

UNIVERZITET U BEOGRADU

FARMACEUTSKI FAKULTET

Jelica M. Vučićević

**Heminformatička analiza, dizajn i ispitivanje
proapoptotske aktivnosti novih liganada
imidazolinskih receptora**

Doktorska disertacija

Beograd, 2019

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF PHARMACY

Jelica M. Vučićević

**Cheminformatic analysis, design and
examination of the proapoptotic activity of novel
imidazoline receptor ligands**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2019

MENTOR

Dr sc. Katarina Nikolić, vanredni profesor,
Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet

Dr Nevena Veljković, naučni savetnik, Institut
za nuklearne nauke Vinča

ČLANOVI KOMISIJE

Dr sc. Danica Agbaba, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet

Dr. sc. Tatjana Srdić-Rajić, naučni savetnik,
Institut za onkologiju i radiologiju Srbije

Datum odbrane: _____

HEMINFORMATIČKA ANALIZA, DIZAJN I ISPITIVANJE PROAPOPTOTSKE AKTIVNOSTI NOVIH LIGANADA IMIDAZOLINSKIH RECEPTORA

REZIME

Ligandi imidazolinskih receptora predstavljaju veliku grupu biološki aktivnih jedinjenja koja svoju aktivnost ostvaruju delovanjem na imidazolinske receptore (I₁-IR, I₂-IR, and I₃-IR) i na α_2 -adrenergičke receptore (α_2 -AR). Centralni antihipertenzivni efekat imidazolina kao što su klonidin, rilmenidin i moksonidin je rezultat aktivacije I₁-IR and α_2 -AR. I₂-imidazolinski receptori predstavljaju katalitičko mesto monoamino oksidaze B (MAO-B), enzima koji je uključen u nekoliko neuroloških poremećaja. Jedinjenja kao što su idazoksan i njegovi analozi pokazuju visok afinitet za ovaj tip receptora. I₃-IRs imaju ulogu u indukciju sekrecije insulina iz β -ćelija pankreasa i održavanje homeostaze glukoze. Imajući u vidu da većina liganada imidazolinskih receptora svoje efekte ostvaruje unutar centralnog nervnog sistema (CNS) delujući kao centralni antihipertenzivi i/ili su potencijalni lekovi u lečenju neuroloških oboljenja, procena njihove permeabilnosti kroz krvno-moždanu barijeru (KMB) je od suštinskog značaja u ranom otkriću lekova.

U ovoj disertaciji KMB permeabilnost 18 liganda α_2 -adrenergičkih i/ili imidazolinskih receptora i 22 leka koja deluju na CNS je ispitana primenom paralelnog testa permeabilnosti na veštačkim membrana (eng. *Parallel Artificial Membrane Permeability Assay*, PAMPA) i bioparticione micelarne hromatografije (eng. *Biopartitioning Micellar Chromatography*, BMC). Vrednosti dobijene PAMPA ($\log P_e$) i BMC ($\log k_{BMC}$) su dalje analizirane kvantitativnim odnosom strukture i permeabilnosti jedinjenja (eng. *Quantitative Structure-Permeability Relationship*, QSPR).

Dominantni molekularni/kajonski oblici na pH = 7,4 su određeni korišćenjem MarvinSketch 6.1.0 softvera. Geometrija odabranih molekularnih/kajonskih oblika ispitivanih jedinjenja je optimizovana primenom B3LYP /6-31G (d,p) nivoa *Density Functional Theory* (DTF) u ChemBio3D Ultra 13.0 programu. Deskriptori optimizovanih struktura su izračunati u ChemBio3D Ultra 13.0, Dragon 6.0 i ADMET Predictor 6.5 programima. $\log P_e$ i $\log k_{BMC}$ vrednosti su korišćene kao zavisne varijable (Y), dok su

izračunati molekularni parametri predstavljali nezavisne varijable (X) u QSPR studiji. Metoda najmanjih kvadrata (eng. *Partial Least Squares*, PLS) je izvedena korišćenjem SIMCA P+ 12.0 programa, dok su modeli dobijeni multiplom linearnom regresijom (eng. *Multiple Linear Regression*, MLR) i veštačkim neuronskim mrežama (eng. *Artificial Neural Networks*, ANNs) formirani u STATISTICA Neural Network 4.0.

Pokazano je da promene koje bi trebalo da poboljšaju permeabilnost su: (1) uvođenje elektronegativnih atoma u aromatičnu strukturu, (2) supstitucija atoma broma ili hidroksilnih grupa njihovim izosterima (npr. fluorom ili hlorom), (3) uvođenje voluminoznijih grupa kao i atoma koji imaju visoku Sanderson elektronegativnost. Sa druge strane, pokazano je da prisustvo gvanidinske ili aminogvanidinske grupe, kao i metil i izobutil grupa ima negativan uticaj na KMB permeabilnost.

Formirani QSPR modeli se mogu koristiti umesto *in vitro* metoda za predviđanje permeabilnosti liganada α_2 -adrenergičkih i/ili imidazolinskih receptora i strukturno sličnih jedinjenja kroz KMB. Ovi modeli omogućuju optimizaciju strukture novih potencijalnih lekova i eliminaciju jedinjenja sa niskom permeabilnošću pre sinteze.

Novije studije su pokazale da imidazolinski derivati pored kardiovaskularne regulacije, ispoljavaju i druge biološke efekte kao što su kontrola apoptoze i proliferacije ćelija. Pokazano je da samo rilmenidin, koji je snažan I_1 -IR agonista, pokazuje proapoptotsku aktivnost na K562 ćelijskoj liniji blastične faze hronične mijeloidne leukemije vezujući se za I_1 -IR kandidat, nisharin, dok su moksonidin (umereno efikasni I_1 -IR agonista) i efaroksan (antagonista I_1 -IR) neaktivni.

U ovoj disertaciji dodatno je ispitan i odnos između strukture jedinjenja i aktivnosti koji leži u osnovi proapoptotske aktivnosti rimenidina i njegovih derivata. Identifikovana su nova jedinjenja sa drugačijom hemijskom strukturom, a koja pokazuju aktivnost i mehanizam dejstva kao i rilmenidin. U cilju identifikacije novih jedinjenja razvijena je razvijen je nova metoda virtuelnog skrininga (eng. *Virtual Screening*, VS) koji uključuje filtriranje baze na osnovu vrednosti AQVN deskriptora (eng. *Average Quasivalence Number*) koji se računa za dalekodosežne međumolekulske interakcije organskih molekula i primenu kombinovanih metoda virtuelnog skrininga koje uzimaju u obzir sličnost između GRID molekularskih interakcionih polja ispitivanih jedinjenja i rilmenidina, odnosno aktivnog mesta nisharina.

Od jedanaest kandidata selektovanih ovom metodom, *in vitro* testiranjima pokazano je da je jedinjenje **5** najaktivnije i da je njegova citotoksična aktivnost na K562 ćelijskoj liniji slična rilmenidinovoj. Citometrijskom analizom je utvrđeno da ovo jedinjenje dovodi do akumulacije ćelija u sub-G1 fazi i smanjenja procenta ćelija u G1 i S fazi ćelijskog ciklusa. Pored apoptotske aktivnosti ispitana je i antiproliferativna aktivnost jedinjenja **5** gde je uočena značajna inhibicija formiranja kolonija K562 ćelija na dozno zavisani način.

Takođe, ni jedno od jedanaest selektovanih i sintetisanih jedinjenja nije pokazalo značajan afinitet na rekombinantnim humanim α_{2A} adrenergičkim receptorima, što ukazuje na njihovu selektivnost.

U novijoj studiji je pokazano da rilmenidin povećava osetljivost K562 ćelija na apoptozu. K562 ćelijska linija je relativno neosetljiva na apoptozu indukovanu lekovima koji oštećuju DNK, kao što je doksorubicin. U ovoj disertaciji je pokazano da kombinovana primena jedinjenja **5** i doksorubicina dovodi do povećanja apoptoze u poređenju sa samom primenom doksorubicina (64% u odnosu na 20%) što ukazuje na potencijal korišćenja jedinjenja **5** i njegovih derivata kao adjuvantnih agenasa u konvencionalnim terapijama za lečenje tumora koji imaju smanjenu osetljivost na lekove slične doksorubicinu i izražene neželjene efekte.

Ovaj integrisani medicinsko hemijski pristup predstavljen u ovoj disertaciji je doveo do identifikovanja novog jedinjenja (jedinjenja **5**) koje se može iskoristiti za dalje ispitivanje I₁-IR signalnog puta, kao i za razvoj adjuvantnih agenasa koji se mogu koristiti u terapiji kancera koji imaju smanjenu osetljivost na lekove slične doksorubicinu.

Imajući u vidu da se imidazolinski ligandi pored imidazolinskih receptora koji su ciljano mesto njihovog dejstva vezuju i za G-protein kuplovane receptore (eng. G-protein coupled receptors, GPCR), u ovoj disertaciji je primenjena metoda virtuelnog skrininga u cilju identifikacije novih '*off targets*' ove grupe jedinjenja kao i jedinjenja **5** prethodno identifikovanog kao '*hit*' za nisharin. Beta adrenergički, dopaminski i muskarinski receptori su selektovani kao potencijalni '*off targeti*' za određene ligande imidazolinskih i/ili α_2 -adrenergičkih receptora kao što su BDF6143, BU224, BU226, ksilometazolin i jedinjenje **5**. Dobijeni rezultati mogu biti korisni u razumevanju potencijalnih neželjenih efekata ovih jedinjenja, ili u pronalaženju njihovih novih terapijskih primena.

**CHEMINFORMATIC ANALYSIS, DESIGN AND EXAMINATION OF THE
PROAPOPTOTIC ACTIVITY OF THE NOVEL IMIDAZOLINE RECEPTOR
LIGANDS**

ABSTRACT

Imidazoline receptor ligands are a numerous family of biologically active compounds known to produce central hypotensive effect by interaction with both α_2 -adrenoreceptors (α_2 -AR) and imidazoline receptors (I₁-IR, I₂-IR, and I₃-IR). The central hypotensive effect of imidazoline derivatives such as clonidine, rilmenidine and moxonidine is results of activation both I₁-IR and α_2 -AR. I₂-IRs have been shown to be modulatory site for monoamine oxidase-B, enzyme responsible for several neurological disorders. This type of imidazoline ligand receptors have high affinity for idazoxan and its analogues. I₃-IRs are involved in induction of insulin secretion from β -cells and maintaining glucose homeostasis. Since the most IRs ligands are examined as centrally acting antihypertensives and/or drug candidates for treatment of various neurological diseases, predicting their brain penetration is a critical step in early drug discovery phase.

In the framework of this doctoral dissertation, the effective Blood–Brain Barrier (BBB) permeability of 18 IRs/ α_2 -AR ligands and 22 Central Nervous System (CNS) drugs was experimentally determined by using both Parallel Artificial Membrane Permeability Assay (PAMPA) and Biopartitioning Micellar Chromatography (BMC) and further studied by the Quantitative-Structure-Permeability Relationship (QSPR) methodology.

The dominant molecules/cations species of compounds have been calculated at pH = 7.4 by using MarvinSketch 6.1.0 software. The analyzed ligands were optimized using Density Functional Theory (B3LYP/6-31G(d,p)) included in ChemBio3D Ultra 13.0 program and molecule descriptors for optimized compounds were calculated using ChemBio3D Ultra 13.0, Dragon 6.0 and ADMET predictor 6.5 software. PAMPA effective permeabilities of examined compounds ($\log P_e$) and their $\log k_{\text{BMC}}$ values were used as dependent variable (Y), while calculated molecular parametres were used as independent variables (X) in the QSPR study. SIMCA P+ 12.0 was used for Partial Least Square (PLS) analysis, while the stepwise Multiple Linear Regression (MLR) and Artificial Neural Networks (ANN) modeling were performed using STASTICA Neural Networks 4.0. Predictive potential of the formed models was confirmed by Leave-One-Out Cross- and external-validation and the most reliable models were selected.

The descriptors that are important for model building are identified as well as their influence on BBB permeability. It has been shown that modifications that could be applied in order to improve BBB permeability of imidazoline ligands are introduction of

novel atoms with high electronegativity in aromatic rings, replacement of bromine or hydroxyl groups with their isosters (fluorine/chlorine), and introduction of voluminous moieties in the molecular structure. On the other hand, the presence of guanidine or aminoguanidine functional groups in molecular structures, as well as methyl and isobutyl, could have a negative influence on BBB permeability.

