



# SİNERJİSTİK İLAÇ KOMBİNASYONLARININ ANALİZİNDE GÜNCEL MATEMATİKSEL VE İSTATİSTİKSEL YÖNTEMLER

## CURRENT MATHEMATICAL AND STATISTICAL METHODS IN THE ANALYSIS OF SYNERGISTIC DRUG COMBINATIONS

Bayram Oğuz ÖZER<sup>1\*</sup> 

<sup>1</sup>Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji ve Genetik Anabilim Dalı, 22030, Edirne,  
Türkiye

### ÖZ

**Amaç:** İlaç kombinasyon tedavisi, kanser gibi çeşitli ölümcül hastalıkların tedavisinde önemli rol oynamaktadır. İlaçlar kombine edildiğinde sinerjistik, additif veya antagonistik etkileşimler meydana gelir. Bu etkileşimlerin tanımlanması ve ilaç kombinasyonlarının kantitatif analizi basit değildir. Terminoloji, deneysel protokoller ve modellerin yanı sıra veri analizinde standardizasyon eksikliği başlıca sorunlardır. Bu çalışmada, sinerjistik ilaç kombinasyonlarının incelenmesi ve analizi ile ilgili mevcut matematiksel ve istatistiksel yöntemler derlenmiştir. Takibinde, yaygın kullanılan yöntemleri anlamak için gerekli olan farmakolojik ve matematiksel kavramlar da derlenmiş, avantaj ve dezavantajları tartışılmıştır. Son olarak ilaç kombinasyonlarının analizinde dikkat edilmesi gereken temel konular açıklanmıştır.

**Sonuç ve Tartışma:** Muhtemel tüm deneysel koşullar için uygun optimum bir model olmadığı için, ilaç kombinasyonlarının kantitatif analizinin, burada tartışılan farklı yaklaşımların kolektif kullanımı ile kolaylaşacağını umuyoruz. Bu çalışmanın ilaç kombinasyonlarının analizi için bir referans teşkil edeceğine inanıyoruz.

**Anahtar Kelimeler:** Bliss bağımsızlığı, chou-talalay, ilaç kombinasyonu, kombinasyon indeksi, loewe sinerjizm

### ABSTRACT

**Objective:** Combination drug therapy plays an important role in treating various deadly diseases such as cancer. When drugs are combined, synergistic, additive or antagonistic interactions occur. The determination of these interactions and the quantitative analysis of drug combinations are not simple. The lack of standardization in terminology, experimental protocols, and models as well as data analysis are major challenges. In this study, the current mathematical and statistical methods

\* Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Bayram Oğuz Özer  
e-posta / e-mail: boguzozer@yahoo.com, Tel. / Phone: +905012542382

concerning the study and analysis of synergistic drug combinations are reviewed. Following, the pharmacological and mathematical concepts necessary to understand the widely used methods are also reviewed, and their advantages and disadvantages are discussed. Finally, the main issues to be considered in the analysis of drug combinations are explained.

**Result and Discussion:** Because there is no optimal suitable model for all possible experimental conditions, we hope that the quantitative analysis of drug combinations will be facilitated by the collective use of the different approaches discussed here. We believe that this study will serve as a reference for the analysis of drug combinations.

**Keywords:** Bliss independence, chou-talalay, drug combination, combination index, loewe synergism

## GİRİŞ

Hastalıkların tedavisinde ilaçların kombinasyon olarak kullanımı oldukça yaygındır. Tek ajan ile tedaviye (monoterapi) kıyasla yüksek etki, azaltılmış yan etkiler ve ilaç direnci gelişmesinin engellenmesi gibi avantajları sebebiyle kombinasyon tedavi modaliteleri kanser gibi ölümcül hastalıklarda standarttır [1]. Örnek olarak, farklı tür lösemiler için kombinasyon kemoterapisi [2], veya kolorektal kanser için floropirimidinler (örneğin; 5-florourasil) ve platinyum bileşikler (örneğin; okzaliptin) ve/veya hedefli ajanlar (Örneğin, Panitumumab veya Bevacizumab) ile kombinasyon tedavi modaliteleri verilebilir [3].

Geçtiğimiz 20 yılda, birçok hastalıkta sorumlu mutasyonlar ve sinyal yollarını karakterize eden omik teknolojilerinde önemli gelişmeler meydana gelmiştir [4]. Hastalıkların moleküler özelliklerine göre optimize edilen kişiselleştirilmiş tıp yaklaşımları ortaya çıkmıştır [5]. Omik ve hücre biyolojisindeki önemli ilerlemeler, modern tıpta ilaç kombinasyonlarının artan kullanımına katkıda bulunmuştur [6]. Kombinasyon ilaç tedavisinin üstün etkilerinin incelenmesi güncel araştırma alanıdır [7]. Hastalar-arası ve hastaya-özü genetik heterojenite, klonal evrim ve direnç mekanizmalarının belirlenmesindeki sorunlar devam etmektedir. Bu problemler, kombinasyon tedavi modaliteleri ile büyük oranda çözülebilmektedir.

İlaç-ilaç etkileşimleri, bir ilaç diğer bir ilacın aktivitesini etkilediğinde meydana gelir. Bu etkileşimler farmakokinetik veya farmakodinamik olabilir [8]. Farmakodinamik ilaç etkileşimleri sinerjistik, additif veya antagonistik olarak sınıflandırılır. Sinerjizm, iki ilacın kombinasyon etkisinin aynı koşullardaki bireysel etkilerinin toplamından daha fazla olmasıdır [9]. İlaçların kombinasyon etkisi, aynı deneysel ortamdaki ilaçların bireysel etkilerinden daha küçük olduğunda gerçekleşen etkileşim türü antagonizmdir.

Terminoloji, farmakolojik sinerjizmin tanımlanması, ilaç kombinasyonlarının belirlenmesi için referans metodoloji ve analizde standardizasyon eksikliği bulunmaktadır [10]. Bu kavramların, additif etkinin tanımıyla başlayan ve basit olmayan çözümlerin önerildiği geçerli bir metodolojiye uygulanması karmaşıktır. Etkinliği belirlenmiş ilaç kombinasyonlarının klinik araştırmalara uygulanabilmesi için bilimsel ve teknik problemlerin çözülmesi gerekir [11,12]. Bu bilgiler doğrultusunda, bu çalışmada sinerjistik ilaç kombinasyonlarının analizi ve sinerjizmin belirlenmesi için matematiksel ve istatistiksel yöntemler derlenmiştir. İlk aşamada, kombinasyon etkisinin ölçüsü olarak bilinen ve bu etkinin beklenen additif etkiden daha büyük, daha küçük veya eşit olduğu bir etkiyi gösteren kombinasyon indeksi (CI) tanımlanmıştır. İkinci basamakta, ilaç kombinasyonlarının analizinde kullanılan terminoloji ayrıntılı olarak açıklanmıştır. Üçüncü aşamada ise, ilaç kombinasyonlarının analizinde etkileşimsizlik hipotezinin uygulaması için en yüksek tek ajan (HSA) yaklaşımı, Chou-Talalay metodu, Bliss istatistiksel bağımsızlık modeli ve Loewe additif etki yaklaşımı dahil olmak üzere yaygın olarak kullanılan geleneksel modeller sunulmuştur. Bu yöntemlerin avantaj ve dezavantajları tartışılmış, kullanılamayacağı durumları da belirtilmiştir. Takibinde, güncel kullanılan yöntemler açıklanmıştır. Son olarak, ilaç kombinasyonlarının analizinde dikkat edilmesi gereken hususlar sıralanmıştır.

## Terminoloji ve İlaç Kombinasyonlarının Analizi

İlaç kombinasyonlarındaki etkileşimleri tanımlamak ve sinerjizmi tespit etmek amacıyla matematiksel ve/veya istatistiksel yöntemler geliştirilmiştir. Ancak, analiz metodlarında kullanılan

terminoloji maalesef her zaman uyumlu değildir. Bu tutarsızlık, farmakoloji başta olmak üzere çeşitli araştırma alanlarında hala gözlenmektedir ve ilaç kombinasyonlarının analizinde hatalara neden olmaktadır [13]. Bu bölümde, ilaç kombinasyonlarındaki sinerjistik etkileşimlerin tanımlanması ve nicelleştirilmesindeki muhtemel tutarsızlıkları ve yanlış anlaşılmalara önlemek için, terminoloji kapsamlı şekilde açıklanmıştır.

İlaç kombinasyonları, kombinasyon etkisinin sıfır hipotezinden (etkileşimsizlik etkisi) sapmasına bağlı olarak sinerjistik, additif veya antagonistik olarak tanımlanır [12]. Sinerjizmin kantitatif tek ölçüsü CI değeridir.  $CI < 1$ ,  $= 1$ ,  $> 1$ , sırasıyla sinerjizm, additif etki ve antagonizmi ifade eder. Sinerjizm additif etkiden daha büyük, antagonizm ise additif etkiden daha küçük olan etkidir [11]. Additif etkiden önemli sapma, sapmanın yönüne bağlı olarak sinerjizm veya antagonizm olarak tanımlanır. Sinerjizm ile ilgili olarak tanımlanması elzem ilk kavram, additif etkidir. Additif etki, etkileşimsizlik ve intertizim olarak da adlandırılır ve sinerjizmin belirlenmesinde temel kabul edilir. Bir ilacın etkisi, diğer bir ilacın etkisini maskeleyemediği veya artırmadığı durumda kombinasyon additiftir. Bu durum etkileşimsizlik olarak da bilinir ve birden fazla ilacın kombinasyonu sinerjizme yol açmadığında beklenen veya ölçülen etkiyi belirtir. Sinerjizmin belirlenmesi için additif etki kavramının doğru şekilde anlaşılması ve hesaplanması gereklidir. Additif etkinin matematiksel olarak tanımlanması önemli bir problemdir. Additif etkinin tanımıyla eş anlamlı olan iki terim, Loewe additif etkisi ve Bliss bağımsızlığıdır. Loewe additif etkisi, doz additivitesi ve konsantrasyon ilavesi olarak da isimlendirilir. Bliss bağımsızlığı ise, Bliss additivitesi, yanıt-çoğaltımı, yanıt-ilavesi, etki-ilavesi ve bağımsız-hareket olarak adlandırılır [13].

Sinerjizm, iki ilacın kombinasyon etkisinin aynı deney koşullarındaki bireysel etkilerinin toplamından daha fazla olmasıdır. Sinerjistik kombinasyon tedavi rejimleri, ilaç dozlarının azaltılması ve terapötik etki korunurken doz ile ilişkili yan etkilerin azaltılmasına olanak sağlayabilir [11]. İlaç kombinasyonlarında sinerjizm, tamamlayıcı ilaç etkileri (aynı protein veya yolak üzerindeki farklı bölgelerin hedeflenmesi), anti-karşı etkiler (bir ilaç diğer bir ilacın farmakolojik yanıtını etkilediği durum) veya fasilitasyon etkilerinin (bir ilaç diğerinin etkisini artırdığı durum) sonucu ortaya çıkar [12]. Sinerjizm, süper-additif etki, potansiyalizasyon, güçlendirme, supra-additif etki olarak da isimlendirilir. Koalizim terimi, kombinasyondaki ilaçların hiçbiri tek başına etkili olmadığında sinerjizme atıfta bulunmak için kullanılır.

İlaçların doz-etki eğrilerinin belirlenmesi ve ilaç kombinasyonlarındaki sinerjistik etkileşimlerin düzeyini ölçmek için yaygın kullanılan geleneksel yöntemler, HSA modeli, Loewe additif etki yaklaşımı, Bliss istatistiksel bağımsızlık modeli ve Chou-Talalay (kütle-eylem yasası temelli medyan-etki denklemi) yöntemidir [14] (Tablo 1). Bu bölümde, ilaç kombinasyonlarının analizi için yaygın kullanılan geleneksel yöntemlerin prensipleri, avantaj ve dezavantajları açıklanmıştır. Takibinde de güncel orijinal çalışmalara değinilmiştir.

