



## Chou-Talalay Metodu ile İlaç Kombinasyonlarının Analizi: Prensipler, Deneysel Tasarım Stratejileri ve Bilgisayar Yazılımıyla Analiz

Analysis of Drug Combinations with Chou-Talalay Method: Principles, Experimental Design Strategies, and Analysis with Computer Software

Bayram Oğuz Özer<sup>\*</sup>

Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Edirne, Türkiye

### Öz

Şu ana kadar, ilaç kombinasyonlarının analizi için çok sayıda çeşitli yöntem geliştirilmiştir. Bu metodlar arasında “Chou-Talalay’ın kombinasyon indeksi teorisi” artan bir popülerlik kazanmış ve yaygın kabul görmüştür. Chou-Talalay yöntemi, kütle-eylem yasasının medyan-etki prensibinden türetilen kombinasyon etkisi denklemine dayanır. Yöntem ilaç etkileşimlerinin nicel analizi ve ilaç kombinasyonlarının simülasyonu için bilgisayar yazılım algoritması sağlar. Her bir ilacın ve kombinasyonlarının doz-etki eğrisinin potensini ve şeklini dikkate alır. CompuSyn yazılımı ile bilgisayar simülasyonu, in vitro veya in vivo çalışmalar için doz-etki eğrisini, medyan-etki grafiğini, kombinasyon indeksi grafiğini, izoblogramı, doz-azaltma indeksi grafiğini ve poligonogramı gösterir.

Bu derlemede, ilaç kombinasyon çalışmaları için teorik ve pratik bir kılavuz sağlanması ve kütle-eylem yasası temelli teori, deneysel tasarımı ve veri analizinin açıklanması amaçlanmıştır. Chou-Talalay’ın medyan-etki denklemi, ilaç kombinasyonlarının nicel analizi için kullanışlı ve pratik bir yöntemdir. Medyan-etki eşitliği in vitro, in vivo ve klinikte az sayıda deneysel veri kullanılmasına imkan verir. Medyan-etki denkleminin algoritmaları, küçük-ölçekli deneyler için daha az deneysel veri gereksinimi ve ilaç kombinasyonlarının analizine yönelik kantitatif çıkarımlar sağladığı için verimli, düşük maliyetli çalışma, ilaç keşfi ve klinik araştırmalarda etik planlamaya olanak sağlar. Yöntem, ilaç kombinasyonlarının analizinde en yaygın kullanılan metodtur ve çok sayıda atıf almıştır. Bu çalışmanın ilaç kombinasyonlarının analizi için önemli bir referans teşkil edeceğine inanılmaktadır.

**Anahtar kelimeler:** Chou-Talalay; CompuSyn; İlaç kombinasyonu; Kombinasyon indeksi; Medyan-etki denklemi

### Abstract

Until now, a large number of various methods have been developed for the analysis of drug combinations. Among these methods, “combination index theory of Chou-Talalay” has gained increasing popularity and endured widespread acceptance. The Chou-Talalay method is based on the combination effect equation derived from the median-effect principle of the mass-action law. It provides quantitative analysis of drug interactions, and the algorithm for computer software for the simulation of drug combinations. It takes into account both the potency and the shape of the dose-effect curve of each drug alone and their combinations. Computer simulation using CompuSyn software displays the dose-effect curve, median-effect plot, combination index plot, isobologram, dose-reduction index plot, and polygonogram for in vitro or in vivo studies.

In this review, aims to provides a theoretical and practical guide for drug combination studies and delineates its essence in terms of the mass-action law based theory, experimental design and data analysis. Median-effect equation of Chou-Talalay is a useful and practical method for the quantitative analysis of drug combinations. The median-effect equation allows the use of few experimental data in vitro, in vivo, and in clinics. The algorithms of the median-effect equation enable efficient, low-cost study, drug discovery, and ethical planning in clinical research, as they provide less experimental data requirements for small-scale experiments and quantitative implications for the analysis of drug combinations. The method is the most widely used in the analysis of drug combinations and has received numerous citations. It is believed that this study will constitute an important reference for the analysis of drug combinations.

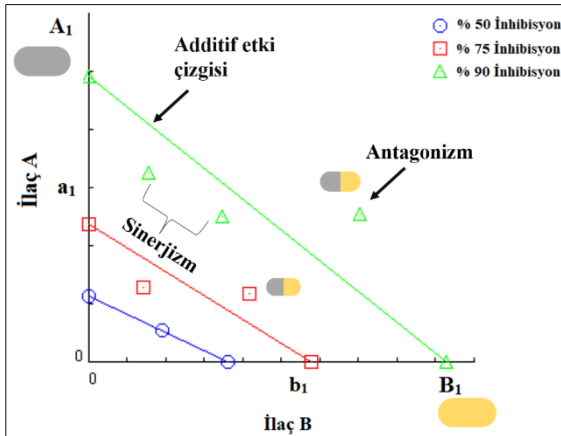
**Keywords:** Chou-Talalay; CompuSyn; Combination index; Drug combination; Median-effect equation

## GİRİŞ

Hastalıkların tedavisinde ilaç kombinasyonları yaygın kullanılmaktadır. Kombinasyon tedavisine örnek olarak, geleneksel Çin tıbbi ilaçları verilebilir (1). Kombinasyon tedavi modaliteleri, ilaç etkisini artırmak, ilaç direncini engellemek için önemli bir stratejidir ve hastalıklar için standarttır (2). İlaçların düşük dozlarda uygulanmasıyla sistemik toksisitenin azaltılması ve maksimum etkinlik elde etmeyi amaçlayan kombinasyon çalışmalarına ilgi artmaktadır. Kombinasyon modalitelerinin prensipleri, son otuz yılda değişmemiştir. Genel ilkeler; ilacın maksimum dozda uygulanabilmesi için toksisiteyi örtüşmeyen ilaçların kullanılması; ilaç direnci gelişmesini önlemek amacıyla farklı etki mekanizmaları ve minimum çapraz dirence sahip ajanların kombinasyonda kullanılması; tek ajan olarak etkinliği bilinen ilaçların kullanımı ve kombinasyonun hastalığın erken evresinde ve uygun programda verilmesidir (3). Kombinasyon tedavisi, uygulama sayısının azaltılması ile hasta uyumunun gelişmesine, sinerjizm ile etkinliğin artırılmasına, çoklu ilaç direnci gelişmesinin engellenmesine ve ilaç dozunun azaltılarak sağlıklı dokulara yan etkinin en aza indirilmesine olanak sağlayabilir (4).