Formed QSPR models could be used for *in silico* prediction of blood–brain permeability of imidazoline ligands and related compounds. These models enable us to assess the BBB penetration of novel imidazoline ligands and exclude compounds with low permeability prior to synthesis.

Imidazoline derivatives have been also found to have other important biological effects not related to cardiovascular regulation, such as control of apoptosis and cell proliferation. Recently, *in vitro* study demonstrated that rilmenidine (strong I₁-IR agonist) is capable of inducing apoptosis in cancer cell lines (K562), oppositely to moxonidine (moderate I₁-IR agonist) and efaroxan (I₁-IR partial agonist), probably through acting on I₁-IR candidate, nischarin.

In this dissertation, which extends the previous investigation on the nischarin–rilmenidine binding site, we aimed at understanding proapoptotic activity of rilmenidine. We sought to identify novel compounds with rilmenidine-like activity and mechanism of action, but with different chemical structure. Virtual Screening protocol that includes AQVN calculations accounting for the long-range properties of organic molecules and combined ligand- and structure-based virtual screening protocols based on GRID MIF similarities between tested compounds and the templates (rilmenidine or active center of nischarin) were applied.

Among eleven prospective candidates that stemmed from the *in silico* screening experiments, compound 5 was found to be the most active derivative with cytotoxic activity against K562 cells comparable to that of rilmenidine. Consistently with the observed apoptosis, the flow cytometric analysis of cell cycle progression showed an increase in the proportion of K562 cells in the sub-G1 phase, complemented with decreased proportions of cells in G1, S and G2/M. Apart from proapoptotic effect, the antiproliferative effect of compound 5 was assessed. It has been shown that compound 5 inhibits the formation of K562 colony in a dose-dependent manner.

In addition, none of the identified eleven compounds showed any detectable agonist activity at recombinant human α_2A -adrenoceptors, suggesting that unwanted side effects mediated by the activation of this receptor may be avoided.

Previously, we have also shown that rilmenidine rendered K562 cells, which are particularly resistant to chemotherapeutic agents, susceptible to the DNA damaging drug doxorubicin. In this dissertation, combined treatment with compound 5 and doxorubicin showed synergistic increases in apoptosis compared to doxorubicin alone (64% vs 20%), which highlighted the potential of compound 5 or its derivatives to complement conventional chemotherapeutic regimens through improved antitumor efficacy and possibly reduced side effects.

The integrated medicinal chemistry study herein reported provides biologists and pharmacologists with a novel tool (compound 5) that may represent a promising starting point for the exploration of the I1-IR pathway and for the development of better adjuvant chemotherapeutic strategies for cancers with limited susceptibility to doxorubicin-like agents.

It has been known so far that apart from imidazoline receptors, imidazolines interact with G-protein coupled receptors (GPCRs) as well. Based on that fact, one of the aims of this dissertation was to identify novel '*off targets*' of this group of compounds as well as compound 5. Beta adrenergic, dopamine and muscarinic receptors have been selected as potential '*off targets*' for several α -adrenergic/imidazoline receptor ligands including BDF6143, BU224, BU226, xylometazoline and compound 5. Obtained results could be very useful in understanding the potential side effects of these drugs or in finding their novel therapeutic applications.

LISTA SKRAĆENICA

ABC - *ATP Binding Cassete*

ANNs - *Artificial Neural Networks* (veštačke neuronske mreže)

α_2 -AR - α_2 -adrenergički receptori

AQVN- *Average Quasivalence Number* (srednji kvazivalentni broj)

AUROC - *Area Under the ROC Curve*

B-CK - *Brain Cretaine Kinase* (kreatin kinaza mozga)

BBMEC - *Primary Bovine Brain Microvessel Endothelial Cells* (mikrovaskularne endotelne ćelije goveđeg mozga)

BMC - *Biopartitioning Micellar Chromatography* (bioparticiona micelarna hromatografija)

CHO - *Chinese Hamster Ovary* (ćelije jajnika kineskog hrčka)

CI - *Connectivity Indices* (indeks povezivanja)

CI - *Combination Index* (kombinacioni indeks)

CMC - *Critical Micellar Concentracion* (kritična micelarna koncentracija)

CML - *Chronic Myeloid leukemia* (hronična mijeloidna leukemija)

CNS - centralni nervni sistem

CSF - *Cerebrospinal Fluid* (cerebrospinalna tečnost)

DFT - *Density Functional Theory* (teorija funkcionala gustine)

EIIP - *Electron-Ion Interaction Potential* (potencijal elektron-jon interakcija)

FAK - *Focal Adhesion Kinase* (fokalna adheziona kinaza)

FBS - *Fetal Bovine Serum* (goveđi fetalni serum)

FCS - *Fetal Calf Serum* (teleći fetalni serum)

GPCR - *G Protein Coupled Receptor* (G-protein kuplovani receptor)

HBA – *Hydrogen Bond Acceptor* (akceptor vodoničnih veza)

HBD – *Hydrogen Bond Donor* (donor vodoničnih veza)

HM – homologni model

HOMO - *Highest Occupied Molecular Orbital* (najviša popunjena molekulska orbitala)

I-IR – imidazolinski receptori

IAM - *Immobilized Artificial Membrane Chromatography* (hromatografija sa imobilisanim veštačkim membranama)

IM – imatinib

IRAS - *Imidazoline Receptor Antisera-Selected Protein* (imidazolinski receptor selektovan antiserumom)

KMB - krvno-moždana barijera

LBVS - *Ligand-Based Virtual Screening* (virtuelni skrining zasnovan na ligandu)

LIMK 1 - *LIM domain kinase 1* (LIM domen kinaza 1)

LKB 1 - *Liver Kinase B 1* (kinaza jetre B1)

LOO - *Leave-One-Out*

LUMO - *Lowest Unoccupied Molecular Orbital* (najniža popunjena molekulska orbitala)

LV - latentne varijable

MAO-B - *Monoamine Oxidase-B* (monoamino oksidaza B)

MAPK - *Mitogen-Activated Protein Kinase* (mitogenom-aktivirane protein kinaze)

MDCK - *Mardin-Darby Canine Kidney* (Madin-Darby ćelije psećeg bubrega)

MDR1 - *Multidrug Resistance protein 1*

MIF - *Molecular Interaction Fields* (molekulska interakciona polja)

MLP - *Multilayer Perceptrons* (višeslojni perceptron)

MLR - *Multiple Linear Regression* (multipla linearna regresija)

MW - *Molecular Weight* (molekulska težina)

mTOR - *mammalian Target Of Rapamycin* (target rapamicina kod sisara)

OPLS - *Optimized Potentials for Liquid Simulations*

P-gp - P-glikoprotein

PAK 1 - *p21 Activated Kinase 1* (p21 aktivirana kinaza)

PAMPA - *Parallel Artificial Membrane Permeability Assay* (test permeabilnosti na veštačkim paralelnim membranama)

PBL - *Porcine Polar Brain Lipid* (polarni lipidi mozga svinje)

PC – *Phosphatidylcholine* (fosfatidinholin)

PC 12 - *Rat Pheochromocytoma Cells* (ćelije feohromocitoma pacova)

PCA – *Principal Component Analysis* (analiza glavnih komponenti)

PE - lipofosfolipidi

PI - *Phosphatidylinositol* (fosfatidilinozitol)

PI3P - *Phosphatidylinositol 3-phosphate* (fosfatidilinozitol 3-fosfat)

PKC - *Protein Kinase C* (protein kinaza C)

PLC - *Phosphatidylcholine-sensitive Phospholipase C* (fosfatidilholin-osetljiva fosfolipaza C)

PLS - *Partial Least Squares* (metoda najmanjih kvadrata).

PRESS - *Predicted Residual Sum of Squares*

PS – *Phosphatidylserine* (fosfatidilserin)

PSA - *Polar Surface Area* (polarna površina molekula)

PVDF - *Polyvinylidene Fluoride*

QSAR - *Quantitative Structure –Activity Relationship* (kvantitativni odnos strukture i aktivnosti)

QSPR - *Quantitative Structure – Property Relationship* (kvantitativni odnos strukture i osobina)

RBF - *Radial Basis Function* (funkcija radijalne raspodele)

RBN - *Number of Rotatable Bonds* (broj rotirajućih veza)

RMSEE - *Root Mean Square Error of Estimation* (srednja kvadratna greška procene)

RMSEP - *Root Mean Square Error of Prediction* (srednja kvadratna greška predviđanja)

RMSD - *Root-Mean-Square Deviation*

RP-HPLC – *Reversed Phase High-Performance Liquid Chromatography* (reverzno fazna hromatografija visokih performansi)

RVLM - *rostral ventrolateral medulla* (rostralno ventrolateralna medula)

SBVS - *Structure-Based Virtual Screening* (virtuelni skrining zasnovan na strukturi proteina)

SCF - *Self Consistent Field Energy*

SVM - *Support Vector Machine* (metoda podržavajućih vektora)

TMS - tetrametilsilan

TKI - inhibitori tirozin kinaze

VIP - *Variable Importance for the Projection*

VS – *Virtual Screening* (virtuelni skrining)

SADRŽAJ

1	UVOD	1
1.1	IMIDAZOLINSKI RECEPTORI I LIGANDI IMIDAZOLINSKIH RECEPTORA ...	2
1.1.1	I ₁ – imidazolinski receptori i ligandi ovog podtipa receptora.....	2
1.1.2	I ₂ – imidazolinski receptori i ligandi ovog podtipa receptora.....	4
1.1.3	I ₃ – imidazolinski receptori i ligandi ovog podtipa receptora	5
1.1.4	Hronična mijeloidna leukemija i antutumorska aktivnost liganada imidazolinskih receptora u K562 ćelijskoj liniji	7
1.1.5	Imidazolinski I ₁ receptor, NISHARIN.....	11
1.1.6	Uloga Imidazolinskog I ₁ receptora, Nisharina, u hipertenziji.....	14
1.1.7	Uloga Imidazolinskog I ₁ receptora , Nisharina, kao tumor supresora	14
1.1.8	Terapeutski značaj nisharina	16
1.2	KRVNO-MOŽDANA BARIJERA I ISPITIVANJE PERMEABILNOSTI KROZ KMB	17
1.2.1	Krvno-moždana barijera.....	17
1.2.2	Prisustvo transportera u KMB	19
1.2.3	Metode za procenu KMB permeabilnosti.....	20
1.3	FORMIRANJE, PROCENA KVALITETA I VALIDACIJA QSPR MODELA.....	29
1.3.1	Molekulski deskriptori	30
1.3.2	Odabir odgovarajućih deskriptora	31
1.3.3	Multipla linearna regresija.....	31
1.3.4	Metoda parcijalnih najmanjih kvadrata.....	31
1.3.5	Veštačke neuronske mreže (ANN).....	32
1.3.6	Metoda podržavajućih vektora (SVM).....	34
1.3.7	Validacija QSPR modela.....	35
1.3.8	Interna validacija	35
1.3.9	Eksterna validacija	37
1.4	VIRTUELNI SKRINING	37
1.4.1	Metode <i>in silico</i> identifikovanja novih bioloških targeta liganada (eng. <i>off-targets</i>)	39
2	CILJ	41
3	EKSPERIMENTALNI DEO.....	44