**Tablo 1.** İlaç kombinasyonlarının analizi için yaygın kullanılan geleneksel yöntemler

Yöntem	Temeli	Sınırlama
<b>Kombinasyon Alt Eşikleme Yaklaşımı</b>	Etkisiz ilaç dozlarının kombinasyonunun önemli bir etki oluşturduğu prensibine dayanır.	Etkililik genellikle, istatistiksel analiz sonucu elde edilen $p$ -değeri ile verilir. Bir eşige bağlı olarak hesaplanan etkililiğin, ilaç kombinasyon etkisi ile bireysel bileşenlerin etkileri arasında önemli bir fark olduğu anlamına gelmez.
<b>HSA Yaklaşımı</b>	Kombinasyon etkisi, bireysel olarak HSA'nın etkisi ile karşılaştırılır.	Yöntem, bireysel bileşenlerden beklenen additif etkisiye kıyasla üstün bir kombinasyon etkisini göstermekte başarısızdır. En az bir ilacın bireysel olarak etkisiz olduğu durumlarda kısıtlı veri sunar.
<b>Yanıt-katkı Yaklaşımı</b>	Kombinasyon etkisini, ilaçların bireysel etkileri yerine beklenen additif etki ile karşılaştırır. Yöntem, ilaçların sıfır kesişimli doğrusal doz-etki eğrilerine sahip olduğunu varsayar.	Yöntem, doğrusal olmayan doz-etki eğrilerine sahip kombinasyonların analizinde kullanılamaz.

**Tablo 1 (devamı).** İlaç kombinasyonlarının analizi için yaygın kullanılan geleneksel yöntemler

Yöntem	Temeli	Sınırlama
<b>Bliss İstatistiksel Bağımsızlık Modeli</b>	İlaç etkilerinin olasılıksal süreçlerin sonuçları olduğu ve ilaçların birbirini etkilemediği (farklı etki mekanizmaları), ancak her birinin ortak bir sonuca katkıda bulunduğu varsayımına dayanır.	Model, yalnızca 0 ve 1 arasında değişen olasılık olarak ifade edilen etkiler için geçerlidir.
<b>Klasik İzobologram</b>	İzobologram çizgileri, aynı etkiye (izo etkisi) sahip dozları veya dozların kombinasyonlarını birleştirir.	Yöntem, çok sayıda deneysel veri gerektirir. Ayrıca, bilgisayar yazılımı ve istatistiksel yaklaşım yetersizdir ve sadece ikili-ilaç kombinasyonu değerlendirilebilir. Birbirini-dışlamayan iki ilaç durumunda yöntem uygulanamaz.
<b>Modifiye İzobologram</b>	Yöntemin temeli additif etkidir. Sitotoksik ajanların önemli ölçüde etkileşime girmediği güven aralığı ile sınırlanmış bölgede analiz yapılır.	
<b>Medyan-Etki Modeli (Chou-Talalay metodu)</b>	Enzim kinetiği sistemleri: Kütle eylem yasası, Michaelis-Menten ve Hill denklemleri.	Doğrusal regresyon analizinin uygulama zorluğu nedeniyle, doz-cevap eğrileri sigmoidal olmadığında yöntem uygulanmamalıdır.
<b>3-boyutlu Analiz</b>	Michaelis-Menten denklemleri ve Medyan-Etki prensibi.	Model, her farklı yanıt-yüzey tipi için birkaç matematiksel fonksiyon ve yazılım gerektirir. Karmaşık uygulama, prelinik çalışmalarda yaygın kullanımı öner.
<b>Oransal-verim metodu</b>	İki ilacın etkisinin toplamı, inhibisyon etkilerinin sonucu ile ifade edilir.	Yöntem, doz-cevap eğrilerinin ( $m > 1$ veya $m < 1$ ) muhtemel sigmoidalitesini dikkate almaz ve karşılıklı olarak birbirini dışlayan iki ayrı ilaç veya ikinci-derece karşılıklı olarak birbirini tamamen-dışlamayan iki ilaç için geçerli değildir.

Kombinasyon alt-eşik yaklaşımı, ilaçların etkili olmayan dozlarının kombinasyonunun önemli etkisinin olduğu düşüncesine dayanır. Etkinlik, ilaç kombinasyon grubunun etkisinin kontrol grubuna karşı istatistiksel analiz ile kıyaslanarak  $p$ -değerine bağlı gösterilir (istatistiksel anlamlılık,  $p < 0.05$ ). Ancak, belirli eşik değer referans alınarak gösterilen etkililik, kombinasyon etkisi ile ilaçların bireysel etkileri arasında önemli bir fark olduğu anlamına gelmez [15]. Kombinasyon etkisinin çok az anlamlı olduğu (örneğin,  $p = 0.049$ ) ve ilaçların bireysel etkileri anlamlı olmadığında (Örneğin,  $p = 0.051$ ), "anlamlı" ve "anlamlı olmayan" arasındaki fark her zaman anlamlı değildir ve tek ajanın etkisine kıyasla pozitif bir ilaç kombinasyon etkisini göstermez [10]. Dolayısıyla bu yaklaşım ilaç kombinasyonlarının analizinde tercih edilmemelidir.

HSA modeli [16], bir ilaç kombinasyon etkisinin ( $E_{AB}$ ), bireysel bileşenlerin etkilerinden ( $E_A$  ve  $E_B$ ) daha büyük olduğu fikrine dayanır [17]. HSA modeli, ilaç kombinasyon etkisi bileşenlerin etkisinden büyük olduğunda bir miktar etkileşimin gerçekleşmiş olması gerektiği sezgisidir. Modelde, ilaçların herhangi bir konsantrasyonunda ( $X, Y$ ), inhibisyon etkisi  $I_{HSA} = \max(I_X, I_Y)$ , hesaplanır.  $I_X$  ve  $I_Y$ , aynı deney koşullarında ilaçların tek ajan olarak etkileridir (sırasıyla  $(X, 0)$  ve  $(0, Y)$ ). Model değerleri,  $I_X$  ve  $I_Y$ 'nin tek ajanın etki verilerine sigmoid uyumu kullanılarak belirlendiği her bir doz matriks noktasında hesaplanır. HSA modeli ile CI değeri aşağıdaki formülle belirlenir. Denklemde  $E_A$ , A ilacının,  $E_B$  ise B ilacının tek ajan olarak etkisini,  $E_{AB}$  ise, A ve B kombinasyonunun etkisini gösterir [10].

$$CI = \frac{\max(E_A; E_B)}{E_{AB}}$$

HSA, hedefleri ortak olmayan ajanların kombinasyonlarından pozitif bir etki beklentisidir. Model basit olduğundan dolayı, ilaç kombinasyonlarının analizinde yaygın olarak kullanılır. HSA metodu ile elde edilen sonuç, hedefleri ortak olmayan ilaçların kombinasyonlarının ürünüdür [16]. Ancak, referansın üzerindeki kombinasyon yanıtları, etki artışlarından ve/veya potensideki sapmalardan kaynaklanabilir. Pozitif kombinasyon etkisinin önemi, kombinasyonun etkisini HSA ile karşılaştıran

istatistiksel analiz için  $p$  değeri ile verilir. HSA modeli, kombinasyon alt eşik yaklaşımından daha gelişmiş bir yöntemdir ve anlamın farklılığından ziyade farklılıkların anlamını gösterir [10]. HSA modeli, işlenmemiş veriler, inhibisyon ve kat artışları dahil tüm etki ölçümleri için kullanılabilir. HSA hesaplaması, ikili-ilaç kombinasyonu için her iki ajanın da tüm konsantrasyonlarda pozitif etkileri olduğunda (gürültü hariç) anlamlıdır. Bu basit model, aynı deney koşullarında kombinasyondaki bileşenlerin bireysel etkilerine kıyasla, kombinasyon etkisinin üstünlüğüne dair kanıt sağlar. Fakat model, kombinasyonda yer alan bir ilacın herhangi bir konsantrasyonda etkisiz olduğu durumlarda kullanılabilir [14]. Hatta, bu modele göre prelinik çalışmalarda bir ilaç kendisi ile kombine edildiğinde bile HSA'dan fazla etki gösterebilir ve dolayısıyla bu durum anlamsızdır.

Yanıt katkı yaklaşımı (lineer etkileşim etkisi [18], kombinasyon etkisi, ajanların bireysel etkilerinin toplamı ile verilen additif etkiden daha büyük olduğunda pozitif kombinasyon etkisinin meydana geldiğini ifade eder [10]. Bu yöntemde CI değeri aşağıdaki formül ile hesaplanır.

$$CI = \frac{E_A + E_B}{E_{AB}}$$

$p$  değeri, ajanların bireysel ve kombinasyon etkilerinin varyans analizindeki etkileşim etkisinin önemidir. Yanıt-katkı yaklaşımı, kombinasyon etkisini ajanların bireysel etkisi yerine beklenen additif etki ile karşılaştırır. Sinerjizmi değerlendirmek için HSA modelinin gelişmiş formudur. İlaçların sıfır-kesişimli lineer doz-etki eğrilerine sahip olduğunu varsayar. Ancak doz-etki eğrileri genellikle lojistik veya eğriseldir [19]. Yanıt katkısı, yukarı-eğimli kısımda sinerjizmi ve aşağı-eğimli kısımda antagonizmi gösterir ve kombinasyon etkisinin geçersiz çıkarımıyla sonuçlanır [10]. Bir başka ifade ile, bu çıkarım sinerjistik kombinasyon etkisinin, ajanların bireysel etkilerinden daha az olduğu anlamına gelir ki bunun da bilimsel bir temeli bulunmamaktadır.

Bliss istatistiksel bağımsızlık modeli, ilaç etkilerinin olasılıksal süreçlerin sonucu olduğu ilkesine dayanır ve ilaçların, birbirini etkilemediği (farklı etki mekanizmaları) ancak her birinin ortak bir sonuca katkıda bulunacak şekilde bağımsız etki gösterdiğini varsayar. Bliss modeli, bir yüzeyin Bliss bağımsızlığından sapmasını ölçer [13]. Yöntem, ilaç etkilerinin olasılıksal olarak bağımsız olaylar olduğunu varsayar. Olasılık olarak ifade edilen gözlemlenen kombinasyon etkisi ( $0 \leq E_{AB} \leq 1$ ), olasılık bağımsızlık  $E_A + E_B(1 - E_A) = E_A + E_B - E_A E_B$  için beklenen additif etki ile karşılaştırılır ( $0 \leq E_A \leq 1$  ve  $0 \leq E_B \leq 1$ ). Bliss modeli ile CI değeri aşağıdaki formül ile hesaplanmaktadır [10].