İlaçlar kombine edildiğinde, sinerjistik, additif ve antagonistik etkileşimler meydana gelir (Şekil 1).

**Şekil 1.** Farklı doz ve etki seviyelerinde farmakodinamik ilaç etkileşimleri.



Sinerjizm, additif etki ve antagonizm, kombinasyon etkisinin bireysel ilaç etkilerinin toplamına göre sırasıyla daha büyük, eşit veya daha küçük olmasıdır. Sinerjistik etkileşimlerin avantajlarına örnek olarak terapötik etkinin

artırılması, yan etkileri önlemek için dozun azaltılması ve beraberinde etkinliğin artırılması veya aynı düzeyde sürdürülmesi, ilaç direnci gelişiminin en aza indirilmesi verilebilir. İlaç kombinasyonu, farklı doz ve/veya etki seviyelerinde sinerjistik, antagonistik veya additif olabilir (5).

İlaç kombinasyonlarının analizi için yaygın kullanılan metod; Chou-Talalay'ın medyan-etki yöntemidir (6). Yöntemin denklemleri, enzim-substrat etkileşimleri için geliştirilen ve n-ilaç kombinasyonlarına genişletilen kütle-eylem temelli enzim kinetik modellerinden türetilmektedir. Denklem, kararlı durumundaki 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 türetilmiş birleşik bir teoridir. Medyan-etki denklemi, n-bileşenden oluşan ilaç kombinasyonları için genişletilebilir. Eşitlikler, kombinasyon indeksi'nin (CI) hesaplanmasını sağlayan CI-izobologram denkleminin temelidir. Kombinasyon indeksi'nin <1, =1 ve >1 olması sırasıyla sinerjizm, additif etki ve antagonizmi gösterir (7). Sinerjizm'in simülasyonu için CompuSyn yazılımı geliştirilmiştir (8). Bu sayede, doz-etki eğrisi, medyan-etki grafiği, CI grafiği, izobologram, doz-azaltma indeksi (DRI) grafiği ve poligonogram kolaylıkla çizilebilir.

Bu derlemede ilaç kombinasyon çalışmalarında Chou-Talalay'ın kütle-eylem yasası temelli CI teorisi, deneysel tasarım stratejileri, CompuSyn ile analiz açıklanmıştır. İlaç kombinasyonlarında kullanılan terminoloji tanımlanmıştır. Medyan-etki denkleminin prensibi ve özellikleri, Chou-Talalay'ın CI metodunun temelleri anlatılmış, prelinik ilaç kombinasyon çalışmaları ve prensipleri açıklanmıştır.

### Sinerjizm veya antagonizm

İlaç kombinasyonlarında "sinerjizm" teriminin kullanımı yaygındır. İlaç kombinasyonlarında sinerjizm veya antagonizm, kombinasyondaki her ilaçtan kaynaklanmayabilir. Örneğin; bir ilaç kombinasyonu sinerjistik etkileşim gösterdiğinde, bu durum A ilacının mı B ilacına, veya B ilacının mı A ilacına sinerji oluşturduğunu belirtemez. A ve B ilaçlarının her biri bireysel olarak etkili ise, kombinasyondaki etkileşimler sinerjistik, additif veya antagonistik olarak isimlendirilir.

A ilacının bireysel etkisi olduğu ve B ilacının tek başına bir etkisi olmadığı, kombinasyonda B ilacı A ilacının etkisini artırdığı durumda, bu etkileşim türü sinerjizm değil, tek taraflı basit geliştirme veya güçlendirmedir (2, 9). Sinerjizm, CI değeri ile ifade edilirken, geliştirme veya kuvvetlendirme, yüzde veya kat artışı ile gösterilir. Sinerjizmin derecelerini tanımlamak için yarı-niceliksel yöntem önerilmiştir (10, 11). Kombinasyon indeksi değeri sinerjizm için 0-1, antagonizm için ise 1-sonsuz aralığındadır (Tablo 1).

### Medyan-etki denklemi ve prensibi

Medyan-etki denklemi; mekanizma ve etki-temelli denklemlerden türetilir ve ilaç etkilerinin boyutsuz olarak ölçülmesine olanak sağlar. Yöntemin prensibi kütle-eylem yasasının medyan-etki ilkesidir (12-14). Kombinasyonların CompuSyn ile simülasyonu için algoritmalar geliştirilmiştir (8, 15, 16). Chou-Talalay'ın medyan-etki ilkesinin ve CI teoreminin özelliği, matematiksel tüme-varım ve tümenden-gelim yaklaşımları kullanılarak mekanizmaya özgü denklemlerden elde edilmesidir. Birleşik veya genel denklem, mekanizma-özgü, hedef-spesifik, kanser tipi-spesifik, hastalık-spesifik ve ilaç birimlerine spesifik değildir. Kombinasyon indeksi teoremi, ilaçların etki mekanizmalarından bağımsızdır ve farklı etki mekanizmalarına sahip ilaçların kombinasyonları için kullanılabilir. Kombinasyon indeksi denklemindeki terimler orandır ve boyutsuz miktarlardır, doz birimleri ihmal edilebilir. Medyan-etki denklemi, 'doz' ve 'etki' ilişkisini tanımlayan temel formdur. Doz ve etki birbiri yerine kullanılabilir. Bu özellik, medyan-etki denkleminin birleşik teori olduğunu gösterir (9). Medyan-etki denklemi düzenlenerek biyomedikal bilimlerdeki dört temel eşitlik türetilir (Şekil 2) (17).