3.1	Opšti podaci.....	44
3.1.1	Hemikalije i reagensi.....	44
3.1.2	Oprema	46
3.1.3	Računarski programi	48
3.2	Procena permeabilnosti kroz krvno-moždanu barijeru primenom PAMPA testa	49
3.2.1	Priprema rastvora	49
3.2.2	Izvođenje PAMPA testa	50
3.2.3	Hromatografske metode određivanja koncentracija ispitivanih jedinjenja	51
3.2.4	Izračunavanje PAMPA parametara	51
3.2.5	Odabir dominantnih tautomernih oblika i optimizacija jedinjenja.....	52
3.2.6	Molekulski deskriptori	53
3.2.7	QSPR modelovanje	53
3.3	Procena permeabilnosti kroz krvno-moždanu barijeru primenom bioparticione micelarne hromatografije (BMC).....	54
3.3.1	Priprema rastvora	54
3.3.2	Određivanje optimalnog sadržaja metanola u mobilnoj fazi BMC sistema	55
3.3.3	Izvođenje BMC ispitivanja.....	56
3.3.4	Optimizacija jedinjenja i izračunavanje molekulskih deskriptora.....	56
3.3.5	QSPR modelovanje	56
3.4	Procena lipofilnosti primenom reverzno-fazne tečne hromatografije (RP-HPLC)	57
3.4.1	Priprema rastvora	57
3.4.2	Izvođenje RP-HPLC ispitivanja	57
3.5	Kombinovani VS protokol zasnovan na ligandu i strukturi proteina za identifikaciju novih liganada imidazolinskih (I ₁) receptora	58
3.5.1	Set jedinjenja	58
3.5.2	Heminformatički skrining	58
3.5.3	Virtuelni skrining zasnovan na ligandu i strukturi proteina	59
3.6	Sinteza	61
3.6.1	Opsta procedura za sintezu jedinjenja 2a-d	62
3.6.2	Opsta procedura za sintezu jedinjenja 3a-i	62
3.6.3	Opsta procedura za sintezu jedinjenja 5 i 7	62
3.7	Procena afiniteta na α_2 -adrenergičkim receptorima	63
3.7.1	Ćelijska kultura	63
3.7.2	Priprema membrane	63
3.7.3	Test vezivanja [³⁵ S]GTP γ S.....	64

3.7.4	Testovi kompetitivnog vezivanja	64
3.8	Ispitivanje antiproliferativne i proapoptotske aktivnosti	65
3.8.1	Ćelijska kultura	65
3.8.2	Ispitivanje citotoksičnosti i kombinacioni index (eng. <i>Combination Index</i> , CI)	65
3.8.3	Citometrijska analiza apoptoze ćelija	66
3.8.4	Ispitivanje specifičnosti antitumorskog dejstva	67
3.9	Predviđanje novih bioloških targets (<i>off target-a</i>) za ligande imidazolinskih receptora	68
3.9.1	Priprema seta jedinjenja	68
3.9.2	Priprema proteina	71
3.9.3	<i>In silico</i> doking	71
4	REZULTATI I DISKUSIJA	73
4.1	<i>In silico</i> predviđanje afiniteta ispitivanih jedinjenja za P-gp	74
4.2	Farmakokinetički parametri penetracije kroz KMB	74
4.3	Određivanje stepena permeabilnosti kroz krvno-moždanu barijeru PAMPA metodom	77
4.3.1	PAMPA rezultati	77
4.3.2	QSPR analiza PAMPA rezultata	81
4.4	Određivanje permeabilnosti kroz krvno-moždanu barijeru BMC i RP-HPLC	93
4.4.1	QSPR studija	97
4.4.2	Tumačenje izabranih QSPR modela	99
4.5	VIRTUELNI SKRINING	102
4.5.1	Heminformatički skrining	102
4.5.2	Virtuelni skrining zasnovan na ligandu i strukturi proteina	105
4.6	Sinteza selektovanih hit jedinjenja	109
4.7	Određivanje afiniteta vezivanja liganada na humanim α_{2A} adrenergičkim receptorima	114
4.8	Ispitivanje citotoksičnosti	116
4.8.1	Ispitivanje specifičnosti antitumorskog dejstva jedinjenja 5 na K562 ćelijama	118
4.8.2	Sinergističko delovanje jedinjenja 5 i doksorubicina na K562 ćelije	119
4.9	Potencijalno novi targeti (<i>off-target-i</i>) liganada α_2 -adrenergičkih i/ili imidazolinskih receptora	120
5	ZAKLJUČAK	125
6	LITERATURA	129

1 UVOD

1.1 IMIDAZOLINSKI RECEPTORI I LIGANDI IMIDAZOLINSKIH RECEPTORA

Imidazolini predstavljaju veliku grupu biološki aktivnih jedinjenja koja imaju široku terapijsku primenu. Ova heterogena grupa liganada svoju aktivnost ostvaruje delovanjem na imidazolinske receptore (I-IR) i na α_2 -adrenergičke receptore (α_2 -AR).¹⁻⁴ Brojnim biohemijskim i fiziološkim studijama do danas su identifikovana tri tipa imidazolinskih receptora:^{5,6}

- I₁-imidazolinski receptori (I₁-IR)
- I₂-imidazolinski receptori (I₂-IR)
- I₃-imidazolinski receptori (I₃-IR).

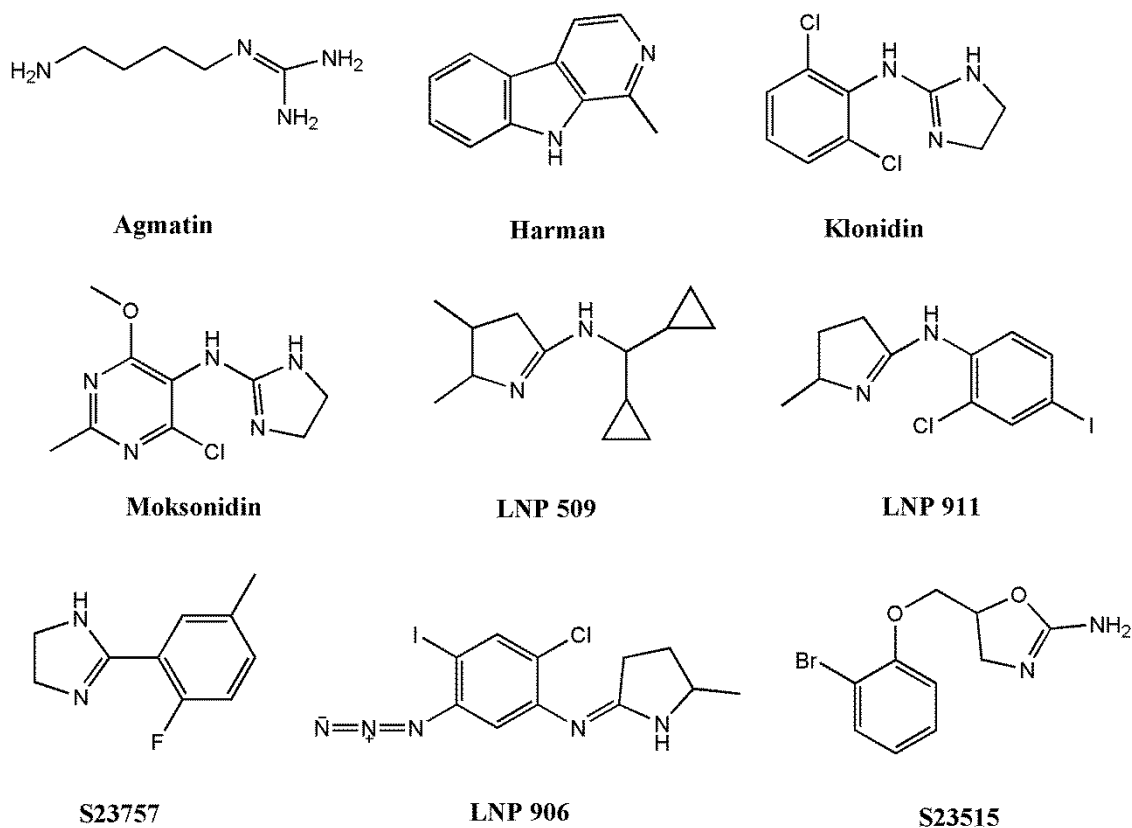
Ovi receptori su prisutni i u centralnom i u perifernom nervnom sistemu i zastupljeni su u različitim organima kao što su bubreg, stomak, prostata, pluća i srce. Imidazolinski receptori su uključeni u regulaciju nekoliko bioloških sistema, pri čemu je glavni centralna regulacija krvnog pritiska.^{2,7}

Prema imidazolinskoj hipotezi antihipertenzivni efekat lekova kao što su klonidin, moksonidin i rilmenidin je rezultat aktivacije I₁-imidazolinskih receptora i α_2 -adrenergičkih receptora u rostralno ventrolateralnoj meduli (RVLM).^{8,9} Takođe, uočena je pozitivna korelacija između hipotenzivnog efekta ovih lekova i njihovog afiniteta za I₁-imidazolinske receptore, dok su neki od njihovih neželjenih efekata, kao što su sedacija i suvoća usta, posredovani α_2 -adrenergičkim receptorima u plavom jedru (lat. *Locus coeruleus*).^{4,10-12} Pored regulacije krvnog pritiska imidazolinski receptori takođe imaju ulogu u sekreciji insulina^{13,14}, regulaciji intraokularnog pritiska¹⁵ i kontroli srčanog ritma.^{16,17}

1.1.1 I₁ – imidazolinski receptori i ligandi ovog podtipa receptora

Prvi podtip imidazolinskih receptora, I₁-imidazolinski receptor, je identifikovan korišćenjem radioliganada [³H]-*p*-NH₂-klonidina i [³H]-klonidina.¹⁸ Kao što je već pomenuto ovaj podtip receptora je lokalizovan u rostralno ventrolateralnoj meduli i uključen je u centralnu regulaciju kardiovaskularnog pritiska.¹⁹ Smatra se da su agmatin^{20,21} i harman²² endogeni ligandi ovog podtipa receptora (**Slika 1**).

I₁-imidazolinski receptori pokazuju visok afinitet za klonidin, moksonidin i rilmenidin, ali ne i za kateholamine.²³ Klonidin (**Slika 1**) je prvi identifikovani I₁-IR ligand koji pokazuje antihipertenzivnu aktivnost. Pokazano je da se ovo jedinjenje vezuje istim afinitetom i za I₁-imidazolinski receptor i za α_2 -adrenergički receptor i da njegovi neželjeni efekti, pre svega sedacija, nastaju usled aktivacije adrenergičkog sistema.¹² Daljim strukturnim modifikacijama klonidina nastali su moksonidin i rilmenidin, kao potentniji i selektivniji I₁-IR ligandi.²⁴ Shodno tome, oni pokazuju manje neželjenih efekata od klonidina.^{25,26} Pored navedenih jedinjenja koja se nalaze u terapiji, otkriće visoko selektivnih I₁-IR liganada, kao što su *cis*-/*trans*-diciklopropilmetil-(4,5-dimetil-4,5-dihidro-3H-pirol-2-il)-kamin (LNP 509), 2-(2-hloro-4-jodofenilamino)-5-metil-pirolin (LNP 911),²⁷ 2-(5-azido-2-hloro-4-jodo-fenilamino)-5-metil-pirolin (LNP 906),²⁸ (+)-5-(2-bromofenoksi)-metil-2-amino-4,5-dihidro-1,3-oksazol (S23515),²⁹ (+)-2-(2-fluoro-5-metilfenil)-4,5-dihidro-1H-imidazol (S23757),²⁹ omogućava karakterizaciju I₁-IR subtipa čak i u ćelijama koje eksprimiraju takođe α_2 -AR ili I₂-IR (**Slika 1**).