$$CI = \frac{E_A + E_B - E_{AB}}{E_{AB}}$$

Loewe additif etki yaklaşımına alternatif olarak kullanılan yöntem Bliss modelidir. Ancak, Bliss modeli Hill eğimine bağlı Loewe additif etkisini gösteremez [13]. Model, bir kombinasyondaki her ilacın birbirinden bağımsız etki mekanizmalarının olduğunu varsayar ve etkileşimsizlik fikrine dayanır [10]. Bliss modeli ile hesaplanan kombinasyon etkisi, beklenen additif etkiden daha büyük olduğunda etkileşim türü sinerjizmdir. Bliss modeli çoklu-ilaç kombinasyonlarına uygulanabilir [20]. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, ikili, üçlü, dörtlü ve beşli-ilaç kombinasyonlarının analizinde Bliss istatistiksel bağımsızlık modeli kullanılmıştır [21]. Şunu belirtmekte fayda vardır ki, en az üç ilaç kombinasyon olarak uygulandığında, formül karmaşık hale gelebilir. İlaç kombinasyonlarının analizi için yaygın kullanılmasına rağmen, Bliss modelinin bazı sınırlamaları mevcuttur. Bliss modelinin istatistiksel kesinlikten yoksun olduğu ve bazı durumlarda yanlış-pozitif sonuçlara yol açtığı bilinmektedir [22]. Yöntem, ikili ilaç kombinasyonundaki moleküllerin birbirinden bağımsız etki mekanizmalarına sahip olduğunu varsayar [10]. İlaç kombinasyonlarındaki farmakolojik etkileşimlerin büyük bir kısmı için bu durumun geçerli olmayabileceği gösterilmiştir [23,24]. Bliss modelinin geçerli olması için, doz-etki eğrisinin tüm doz ve/veya etki seviyelerine uygulanabilir olması gerekir. Bu durum birçok koşulda doğru olmayabilir [24]. Bliss metodu, Loewe additif etki modelinin temeli olan "sham karışım" yaklaşımına uygulandığında hatalı analiz sonuçlarının elde edilmesi muhtemeldir. Sham karışım yaklaşımının sezgisel olduğu belirtilmiştir [13]. Farmakolojik sinerjizm, karmaşık ve

bilinmeyen birden çok etki mekanizmalarına sahip ilaçları kapsar. Dolayısıyla, metodolojiler ilaçların etki mekanizmalarına bağlı olmamalıdır. Bliss modeli, ilaçların üstel doz-etki eğrilerine sahip olduğunu varsayar. Yöntem, 0 ve 1 aralığında değişen olasılık olarak ifade edilen etkiler için geçerlidir [10]. Bliss modeli, sigmoidal doz-etki eğrileri için uygun değildir ve sabit oranlı bir kombinasyonun tek başına her iki ilaçtan daha az etkili olduğu ve dolayısıyla sinerjizm olarak kabul edilebileceği gibi mantık dışı sonuçlar üretebilir.

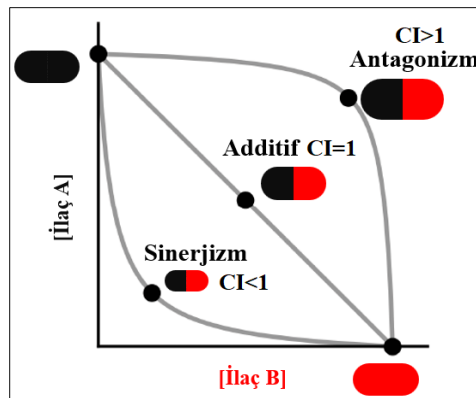
Doz-etki temelli analiz yöntemlerine göre non-lineer doz-etki eğrilerine sahip farklı ajanların etkilerini karşılaştırmanın yolu, her bir ilacın hangi konsantrasyonunun aynı etkiyi ürettiğini belirlemektir. Doz-etki temelli yaklaşımlar, ilk olarak Frei tarafından bildirilmiştir [25]. Loewe tarafından resmi olarak tanımlanmıştır ve Loewe additif etkisi olarak bilinen matematiksel modele dayanır. Loewe additif etkisi, doz denklik ilkesi ve sham kombinasyon ilkesini temel alır [14]. Örneğin; A ve B ilaçlarının additif etkisi, bireysel doz-etki eğrilerine bağlıdır. Loewe, ilaçların sabit bir etki (potensi) oranına sahip olduğunu varsayar ( $R=A/B$ ). Sabit potensi oranına sahip doz-etki eğrileri, her etki düzeyinde sabit doz oranına sahiptir ve log-doz ölçeğinde paraleldir ve eşit bireysel ilaç maksimum etkilerine sahiptir [26].  $E_{AB}$  kombinasyon etkisine sahip tüm doz çiftleri (a, b) ve bu etkiye ulaşmak için gerekli olan A ve B dozları arasındaki ilişki aşağıdaki eşitlikler ile tanımlanır.

$$a + a_b = A \quad ; \quad a + b \times R = A \quad ; \quad a + b \times \frac{A}{B} = A$$

Yukarıdaki eşitlikler, Loewe additif etki modelinin matematiksel olarak ifade edilmesini ve CI parametresinin değerlendirilmesine olanak sağlar [27,28].

$$\frac{a}{A} + \frac{b}{B} = 1 \quad ; \quad CI = \frac{a}{A} + \frac{b}{B}$$

$CI < 1$  değeri, a ve b dozlarının kombinasyon etkisinin additif etkiden daha düşük olduğunu ve sinerjizmi gösterir. Loewe additif etki modelinin bir diğer avantajı, cebirsel analizi izobologram olarak bilinen sezgisel ve yaygın kabul gören grafiksel yöntem ile tanımlanmasına olanak sağlamasıdır [29]. A ve B ilaçlarının sırasıyla a ve b dozlarının kombinasyon etkisi (E),  $a/A + b/B = 1$  denklemi,  $E_{AB}$  kombinasyon etkisine yol açan tüm A ve B ilaç doz çiftlerini tanımlar. x- ve y- eksenlerinin A ve B ilaçlarının dozunu gösterdiği bir grafikte negatif eğimin additif etki eğrisi olarak çizilebilir. Bu gösterim, A ilacı A dozunda uygulandığında, belirtilen seviyeye ulaşmak için gereken B ilacı miktarının sıfır olduğunu ve B ilacının varlığında ise, model tarafından tahmin edilen miktarda gereken A dozuna ihtiyacın azaldığını ifade eder. Additif etki çizgisine göre bir kombinasyon etkisi ( $E_{AB}$ ) için ihtiyaç duyulan dozlara karşılık gelen deneysel veri (a, b) sinerjizm, additif etki ve antagonizm açısından değerlendirilebilir [30]. Çizginin altındaki deneysel veri,  $CI < 1$  ve sinerjizmi belirtir. Çizgi üzerindeki bir nokta  $CI = 1$ 'e ve çizginin üstündeki nokta ise  $CI > 1$ 'e karşılık gelir ve sırasıyla additif etki ve antagonizmi gösterir (Şekil 1).



Şekil 1. İzobologram. CI: Kombinasyon indeksi.

Loewe additif etki temelli ilaç kombinasyon analizinin bazı sınırlamaları bulunmaktadır. Kombinasyon etkisini ( $E_{AB}$ ) üreten dozların (A ve B) hesaplanması için belirlenen doz-etki eğrilerine dayanır. Doz-etki ilişkisi, aşağıdaki formül tarafından tanımlanan Hill denklemini (sigmoid veya lojistik fonksiyon) temel alır [10].

$$E = E_{\text{maksimum}} \times \frac{C^n}{EC_{50}^n + C^n}$$

Formülde E, c konsantrasyonunun etkisini,  $E_{\text{max}}$  maksimum etkiyi,  $EC_{50}$  maksimum etkinin yarısına denk gelen ilaç dozunu gösterir ve eğrinin bükülme noktasıdır. n, eğrinin şekil parametresidir. Kombinasyondaki ilaçlar için doz-etki eğrilerinin tahmini, belirli miktarda veri gerektirir. Bu durum, deneysel ve hesaplama açısından zor olmanın yanı sıra pahalıdır ve ilaç kombinasyonlarının analizini engelleyici hale getirebilir [16]. Loewe additif etki modeli, ilaç doz-etki eğrisi mevcut olmadığı veya modellemesinin zor olduğu durumlarda kullanışsızdır [22]. Sınırlı durumlarda additif izoboller düz çizgidir. Potensi oranı (R), genellikle sabit değildir. Dolayısıyla, bireysel log-doz-etki eğrileri paralel olmadığında ve/veya ilaç maksimum etkileri farklılık gösterdiğinde ve additif izobollere yol açtığında geçerlidir [30].

İlaç kombinasyonlarının kantitatif analizi için kullanılan en yaygın yöntem, Dr. Chou ve Dr. Talalay tarafından geliştirilmiş olan medyan-etki denklemdir [11]. Chou-Talalay, ilaç kombinasyon etkilerinin kütle-eylem ilkesi temelinde analizini sağlayan medyan-etki yaklaşımını önermiştir. Medyan-etki denklemi, kütle-eylem yasası ilkesinden yararlanılarak çeşitli reaksiyon mekanizmaları ve farklı inhibisyon türleri için Michaelis-Menten, Hill, Henderson-Hasselbalch ve Scatchard denklemlerinden matematiksel tüme-varım ve tümden-gelim ile türetilmiştir. Chou-Talalay yöntemi, kütle-eylem yasasının medyan-etki prensibinden türetilen ilaç kombinasyon etkisi denklemine dayanır. İlaç etkileşimlerinin sayısal analizi ve kombinasyonların simülasyonu için CompuSyn bilgisayar yazılım algoritması sağlar. Yöntem, her bir ilacın ve kombinasyonlarının doz-etki eğrisinin potensini ve şeklini temel alır [31]. Denklem, CI değerinin hesaplanması ve ilaç kombinasyonlarının analizinde sıklıkla tercih edilmektedir ve çok sayıda atıf almıştır. Medyan-etki denklemi, aşağıda verildiği gibidir.

$$\frac{f_a}{f_u} = \left( \frac{D}{D_m} \right)^m$$

Medyan-etki eşitliği, ilacın dozunu ve etkisini ilişkilendirir. Denklemde D; ilacın dozu,  $f_a$ ; ilaç dozunun etkisi ve  $f_u$ ; ise ilaç dozundan etkilenmeyen kısımdır ( $f_u = 1 - f_a$ ).  $D_m$ , % 50 inhibisyona yol açan medyan-etki ( $IC_{50}$ ,  $ED_{50}$  veya  $LD_{50}$ ) dozu ve m, doz-etki eğrisini gösteren kinetik katsayıdır.  $m=1$ ,  $>1$  ve  $<1$  sırasıyla hiperbolik, sigmoidal ve düz-sigmoidal doz-etki eğrisini ifade eder [32]. Medyan-etki denklemi, mekanizma-temelli (örneğin; Michaelis-Menten) ve etki-temelli denklemlerden türetilir ve ilaç etkilerinin boyutsuz olarak ölçülmesine olanak sağlar. Denklem, etkilerin oranı ( $E_d$ ,  $(1-E_d)$  veya  $f_a$  ve  $f_{ua}$ ) ve dozların oranından (gerçek doz d, medyan doz M) oluşur. Doz ve etkinin tanımlanmış parametreler ile değiştirilebileceği rapor edilmiştir [11]. Medyan-etki denklemi, analiz yoluyla türetilmiş olmasına rağmen mekanizmaya-öзгü sabitler yerine doz ve etkiyi boyutsuz oranlarda ilişkilendirir. Medyan-etki denkleminde m eğim değeri,  $D_m$  ise x eksenini kesen noktanın anti-logaritmasıdır. m ve  $D_m$  değerleri biliniyorsa, herhangi bir etki ( $f_a$ ) seviyesi için doz (D) veya herhangi bir doza karşılık gelen etki ve doz-etki eğrisi belirlenebilir [32]. Medyan-etki denklemi, eşitliğin her iki tarafının logaritması alınarak kolaylıkla doğrusallaştırılabilir.  $\log(f_a/f_{ua})$  ile  $\log(d)$  arasındaki düz çizgi, Hill grafiğini verir [31].

Medyan-etki denklemi yeniden düzenlenerek ve/veya logaritması alınarak biyomedikal bilimlerdeki dört temel yaygın denklem Michaelis-Menten (birinci dereceden enzim kinetiği,  $m=1$ ), Hill eşitliği (oksijen-hemoglobin etkileşimi ( $m=n$ )) gibi yüksek miktarda biyolojik reseptörlerde birincil ligand etkileşimi), Scatchard denklemi (ligand reseptör bağlanması ve ayrışması) ve Henderson-Hasselbalch (pH-iyonizasyonu) denklemi elde edilebilir [32]. Medyan-etki dozu ( $D_m$ ), Michaelis-Menten denklemindeki  $K_m$  değerine (yarı-doygunluk), Hill denklemindeki K değerine (yarı-etkileşim),

Henderson-Hasselbach eşitliğindeki  $pK_a$  değerine (yarı-iyonizasyon) ve Scatchard denklemindeki  $K_d$  değerine (yarı-bağlanma ve -ayrışma) karşılık gelir [11].