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

Yukarıdaki denklemde D; ilacın dozu (konsantrasyon),  $f_a$ ; D tarafından etkilenen ve  $f_u$ , etkilenmeyen kısımdır ( $f_u = 1 - f_a$ ).  $D_m$ ; % 50 etkiye neden olan medyan-etki dozudur ( $IC_{50}$ ,  $ED_{50}$  veya  $LD_{50}$ ), ve m; doz-etki ilişkisinin şeklini gösteren katsayıdır.  $m=1$ ,  $>1$  ve  $<1$  sırasıyla hiperbolik, sigmoidal ve düz-sigmoidal doz-etki eğrilerini ifade eder (14, 18). Medyan-etki denkleminin logaritması

alındığında, grafiğin eğimi m ve x-kesme noktası elde edilir.

Medyan-etki dozu ( $D_m$ ) değeri potensi, m eğrinin şeklini ve lineer korelasyon katsayısı (R), verilerin kütle eylem yasasına uygunluğunu gösterir. Verilerin medyan-etki prensibine uyumu R ile belirlenir. Medyan-etki denklemi iki adet veriyle doz-etki eğrisinin çizilmesine imkan verir. Tek ilaç için geliştirilen medyan-etki denklemi, çoklu ilaç kombinasyonlarına uygulanabilir (11, 19, 20).

### Chou-Talalay'ın CI metodunun özellikleri

Medyan-etki dozu, Michaelis-Menten denklemindeki  $K_m$  değerine, Hill denklemindeki K değerine, Henderson-Hasselbach eşitliğindeki  $pK_a$  parametresine ve Scatchard denklemindeki  $K_d$  değerine karşılık gelir. Dolayısıyla  $D_m$  ortak-bağlantıdır (9).

Chou-Talalay'ın CI metodu, kütle-eylem yasasının medyan-etki ilkesinden türetilen çoklu-ilac etkisi denkleminde dayanır ve sinerjizmin tespiti için algoritmalar sağlar (17). Her bir ilacın bireysel olarak ve kombinasyonlarının potensini ve doz-etki eğrisinin şeklini temel alır. Her ilaç için parametreler medyan-etki grafiği ile belirlenirse, kombinasyondaki etkileşimler tanımlanabilir. CompuSyn, sinerjistik etkileşimleri ve herhangi bir etki veya doz seviyesindeki sinerjizmi belirleyebilir. CompuSyn, her ilaç için gereken dozla karşılaştırarak, sinerjizm için belirli bir etki seviyesinde ilaç dozunun kaç kat azaldığını/arttığını, sinerjizm için optimum oranı ve sıra-bağımlılığını gösterir.

Kütle-eylem yasası temelli medyan-etki denklemi sayesinde, CI kavramı tanımlanmıştır (11, 20). Kombinasyon indeksi değeri, ilaç kombinasyonlarındaki etkileşimlerin kantitatif göstergesidir. x-eksenindeki etki seviyelerinin bir fonksiyonu olarak y eksenindeki CI grafiğine,  $f_a$ -CI veya CI grafiği denir.  $f_a$ -CI grafiği, tüm etki seviyelerindeki CI değerlerini gösterir (Şekil 3A).  $f_a$ -log (CI) grafiği,  $f_a$ -CI grafiğindeki ölçek-dışı noktaların küçültülmesine ve grafiksel gösterimin additif etki ekseni ile simetrik hale getirilmesine olanak sağlar. CompuSyn ile elde edilen  $f_a$ -log (CI) grafiğinde sinerjizm negatif, antagonizm ise pozitifdir.

İzobologram dozlarda eşitlik toplamı olan bir grafikdir. İzobologram ve  $f_a$ -CI grafiği, CI denkleminde dayanır. Çoklu-ilac kombinasyonları için CI denklemi 1'e eşit

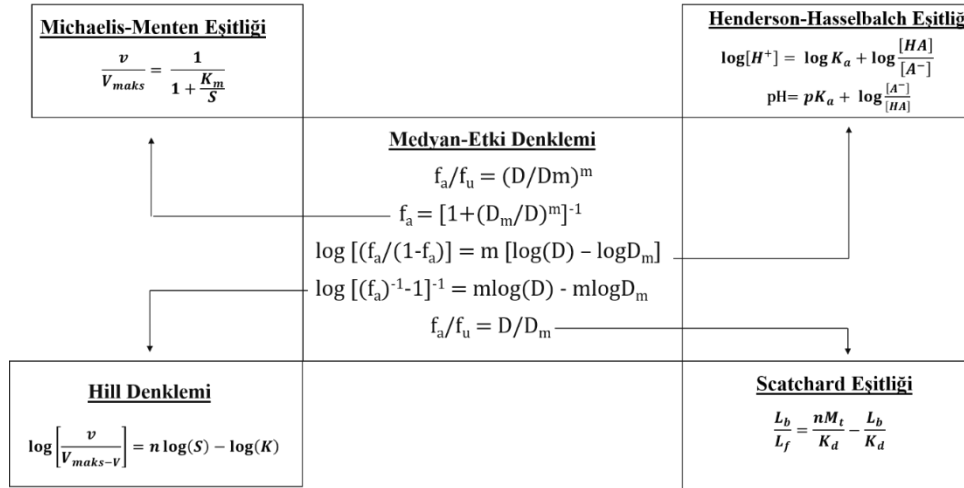
olduğunda, sonuç izobologram denklemdir. Şekil 3B, sırasıyla x ve y ekseninde (D)<sub>1</sub> ve (D)<sub>2</sub> doz değerlerini gösteren klasik izobologramdır. Şekil 3C, sabit-olmayan kombinasyon oranları

için normalleştirilmiş izobologramdır. İzobologram, iki boyutludur ve ikili-ilaç kombinasyonları için uygundur.