Slika 1. Ligandi I₁-imidazolinskih receptora

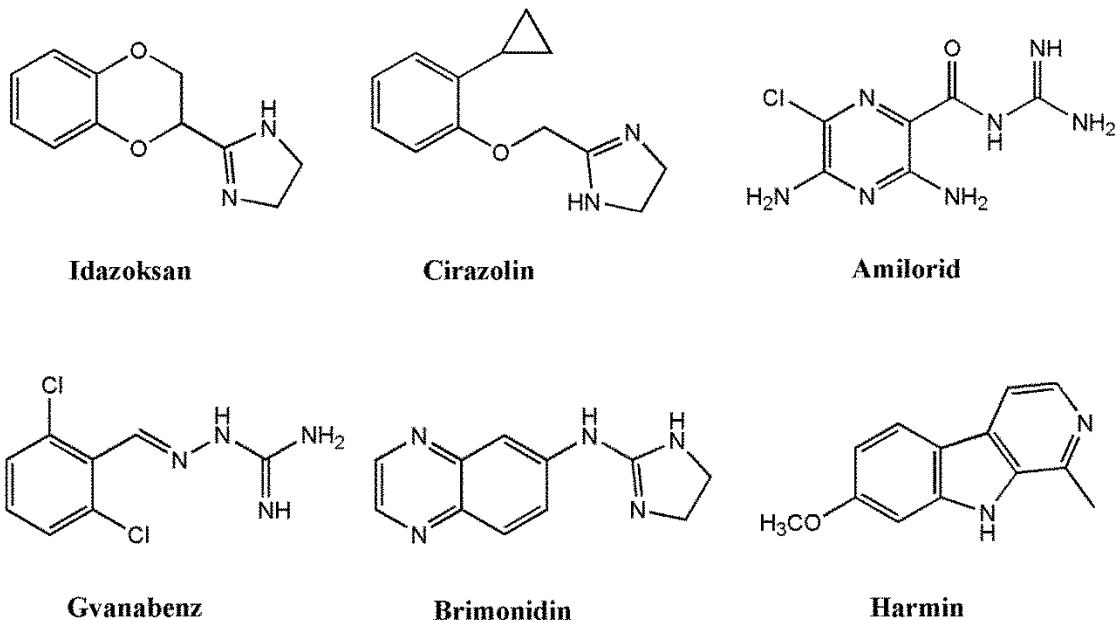
Nedavno je pokazano da su I₁-imidazolinski receptori prisutni takođe i u masnom tkivu, gde selektivno aktiviranje ovog podtipa receptora ne samo da smanjuje krvni pritisak nego ima i pozitivan uticaj na regulisanje poremećaja metabolizma koji su povezani sa hipertenzijom (metabolički sindrom).³⁰

Aktiviranje fosfatidilholin-osetljive fosfolipaze C (eng. *phosphatidylcholine-sensitive phospholipase C-PLC*)³¹⁻³³ i inhibicija adenilat ciklaze³⁴ su dva glavna signalna transdukciona mehanizma povezana sa aktivacijom I₁-imidazolinskih receptora. Određeni I₁-IR ligandi deluju kao agonisti tako što aktiviraju oba transdukciona signalna puta (rilmenidin i benazolin), kao parcijalni agonisti tako što aktiviraju samo jedan transdukcioni put (efaroksan) ili kao antagonisti tako što blokiraju oba transdukciona puta (S23757).³⁴ Aktivacijom I₁-imidazolinskih receptora agonistima takođe dolazi i do povećane fosforilacije mitogenom-aktiviranih protein kinaza (MAPK1 i MAPK3) u rostralno ventrolateralnoj meduli neurona što takođe dovodi do sniženja krvnog pritiska,^{33,35} konverzije ekstracelularnim signalom regulisanih kinaza (ERK1 i ERK2) i c-jun kinaza u njihove aktivne forme,^{33,36} aktiviranja izoformi protein kinaze C (eng. *protein kinase C-PKC*),^{36,37} oslobađanja arahidonske kiseline i prostaglandina E₂³⁸ i povećanja ekspresije mitogenom-aktivirane protein kinaze 2³⁷ i feniletanolamin-N metil transferaze.³⁹

1.1.2 I₂ – imidazolinski receptori i ligandi ovog podtipa receptora

I₂-imidazolinski receptori su identifikovani uz pomoć [³H]-idazoksana. Ovi proteini su lokalizovani na spoljašnjoj membrani mitohondrija i uglavnom se nalaze u glija ćelijama, tromocitima, jetri i adipocitima.⁴⁰ I₂-imidazolinski receptori predstavljaju katalitičko mesto monoamino oksidaze B (MAO-B) i drugih ne-MAO oksidativnih enzima i podeljeni su na dva subtipa I_{2A} i I_{2B} na osnovu njihovog afiniteta (visokog ili niskog) ka amiloridu.^{41,42} Sekvenca ovog proteina pokazuje značajan stepen homologije sa MAO enzimom i smatra se da ovaj tip receptora ima ulogu u neuroprotekciji, analgeziji, odgovoru na stres i nastanku konvulzija. Takođe, zna se da su ovi receptori uključeni u patofiziologiju Parkinsonove, Huntington-ove i Alzheimer-ove bolesti.⁴³⁻⁴⁵ Istraživanja su pokazala da kreatin kinaza mozga (eng. *Brain Creatine Kinase*, B-CK) sadrži I₂ imidazolinsko vezujuće mesto što značajno doprinosi razvoju novih lekova za lečenje psihijatrijskih poremećaja.⁴⁶

I₂-imidazolinski receptori pokazuju visok afinitet za gvanidine i imidazoline, a nizak afinitet za 2-aminoimidazoline.⁴² Najpoznatiji ligandi ovog podtipa imidazolinskih receptora su idazoksan, amilorid, gvanabenz, brimonidin i harmin (**Slika 2**).



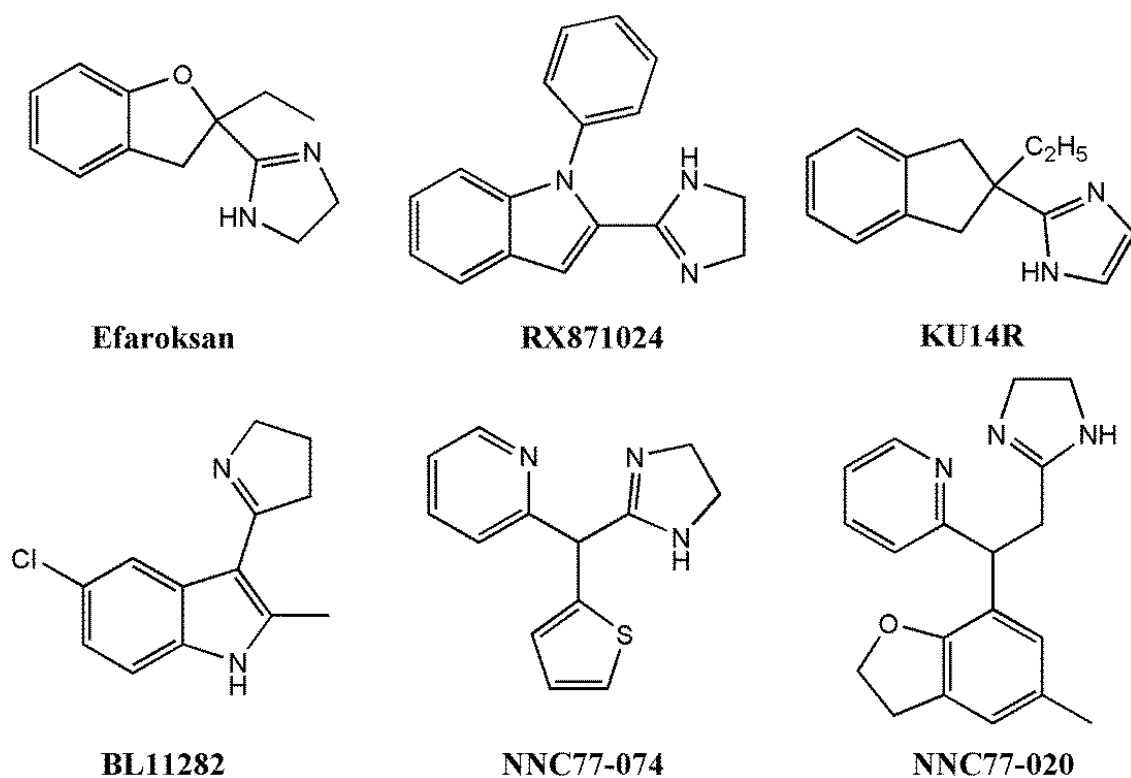
Slika 2. Ligandi I₂-imidazolinskih receptora

1.1.3 I₃ – imidazolinski receptori i ligandi ovog podtipa receptora

I₃-IR imaju ulogu u indukciju sekrecije insulina iz β -ćelija pankreasa i održavanju homeostaze glukoze.^{1,47,48} Insulotropno delovanje imidazolina posredovano I₃ receptorima se pripisuje isključivo zatvaranju ATP-osetljivih kalijumskih kanala (K_{ATP}) koji dovode do depolarizacije membrane, influksa kalcijuma i oslobađanja insulina.⁴⁹ Međutim, pokušaji da se I₃-IR okarakterišu su bili neuspešni zbog nedostatka specifičnih radioliganada za ovaj podtip receptora. Farmakološke studije pokazuju da I₃-IR vezujuće mesto imidazolina možda leži u podjedinici K_{ATP} kanala koja formira pore i sprovodi jone.⁵⁰⁻⁵²

Efaroksan je selektivni I₃-IR agonista, dok je njegov imidazolni analog KU14R definisan kao I₃-IR antagonista (**Slika 3**).⁵³ Imidazolinski I₃-IR ligandi se dele na klasičnu grupu liganada (kao što je RX871024) koji izazivaju insulotropni efekat zatvaranjem K_{ATP} kanala pri normalnom ili povišenom nivou glukoze,⁵⁴ i ligande nove generacije (BL11282),⁵² NNC77-0074,⁵⁵ NNC77-0020⁵⁶ (**Slika 3**) koji pokazuju glukozom zavisnu

insulotropnu aktivnost bez efekta na K_{ATP} kanale.^{52,54,57} Smatra se da jedinjenje NNC77-0074 inhibira sekreciju glukagona iz langerhansovih ostrvaca pacova modulacijom granula koje sadrže insulin i glukagon, dok NNC77-0020 utiče na sekreciju hormona pankreasa pri čemu stimuliše sekreciju insulina i somatostatina i inhibira oslobađanje glukagona.^{55,56}



Slika 3. Ligandi I₃-imidazolinski receptora

Osim navedenih, intenzivna istraživanja o imidazolinskim receptorima ukazuju i na druge primene imidazolinskih liganada kao što su:

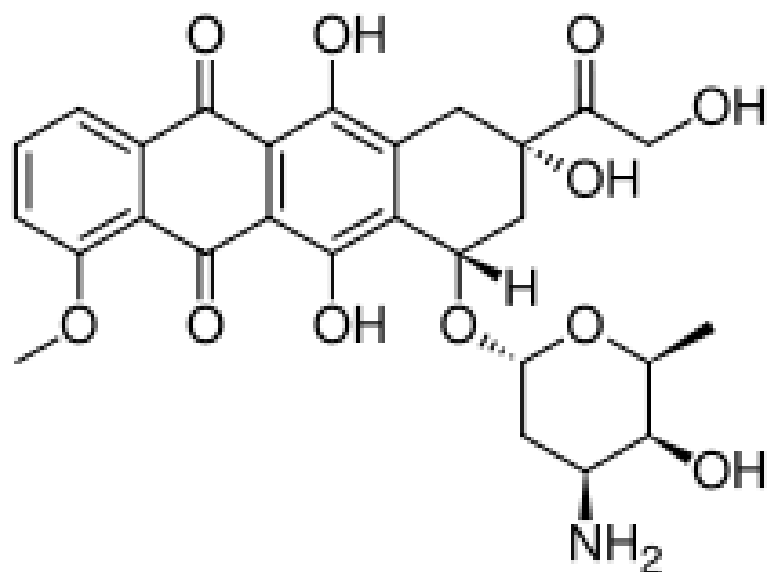
- lečenje različitih vrsta tumora^{31,32,58-60}
- prevencija relapsa simptoma kokainske adicije upotrebom I₁ agonista⁶¹
- I₂ ligandi imaju modulatorni efekat na analgeziju indukovanu upotrebom opioida⁶²
- dijagnostifikovanje glioma upotrebom I₂-IR liganada⁶³

1.1.4 Hronična mijeloidna leukemija i antutumorska aktivnost liganada imidazolinskih receptora u K562 ćelijskoj liniji

Hronična mijeloidna leukemija (eng. *Chronic myeloid leukemia*, CML) je maligni poremećaj hematopoetskih matičnih ćelija koji se karakteriše fuzijom skraćenog Bcr gena (hromozom 22) u sekvence c-Abl gena (hromozom 9), pri čemu nastaju himerni Bcr-Abl proteini sa konstantnom tirozin kinaznom aktivnošću. Glavni mehanizmi kojim ovi proteini dovode do maligne transformacije ćelije su smanjena apoptoza ćelija, nekontrolisana produkcija faktora rasta i izmenjena adhezija.⁶⁴

Uvođenjem imatiniba (IM) i drugih kompetitivnih inhibitora tirozin kinaza (TKI) indukovane su dugotrajne hematološke remisije kod pacijenata sa CML, čime je produžen njihov život.⁶⁵ Međutim, uprkos naprecima u efikasnosti terapije, lečenje pacijenata koji se nalaze u hroničnoj ili blastičnoj fazi CML je i dalje ograničeno.⁶⁶ Bcr-Abl kinaze pored toga što utiču na preživljavanje tumorskih ćelija, one čine ove ćelije otpornim na veliki broj lekova koji se koriste u lečenju leukemije. Ove kinaze inhibiraju apoptozu ćelija koja se javlja usled oštećenja DNK raznim lekovima, tako što produžavaju zaustavljanje ćelijskog ciklusa u G2/M fazi. Ovaj arest omogućava reparaciju i potpunu replikaciju genetskog materijala, i preživljavanja malignih ćelija.⁶⁷