Tek ilaç için geliştirilmiş olan medyan-etki denkleminin, çoklu ilaç kombinasyonlarına genişletilmesi mümkündür. n sayıda bileşenden oluşan ilaç kombinasyonları, medyan-etki prensibi ile analiz edilebilir. İkili-ilaç kombinasyonlarının analizi ve sinerjizmin sayısal tayini için CI terimi ve eşitliği tanımlanmıştır.

$$CI = \frac{(D)_1}{(D_x)_1} + \frac{(D)_2}{(D_x)_2} = \frac{(D)_1}{(D_m)_1 \times \left[ \frac{f_a}{1-f_a} \right]^{m_1}} + \frac{(D)_2}{(D_m)_2 \times \left[ \frac{f_a}{1-f_a} \right]^{m_2}}$$

CI denkleminde  $(D_x)_1$  ve  $(D_x)_2$ , % x inhibisyon için gereken  $D_1$  ve  $D_2$  dozlarıdır.  $(D_x)_1$  ve  $(D_x)_2$  değerleri, doz-etki denkleminde hesaplanabilir. Paydadaki dozların toplamı,  $(D)_1+(D)_2$ , sistemi % x oranında inhibe eder. Yukarıdaki eşitlikte CI değerinin  $<1$ ,  $=1$  ve  $>1$ , olması sırasıyla sinerjizm, additif etki ve antagonizmi gösterir. Medyan-etki prensibi sayesinde CI teoremi ve izobologram geliştirilmiştir [11,31].  $F_a$ -CI grafiğindeki, x-ekseni etki seviyelerini ( $f_a$ ) y-ekseni ise CI değerlerini belirtir.  $F_a$ -log(CI) grafiği,  $F_a$ -CI eğrisindeki büyük ölçekli noktaları küçültürken additif eksen ( $CI=1$ ) ile simetrik hale getirir. Medyan-etki eşitliği, ilaç kombinasyonlarının kantitatif olarak tespit edilmesini sağlayan CI-izobologram denkleminin temelidir. İzobologram eğrisi, ilaçların dozlarını temel alır. CI grafiği ise etki-temelli bir grafiğdir. Her iki yaklaşımın prensibi, CI teoremine dayanır. İzobologram iki boyutludur ve ikili-ilaç kombinasyonları için uygundur. İzobologram grafiği, ilaçların kombinasyon etkisi olarak çizilir. Her ilacın bireysel etkileri, eksenlerden belirlenebilir. İzobologram,  $IC_{50}$  ( $IC_{75}$  veya  $IC_{90}$ ) ve bu etkiyi elde etmek için ilacın hangi konsantrasyonunun gerekli olduğunu gösterir.

Sinerjistik etkileşimin derecesi, ilaç kombinasyonunun farklı doz ve/veya etki seviyelerinde farklı olabilir. Chou tarafından, sinerjizmin dereceleri tanımlanmıştır (Tablo 2). Sinerjizm için CI değeri, 0 ile 1 aralığındadır. Log(CI), CI grafiğinin simetrik olarak gösterilmesine imkan sağlar ( $F_a$ -log(CI) grafiğinde, sinerjizm için  $CI = 0.1$  ve  $0.01$ ,  $\log(CI) = -1$  ve  $-2$ 'yi verir).

Dr. Chou, medyan-etki prensibi ile ilaç kombinasyon çalışmalarının tasarımı için moleküllerin ve/veya kemoterapötiklerin  $IC_{50}$  doz katlarını temel alınmasını ve ilaçların  $IC_{50}/4-4IC_{50}$  konsantrasyon aralığında sabit-oranlı dozların kombinasyon etkilerinin incelenmesini önermektedir [11]. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, polifenol-kemoterapötik ajan ikili ilaç kombinasyonlarının etkilerinin incelenmesinde  $IC_{50}/16-4IC_{50}$  doz aralığı kullanılmış ve kombinasyonlar analiz edilmiştir [21]. Elde edilen *in vitro* deneysel bulgulardan, Chou-Talalay metodunun ikili-ilaç kombinasyonlarındaki sinerjistik ve kuvvetli sinerjistik etkileşimleri başarılı bir şekilde gösterdiği anlaşılmaktadır.

**Tablo 2.** CI metodu ile sinerjizm ve antagonizmanın dereceleri [11]

CI aralığı	Log10 (CI) aralığı	Sınıflandırma
< 0.1	< -1	Çok güçlü sinerjizm
0.1 - 0.3	(- 1) - (- 0.52)	Güçlü sinerjizm
0.3 - 0.7	(- 0.52) - (- 0.15)	Sinerjizm
0.7 - 0.85	(- 0.15) - (- 0.07)	Orta sinerjizm
0.85 - 0.9	(- 0.07) - (- 0.05)	Az sinerjizm
0.9 - 1.1	(- 0.05) - (0.04)	Additif etki
1.1 - 1.2	0.04 - 0.08	Az antagonizm
1.2 - 1.45	0.08 - 0.16	Orta antagonizm
1.45 - 3.3	0.16 - 0.52	Antagonizm
3.3 - 10	0.52 - 1	Güçlü antagonizm
>10	>1	Çok güçlü antagonizm



Chou ve ekibi, ilaç etkileşim parametrelerinin belirlenmesini sağlayan CompuSyn yazılımını geliştirmiştir. Yazılım, prelinik çalışmalar için doz-etki eğrisini, medyan-etki grafiğini, CI grafiğini, izoblogramı ve poligonogramı gösterir [31]. CompuSyn güncel kullanılan yazılımlardan birisidir, basit ara-yüze sahiptir ve kullanımı kolaydır. Chou-Talalay metodu çok sayıda atıf almıştır ve yaygın olarak kullanılmaktadır [33,34]. Ancak, bazı sınırlamaları mevcuttur [9,12]. Yöntem, ilaçların sabit potansi oranına sahip olduğunu varsaymaktadır. İlaçların doz-etki eğrileri non-lineer olduğu için, medyan-etki dozunun ve doz-etki eğrisinin sigmoiditesinin doğru bir şekilde hesaplanması zordur. Lineer regresyon analizinin zorluğundan dolayı, doz-etki eğrileri sigmoidal olmadığında yöntem uygulanmamalıdır. Medyan etki yöntemi, Scatchard analizi gibi idealleştirilmiş kütle-eylem ilkesini temel alır varsayar ve log-linearizasyona dayanır.

Farmakolojide Scatchard analizi yerine, non-lineer regresyon kullanılmaktadır. Log-linearizasyondaki deneysel hatalardan dolayı zayıf model uyumunun olduğu ve medyan etki analizinde de benzer bir sorun yaşanabileceği öne sürülmüştür. Hatta, kombinasyon analizine uygun olmayan modelin, deneyde kullanılan ilaçlara verilen yanıtların analizinde hatalara neden olabileceği ve dolayısıyla kombinasyonunun yanlış yorumlanmasına yol açacağı bildirilmiştir [35].

Bahsedilen geleneksel metotlara ek olarak, bazı çalışmalarda ilaç etkileşim eşitliği (CDI) olarak adlandırılan basit denklem kullanılarak ilaç kombinasyonlarının monoterapiye kıyasla üstün etkisi tahmin edilmiştir [36]. Bu yöntem, ilaç kombinasyon etkisinin bireysel ilaç etkisine göre basit bir kıyaslamasıdır. Ancak bu metot oldukça ilkel bir kıyaslama yaklaşımıdır ve literatürde yaygın olarak tercih edilmemektedir. Bu denklemle hesaplama yapılırken ilaç doz-cevap eğrilerinin temel alınması ve analizi ile ilgili bir çalışma bulunmamaktadır. Hatta 0.7'den küçük olan her CDI değeri için sinerjizm değerlendirmesi yapmaktadır ve "kuvvetli sinerjizm" veya "hafif sinerjizm" gibi çıkarımlar vermemektedir.

İlaç kombinasyonlarının analizi için, son zamanlarda yeni yöntemler geliştirilmiştir. İlaçların bireysel ve kombinasyon etkileri arasındaki doz-etki eğrilerinin potansisindeki değişiklikler karşılaştırılarak ilaç etkileşimlerini belirleyen sıfır etkileşim gücü (ZIP) adlı model önerilmiştir. Yöntem, ilaç kombinasyonlarını tek bir parametre temelinde değerlendirmek yerine, sinerjistik doz bölgelerini belirlemek ve ölçmek için tam doz-yanıt matrisi üzerinde bir etkileşim bölgesinin kullanılmasına dayanır. Çalışma, literatürde 300'den fazla atıf almıştır [37]. Modelde sıfır etkileşim beklentisinden sapmayı ölçmek için bir delta değeri tanımlanmıştır. Sıfır delta puanı, olasılıksal bağımsızlığın ve doz additivitesinin göstergesidir. Boyutsuz CI parametresinden farklı olarak, delta skoru hücre proliferasyon inhibisyonunun yüzdesini gösterir ve ilaç etkileşim etkisinin doğrudan tahminini sağlayabilir. Örneğin, 0.1 delta değeri, kombinasyondan beklenen etkiye kıyasla ortalama % 10 daha fazla inhibisyon üreteceğini belirtirken, -0,1 delta skoru ise aynı büyüklükteki antagonizmi gösterir. Delta skoru 0 ile 1 aralığında ise kombinasyon sinerjistikdir. Bu değer -1 ile 0 arasında olması, ilaç kombinasyonunun antagonistik etkileşime sahip olduğunu ifade eder. Antikanser ilaç kombinasyon çalışmasından elde edilen veriler kullanılarak, ZIP skorlama yaklaşımının yanlış-pozitif oranı düşük bir seviyede tutarken ilaç sinerjizmini başarılı bir şekilde göstermiştir. Etkileşim bölgesi, çeşitli ilaç kombinasyonları arasında ayırım yapılmasını sağlar. Bu sebeple kombinasyonların kliniğe uygulanmasına yönelik ilaç etki mekanizmalarını belirlemek için iyi bir metot olabilir.

İlaç kombinasyonlarının sıklıkla CI-temelli metotlar kullanılarak analizi oldukça yaygındır. Ancak yapılan çalışmalar, yanıt-yüzey temelli modellerin ilaç sinerjizminin belirlenmesinde daha güvenilir olduğunu göstermiştir [38]. Yanıt-yüzey temelli modeller, 3'lü ilaç kombinasyonlarına ve atipik ilaç kombinasyon yanıtlarına da uygulanabilir. Yakın zamanda, additif etkileşimli dozlara iki-değişkenli yanıt (BRAID) olarak adlandırılan BRAID yanıt-yüzey modeli rapor edilmiştir [39]. Yöntem, yanıt-yüzey temelli bir modeldir ve ilaç etkileşimlerini belirlemek için gerekli kolaylık, sezgisellik, farmakolojik ve toksikolojik kısıtlamalar temelinde analiz için çok yönlü modeldir. Model, tek bir ilacın doz-etki analizi için yaygın olarak kullanılan Hill veya log-lojistik denklemlerine dayanır. İlaç etkileşimlerinin sınıflandırılması ve kombinasyonun doz-etki eğrilerinin modellemesini de barındıran birleşik bir araç olarak düşünülebilir. Model, Ewing sarkomu üzerine yapılan deneylerde elde kombinasyon veri setinin analizinde kullanılmıştır. Yöntem temelinde yapılan analiz sonucunda, ilaç kombinasyonlarındaki etkileşimlerin sınıflandırmalarının, geleneksel yöntemlere göre daha tutarlı olduğu ve ilaç etki mekanizmaları ile etkileşim arasındaki ilişkiyi gösterdiği rapor edilmiştir. Çalışmalar

sonucunda, farklı modellerin keşfedilmesine ve spesifik deneysel veriler için en uygun olanın seçilmesine olanak tanıyan açık erişimli ve kullanımı kolay tek ve kombine ilaç etkisi analizi (SiCoDEA) olarak adlandırılan kombinasyon analiz uygulaması geliştirilmiştir [40]. Yöntem, yukarıda anlatılan etki- ve doz-etki temelli geleneksel yöntemleri referans alır. SiCoDEA sınır verilerinin çıkarılması veya analiz için farklı modeller arasında seçim yapma imkanı sunmak gibi seçenekleri barındırdığı için esnek bir uygulamadır.