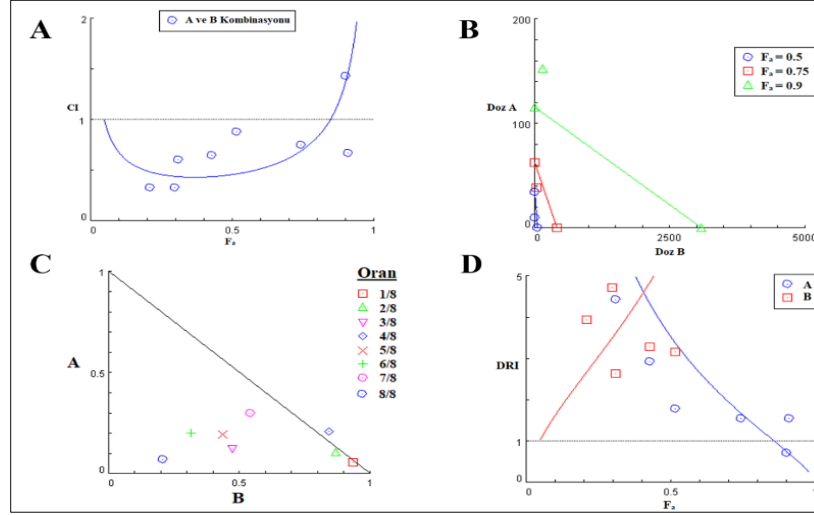
**Tablo 1.** İlaç sinerjizminin dereceleri

CI aralığı	Log10 aralığı (CI)	Sınıflandırma	Sembol	Grafiksel Sembol
< 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	-----	

**Şekil 2.** Birleşik teori olarak medyan-etki denklemi



**Şekil 3.** CompuSyn yazılımı ile ilaç kombinasyonlarının analizi. A ve B ikili-ilaç kombinasyonuna ait  $F_a$ -CI grafiği (A), klasik izobologram (B), A ve B ilaç kombinasyonunun sabit-olmayan ve farklı oranlardaki kombinasyonlarına ait normalize izobologram (C) ve  $F_a$ -DRI grafiği (D). Grafikler CompuSyn yazılımı ile yapılan analizden elde edilmiştir.



Kombinasyon indeksi grafiği, n sayıda ilaç için oluşturulabilir. Kombinasyondaki doz oranı sabit olduğunda, ilaç karışımı  $(D_m)_{1,2}$  ve  $(m)_{1,2}$  ve  $(r)_{1,2}$  değerlerine sahip üçüncü bir ajan gibi davranır. Bu durumda, herhangi bir etki seviyesinde izobologram grafiği çizilebilir. Diğer grafiksel yöntem normal-izobologramdır. Normal-izobol, ilaç kombinasyonlarının sabit-olmayan dozları için oluşturulabilir. Sabit-olmayan doz oranlarında, her bir kombinasyon için sadece CI değerleri gösterilir. Ancak,  $F_a$ -CI grafiği ile karşılaştırıldığında, izobologramda veriler kalabalıktır ve okunması zordur.

Sinerjistik ilaç kombinasyonları, terapötik etki korunurken ilaç dozunun ve doz ile ilişkili yan etkilerin azaltılmasına olanak sağlayabilir (2-4). Doz-azaltma indeksi, sinerjistik bir kombinasyondaki ilaçların dozunun, bireysel dozlar ile karşılaştırıldığında, belirli bir etki seviyesinde kaç kat azaltılabileceğinin bir ölçüsüdür (9). Doz-azaltma indeksi değeri, terapötik etkinlik korunurken, doz-azaltılmasının yan etkileri en aza indirdiği durumlarda önemlidir. Ancak,  $DRI > 1$  yararlı olmasına rağmen, sinerjizmi göstermez. Ayrıca, additif etki veya antagonistik etkileşimlerde de DRI değeri 1'den büyük olabilir (5). Daha büyük DRI değeri, belirli bir terapötik etki için daha fazla doz azalmasını gösterir. Doz-azaltma indeksi =1, >1 ve <1 sırasıyla ilaç doz azalmasının/artışının gerçekleşmediğini, olumlu doz-azalmasının gerçekleştiğini ve

uygun olmayan doz-artışının gerçekleştiğini ifade eder (17). CompuSyn ile kombinasyondaki her bir ilaca ait DRI parametreleri belirlenebilir (8).  $f_a$ -DRI grafiği, DRI değerlerini farklı doz ve/veya etki seviyelerinde gösterir (Şekil 3D).

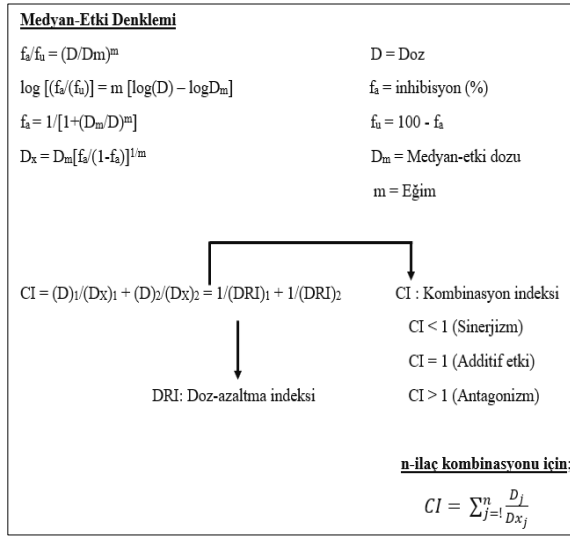
### İlaç kombinasyonlarının bilgisayarlı simülasyonu

İlaç kombinasyonlarındaki sinerjizm ve/veya antagonizmanın bilgisayarlı simülasyonu için algoritmalar geliştirilmiştir (Şekil 4). CompuSyn yazılımı, Chou ve Talalay'ın teorisine dayanır (21).