K562, ćelijska linija blastične faze CML, je neosetljiva na apoptozu indukovanu IM i lekovima koji oštećuju DNK kao što je doksorubicin.⁶⁸ Doksorubicin (**Slika 4**), antraciklinski antibiotik i jedan od najefikasnijih antineoplastika, nalazi se u kliničkoj upotrebi više od 30 godina i ima značajnu ulogu u lečenju mnogih hematoloških kancera (leukemija i limfoma) i više vrsta čvrstih tumora (karcinoma i sarkoma).⁶⁹

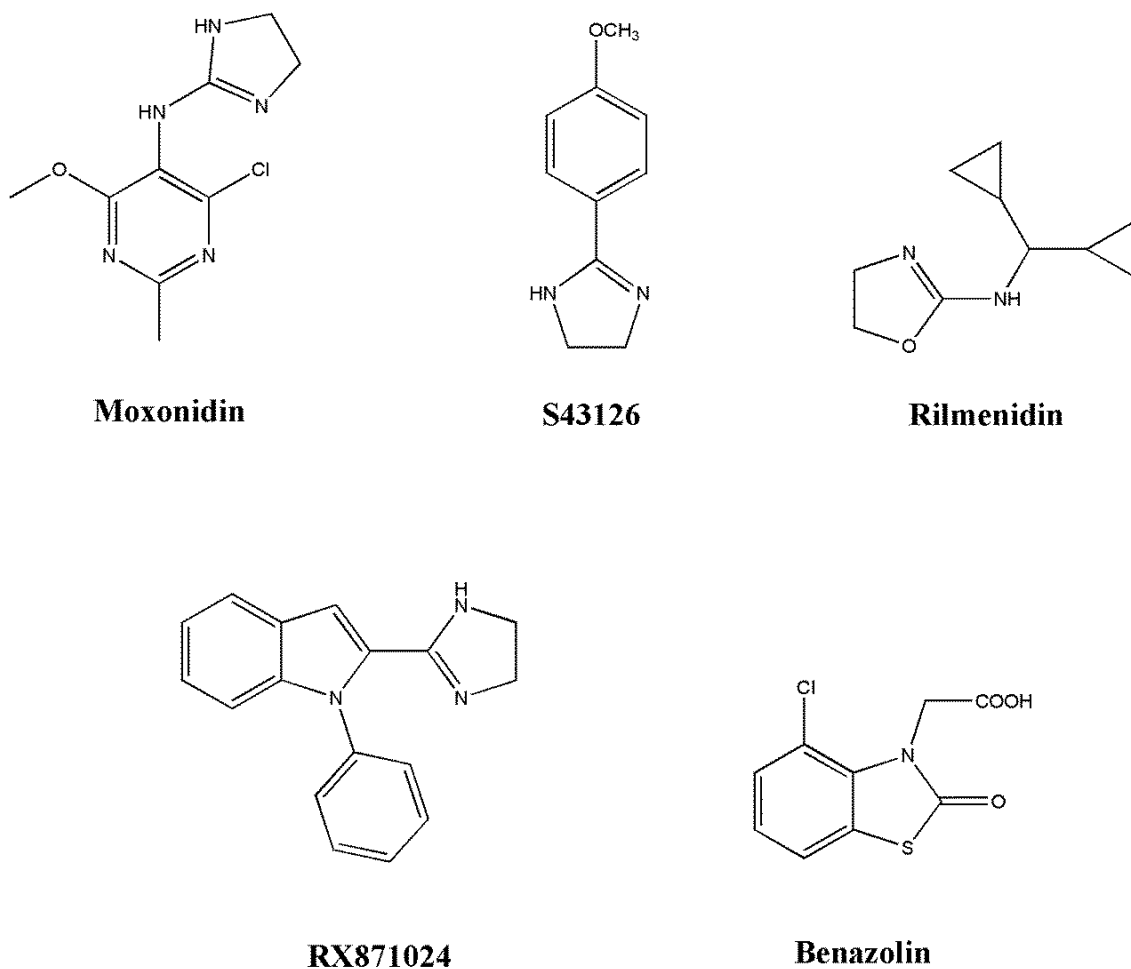


Slika 4. Antraciklinski antibiotik-doksorubicin

Međutim, upotreba doksorubicina u terapiji je ograničena zbog rizika od kardiotoksičnosti, koji zavisi od kumulativne doze i vremena doziranja leka. Da bi se izbegli ovi opasni neželjeni efekti maksimalna preporučena kumulativna doza doksorubicina je 500 mg/m^2 .⁷⁰ Pored toga, doksorubicin može da ispolji kardiotoksičnost i pri nižim dozama ako se primenjuje zajedno sa drugim antineoplastcima (npr. paklitaksel, transtuzumab). Ova kombinovana primena lekova dovodi do povećanja efikasnosti lečenja, ali se povećava rizik od kardiotoksičnost koja se u ovim kombinacijama može javiti i pri kumulativnoj dozi doksorubicina od $360\text{--}400 \text{ mg/m}^2$.^{71,72} Do danas je analiziran veliki broj kombinovanih terapija sa ciljem povećanja sinergističnih efekata lekova. Tako, nanočestice koje imaju inkapsulirani inhibitor angiogeneze-kombrestatin i doksorubicin su značajno efikasnije u inhibiranju rasta tumora nego kad bi se koristili pojedinačni lekovi.⁷³ Takođe, kombinovana primena doksorubicina i kurkumina značajno povećava apoptozu K562 ćelija.⁷⁴

Nedavno je utvrđeno da imidazolinski derivati pored kardiovaskularne regulacije, ispoljavaju i druge biološke efekte kao što su kontrola apoptoze i proliferacije ćelija. Nikolic i saradnici^{60,75} su ispitali antitumorski potencijal agonista i antagonista I_1 imidazolinskog receptora na K562 ćelijskoj liniji. Pokazano je da samo rilmenidin, koji je jak I_1 -IR agonista, pokazuje proapoptotsku aktivnost na ovom tipu ćelije, dok su moksonidin, umereno efikasni I_1 -IR agonista, i efaroksan, antagonist I_1 -IR, neaktivni.⁶⁰

Smatra se da rilmenidin inhibira rast K562 ćelija i dovodi do apoptoze kroz perturbaciju mitohondrijalnog puta. Ovaj lek značajno indukuje oštećenje membrane i deaktivira Ras/MAP kinazu ERK, p38 i JNK u K562 ćelijama.⁷⁵ Takođe, u ovoj studiji je pokazano da kombinovana primena rilmenidina i doksorubicina povećava stepen depolarizacije membrana, a samim tim i osetljivost K562 ćelija na apoptozu, kao i da rilmenidin svoju aktivnost ispoljava vezivanjem za nisharin i Rac1 signalni protein.⁷⁵ Uočeni sinergistički efekat je značajan jer kombinovana terapija ova dva leka znatno povećava procenat apoptičnih ćelija nego kada se koristi sam doksorubicin. Međutim, za razliku od doksorubicina, rilmenidin je bezbedan lek bez ozbiljnih neželjenih efekata čak i pri dozama mnogo većim od terapijskih.^{76,77}



Slika 5. Strukture imidazolinskih jedinjenja koja regulišu celularnu apoptozu i proliferaciju *in vitro*

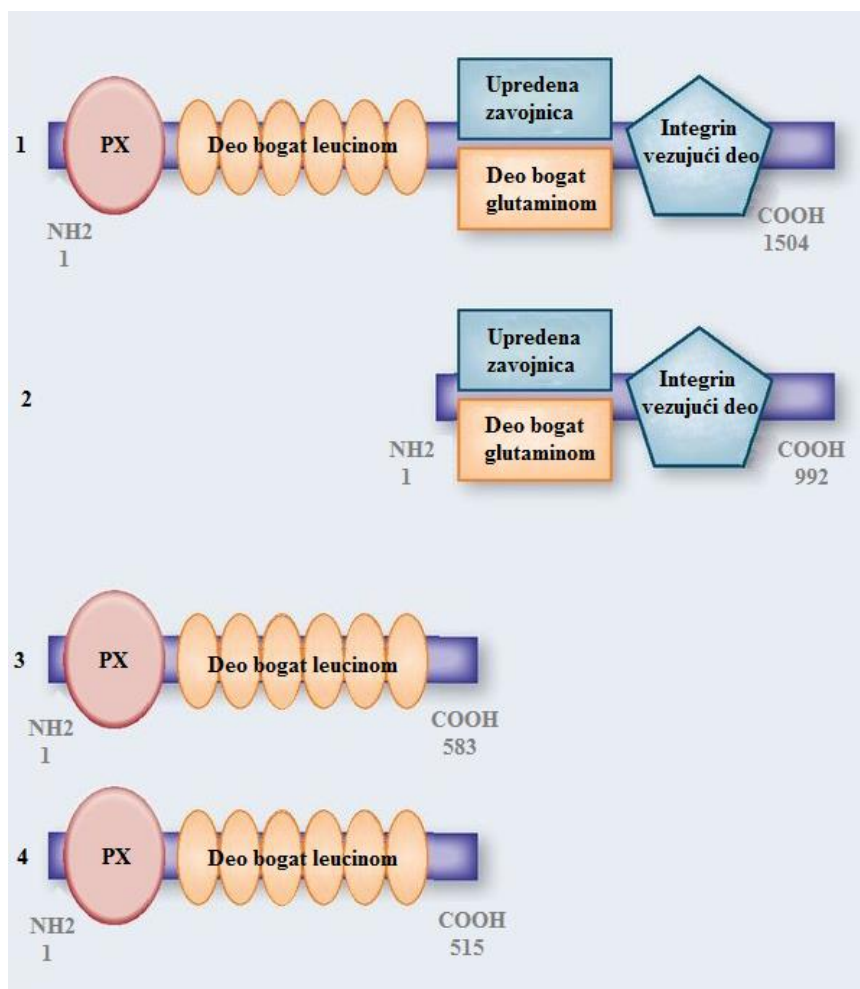
Pored studije sprovedene na K562 ćelijskoj liniji, pokazano je da imidazolinski antitumorsku aktivnost mogu ispoljiti i na drugim ćelijskim linijama. Zabeležena su proapoptotska dejstva moksonidina u fibroblastima i antiapoptotska u kardiomiocitima.⁵⁸ Takođe, *in vitro* studija na PC12 ćelijama je pokazala da benazolin, selektivni I₁ agonista, dovodi do apoptoze koja je izazvana deprivacijom seruma delujući na I₁-IR i PC-PLC transdukcionu put, ali i da inhibira ćelijsku smrt indukovanu TNF α .^{31,32} Imidazolinsko jedinjenje RX871024 indukuje smrt MIN6 ćelija koje luče insulin.⁷⁸ Drugi selektivni ligand I₁-IR, S43126, dovodi do dozno zavisne ćelijske smrti i formiranja apoptotskih tela u PC12 ćelijama nakon 72 h tretmana.⁵⁹ (Slika 5)

Ovi efekti ukazuju na potencijalne nove primene liganada imidazolinskih receptora u terapiji različitih maligniteta.