İlaç kombinasyon etkilerinin kantitatif analizi için geliştirilen bir diğer model yanıt zarf analizidir [41]. Yöntem, mevcut yöntemlerin sınırlamalarını önemli ölçüde bertaraf eder. Bu yöntem, ilaç-reseptör etkileşimlerinin tanımlanmasında yaygın olarak kullanılan Hill denkleminde dayanarak Loewe additif modeli ve Bliss bağımsızlık modelinden türetilmiştir. Bliss modeli ve genelleştirilmiş Loewe additif etki yaklaşımı, ilaç etkileşimlerinin iki sınırını gösterdiği için inhibisyon mekanizmalarına gerek kalmadan sinerjizm, additif etki ve antagonizmin belirlenmesi amacıyla bir yanıt zarfı tanımlar. Metot, aslında Loewe ve Bliss modellerini temel alan üç-boyutlu yanıt-yüzey yaklaşımıdır. Yöntem kullanışlıdır ve farklı ölçeklerde ve çeşitli ilaç kombinasyonlarının etkilerini incelemek için kullanılabilir. Yapılan çalışmada, antikanser ve antibiyotik ilaç kombinasyonları analiz edilmiş ve yanıt-zarf modelinin mevcut yöntemlere göre avantajlı olduğu gösterilmiştir. Bu model ile analiz edilen ilaç kombinasyon etkilerinin, moleküler veya klinik düzeyde karmaşık çalışmaların sonuçlarıyla daha uyumlu olduğu gösterilmiştir. Diğer yöntemlere kıyasla, doğruluğu yüksek bir yöntemdir.

### **İlaç Kombinasyonlarının Analizinde Dikkat Edilmesi Gereken Hususlar**

İlaç kombinasyonlarının analizi için geliştirilen metotlar, matematiksel ve istatistiksel modellere rağmen, bütün deney koşulları için geçerli tek bir ideal analiz yöntemi bulunmamaktadır. Önceki bölümde açıklanan geleneksel metotlar ve güncel modellerin her biri sınırlı koşullarda geçerlidir. Bu sebeple, en uygun referans analiz modelini belirlemek zordur. Dolayısıyla, ilaç metabolizması veya olumsuz etkiler gibi ajanların bireysel etkileşimlerini etkileyen birçok faktörün dikkate alınması gereklidir [10,12]. Varsayımlarındaki temel farklılıklar sebebiyle, hangi referans modelin istatistiksel olarak doğru bir şekilde kullanılması gerektiği konusunda konsensüs yoktur ve hatta uygun referans modelin nasıl seçileceğine dair bir kılavuz bulunmamaktadır. Şunu belirtmekte fayda vardır ki; mevcut hiçbir analiz yöntemi, muhtemel tüm deney koşullarında sinerjizmi gösteremez. Hatta, aynı deneysel veri setine uygulanan farklı yöntemler birbirinden farklı sonuçlara yol açabilir [12,42]. Bu bölümde, ilaç kombinasyonlarının analizi için uygun yöntemin seçilmesi ve bu alanda dikkat edilmesi gereken hususlar açıklanmıştır.

İlaç kombinasyonlarının sayısal analizi ve CI değerlerinin hesaplanması için dikkat edilmesi gereken hususların birincisi, terminoloji ve yöntemlerin uygun bir şekilde kullanımıdır. İlaç kombinasyonlarının kantitatif analizi için uygun yöntem ve/veya yöntemler seçilmelidir. Sinerjizm kavramı yaygın olarak kullanılır. Ancak, literatürde tam anlaşılmamış ve açıkça tanımlanmayan teknik terimler mevcuttur [27] ve sinerjizm kavramının analiz yöntemlerine ve anlamına uygun olarak kullanılmadığı bilinmektedir [43,44]. İlaç kombinasyonlarının sayısal analizi için, ilaçların tek ajan olarak doz-etki eğrilerine ilişkin deneysel verilerin elde edilmesi zorunludur. Deneysel tasarım, ilaç kombinasyonlarının doğru analizi için önemlidir. Sinerjistik ilaç etkileşimlerini doğru bir şekilde belirleyebilecek bir yöntem seçilmelidir. Deneysel verilerin yanlış analizi sonucunda etkileşim türü sinerjizm olarak veya sinerjistik ilaç kombinasyonu additif olarak yorumlanabilir. Hatta antagonistik ilaç kombinasyonları, yanlış analizden dolayı additif olarak değerlendirilebilir. İlaç kombinasyon çalışmalarındaki sinerjistik etkileşimleri araştırmak için ilaçların en az üç farklı dozunun uygulanması gereklidir. Bir ilacın üç farklı dozundan daha az sayıda doz uygulaması yapılan çalışmalar, sinerjistik ilaç etkileşimlerini araştırmak için yeterli değildir [27]. Önceki bölümde anlatıldığı gibi, iki ilacın kombinasyonunun (Örneğin; A ve B ilaç kombinasyonu) bireysel ilaç uygulamasına kıyasla üstün bir etkileşim göstermesi sinerjizmden başka formlarda da tanımlanabilmektedir. Kombinasyondaki ilaçlardan biri tek ajan olarak etkili ise, bireysel ilaç uygulamasına kıyasla üstün bir kombinasyon etkisi “potansiyalizasyon” olarak adlandırılır [11,31]. Kombinasyon etkisi incelenen ilaçlar tek ajan olarak etkili olmadığında, bireysel ilaç uygulamasına kıyasla üstün bir kombinasyon etkisi koalizm olarak tanımlanır. Herhangi bir ilacın etkisine tamamen bağlı olmayan etkili kombinasyonlardaki etkileşim türü ise, “iş birliği etkisi” olarak isimlendirilir [45].

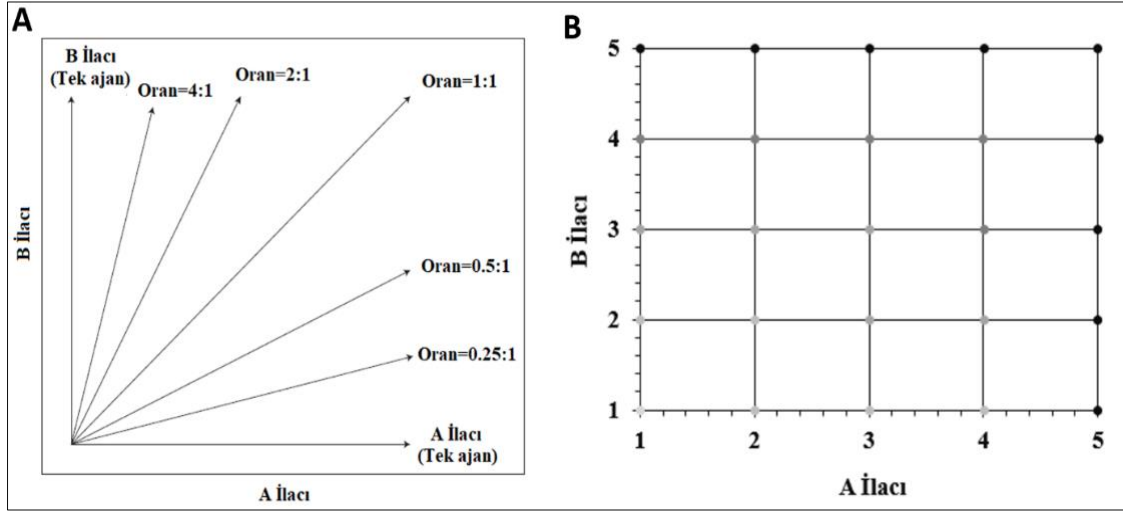
Dikkat edilmesi gereken ikinci husus, ilaç kombinasyonlarının analizinin standart bir referans model gerektirmesidir. İdeal analiz modeli, kesin olarak bilinmeyen ilaç etki mekanizmalarından bağımsız olarak additif, sinerjizm ve/veya antagonistik etkileşimi tanımlamalıdır. Aynı deneysel verinin farklı modeller ile analizi sonucunda farklı sonuçlar ve çıkarımlar ile karşılaşılabilir. İdeal analiz modeli, ilaçların etki mekanizmalarından bağımsız olmalıdır [46]. Ayrıca, ilaç kombinasyonlarının analizi için ideal metot, nadir ve özel durumları kapsayacak kadar genel olmalı, karşıt sezgisel sonuçlar ile sonuçlanmamalı, veri elde etmek için pratik ve etik konulara uygun ve bilimsel olarak kabul edilebilir olmalıdır. Ancak, ilaç kombinasyonlarının analizi için bütün bu nitelikleri karşılayan ideal bir model yoktur [47]. Loewe additif etki modeline dayanan doz-etki temelli yaklaşımlar, ilaç kombinasyonlarının analizi için uygundur. Fakat, bu yöntemler önemli miktarda deneysel veri gerektirir. Bu durum, verilerin elde edilmesinin pahalı ve/veya zor olduğu durumlarda çalışmayı sınırlayabilir. Yanıt-katkı yaklaşımı, HSA modeli ve Bliss yöntemi, en az üç ve/veya dört deneysel veriye ihtiyaç duyduğu için pratik sınırlamalara daha fazla uyumludur. Ancak, bu analiz yöntemleri çeşitli sınırlamalara ve bazı dezavantajlara rağmen bireysel ilaç uygulamasına kıyasla üstün pozitif bir kombinasyon etkisine dair yeterli kanıtlar sağlayabilir [10].

Dikkat edilmesi gereken üçüncü husus, ilaç kombinasyonlarının analizi için araştırma ve geliştirme süreçlerinin her aşamasına uygulanabilir yöntemlerin seçilmesi gerektiğidir. İlaçların kombinasyon etkileri farklı dozlarda uygulama yapılarak genellikle *in vitro* modeller kullanılarak araştırılır. Ancak *in vitro* ortamlarda ilaç dozu sabittir. Hücre dizileri ile yapılan *in vitro* deneyler, hastalıkların moleküler mekanizmalarını araştırmak için önemli kaynaktır. Hücre kültürü sistemleri, avantajlıdır. Örnek olarak; çeşitli insan hücre dizilerinin kullanılabilmesi, kültür koşullarının esnekliği ve protein/nükleik asit miktar tayininin kolaylığı verilebilir [9]. Fakat, her bir ilaç için doz belirleme deneylerinin, ilacın IC<sub>50</sub> değerinden büyük ve küçük dozları kapsayacak şekilde yapılması önerilmektedir [11,31]. HSA yaklaşımı, Bliss metodu ve Loewe additif etki modeli, çeşitli araştırmalar için faydalı olabilir. Ancak, ilaçların, doz-etki eğrileri ayrıntılı olarak incelenmelidir. İlaç kombinasyonlarının analizi için, CI değeri ve izobologram eğrisi ile Loewe additif etki modeline dayanan doz-etki yaklaşımları uygun yöntemlerdir. Potansiyalizasyon veya koalizm gibi etkileşimlerde tüm ilaçlar için doz-etki eğrilerinin mevcut olmadığı kombinasyonlarda, HSA yaklaşımı kullanılabilir.