Medyan-etki denklemi ile ilaç kombinasyonlarının analizinde dikkat edilmesi gereken hususlar bulunmaktadır. Metod, her ilacın  $IC_{50}$  değerinin olduğunu varsayar. Örneğin, bir molekülün yüksek konsantrasyonlarında dahi anti-kanser etki gözlenmemişse, bu molekülün anti-kanser ilaçlar ile kombinasyon etkileri Chou-Talalay metodu kullanılarak analiz edilmemelidir (5). İnhiyasyon değeri %0 ise, bu veri kullanılamaz. Herhangi bir etki yoksa, kullanılan molekül ilaç değildir.  $F_a=0$  değeri ( $\log(f_a)$ =negatif sonsuzluk) CompuSyn yazılımına tanıtıldığında, program hata vermektedir. Negatif  $f_a$  değeri veya  $f_a > 1.0$  CompuSyn programına girilmemelidir. Medyan-etki denklemi ile hesaplanan CI değerleri hiçbir koşulda negatif olamaz. Medyan-etki grafiğinin

eğimi negatif ise, muhtamelen kütle-eylem yasası ilkesiyle bir tutarsızlık vardır. Bu, hatalı analizlerin, yanlışlıkla  $f_a$  yerine Chou denkleminde  $f_u$  değerlerinin sonucu olabilir. Çözücü minimum toksisiteye sahip olmalı ve her deney grubu eğit konsantrasyonda çözücü içermelidir (2). Aksi durumda, çözücü ilaç olarak kabul edilir. İlaçların bireysel ve kombinasyon etkileri aynı koğullarda incelenmelidir.

**Şekil 4.** Farklı etki seviyelerinde CI grafiği ve DRI grafiğinin CompuSyn ile simülasyonu için geliştirilmiş algoritmalar



CompuSyn raporu, doz-etki eğrisi, medyan-etki grafiği,  $f_a$ -CI tablosu ve grafiği,  $f_a$ -DRI tablosu ve grafiği, klasik- veya normal-izobologramı, poligonogramı içerir. Poligonogram, pratik kullanım için geliştirilmiştir (8, 22). Poligonogram, karmaŐık çoklu-ilaç kombinasyonlarının basit grafiksel gösterimle ifade edilmesini sağlar (Şekil 5).

Grup-ilaç kombinasyonları veya kombinasyon kokteyllerini geliŐtirmek için kullanıŐlıdır. Poligonogramlarda, sinerjizm düz, antagonizm ise kesik çizgi ile temsil edilir. Sinerjizm veya antagonizmanın derecesi, çizginin kalınlığı ile ifade edilir. Poligonogramda ilaç etkileşimleri renklerle de belirtilebilir. Sinerjizm kırmızı, antagonizm ise mavi renkler ile gösterilir.

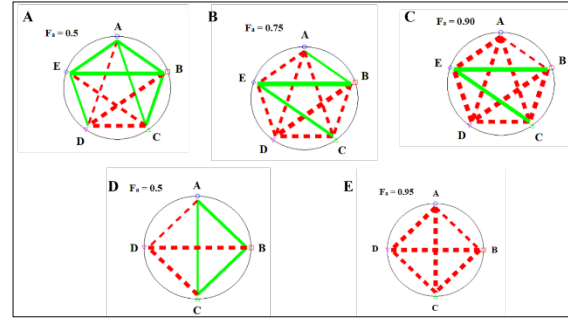
#### In vitro ve in vivo ortamlarda ilaç kombinasyon alıŐmaları

İlaç oranına bağlı etkilerin değerlendirilmesi amacıyla hücre kültürü sistemleri kullanılır (3). Konsantrasyon ve uygulama süresi kontrol edilebilir ve hücre büyümesinin inhibisyonu

llebilir. Çeşitli hücre dizilerinin kullanılabilmesi, kültür koŐullarının esnekliği ve protein/nükleik asit miktar tayin kolaylığı hücre kültürü sistemlerinin avantajlarıdır. Hücre dizileri, primer hücre kltrleri veya *in vivo* modeller ile yapılan preklinik çalıŐmaların tasarımı, ilaç konsantrasyonu, maruziyet süresi, uygulama programı ve ilaç etkileŐimini değerlendirmek için kullanılan metod gibi çeşitli faktörler dikkate alınmalıdır.

**Şekil 5.** rnek poligonogram gösterimleri.

A, B, C, D ve E beŐli ilaç kombinasyonunun %50 inhibisyon seviyesine ait poligonogram (A), %75 inhibisyon seviyesine ait poligonogram (B) ve %90 inhibisyon seviyesine ait poligonogram (C). A, B, C ve D dörtlü ilaç kombinasyonuna ait %50 inhibisyon seviyesine ait poligonogram (D) ve %95 inhibisyon seviyesine ait poligonogram (E). Grafikler CompuSyn yazılımı ile yapılan analizden elde edilmiştir.