1.1.5 Imidazolinski I₁ receptor, NISHARIN

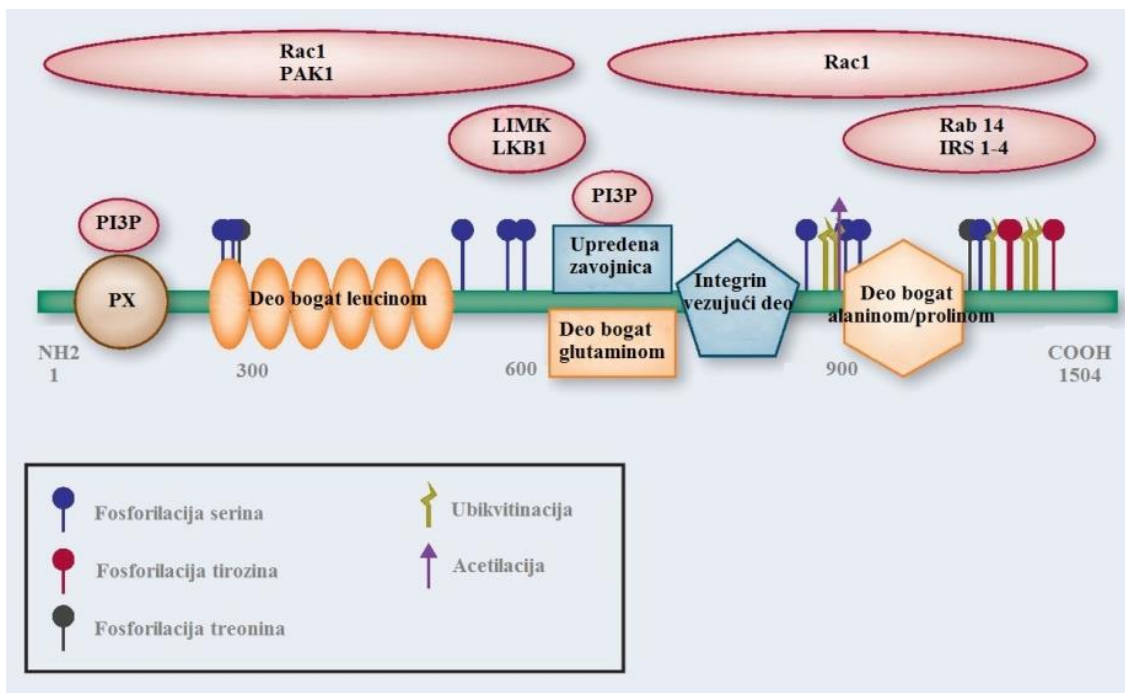
Alahari i saradnici su identifikovali i okarakterisali protein nisharin koji je kodiran *nisch* genom u ćelijama glodara.⁷⁹ Ubrzo nakon toga, otkriven je i humani homolog nisharina koji je nazvan Imidazolinski Receptor Selektovan Antiserumom (*eng. Imidazoline Receptor Antisera-Selected protein, IRAS*).⁸⁰ Pokazano je da ljudski nisharin-IRAS pokazuje 80% homologije sa nisharinom glodara, ali da su njihova integrin $\alpha 5$ -vezujuća mesta 100% identična.⁸⁰ Ovaj protein je kod ljudi prvo otkriven kao I₁-imidazolinski receptor, koji je eksprimiran u neuronima i astrocitima.^{80,81} Transfekcijom cDNK humanog IRAS-a u ćelije jajnika kineskog hrčka (*eng. Chinese Hamster Ovary-CHO*) i ćelije feohromocitoma pacova (*eng. Rat Pheochromocytoma Cells-PC 12*) gen ovog proteina je kloniran i dobijena su visokoafinitetna vezujuća mesta I₁ receptora.^{79,80}

Nisharin je citosolni protein koji se vezuje za unutrašnji sloj plazma membrane, i dokazano je da interaguje i sa citosolnim i sa proteinima membrane.⁷⁹ Ljudski Nisharin postoji u četiri izoforme.⁸² Izoforma 1 kodira protein u punoj dužini (1504 amino kiseline) i visoko je eksprimirana u nervnom i endokrinom tkivu. Kod izoforme 2 amino kiseline 1-511 su izostavljene i ova forma je eksprimirana u mozgu. Izoforma 3, poznata kao IRAS-L, je takođe visoko eksprimirana u mozgu. Ovoj formi nedostaju amino kiseline 584-1504, dok su sekvence amino kiselina 511-583 modifikovane. Izoforma 4, takođe poznata kao IRAS-S, je visoko eksprimirana u mozgu, ima izostavljene amino kiseline 516-1504, dok su amino kiseline 512-515 izmenjene (**Slika 6**).



Slika 6. Strukturni domeni humanog nisharina koji postoji u 4 izoforme⁸³

Struktura domena nisharina je prikazana na **Slici 7**. N-terminalni kraj ovog proteina sadrži *phox* (PX) domen koji se sastoji od 11-121 amino kiseline i koji je neophodan za vezivanje nisharina za plazma membranu.⁸⁴ (**Slika 7**)



Slika 7. Struktura nisharina i moguće interakcije sa signalnim molekulima⁸³

PX domen kao i coiled-coil domen nisharina (634-695) su od suštinskog značaja za targetovanje endozoma i interakciju sa fosfatidilinozitol 3-fosfatom (eng. *Phosphatidylinositol 3-phosphate*, PI3P) u endozomima koji su obogaćeni ovim fosfolipidom.⁸⁴ Takođe, dokazano je da i drugi regioni nisharina interaguju sa signalnim molekulima. Domen nisharina 1-624 snažno interaguje sa p21 aktiviranom kinazom (PAK) i na taj način sprečava migraciju ćelija.⁷⁹ Pozicije 416-624 nisharina interaguju sa LIM domen kinazom 1 (eng. *LIM domain kinase 1*, LIMK 1) čime se sprečava reorganizacija citoskeleta.⁸⁵ Kinaza jetre B1 (eng. *Liver Kinase B1*, LKB1) interaguje sa pozicijama 416-624 nisharina i tako sprečava progresiju kancera.⁸⁶ Pored toga, Rab14 i supstrati insulinskog receptora interaguju sa c-terminalnim domenom nisharina.^{87,88}

Do danas najviše su najviše izučavane interakcije nisharina sa $\alpha 5$ integrinima. Integrini su ćelijski adhezioni heterodimeri koji imaju glavnu ulogu u transmitovanju signala od spoljašnosti membrane do untrašnjosti ćelije, i obrnuto. Ekstracelularni signali pokreću signalne kaskade koje modulišu ćelijsko ponašanje poput remodelovanja citoskeleta. Pokazano je da proksimalni deo integrin $\alpha 5$ subjedinice interaguje sa nisharinom i inhibira ćelijsku migraciju.^{79,89}

1.1.6 Uloga Imidazolinskog I₁ receptora, nisharina, u hipertenziji

U PC12 ćelijama, hipotenzija indukovana aktiviranjem I₁ receptora zavisi od nisharina koji generiše pERK1 i pERK2 nivoe.⁹⁰ Rilmenidin, lek koji se koristi u terapiji hipertenzije, ispoljava hipotenzivne efekte povećanjem produkcije pERK1/2 u RVLM. Centralna primena rilemenidina imala je oslabljen hipotenzivni efekt i snižen nivo pERK1/2 kod pacova koji su imali redukovanu ekspresiju nisharina, u poređenju sa kontrolom.⁹⁰ Ova saznanja potvrđuju činjenicu da nisharin ima ulogu u pERK1/2 posredovanoj hipotenziji.

1.1.7 Uloga Imidazolinskog I₁ receptora , nisharina, kao tumor supresora

1.1.7.1 Nisharin kao tumor supresor kancera ovarijuma

Uočeno je da je ekspresija nisharina smanjena u ćelijama kancera ovarijuma.⁹¹ Smatra se da je stepen ekspresije ovog proteina povezan sa invazivnošću, stadijumom tumora, metastazama limfnih čvorova i histologijom tumora. Studije su pokazale da pacijenti sa karcinomom jajnika kod kojih je ekspresiran nisharin pokazuju veći stepen preživljavanja.⁹¹ Međutim, uloga nisharina u progresiji kancera ovarijuma je nedavno otkrivena i potrebna su dalja istraživanja da bi se razumeo mehanizam tumor supresivnog efekta nisharina u ovim malignim ćelijama.

1.1.7.2 Nisharin kao tumor supresor kancera dojke

Poznato je da nisharin kontroliše migraciju ćelija antagonizovanjem signalnih proteina.⁷⁹ Ovaj protein se nalazi na 3p21.1 hromozomu i zna se da su 3p regioni povezani sa razvojem velikog broja tumora. U 30% slučajeva raka dojke, malignim ćelijama nedostaje NISCH lokus i samim tim ekspresija nisharina je smanjena.⁹²

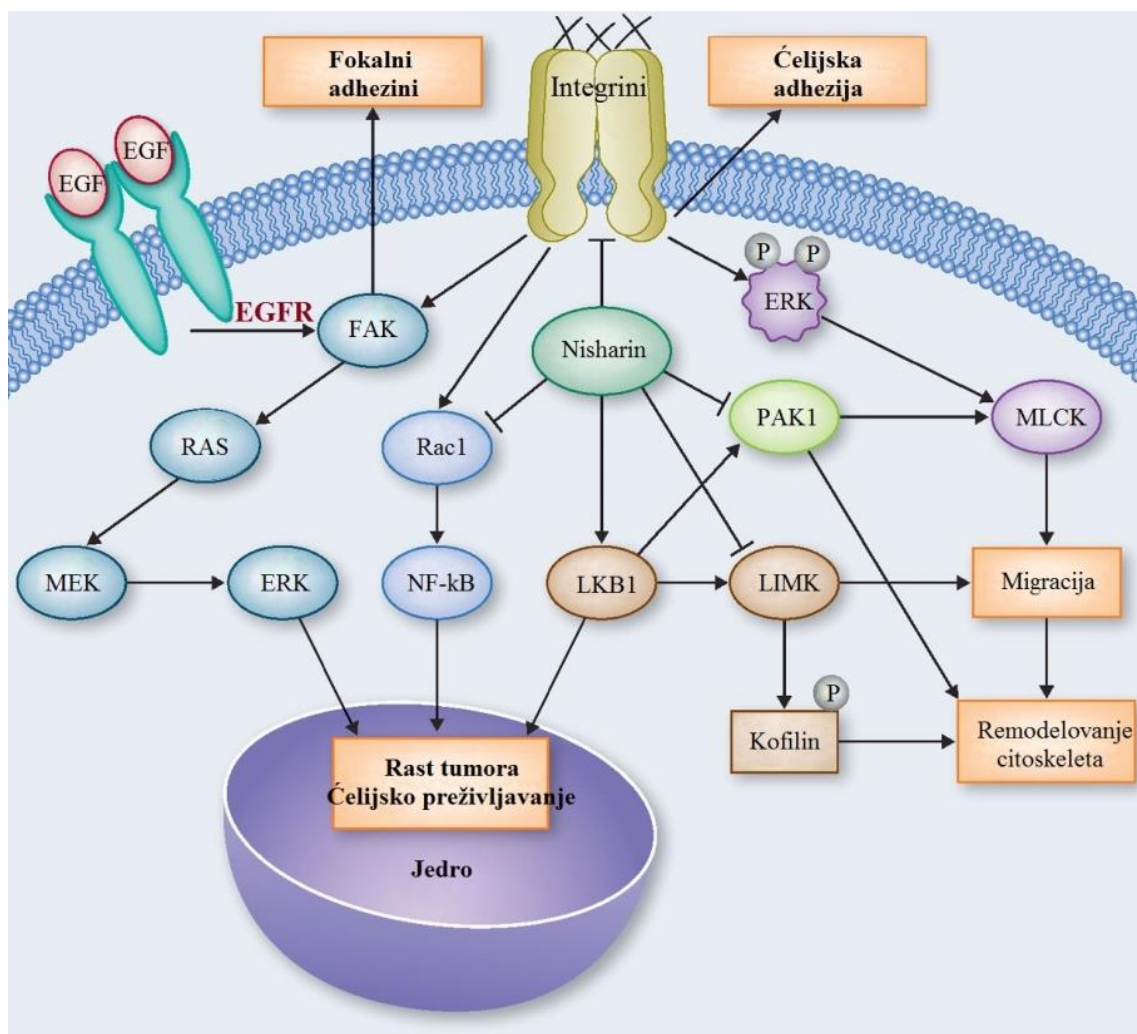
Gubitak nisharina ima značajnu ulogu u progresiji raka dojke. mRNK nisharina je visoko ekspresiran u normalnom tkivu dojke, dok je slabo ekspresiran u ćelijama raka dojke. Poznato je da visoko invazivne ćelijske linije raka dojke kao što je MDA-MB-231 pokazuju nizak nivo ekspresije nisharina, umereno invazivne ćelijske linije raka dojke kao što je MCF-7 pokazuju viši nivo ekspresije nisharina dok netumorske ćelije kao što je MCF-10A imaju najveći nivo ekspresije nisharina.⁹²

Povećanjem ekspresije nisharina u visoko invazivnim ćelijama raka dojke smanjuje se stepen fosforilacije fokalne adhezije kinaze (eng. *Focal Adhesion Kinase*,

FAK) usled smanjene ekspresije $\alpha 5$ -integrina.⁹² Redukovana FAK fosforilacija na taj način sprečava aktivaciju ERK, sto dovodi do smanjenog ćelijskog preživljavanja.⁹² Takođe, kod pacijenata sa tumorom dojke je pokazano da tkiva sa metastazama limfnih čvorova imaju značajno smanjene nivoe nisharina nego pacijenti bez metastaza limfnih čvorova.⁹³

1.1.7.3 Nisharin inhibira ćelijsku migraciju i invaziju

Utvrđeno je da nisharin interaguje sa nizom signalnih proteina (integrin $\alpha 5$, PAK1, LIMK1, Rab14, LKB1 i Rac1) i na taj način inhibira ćelijsku migraciju (Slika 8).