Preklinik ilaç kombinasyon çalışmaları, her ilacın maksimum tolere edilebilen dozlarında birlikte uygulanarak en yüksek etkinliğin elde edilebileceği varsayımına dayanan kombinasyon kemoterapi protokollerinin rasyonel tasarımına imkan sağlar [9]. Dolayısıyla preklinik kombinasyon çalışmalarının tasarımı yapılırken, ilaç konsantrasyonu, uygulama süresi, yöntemi ve ilaç kombinasyonlarını analiz etmek için kullanılan matematiksel ve istatistiksel metot gibi çeşitli faktörler dikkate alınmalıdır. Klinik çalışmalarda, ilaç kombinasyonlarının analizi kolay değildir. Bu aşamada, pratik ve etik kısıtlamalar söz konusudur ve sinerjistik ilaç etkileşimini bilimsel olarak belirlemek için yeterli veri elde etmek neredeyse imkansızdır [11,31]. Bu sebeplerle, resmi kuruluşlar tarafından kombinasyon ilaç tedavi modalitelerinin geliştirilmesi için gereken kriterler açıkça belirlenmiştir [48,49]. *In vitro* deneylerden elde edilen sonuçların hayvanlara, *in vivo* çalışmalardan elde edilen verilerin insan klinik denemelerine ekstrapolasyonu önemlidir [11,31]. Klinikte kombinasyon tedavi geliştirme çalışmaları, kombinasyon etkisinin aynı dozda tek başına verilen ilaçların herhangi birinden daha yüksek etkinliğe ve/veya iyi güvenlik profiline sahip olduğunu kanıtlamalıdır [9-11,31]. Her aşama için gerekli veri miktarı, türleri ve uygun çalışma tasarımları, kombinasyonun yapısı, hastalık ve önceki aşamalardan elde edilen bilgilere göre değişmektedir. Dört-kollu klinik çalışma (plasebo veya standart bakım, ilaç A, ilaç B ve kombinasyon) yapılmalıdır [49]. Her ilacın kombinasyon etkisine katkısı önceki aşamalarda gösterilmiş ise, plasebo ve/veya sub-optimal doz terapisinin etik olmadığı durumlarda deneysel tasarım basitleştirilebilir [10].

Dikkat edilmesi gereken dördüncü husus, optimum doz oranının belirlenmesidir. Doz oranı, ilaç kombinasyonlarının analizinde kritik öneme sahiptir [50]. Çoğu durumda, kombinasyon tedavisi monoterapiden daha üstün ve yararlı etkiler sağlayabilir [1]. Ancak, bu üstünlük sadece ilacın özelliğinden dolayı olmayabilir. Bu üstün etki, aynı zamanda doz oranına da bağlı olabilir. Dolayısıyla, iki ilacın belirli bir oranda kombinasyonunu doz-etki eğrisi olan üçüncü bir ajan olarak düşünmek akılcı bir yaklaşım olacaktır. İlaç kombinasyonunun sinerjistik etkileşim gösterip göstermediğini araştırmak yerine, hangi doz oranının sinerjistik etkileşimi optimize ettiğini incelemek çok daha faydalı olabilir

[51]. Doz oranı, klinik denemelerden önce prelinik çalışmalarda belirlenmesi gerekir. Dolayısıyla, ilaç kombinasyon çalışmaları için deney tasarımı iyi planlanmalıdır. İlaçların seçilen dozlarının tüm kombinasyonlarını inceleyen tam-faktörlü tasarım (Şekil 2A) veya belirli bir sabit orana dayalı çoklu-oran tasarımı (Şekil 2B) tercih edilebilir. Farklı doz oranları, eğri-kayması analizi uygulanarak ilgili doz-etki eğrilerinin ortalaması ile karşılaştırılabilir.



Şekil 2. İlaç kombinasyon çalışmalarının tasarımı. Çoklu oran tasarımı (A), tam faktörlü tasarım (B)

Dikkat edilmesi gereken beşinci husus, ilaç kombinasyon çalışmalarında deneysel verilerin analizi için uygun metodolojilerin kullanılması gerektiğidir. Biyolojik deneysel modeller, her zaman hata barındırırlar ve sınır verileri kullanmak neredeyse imkansızdır [52]. Örneğin; 0.98 olan CI değeri rapor edilirken güven aralığı (% 95) dikkate alınmalıdır. Eğer istatistiksel analiz sonucunda elde edilen güven aralığı; 0.95-0.99 ise, kombinasyonun CI değerinin 1'den farklı olduğu çıkarımı yapılabilir. % 95 güven aralığı 0.85-1.05 ise, ilaç kombinasyon etkisi additif etkiden sapan herhangi bir etki olarak kabul edilemez [53]. HSA modeli ve yanıt-katkı yaklaşımı, önemin ölçülmesine ve kombinasyon etkisinin ilaçların bireysel maksimum etkilerine karşı istatistiksel olarak analiz edilmesine dayanır. Bliss modeli ve Loewe additif etki yaklaşımı ile hesaplanan CI değerleri, kesinliğin derecesine ilişkin değerlendirme yapılmadan rapor edilir. Dolayısıyla, bu yaklaşımlarda doğrudan istatistiksel çıkarım sağlayan bilimsel bir temel mevcut değildir. Bu teknik problem, az sayıda çalışmada ele almıştır ve kolay uygulanabilecek bir çözüm bulunmamaktadır [54-57,22].

Şunu belirtmekte fayda vardır ki, ilaç kombinasyonlarının analizi için kullanılan matematiksel ve istatistiksel metotlar karmaşıktır ve gelişmeye açık yöntemlerdir. İlaç kombinasyonu araştırma ve geliştirme süreci çoğu zaman hatalı tasarımlara ve analizlere yol açar. İstatistik uzmanlarının ilaç araştırma ve geliştirme süreçlerinin tüm aşamalarında yer alması faydalı olacaktır. Yöntemlerin çoğuna uyumlu standart yazılım ve/veya veri bankalarının geliştirilmesi, sonuçların iyileştirilmesi ve tekrarlanabilirliğin artırılması bakımından önemlidir. İlaç kombinasyonlarının analizinde özel bir yaklaşıma odaklanan örnekler mevcuttur. MixLow R paket programı, Loewe additif etki modelini önerir [58]. Çok sayıda çalışmada SAS [59] veya R kodlarının [60,61] kullanılmasından bahsedilmektedir. Ancak bu yöntemlerin nasıl uygulandığı ile ilgili literatürde bir bilgi bulunmamaktadır.

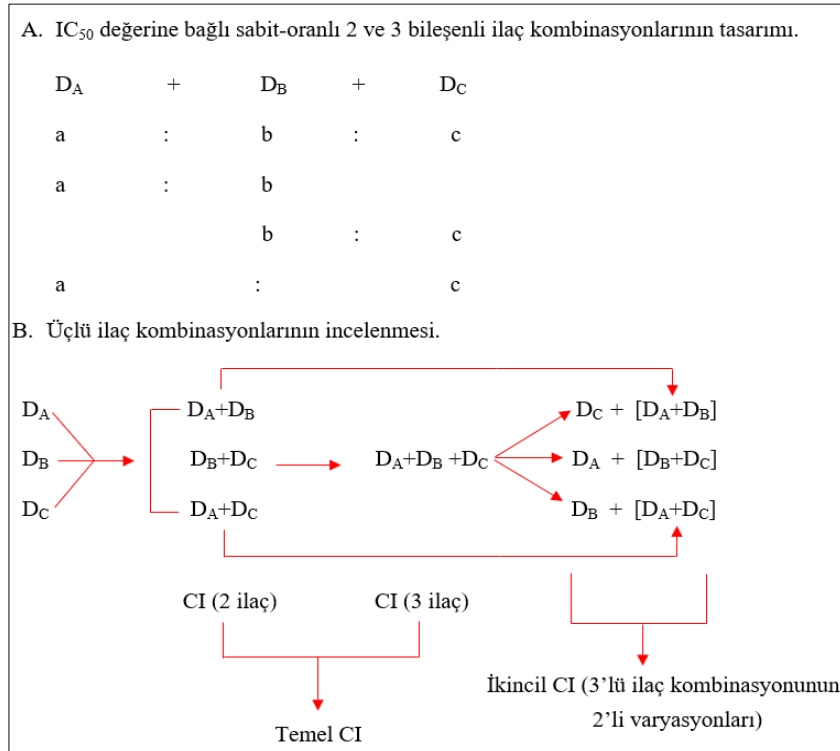
Dikkat edilmesi gereken altıncı ve son husus ise, en az üç-bileşenli ilaç kombinasyonlarının analizidir. İlaç kombinasyonlarının analizi yapılırken genellikle iki-bileşenli ilaç kombinasyonları kullanılır. Hastalıkların tedavisi için üç-bileşenli ilaç kombinasyonları da literatürde rapor edilmiştir [62]. İlaç kombinasyonlarının analizi için geliştirilen yöntemlerin çoğu, n sayıda ilacın kombinasyonlarının analizi için genişletilebilir (Şekil 3). İkili-ilaç kombinasyonlarının analizi için geliştirilmiş olan HSA yaklaşımı, Bliss yöntemi, Loewe additif etki modeli ve Chou-Talalay'ın medyan-etki denklemi üç veya daha fazla bileşenli kombinasyonların analizi için kullanılabilir. Ancak, önceki

bölümde belirtilen HSA modelinin dezavantajlarından dolayı, en az üç bileşenli ilaç kombinasyonları için deneysel tasarım ve analiz için Bliss modeli ve Chou-Talalay metodu tercih edilmelidir.

<p><b>Bliss İstatistiksel Bağımsızlık modeli:</b></p> $CI = \frac{E_A + E_B + \dots + E_N - E_A E_B - E_A E_N - E_B E_N - \dots - E_A E_B \dots \dots E_N}{E_{ABC \dots \dots N}}$	<p><b>Chou-Talalay metodu:</b></p> $CI = \sum_{j=1}^n \frac{(D)_j}{(D_x)_j}$
<p><b>En Yüksek Tek Ajan (HSA) modeli:</b></p> $CI = \frac{\text{maksimum}(E_A, E_B, E_C; \dots; E_N)}{E_{ABC \dots \dots N}}$	<p><b>Loewe Additif Etki modeli:</b></p> $CI = \frac{a}{A} + \frac{b}{B} + \frac{c}{C} + \dots + \frac{n}{N}$

Şekil 3. n bileşenli ilaç kombinasyonlarının analizi için kullanılan matematiksel formüller

İlaç kombinasyonu üç bileşenden meydana geldiğinde, CI=1 denklemi A, B ve C ilaçlarının dozlarından geçen üçlü-koordinat eksenine karşılık gelir. Bu durum, ikili ilaç kombinasyonunda additif etki çizgisi ile gösterilir. Sinerjistik etkileşim gösteren üç ilacın (A, B ve C) kombinasyon etkisi, A ve B arasındaki sinerjistik etkileşimden kaynaklanabilir. Her ilacın kombinasyon etkisine katkısının tam olarak belirlenmesi için, tüm alt kombinasyonların da aynı deneysel koşullardaki etkilerinin değerlendirilmesi gereklidir [31]. Dr. Chou, üçlü-ilaç kombinasyonu ( $D_A$ ,  $D_B$  ve  $D_C$ ) için,  $IC_{50}$  oranlarının (a:b:c) kullanılmasını önermiştir [11].  $D_A+D_B+D_C$ , (a:b:c) oranını ifade eder (Şekil 4). Aynı deneysel ortamda ilaçların iki-bileşenli kombinasyon etkilerinin ( $D_A+D_B$  (a:b),  $D_B+D_C$  (b:c) ve  $D_A+D_C$  (a:c)) de incelenmesi gereklidir.