In vitro ortamda deneysel koşullar kolaylıkla standartlaŐtırılabilir. In vitro çalışmalarda ilaç konsantrasyonu nispeten sabittir. Sinerjistik etkileşimler, büyük ölçüde ilaç:ilaç oranına bağlıdır. Kombinasyon indeksi-izobologram yöntemine dayalı in vitro çalışma 1-2 hafta sürer. Bir araŐtırmada, ilaç kombinasyonlarının analizi için Chou-Talalay metodu kullanılmıŐtır (5). ÇalıŐmada, gallik asit'in 5-florourasil veya okzaliptatin ile IC50/16 - 4IC50 aralığındaki kombinasyonları sinerjizm göstermiŐtir. 5-Florourasil ve okzaliptatin için DRI değerlerinin 1'den büyük olduğu ve olumlu doz-azalmasının gerçekleŐtięi bulunmuŐtur. Deneysel tasarım ve veri analizinde, in vitro ve in vivo modeller ile yapılan ilaç kombinasyon çalışmaları benzer prensibe sahiptir. In vivo çalışmalarda deneysel-ölçek daha küçüktür. In vivo koşullarda maksimum terapötik etkililiği elde etmek için ilaç uygulama programı ve sırasının belirlenmesi gereklidir. In vivo



koşullarda sinerjizm veya antagonizmanın belirlenmesi daha zaman alır, pahalıdır ve ölçümlerde daha fazla değişkenlik meydana gelir. Kütle-eylem yasasına dayanan medyan-etki teorisi ve CI yöntemi, in vivo ilaç kombinasyon çalışmalarının zaman, maliyet ve deney hayvanlarının korunmasını sağlayan kapsamlı, kolay, verimli ve bilgisayarlı analizine imkan verir (23).

İlaç kombinasyonlarının analizi için teorik gereklilikler İlaç kombinasyonlarının analizi için her bir ilacın bireysel doz-etki parametreleri belirlenmelidir. (m)1, (Dm)1, (m)2 ve (Dm)2 değerleri ön-koşullardır. Doz-etki parametreleri biliniyorsa CI değeri hesaplanabilir. İlaç kombinasyonlarında, doz-etki eğrilerinin belirlenmesi önerilmektedir, ancak zorunlu değildir. Kombinasyon için doz-etki eğrisi mevcutsa, herhangi bir etki seviyesinde fa-CI grafiğinin simülasyonu yapılabilir veya herhangi bir doz seviyesinde izobologram oluşturulabilir. İn vitro çalışmalar için, her bir ilaç ve kombinasyonları genellikle 5-8 adet veri noktasından oluşur (2, 9). İn vivo çalışmalarda, deney pratikliği, maliyetler gibi nedenlerle verilerin sayısı azaltılabilir.

Sitotoksitesite testleri kullanılarak, in vitro kombinasyon çalışmalarının tamamlanması haftalar sürer. İlaçların IC50 değerlerini

belirlemek amacıyla genellikle ön çalışma veya literatür araştırması yapılabilir. Deneysel tasarım örneği Tablo 2'de verilmiştir (Tablo 2). Genellikle 2 kat seyreltme yapılmalıdır. Spesifik durumlar dışında beş veya on kat seyreltme oranları kullanılmamalıdır. Bu oranlar, testin doğruluğunu aşan değerleri verebilir veya kullanışsız veriler sağlayabilir. Diyagonal sabit-oranlı ilaç kombinasyon tasarımı, gerekli deney hayvanı sayısının azaltılması, kombinasyonlar hakkında bilgilerin eldesi ve deneylerin maliyet etkinliğinin artırılmasına imkan sağlar. Önerilen diyagonal şema, az sayıdaki veriye sahip karışımın seyreltilmesi ile gerçekleştirilebilecek bir deney tasarımıdır. Elde edilen verilerle fa-CI ve fa-DRI grafikleri oluşturulabilir. Her ilacın etkisinin kombinasyona katkısı eşit olacak şekilde deneyler gerçekleştirilmelidir (2, 9, 11, 24).

Optimum doz oranını belirlemek için kombinasyonun farklı oranlardaki etkileri araştırılabilir. Kombinasyon için sabit oranda doz-etki eğrisinin belirlenmesi önerilmektedir, ancak zorunlu değildir. Deneyler sabit-olmayan ilaç oranlarında da gerçekleştirilebilir. Her ilacın (m)1, (Dm)1, (m)2 ve (Dm)2 parametreleriyle, tek bir

**Tablo 2.** İki-bileşenli ilaç kombinasyon çalışmaları için deneysel tasarım (F<sub>a</sub>; İlaç etkisi. IC<sub>50</sub>; % 50 inhibisyona neden olan doz)

		İlaç A						
		0	0.125 x (IC <sub>50</sub> )A	0.25 x (IC <sub>50</sub> )A	0.5 x (IC <sub>50</sub> )A	1 x (IC <sub>50</sub> )A	2 x (IC <sub>50</sub> )A	4 x (IC <sub>50</sub> )A
İlaç B	0	Kontrol	(F <sub>a</sub> ) <sub>A</sub>	(F <sub>a</sub> ) <sub>A</sub>	(F <sub>a</sub> ) <sub>A</sub>	(F <sub>a</sub> ) <sub>A</sub>	(F <sub>a</sub> ) <sub>A</sub>	(F <sub>a</sub> ) <sub>A</sub>
	0.125 x (IC <sub>50</sub> )B	(F <sub>a</sub> ) <sub>B</sub>	(F <sub>a</sub> ) <sub>A,B</sub>					
	0.25 x (IC <sub>50</sub> )B	(F <sub>a</sub> ) <sub>B</sub>		(F <sub>a</sub> ) <sub>A,B</sub>				
	0.5 x (IC <sub>50</sub> )B	(F <sub>a</sub> ) <sub>B</sub>			(F <sub>a</sub> ) <sub>A,B</sub>			
	1 x (IC <sub>50</sub> )B	(F <sub>a</sub> ) <sub>B</sub>				(F <sub>a</sub> ) <sub>A,B</sub>		
	2 x (IC <sub>50</sub> )B	(F <sub>a</sub> ) <sub>B</sub>					(F <sub>a</sub> ) <sub>A,B</sub>	
	4 x (IC <sub>50</sub> )B	(F <sub>a</sub> ) <sub>B</sub>						(F <sub>a</sub> ) <sub>A,B</sub>

kombinasyon verisi ile sinerjizm belirlenebilir. İlaçların  $m$  ve  $D_m$  değerleri belirli ise, sabit-olmayan oran tasarımı için her bir kombinasyon veri noktasında CI değerleri hesaplanabilir. Bu durumda,  $f_a$ -CI grafiğindeki her bir kombinasyon etkisi için CI değerleri gösterilir ancak grafikte simüle edilemez. Normal-izobologram sabit-olmayan oranlı kombinasyon tasarımı için oluşturulabilir. Klasik izobologram, sadece sabit-oranlı ilaç kombinasyonlarında çizilebilir.