Slika 8. Uloga nisharina kao tumor supresora i moguće interakcije sa signalnim proteinima⁸³

Kinaza jetre B1, koju kodira gen LKB1, je tumor supresor koji reguliše metabolizam ćelije aktiviranjem mTOR (eng. *mammalian Target Of Rapamycin*) signalnog puta i ćelijsku migraciju.⁹⁴ Rac1 je član familije Rho GTP-aza. Ovaj protein aktivira NF-kB transkripcione faktore, pri čemu dolazi do inflamatornog odgovora, ćelijskog rasta i supresije apoptoze.⁹⁵ Oba N- i C- terminalna kraja nisharina interaguju sa Rac1 u svom aktivnom stanju i na taj način ometaju NF-kB signalni put i suprimiraju ciklin D1, promoter koji je povezan sa malignitetom.⁹⁶ Smanjena aktivacija Rac1 dovodi do smanjenog rasta tumora.⁹² Takođe, nisharin direktno reaguje sa p21 aktiviranom kinazom (PAK1) (eng. *p21 activated kinase 1*) signalnim proteinom, inhibira njegovu kinaznu aktivnost i na ovaj način utiče na ćelijsku migraciju.⁹⁶

Pored navedenih, nisharin takođe stupa u interakciju sa nizom drugih signalnih proteina i na taj način inhibira apoptozu.⁹² U PC12 i Cos7 ćelijskim linijama, utvrđeno je da nisharin inhibira aktivaciju kaspaze-3, značajnog medijatora apoptoze.⁸⁰ Nakon tretmana sa citostaticima, staurosporinom i taspigarginom, ćelije kod kojih je transferovan nisharin su pokazale smanjenu apoptotsku aktivnost.⁸⁰ Ova inhibicija apoptoze dovodi do povećanja ćelijskog preživljavanja. Do danas nije jasno kako nisharin inhibira i rast tumora i ćelijsku apoptozu, i da bi se ovi procesi objasnili potrebna su dalja istraživanja.

1.1.8 Terapeutski značaj nisharina

Jak tumor supresivni efekat nisharina na smanjenje invazivnog kapaciteta i migracije tumorskih ćelija, čini ovaj protein potencijalnim targetom u razvoju novih lekova za lečenja karcinoma. Pokazano je da gubitak nisharina dovodi do povećane fokalne adhezije, citoskeletne organizacije, ćelijske migracije, rasta tumora i preživljavanja ćelija. Da bi se nadoknadila izgubljena ili redukovana funkcija nisharina u tumorskim ćelijama, potrebno je dizajnirati nova jedinjenja i to:

- male molekule koji će delovati kao agonisti ovog proteina i/ili
- peptidne lekove koji će imitirati prirodne interakcije nisharina.

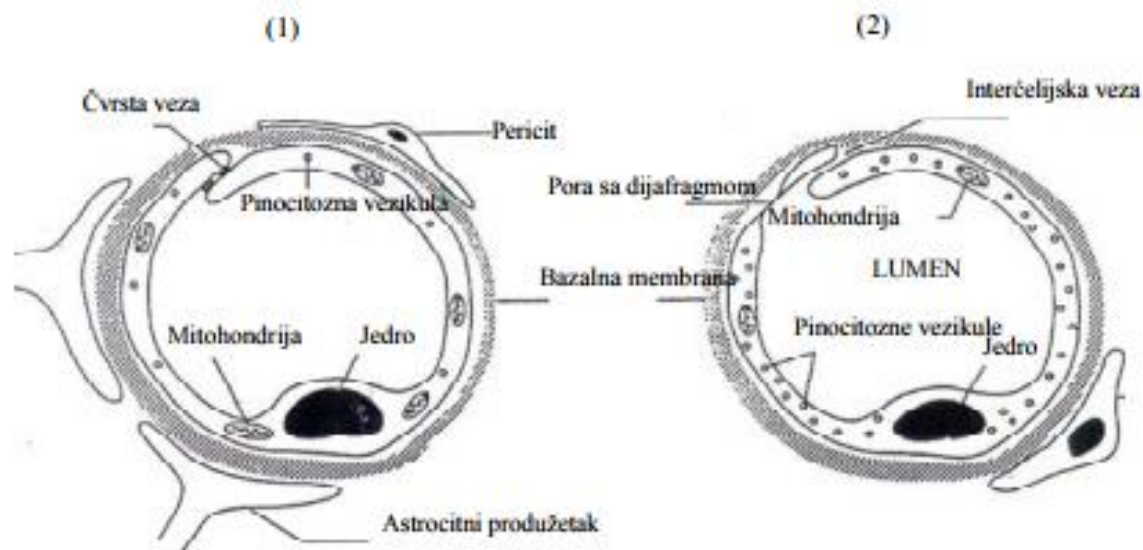
1.2 KRVNO-MOŽDANA BARIJERA I ISPITIVANJE PERMEABILNOSTI KROZ KMB

Imajući u vidu da većina liganada imidazolinskih receptora svoje efekte ostvaruje unutar centralnog nervnog sistema (CNS) delujući kao centralni antihipertenzivi i/ili su potencijalni lekovi u lečenju neuroloških oboljenja, procena njihove permeabilnosti kroz krvno-moždanu barijeru (KMB) je od suštinskog značaja u ranom otkriću lekova.

1.2.1 Krvno-moždana barijera

Da bi se očuvalo fiziološko okruženje i obezbedila zaštita od toksina, mozak ima visoko razvijen sistem zaštite. Značajna komponenta ovog sistema je krvno-moždana barijera koja se nalazi između krvnih kapilara i moždanog tkiva.⁹⁷ KMB ima veoma složenu multicelularnu organizaciju i sačinjena je od endotelnih ćelija koje su međusobno spojene čvrstim vezama, kao i okolnih ćelija uključujući pericite, astrocite i neurone.

Endotelne ćelije oblažu krvne sudove i formiraju kapilarni endotel. Ove ćelije KMB se fenotipski značajno razlikuju od endotelnih ćelija perifernih krvnih sudova.⁹⁸ Karakteriše ih manji broj endocitnih vezikula, međusobno su povezane čvrstim vezama i lišene su transcelularnih pora, čime je smanjen i transcelularni i paracelularni transport (**Slika 9**).



Slika 9. Poprečni presek kapilara unutar CNS-a (1) i na periferiji (2)⁹⁹

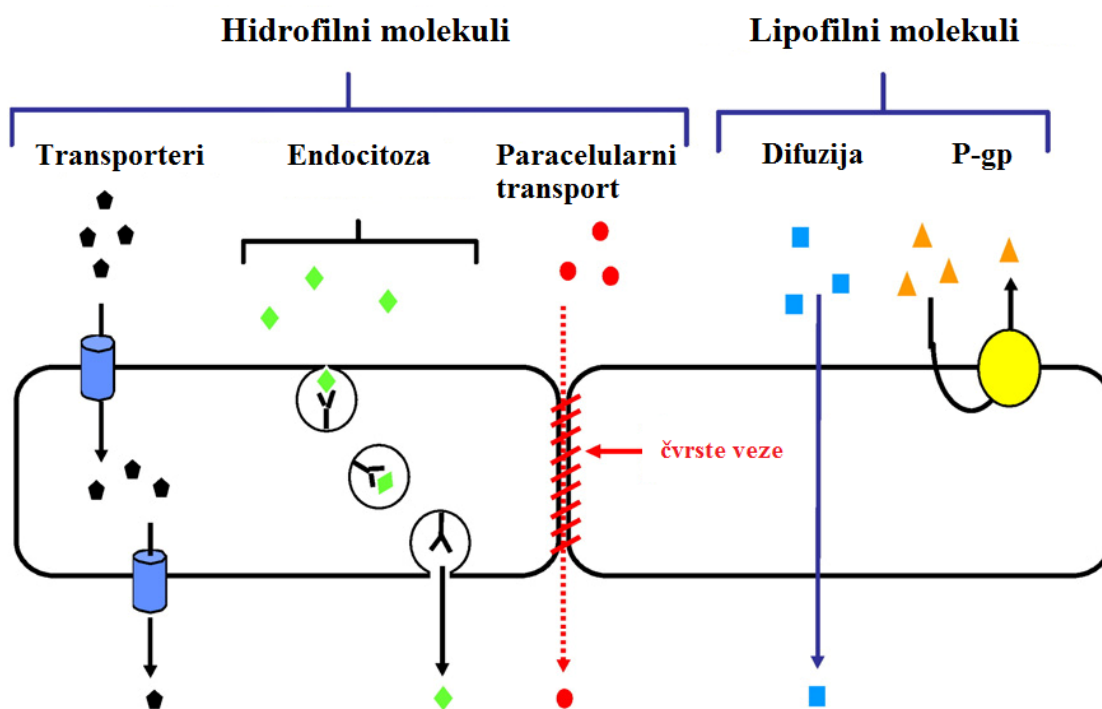
Za razliku od endotelnih ćelija, uloga pericita u funkcionisanju KMB do danas nije razjašnjena. Smatra se da ove ćelije sekretuju imunomodulatore i na taj način utiču na imunološke procese unutar CNS.¹⁰⁰ Astroцитi imaju značajnu ulogu u razvoju KMB, i utiču na aktivnost mikrovaskularnih moždanih endotelnih ćelija.¹⁰¹ Takođe, primećena je njihova značajna uloga u održavanju jonske homeostaze, modifikovanju endokrine funkcije endotela, proizvodnji azot oksida i oslobađaju hemokina.¹⁰¹

Ranije je KMB smatrana statičnom barijerom, dok se danas zna da je prostor između krvi i moždanog tkiva dinamičan, i da na njegovu propustljivost mogu uticati brojni lekovi kao i endogeni faktori.¹⁰² KMB membrana omogućava selektivni pristup potrebnim hranljivim sastojcima i hormonima, dok uklanja nepotrebne materije i smanjuje izloženost moždanog tkiva potencijalno štetnim ksenobioticima.⁹⁷ Optimalna izloženost moždanog tkiva leku mogla bi se definisati kao koncentracija slobodnog leka na ciljnom mestu delovanja u mozgu koja dovodi do maksimalnog željenog efekta i minimalnih neželjanih efekata tokom terapije.

Dva glavna mehanizma kojima lekovi mogu proći KMB i ostvariti svoje dejstvo u CNS su:

- aktivni transport
- pasivna difuzija kroz endotelne ćelije

Prolazak kroz intercelularni prostor između ćelija (paracelularni transport) je onemogućen, kao što je već pomenuto, prisustvom čvrstih veza i nepostojanja transcelularnih pora u KMB. Ova dva transportna mehanizma zajedno sa vezivanjem za proteine plazme i tkiva imaju najznačajniji uticaj na farmakokinetiku leka unutar CNS.¹⁰³(Slika 10)



Slika 10. Mehanizmi prolaska molekula kroz KMB¹⁰⁴

1.2.2 Prisustvo transportera u KMB

Prolazak lekova kroz KMB može biti smanjen zbog prisustva efluks transportera u endotelijalnim ćelijama. P-glikoprotein (P-gp ili eng. *Multidrug Resistance Protein 1*, MDR1) je aktivni efluks transporter koji je do danas najviše izučavan.¹⁰⁵ Ovaj fosforilisani glikoprotein pripada familiji membranskih proteina, takozvanih *ATP binding cassette* (ABC), i eksprimiran u visokom stepenu na luminalnoj strani vaskularnog endotela mozga kao i endotelnih ćelija horoidnog pleksusa, gde olakšava transport ka

cerebrospinalnoj tečnosti.¹⁰⁶ Pored KMB, P-gp se nalazi i u drugim organima uključujući gastrointestinalni trakt, jetru, bubrege, testise i placentu.¹⁰⁷

Smatra se da aktivni efluks ima mnogo veći uticaj na aktivnost lekova u centralnom nego perifernom tkivu. Ovo se dešava jer koncentracija leka u plazmi KMB retko može dostići nivoa Pgp zasićenja, pošto je koncentracija leka u kapilarima mozga znatno niža nego u perifernom tkivu.