Şekil 4. Chou-talalay yaklaşımı ile üçlü ilaç kombinasyonlarının analizi [11]

Yaklaşım, üç-bileşenli ilaç kombinasyonunun iki-bileşenli ilaç kombinasyonları halinde analiz edilmesini sağlar. Bu yaklaşım temelinde, CI değerleri ve ikincil CI değeri belirlenebilir. Deney tasarımı, aynı deneysel şartlarda bireysel ilaçlar ( $D_A$ ,  $D_B$  ve  $D_C$ ),  $D_A+D_B$ ,  $D_B+D_C$ ,  $D_A+D_C$  iki-bileşenli ilaç kombinasyonları ve üç-bileşenli ilaç kombinasyonu ( $D_A$ ,  $D_B$  ve  $D_C$ ) için doz-etki eğrileri elde edilecek şekilde yapılmalıdır [31]. Üç-bileşenli ilaç kombinasyonlarının iki-bileşenli ilaç kombinasyonları halinde (örneğin,  $D_A+D_B$ , orta sinerjistik,  $D_B+D_C$  antagonistik,  $D_A+D_C$  güçlü sinerjistik ve  $D_A+D_B+D_C$  sinerjistik olabilir) analizi, ilaçların farmakolojik etkileşimleri hakkında önemli bilgi sağlayabilir.

## SONUÇ VE TARTIŞMA

İlaçların kombinasyon etkileri uzun yıllardır incelenmiş ve analiz edilmiştir. Kombinasyon tedavisinin avantajları yaygın olarak bilinmektedir ve bu alandaki çalışmalar, çeşitli hastalıkların fizyolojisi ve biyolojisinin anlaşılması ile önemli ölçüde artmıştır. Tıp, farmakoloji, matematik ve epidemiyoloji gibi birçok farklı disiplinden bilim insanları bir araya gelmiş ve bu alandaki araştırmalar sonucunda, biyolojik ve medikal bilimlerde çok sayıda teorik ve deneysel makale yayınlanmıştır. Bu çalışmada, ilaç kombinasyon etkilerinin, özellikle de sinerjizmin belirlenmesi için mevcut istatistiksel ve matematiksel yöntemler derlenmiştir. Bliss modeli, Loewe additif etki yaklaşımı ve Chou-Talalay'ın medyan-etki denklemi de dahil olmak üzere, ilaç kombinasyonlarının analizi için yaygın kullanılan ve çok sayıda atıf almış referans yöntemler sunulmuş ve ilişkili avantajları ve dezavantajları irdelenmiştir. Takibinde, ilaç sinerjizmini ölçmek için kullanılan güncel metodlar tanıtılmıştır. Son olarak ise, ilaç kombinasyonlarının analizinde dikkat edilmesi gereken hususlar açıklanmıştır.

İlaç keşfindeki yüksek ölçekli tarama teknolojileri ve hesaplama kapasitesindeki önemli gelişmeler sayesinde, veri eldesi ve analiz yöntemlerinde önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. Ancak, temel metodolojik sorunlar önemli ölçüde aynı kalmıştır. Bilgi yoksunluğundan kaynaklı olarak, literatürün önemli kısmı terminoloji ve yöntemlerin yanlış anlaşılmasına yol açmaktadır. Gelecekte yapılması planlanan çalışmalarda, kombinasyon etkilerinin bilimsel ve doğru analizi için burada tartışılmış olan kavramların ve yöntemlerin daha uygun ve titiz bir şekilde uygulanması gerektiğini düşünüyoruz.

Bazı kısıtlamalarına rağmen Chou-Talalay metodu en çok atıf almış yöntemdir ve güncel olarak geniş çapta uygulama alanına sahiptir. Chou-Talalay metodundan sonra, sıklıkla tercih edilen yöntem ise Bliss modelidir. Bliss modelinin güncel olarak kullanılmasının yanı sıra, modelin modifiye versiyonları geliştirilmiş ve ilaç kombinasyonlarının analizinde kullanılmıştır [22]. Her iki metod kullanılarak n-ilaç kombinasyonları rahatlıkla tasarlanabilir ve analiz edilebilir. Dolayısıyla, ilaç kombinasyon çalışmaları ve deneysel verilerin analizi için CDI ve HSA gibi günümüzde geçerliliği olmayan ilkel yöntemler yerine Bliss modeli, Chou-Talalay metodu, ZIP modeli tercih edilmelidir. ZIP modeli kullanılarak elde edilen delta skorları, ilaç etkileşim aralığının görselleştirilmesi ve belirli doz bölgelerinde klinik-eşdeğer ilaç sinerjizminin tanımlanmasında önemli rol oynayabilir [37]. Ayrıca, CI-temelli yöntemlerin oldukça değişken ve öngörülemeyen sonuçlara yol açabileceğini düşünenecek olursak, BRAID yanıt-yüzey modeli önemli bir alternatif olabilir.

Çeşitli bilgisayar yazılımlarının kullanılması, kombinasyonların analizini şüphesiz kolaylaştırır. Ancak, CompuSyn programı yalnızca Windows işletim sisteminde çalışmaktadır. Program tek seferde yalnızca bir ilaç kombinasyonu için doz-etki değerlerinin sisteme girilmesine izin verir. İlaç kombinasyonlarının analizinde CompuSyn yazılımına ek olarak, yakın zamanda geliştirilen ve güncel olarak kullanılan CombeneFit [63] ve SynergyFinder [64] yazılımlarıdır. CombeneFit, Loewe, HSA ve Bliss modellerinin kullanılarak analiz yapılmasını sağlar. CompuSyn ve CombeneFit ücretsizdir, kullanımı kolaydır. Windows işletim sisteminde kullanılabilir ve deneysel verilerin grafiklerle gösterimine de olanak sağlarlar. Synerfinder 2.0 uygulaması da Loewe, HSA, Bliss ve ZIP modellerini sunar ve CI değerinin hesaplanması için farklı modeller arasında seçim yapılmasına imkan tanır. Ancak, farklı doz-etki eğrileri modeller arasında seçim yapılmasına izin vermez. Uygulama, R kod temelli paket programdır ve ücretsizdir. Ancak R kodlarının kullanımı karmaşıktır. SiCoDEA, kombinasyon verilerini analiz etmek ve seçilen modele göre farklı sonuçlar sunmak için kullanım kolaylığı olan bir araçtır. CompuSyn veya SynergyFinder 2.0 yazılımlarına alternatiftir.

İlaçların kombinasyon olarak uygulanmasındaki en önemli amaçlardan biri, terapötik etki korunurken veya sinerjistik etkileşimler ile artırılırken aynı zamanda doz ile ilişkili yan etkilerin de azaltılmasıdır. Dolayısıyla ilaç kombinasyon çalışmalarında uygulama dozu ve/veya doz aralığı belirlenirken bu durum dikkate alınmalıdır. Bu sebeple yan etkisi az, minimum çapraz dirence sahip moleküllerin kombinasyon çalışmalarında değerlendirilmesinin klinik uygulamalar ve terapötik modalitelerin geliştirilmesi bakımından hayati öneme sahip bir strateji olduğunu düşünüyoruz. İlaç kombinasyon çalışmalarında deneysel tasarım için ilaçların IC<sub>50</sub> dozları ve katları kullanılarak doz-bağımlı ilaç etkileri incelenebilir. İlaç kombinasyonları düşük dozlarda (IC<sub>50</sub>/16 veya IC<sub>50</sub>/8 gibi) kuvvetli sinerjistik, yüksek dozlarda (2IC<sub>50</sub> veya 4IC<sub>50</sub> gibi) additif hatta antagonistik etkileşimler gösterebilir [21]. Dolayısıyla, ilaç kombinasyonlarında uygulama dozu ve/veya doz aralıkları belirlenirken bu durum da göz önünde bulundurulmalıdır. Ek olarak, sabit-oranlı tasarım ve ray-tasarımı da ilaç kombinasyon çalışmalarında deney tasarımı yapılırken kullanılmalıdır [65]. Tüm deneysel koşullara uygun ideal bir referans analiz metodu olmadığı için, bu çalışmada sunulan farklı yaklaşımların birlikte kullanılması ile ilaç kombinasyonlarının analizinin kolaylaşacağını düşünüyoruz. Günümüze kadar yapılmış olan çalışmaların, klinik olarak etkili ilaç kombinasyon tedavilerinin belirlenmesi, geliştirilmesi ve optimizasyonu süreçleri için umut verici bir temel sağladığına inanıyoruz. Bu çalışmanın, süreçteki önemli hususlar için bir referans görevi göreceğini umut ediyoruz.

## YAZAR KATKILARI

Kavram: B.O.Ö.; Tasarım: B.O.Ö.; Denetim: B.O.Ö.; Kaynaklar: B.O.Ö.; Malzemeler: B.O.Ö.; Veri Toplama ve/veya İşleme: B.O.Ö.; Analiz ve/veya Yorumlama: B.O.Ö.; Literatür Taraması: B.O.Ö.; Makalenin Yazılması: B.O.Ö.; Kritik İnceleme: B.O.Ö.; Diğer: B.O.Ö.

## ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

Yazar bu makale için gerçek, potansiyel veya algılanan çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

## KAYNAKLAR

1. Mokhtari, R.B., Homayouni, T.S., Baluch, N., Morgatskaya, E., Kumar, S., Das, B., Yeger, H. (2017). Combination therapy in combating cancer. *Oncotarget*, 8(23), 38022-38043. [CrossRef]
2. Frei, E., Holland, J.F., Schneiderman, M.A., Pinkel, D., Selkirk, G., Freireich, E.J., Silver, R.T., Gold, G.L., Regelson, W. (1958). A comparative study of two regimens of combination chemotherapy in acute leukemia. *Blood*, 13(12), 1126-1148. [CrossRef]
3. Xie, Y.H., Chen, Y.X., Fang, J.Y. (2020). Comprehensive review of targeted therapy for colorectal cancer. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5(1), 1-30. [CrossRef]
4. Lawrence, M.S., Stojanov, P., Mermel, C.H., Robinson, J.T., Garraway, L.A., Golub, T.R., Meyerson, M., Gabriel, S.B., Lander, E.S., Getz, G. (2014). Discovery and saturation analysis of cancer genes across 21 tumour types. *Nature*, 505(7484), 495-501. [CrossRef]
5. Lazikani, B.A., Banerji, U., Workman, P. (2012). Combinatorial drug therapy for cancer in the post-genomic era. *Nature Biotechnology*, 30(7), 679-692. [CrossRef]
6. Sun, X., Vilar, S., Tatonetti, N.P. (2013). High-throughput methods for combinatorial drug discovery. *Science Translational Medicine*, 5(205), 205rv1-205rv1. [CrossRef]
7. Gibbs, B.K., Sourbier, C. (2018). Detecting the potential pharmacological synergy of drug combination by viability assays *in vitro*, Chaperones. 129-137. [CrossRef]
8. Niu, J., Straubinger, R.M., Mager, D.E. (2019). Pharmacodynamic drug–drug Interactions. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 105(6), 1395-1406. [CrossRef]
9. Pinto, A.C., Moreira, J.N., Simões, S. (2011). Combination chemotherapy in cancer: Principles, evaluation and drug delivery strategies, in *Current Cancer Treatment-Novel Beyond Conventional Approaches*, IntechOpen, 693-714. [CrossRef]
10. Fouquier, J., Guedj, M. (2015). Analysis of drug combinations: current methodological landscape. *Pharmacology Research & Perspectives*, 3(3), e00149. [CrossRef]
11. Chou, T.C. (2006). Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacological Reviews*, 58(3), 621-681. [CrossRef]
12. Pemovska, T., Bigenzahn, J.W., Furga, G.S. (2018). Recent advances in combinatorial drug screening and synergy scoring. *Current Opinion in Pharmacology*, 42, 102-110. [CrossRef]

