокинетиката на verapamil, diltiazem и nifedipine 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-медирания интестинален метаболизъм и/или на чревния ефлукс от P-гр. 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. 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. 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. От друга страна, в резултат на едновременната употреба на тирозин киназия 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.

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-гр, 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-gr. 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.

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  $V_z/F$  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 ketosonazole. 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. Същевременно се съобщава, че ензимите CYP1A2, CYP2C11 и CYP3A4 участват в метаболизма на кофеин при плъхове. 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 хидроксилиране (около 6 %). При гризачи около 40 % от приетия кофеин се подлага на C-8 хидроксилиране до триметилови производни, а също основните продукти от N-деметирането са теофилин и

теобромин. 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-гр, органичните анионни транспортери и други, но се открива твърде малко информация за въздействието на метилксантините върху тези ензими и транспортери. 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.

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-гр. Кофеин обаче не е субстрат на P-гр, поради което не се очаква да взаимодейства с него и да инхибира активността му. 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  $T_{max}$  ( $0.88 \pm 0.12$ ), в сравнение с тази, изчислена след прием на таблетка, съдържаща единствено sildenafil citrate ( $0.63 \pm 0.10$ ). 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, CI/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. Същевременно, Gounaris и съавт. (2020) наблюдават, че при новородени кофеин значително забавя времето за изпразване на стомаха. Забавяне в стомашното изпразване под действие на кофеин е наблюдавано и при новородени пльхове. 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 пльхове, считаме че най-вероятната причина за повишените плазмени нива на лекарството е модулиране на ензимите, участващи в биотрансформацията на sildenafil при пльхове.



### **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.

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. 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. 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. 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 AUC 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. 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. 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. 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. 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.

Възможно ограничение на проведените опити може да бъде вариабилността във фармакокинетиката на лекарствата между хора и плъхове. 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. 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. 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. При

проведените симулации са използвани механистично-статичен и механистично-динамичен минимален ФБФК модели, които са вградени в Simcyp® 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.

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. 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.

## **VI. 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 съдържащия 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 пониското 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 CYP3A4 да се извършва след консултиране и мониториране на пациентите за поява на потенциални взаимодействия.

## VII. 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, третирани със sildenafil.

## VIII. СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИТЕ И УЧАСТИЯТА, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

### ПУБЛИКАЦИИ В НАУЧНИ СПИСАНИЯ

1. **Radeva-Пиева М**, Stoeva S, Hvarchanova N, Zhelev I, Georgiev KD. Influence of methylxanthines isolated from Bancha 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-Пиева МР**, Georgiev KD, Hvarchanova NR, et al. Protective effect of methylxanthine fractions isolated from Bancha 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-Пиева, М.**, 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)

## **IX. 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

## **X. 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!*