Chou-Talalay yöntemi, kombinasyonlarda ilaç oranının sabit tutulması gerektiğini varsayar. Bu şekilde, her ilacın kombinasyona katkısı yaklaşık olarak eşit olur. Önerilen kombinasyon, eşit potens kombinasyonu için  $(IC_{50})_1/(IC_{50})_2$  oranını kullanan sabit kombinasyon oranıdır.  $IC_{50}$  oranında ilaç A ve B'den oluşan bir karışım hazırlanıp ve 4-6 defa 2 kat seyreltme gerçekleştirilebilir. Bu verilerden,  $f_a$ -CI grafiği çizilebilir.

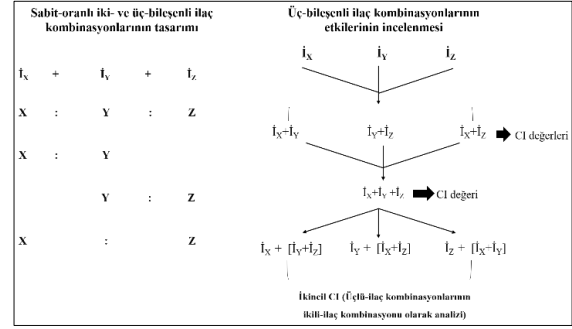
Toksosite, düşük çözünürlük veya ekonomik koşullar gibi birçok durumda ilaç miktarı azaltılabilir ve/veya artırılabilir. Geniş doz aralıklarında rastgele oranlarda deney gerçekleştirilebilir. 1:1, 1:3 ve 3:1 doz oranlarında çalışma yapılarak hangi oranın kuvvetli sinerjizm gösterdiği belirlenebilir (2, 9). Sinerjistik etkileşimlerin araştırılmasında, doz aralığının *in vivo* uygulanabilir ve terapötik olarak etkili aralıkta olması gerektiği unutulmamalıdır.

İlaç kombinasyon çalışmalarında, ajanlar aynı anda veya sıralı uygulama ile kombine edilebilir. Sinerjizm veya antagonizmanın derecesine bağlı olarak programlanabilir. Deneysel tasarıma bağlı olarak uygulama süreleri arasındaki zaman farkı değiştirilebilir. Bir ilaç kombinasyonu monoterapiye kıyasla üstün etkiye sahip ve o kombinasyondaki bileşenlerden birinin bireysel olarak hiçbir etkisi yoksa, bu durumdaki etkileşim türü kuvvetlendirme veya yüzde inhibisyon olarak ifade edilir. Bu durumda Chou-Talalay metodu kullanılmamalıdır. Ancak kombinasyondaki ilaçlar bireysel olarak etkili ise, etkileşim türleri CI yöntemi ile belirlenir.

En az üç-bileşenli ilaç kombinasyonları için denklemler, ikili-ilaç kombinasyonları için geliştirilmiş olan eşitlikler ile aynı formdadır. Ancak bu, iki ilacın sıralı kombinasyonlarından daha karmaşıktır. Bazı koşullarda bir grup olarak iki veya daha fazla ilaç kombine edilebilir ve zaman faktörünün sinerjizm veya antagonizm üzerindeki önemini belirlemek

amacıyla gruplar arasında  $(D_X+D_Y) \rightarrow (D_Y+D_Z)$  sıralı kombinasyon çalışmaları gerçekleştirilebilir. Üç-ilaç, X, Y ve Z, kombinasyonları için sabit kombinasyon oranları (Örneğin  $IC_{50}$  oranları, x: y: z) kullanılmalıdır (Şekil 6).

**Şekil 6.** En az üç-bileşenli ilaç kombinasyonlarının tasarımı ve analizi



Kombinasyon karışımı  $(m)_{x,y,z}$ ,  $(D_m)_{x,y,z}$  ve  $(r)_{x,y,z}$  değerlerine sahip tek bir ilaç gibi davranır. Üçlü-ilaç kombinasyonlarının CI değerleri ve ikincil CI değerleri de belirlenir (2, 9). Etkileşimleri incelemek amacıyla, aynı zamanda ikili- ve üçlü-ilaç kombinasyonlarının etkileri de incelenmelidir.

## SONUÇ

Sonuç olarak, kütle-eylem yasası temeline dayanan birleşik medyan-etki denkleminin ilaç kombinasyonlarının nicel analizi için uygun, kullanışlı ve pratik bir yöntem olduğu kanıtlanmıştır. İlaçların bireysel ve kombinasyon etkilerinin analizi, kantitatif sinerjizmi belirlemeye yönelik algoritmalar. Bu denklemin algoritmaları, küçük-ölçekli deneyler için daha az veri ile ilaç kombinasyonlarının analizine yönelik kantitatif çıkarımlar sağladığı için verimli, düşük maliyetli araştırma, ilaç keşfi ve klinik çalışmalarda etik planlamayı mümkün kılar. En yaygın uygulama alanı ilaç-ilaç kombinasyonları olmasına rağmen, ilaç ve oksijen yoğunluğu, ilaç ve radyasyon, ilaç ve virüs, ilaç ve antikor, radyasyon ve oksijen yoğunluğu gibi koşullara da medyan-etki denklemleri uygulanabilir.