13. Roell, K.R., Reif, D.M., Reif, A.A.M. (2017). An introduction to terminology and methodology of chemical synergy-perspectives from across disciplines. *Frontiers in Pharmacology*, 8, 158. [\[CrossRef\]](#)
14. Duarte, D., Vale, N. (2022). Evaluation of synergism in drug combinations and reference models for future orientations in oncology. *Current Research in Pharmacology and Drug Discovery*, 100110. [\[CrossRef\]](#)
15. Nieuwenhuis, S., Forstmann, B.U., Wagenmakers, E.J. (2011). Erroneous analyses of interactions in neuroscience: a problem of significance. *Nature Neuroscience*, 14(9), 1105-1107. [\[CrossRef\]](#)
16. Lehár, J., Zimmermann, G.R., Krueger, A.S., Molnar, R.A., Ledell, J.T., Heilbut, A.M., Short, G.F., Giusti, L.C., Nolan, G.P., Magid, O.A. (2007). Chemical combination effects predict connectivity in biological systems. *Molecular Systems Biology*, 3(1), 80. [\[CrossRef\]](#)
17. Vlot, A.H., Aniceto, N., Menden, M.P., Merzenich, G.U., Bender, A. (2019). Applying synergy metrics to combination screening data: agreements, disagreements and pitfalls. *Drug Discovery Today*, 24(12), 2286-2298. [\[CrossRef\]](#)
18. Slinker, B.K. (1998). The statistics of synergism. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 30(4), 723-731. [\[CrossRef\]](#)
19. Caudle, R.M., Williams, G.M. (1993). The misuse of analysis of variance to detect synergy in combination drug studies. *Pain*, 55(3), 313-317. [\[CrossRef\]](#)
20. Goldoni, M., Johansson, C. (2007). A mathematical approach to study combined effects of toxicants in vitro: evaluation of the Bliss independence criterion and the Loewe additivity model. *Toxicology in Vitro*, 21(5), 759-769. [\[CrossRef\]](#)
21. Özer, B.O. (2021). Ph.D. Thesis. Development of new nanotherapeutic modalities for the treatment of colon cancer. Department of Biotechnology and Genetics, Institute of Natural Sciences, Trakya University, Edirne, Turkey.
22. Zhao, W., Sachsenmeier, K., Zhang, L., Sult, E., Hollingsworth, R.E., Yang, H. (2014). A new bliss independence model to analyze drug combination data. *Journal of Biomolecular Screening*, 19(5), 817-821. [\[CrossRef\]](#)
23. Gessner, P.K. (1974). The isobolographic method applied to drug interactions. *Drug interactions*, (pp.349-362). New York, NY: Raven Press.
24. Gessner, P.K. (1988). A straightforward method for the study of drug interactions: an isobolographic analysis primer. *Journal of the American College of Toxicology*, 7(7), 987-1012. [\[CrossRef\]](#)
25. Frei, W. (1913). Versuche über kombination von desinfektionsmitteln. *Medical Microbiology and Immunology*, 75(1), 433-496. [\[CrossRef\]](#)
26. Tallarida, R.J. (2012). Revisiting the isobole and related quantitative methods for assessing drug synergism. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 342(1), 2-8. [\[CrossRef\]](#)
27. Berenbaum, M.C. (1977). Synergy, additivism and antagonism in immunosuppression-critical review. *Clinical & Experimental Immunology*, 28(1), 1-18.
28. Chou, T.-C., Talalay, P. (1984). Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Advances in Enzyme Regulation*, 22, 27-55. [\[CrossRef\]](#)
29. Greco, W.R., Bravo, G., Parsons, J.C. (1995). The search for synergy: a critical review from a response surface perspective. *Pharmacological Reviews*, 47(2), 331-385.
30. Grabovsky, Y., Tallarida, R.J. (2004). Isobolographic analysis for combinations of a full and partial agonist: curved isoboles. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 310(3), 981-986. [\[CrossRef\]](#)
31. Chou, T.-C. (2008). Preclinical versus clinical drug combination studies. *Leukemia & Lymphoma*, 49(11), 2059-2080. [\[CrossRef\]](#)
32. Chou, T.-C. (2011). The mass-action law based algorithms for quantitative econo-green bio-research. *Integrative Biology*, 3(5), 548-559. [\[CrossRef\]](#)
33. Bijnsdorp, I.V., Giovannetti, E., Peters, G.J. (2011) Analysis of drug interactions, in *Cancer Cell Culture*, Springer: Humana Press. 421-434. [\[CrossRef\]](#)
34. Chou, T.-C., Shapiro, T.A., Fu, J., Chou, J.H., Merzenich, G.S.U. (2019). Computerized quantification of drugs synergism in animal studies or in clinical trials using only ten data points. *Synergy*, 9, 100049. [\[CrossRef\]](#)
35. Ashton, J.C. (2015). Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method-Letter. *Cancer Research*, 75(11), 2400-2400. [\[CrossRef\]](#)
36. Xu, S.P., Sun, G.P., Shen, Y.X., Peng, W.R., Wang, H., Wei, W. (2007). Synergistic effect of combining paeonol and cisplatin on apoptotic induction of human hepatoma cell lines I. *Acta Pharmacologica Sinica*, 28(6), 869-878. [\[CrossRef\]](#)
37. Yadav, B., Wennerberg, K., Aittokallio, T., Tang, J. (2015). Searching for drug synergy in complex dose-response landscapes using an interaction potency model. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 13, 504-513. [\[CrossRef\]](#)



38. Twarog, N.R., Martinez, N.E., Gartrell, J., Xie, J., Tinkle, C.L., Shelat, A.A. (2021). Using response surface models to analyze drug combinations. *Drug Discovery Today*, 26(8), 2014-2024. [\[CrossRef\]](#)
39. Twarog, N.R., Stewart, E., Hammill, C.V., Shelat, A.A. (2016). BRAID: a unifying paradigm for the analysis of combined drug action. *Scientific Reports*, 6(1), 1-15. [\[CrossRef\]](#)
40. Spinozzi, G., Tini, V., Ferrari, A., Gionfriddo, I., Ranieri, R., Milano, F., Pierangeli, S., Donnini, S., Mezzasoma, F., Silvestri, S. (2022). SiCoDEA: a simple, fast and complete app for analyzing the effect of individual drugs and their combinations. *Biomolecules*, 12(7), 904. [\[CrossRef\]](#)
41. Du, D., Chang, C.H., Wang, Y., Tong, P., Chan, W.K., Chiu, Y., Peng, B., Tan, L., Weinstein, J.N., Lorenzi, P.L. (2019). Response envelope analysis for quantitative evaluation of drug combinations. *Bioinformatics*, 35(19), 3761-3770. [\[CrossRef\]](#)
42. Doern, C.D. (2014). When does 2 plus 2 equal 5? A review of antimicrobial synergy testing. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(12), 4124-4128. [\[CrossRef\]](#)
43. Berthoud, H.R. (2013). Synergy: a concept in search of a definition. *Endocrinology*, 154(11), 3974-3977. [\[CrossRef\]](#)
44. Ocana, A., Amir, E., Yeung, C., Seruga, B., Tannock, I. (2012). How valid are claims for synergy in published clinical studies? *Annals of Oncology*, 23(8), 2161-2166. [\[CrossRef\]](#)
45. Steel, G.G., Peckham, M.J. (1979). Exploitable mechanisms in combined radiotherapy-chemotherapy: The concept of additivity. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 5(1), 85-91. [\[CrossRef\]](#)
46. Jia, J., Zhu, F., Ma, X., Cao, Z.W., Li, Y.X., Chen, Y.Z. (2009). Mechanisms of drug combinations: interaction and network perspectives. *Nature Reviews Drug Discovery*, 8(2), 111-128. [\[CrossRef\]](#)
47. Box, G.E., Draper, N.R. (1987). Empirical model-building and response surfaces. *Wiley Series in Probability & Statistics*, John Wiley & Sons, New York, p.424.
48. Podolsky, S.H., Greene, J.A. (2011). Combination drugs-hype, harm, and hope. *New England Journal of Medicine*, 365(6), 488-491. [\[CrossRef\]](#)
49. Woodcock, J., Griffin, J.P., Behrman, R.E. (2011). Development of novel combination therapies. *New England Journal of Medicine*, 364(11), 985-987. [\[CrossRef\]](#)
50. Tallarida, R.J., Raffa, R.B. (1995). Testing for synergism over a range of fixed ratio drug combinations: replacing the isobologram. *Life Sciences*, 58(2), 23-28. [\[CrossRef\]](#)
51. Keith, C.T., Borisy, A.A., Stockwell, B.R. (2005). Multicomponent therapeutics for networked systems. *Nature Reviews Drug discovery*, 4(1), 71-78. [\[CrossRef\]](#)
52. Breiting, H.G. (2012) Drug synergy-mechanisms and methods of analysis, in *Toxicity and Drug Testing*, W. Acree, Editor, IntechOpen: Toxicity and Drug Testing, 143-166. [\[CrossRef\]](#)
53. Lee, J.J., Kong, M. (2011). Rebuttal to the Response of Chou. *Cancer Research*, 71(7), 2798-2800.
54. Belenkii, M.S., Schinazi, R.F. (1994). Multiple drug effect analysis with confidence interval. *Antiviral Research*, 25(1), 1-11. [\[CrossRef\]](#)
55. Carter Jr, W.H., Gennings, C., Staniswalis, J.G., Campbell, E.D., White Jr, K.L. (1988). A statistical approach to the construction and analysis of isobolograms. *Journal of the American College of Toxicology*, 7(7), 963-973. [\[CrossRef\]](#)
56. Gennings, C., Carter, W., Campbell, E., Staniswalis, J., Martin, T., Martin, B., White, K. (1990). Isobolographic characterization of drug interactions incorporating biological variability. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 252(1), 208-217.
57. Tallarida, R.J. (2001). Drug synergism: Its detection and applications. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 298(3), 865-872.
58. Boik, J.C., Narasimhan, B. (2010). An R package for assessing drug synergism/antagonism. *Journal of Statistical Software*, 34(6), 1-18. [\[CrossRef\]](#)
59. Pan, X.Z., Qiu, Z.D., Baron, P.A., Gold, J.W., Polsky, B., Chou, T.C., Armstrong, D. (1992). Three-drug synergistic inhibition of HIV-1 replication in vitro by 3'-fluoro-3'-deoxythymidine, recombinant soluble CD4, and recombinant interferon-alpha. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 8(5), 589-595. [\[CrossRef\]](#)
60. Whitehead, A., Su, T.L., Thygesen, H., Sperrin, M., Harbron, C. (2013). Investigation of the robustness of two models for assessing synergy in pre-clinical drug combination studies. *Pharmaceutical Statistics*, 12(5), 300-308. [\[CrossRef\]](#)
61. Zhao, L., Au, J.L.S., Wientjes, M.G. (2010). Comparison of methods for evaluating drug-drug interaction. *Frontiers in Bioscience*, 2, 241-249. [\[CrossRef\]](#)
62. Nikanjam, M., Liu, S., Yang, J., Kurzrock, R. (2017). Dosing three-drug combinations that include targeted anti-cancer agents: analysis of 37,763 patients. *The Oncologist*, 22(5), 576-584. [\[CrossRef\]](#)

63. Di Veroli, G.Y., Fornari, C., Wang, D., Mollard, S., Bramhall, J.L., Richards, F.M., Jodrell, D.I. (2016). Combenefit: an interactive platform for the analysis and visualization of drug combinations. *Bioinformatics*, 32(18), 2866-2868. [\[CrossRef\]](#)
64. Ianevski, A., Giri, A.K., Aittokallio, T. (2020). SynergyFinder 2.0: visual analytics of multi-drug combination synergies. *Nucleic Acids Research*, 48(W1), 488-493. [\[CrossRef\]](#)
65. Straetemans, R., O'Brien, T., Wouters, L., Van Dun, J., Janicot, M., Bijmens, L., Burzykowski, T., Aerts, M. (2005). Design and analysis of drug combination experiments. *Biometrical Journal*, 47(3), 299-308. [\[CrossRef\]](#)