Denklemlerin basitliği, deneysel tasarım ve veri analizinin kolaylığı, verimlilik, ekonomi ve kullanılan deney hayvanlarının sayısı veya ilaç kombinasyonunun klinik denemeleri için gereken hasta sayısının azaltılması gibi avantajları vardır. Kütle-eylem yasası temelli



medyan-etki prensibi araştırmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır ve gelecekteki ilaç kombinasyon çalışmalarının yolunu açmıştır. Bu çalışmanın, ilaç kombinasyonlarının analizi için önemli bir referans teşkil edeceğine inanıyorum.

#### **Yazar Deklarasyonları**

Yazarın herhangi bir çıkar atışması yoktur. Çalışmada hiçbir hibe veya destek kullanılmamıştır. Yazar çalışmanın tüm aşamalarına katkıda bulunduğunu beyan etmiş ve makalenin son halini onaylamıştır. Yazar; bu çalışmanın başka bir dergide yayınlanmadığını, sunulmadığını ve başka bir derginin incelemesinde olmadığını beyan eder.

#### **KAYNAKLAR**

1. Fouquier J, Guedj M. Analysis of drug combinations: current methodological landscape. *Pharmacology Research & Perspectives*. 2015;3:e00149.
2. Chou T-C. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacological Reviews*. 2006;58:621-81.
3. Pinto AC, Moreira JN, Simões S. Combination chemotherapy in cancer: Principles, evaluation and drug delivery strategies. *Current Cancer Treatment- Novel Beyond Conventional Approaches*: IntechOpen; 2011.
4. Mokhtari RB, Homayouni TS, Baluch N, Morgatskaya E, Kumar S, Das B, et al. Combination therapy in combating cancer. *Oncotarget*. 2017;8:38022-43.
5. zer B. Kolon kanseri tedavisi için yeni nanoteraptik modalitelerin geliştirilmesi. Edirne.: Doktora Tezi. Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstits Biyoteknoloji ve Genetik Anabilim Dalı, 2021; 2021.
6. Chou T-C. The combination index (CI<1) as the definition of synergism and of synergy claims. *Synergy*. 2018;7:49-50.
7. Chou T-C. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. *Cancer Research*. 2010;70:440-6.
8. Chou T, Martin N. CompuSyn for drug combinations: PC software and user's guide: a computer program for quantitation of synergism and antagonism in drug combinations, and the determination of IC50 and ED50 and LD50 values. Paramus (NJ): ComboSyn; 2005. Available at: [www.combosyn.com](http://www.combosyn.com). 2005.
9. Chou T-C. Preclinical versus clinical drug combination studies. *Leukemia & Lymphoma*. 2008;49:2059-80.
10. Chou T-C, Hayball MP. CalcuSyn for windows: Multiple-drug dose-effect analyzer and manual. Biosoft, UK. 1996.
11. Chou T-C, Talalay P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Advances in Enzyme Regulation*. 1984;22:27-55.
12. Chou T-C. Combinatorial analysis of multiple substrate—multiple product enzyme reactions. *Journal of Theoretical Biology*. 1972;35:285-97.
13. Chou T-C. Relationships between inhibition constants and fractional inhibition in enzyme-catalyzed reactions with different numbers of reactants, different reaction mechanisms, and different types and mechanisms of inhibition. *Molecular Pharmacology*. 1974;10:235-47.
14. Chou T-C. Derivation and properties of Michaelis-Menten type and Hill type equations for reference ligands. *Journal of Theoretical Biology*. 1976;59:253-76.
15. Chou J, Chou T. Dose-effect analysis with microcomputers: Quantitation of ED50, LD50, synergism, antagonism, low-dose risk, receptor binding and enzyme kinetics. *Computer software for Apple II series IBM-PC instruction manual*. 1985:19-28.
16. Chou T, Hayball M. CalcuSyn for Windows: multiple-drug dose-effect analyzer and manual. Biosoft, Cambridge Place, Cambridge, United Kingdom. 1996.
17. Chou T-C. The mass-action law based algorithms for quantitative econo-green bio-research. *Integrative Biology*. 2011;3:548-59.
18. Chou T-C. On the determination of availability of ligand binding sites in steady-state systems. *Journal of Theoretical Biology*. 1977;65:345-56.
19. Chou TC, Talalay P. Generalized equations for the analysis of inhibitions of Michaelis-Menten and higher-order kinetic systems with two or more mutually exclusive and nonexclusive inhibitors.

- European Journal of Biochemistry. 1981;115:207-16.
20. Chou T-C, Talalay P. Analysis of combined drug effects: a new look at a very old problem. Trends in Pharmacological Sciences. 1983;4:450-4.
  21. Özer BO. Sinerjistik ilaç kombinasyonlarının analizinde güncel matematiksel ve istatistiksel yöntemler. Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University. 2023;47:687-704.
  22. Chou T-C, Motzer RJ, Tong Y, Bosl GJ. Computerized quantitation of synergism and antagonism of taxol, topotecan, and cisplatin against human teratocarcinoma cell growth: a rational approach to clinical protocol design. JNCI: Journal of the National Cancer Institute. 1994;86:1517-24.
  23. Chou T-C. Drug combination against xenograft tumors in nude mice: Experimental design, execution, and computerized simulation of synergism and antagonism. Cancer Research. 2008;68:4183-.
  24. Chou T-C. Chemotherapeutic synergism, potentiation and antagonism. In: TC C, DC R, editors. Encyclopedia of Human Biology. Academic Press, New York. 1991. pp. 371-9.