Smanjenje željene koncentraciju leka u moždanom tkivu usled prisustva aktivnog efluksa je glavni problem prilikom dizajniranja novih lekova kojima je CNS primarno mesto dejstva. Dostupnost velikog broja *in vitro* podataka je omogućila razvoj velikog broja *in silico* pristupa za identifikovanje jedinjenja koji su potencijalni supstrati Pgp-a. Ove *in silico* metode mogu biti jednostavne i bazirati se na fizičko-hemijskim karakteristikama jedinjenja, a mogu predstavljati i kompleksne QSAR modele. Takođe, predloženo je Pravilo 4 koje sugeriše da jedinjenja sa molekulskom težinom < 400, ukupnim brojem atoma azota i kiseonika < 4, pKa < 8 verovatno neće biti supstrati za Pgp.¹⁰⁸ Iako veliki broj molekula koji deluju na CNS ne ispunjava bar jedan od ovih kriterijuma, Pravilo 4 je korisna strategija koju istraživači koriste da bi redukovali P-gp efluks.¹⁰⁹

Za razliku od efluksa, aktivni inluks može imati pozitivni efekat na izloženost moždanog tkiva leku, posebno na jedinjenja sa slabom pasivnom permeabilnošću.^{110,111}

1.2.3 Metode za procenu KMB permeabilnosti

Da bi se ispitala permeabilnost novih jedinjenja kroz KMB razvijen je veliki broj *in vivo*, *in vitro* i *in silico* metoda. Svaki od ovih modela ima svoje nedostatke i da bi se u potpunosti procenio transport lekova kroz KMB i razumeli mehanizmi uključeni u njihov prolazak, potrebno je kombinovati *in vitro* i *in vivo* tehnike, i ne oslanjati se isključivo na jednu metodu skrininga. Pored toga, *in silico* modeli mogu biti korisni u selektovanju manjeg broja 'hit' jedinjenja iz ogromnih baza jedinjenja.

1.2.3.1 *In vivo* modeli

Postoji veliki broj *in vivo* metoda se koristi za procenu transporta leka u moždano tkivo uključujući tehnike pojedinačne karotidne injekcije (eng. *single carotid injection technique*), tehnike *in-situ* perfuzije, intravenske injekcione tehnike, indeks moždanog

efluksa i intracerebralna mikrodijaliza. Svaka od ovih tehnika je korisna za izračunavanje $\log BB$ vrednosti, gde BB predstavlja odnos raspodele leka između krvi i moždanog tkiva u definisanom vremenskom periodu. Iako nisu pogodne za brzi skrining jedinjenja, veliki broj tehnika medicinskog slikanja organa (kao što je kvantitativna autoradiografija, magnetna rezonanca, pozitronska emisiona tomografija i kompjuterizovana tomografija sa fotonskim emitovanjem) se takođe može koristiti za procenu transporta leka kroz KMB. Međutim, navedene metode se više koriste u dijagnostici različitih bolesti.

1.2.3.2 *In vitro* modeli

Iako je direktno merenje permeabilnosti kroz KMB najpouzdanija metoda, ona predstavlja skup i dugotrajan proces. Takođe, veliki broj faktora, kao što su metabolizam i vezivanje za tkiva ili proteine plazme, utiče na distribuciju ispitivanih jedinjenja, tako da ova metoda ne daje uvek jasnu sliku o KMB permeabilnosti. Iz tih razloga razvijen je veliki broj *in vitro* modela.¹¹²⁻¹¹⁴ Prednosti *in vitro* metoda su: ekonomičnost, jednostavnija priprema uzorka, dosta su brze i istovremeno se može ispitati veći broj jedinjenja u poređenju sa *in vivo* modelima, mogućnost procene mehanizma transporta i identifikacija ranih znakova citotoksičnosti ako se koriste ćelijski modeli.¹¹⁵

Najviše korišćene metode u farmaceutskoj industriji za predviđanje penetracije novih jedinjenja kroz KMB u ranoj fazi otkrića lekova^{116,117} su:

- test permeabilnosti na veštačkim paralelnim membranama (eng. *Parallel Artificial Membrane Permeability Assay*, PAMPA)
- bioparticiona micelarna hromatografija (eng. *Biopartitioning Micellar Chromatography*, BMC)¹¹⁸
- hromatografija sa imobilisanim veštačkim membranama (eng. *Immobilized Artificial Membrane chromatography*, IAM)^{119,120}
- ćelijske metode (Caco-2, Madin-Darby ćelije psećeg bubrega (eng. *Mardin-Darby Canine Kidney*, MDCK) i mikrovaskularne endotelne ćelije goveđeg mozga (eng. *Primary Bovine Brain Microvessel Endothelial Cells*, BBMEC))

1.2.3.2.1 Upotreba ćelijskih kultura kao *in vitro* modela u ispitivanju permeabilnosti kroz KMB

Endotelne ćelije kapilara mozga govečeta i svinje se mogu koristiti za procenu KMB permeabilnosti. Međutim, prilikom uklanjanja ovih ćelija iz mozga i njihovog uzgajanja može doći do nishodne regulacije transportera i enzima u KMB.¹²¹ Iz tog razloga ove ćelije se često kultivišu sa primarnim astrocitima izolovanim iz neonatalnih pacova. Pokazano je da ovaj pristup ushodno reguliše P-gp funkciju i održava karakteristike KMB bez upotrebe stimulansa. Zbog problema sa gajenjem primarnih endotelnih ćelija mozga, razvijene su različite besmrtnne ćelijske linije pri čemu je većina njih dobijena iz tkiva pacova. Sve ove ćelijske linije imaju jedan veliki nedostatak: iako formiraju monoslojeve, veze između njih nisu dovoljno čvrste da bi simulirale KMB.¹²²

Zbog nedovoljnih barijernih osobina besmrtnih endotelnih ćelija mozga, u istraživačke svrhe se sve više koriste necerebralne periferne epitelne ćelijske linije. Iako ove ćelijske linije nisu endotelne ćelije i ne vode poreklo iz moždanog tkiva, čvrstina njihovog monosloja omogućava da vrednosti permeabilnosti dobijene korišćenjem ovih ćelija (P_{app}) dobro korelišu sa *in vivo* rezultatima. Jedna takva je ćelijska linija Madin-Darby psećeg bubrega (MDCK) (Madin–Darby pasiji bubreg).¹¹⁷ MDCK ćelije se lako gaje i u njih može biti transferovan gen za otpornost na višestruke lekove (MDR1 gen) koji dovodi do ekspresije P-gp, i stoga se mogu koristiti za procenu efekta P-gp na permeabilnost različitih jedinjenja.¹²³⁻¹²⁵ Međutim, smatra se da je poprečna površina intercelularnih veza MDCK ćelija veća nego kod endotelnih ćelija mozga, i stoga se u ovoj ćelijskoj liniji odvija i paracelularni transport, što nije slučaj sa KMB.

Caco-2 su humane ćelije epitela kolorektalnog adenokarcinoma i takođe se koriste za procenu KMB permeabilnosti. Međutim, kao i MDCK, ove ćelije imaju drugačije morfološke karakteristike od endotelnih ćelija mozga. Studija je pokazala da vrednosti dobijene korišćenjem Caco-2 ćelija pokazuju nisku korelaciju sa *in vivo* KMB permeabilnošću.¹¹⁵

Alternativne ćelijske linije koje se koriste za procenu KMB permeabilnosti su ćelije karcinoma bešike, ECV304. Međutim, ove ćelije nemaju eksprimiran Pgp i imaju ograničenu primenljivost u proceni permeabilnosti jedinjenja kroz KMB.^{126,127}

1.2.3.2.2 *Imobilizovane ćelijske membrane (eng. Immobilized Artificial Membranes, IAM)*

IAM su čvrsti, nepokretni modeli fluidnih membrana koji se koriste za procenu permeabilnosti leka kroz ćelijske membrane.¹²⁸ Ove membrane, koje se koriste u tečnoj hromatografiji pod visokim pritiskom, se sastoje od rezidua fosfatidilholina koje su kovalentno vezane za propilamin siliku i simuliraju membranski lipidni dvosloj.¹²⁹ Ova metoda može biti korisna u proceni permeabilnosti jedinjenja koja prolaze KMB barijeru pasivnim mehanizmima.

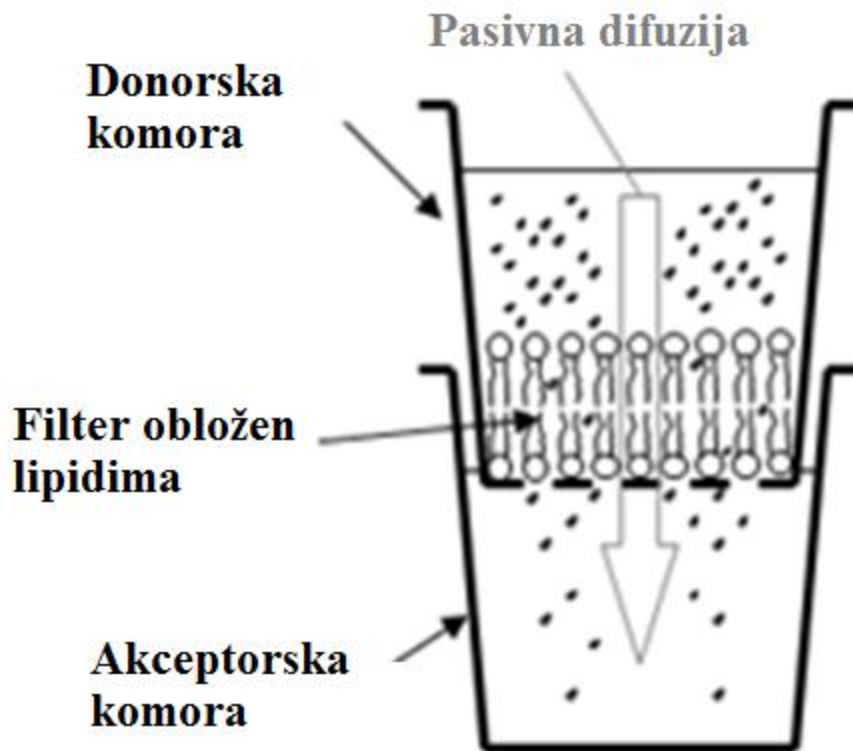
1.2.3.2.3 *Testovi permeabilnosti na paralelnim veštačkim membranama*

PAMPA se koristi kao povoljna skrining metoda za brzu procenu pasivne permeabilnosti kroz biološke membrane u ranoj fazi otkrića novih lekova. Veštačke membrane se mogu kombinovati sa biološkim *in vitro* testovima, i tako kombinovani pristupi omogućavaju bolje razlikovanje paracelularnog i transcelularnog transporta jedinjenja.¹³⁰ Jedan od glavnih nedostataka ove metode je nemogućnost da se predvidi efluks posredovan Pgp, jer je membrana napravljena od polarnih lipida mozga rastvorenih u dodekanu.¹³¹

Kensi i saradnici iz Hoffmann-La Roche su prvi ispitali permeabilnost lekova koristeći filtere obložene fosfolipidima, i metodu nazvali test permeabilnosti na paralelnim veštačkim membranama.^{132,133} Kasnije su ovi modeli i pristupi unapređeni, pri čemu su uvedene neke nove karakteristike koje omogućavaju da se pored permeabilnosti, proceni i retencija leka u membrani, kao i da se kvantifikuje efekat izo-pH i gradijentnih pH uslova na permeabilnost jonizujućih molekula.

PAMPA testovi se zasnivaju na specijalno dizajniranim mikrotitarskim pločama sa 96 odeljaka, pri čemu je svaki odeljak podeljen u 2 komore – akceptorsku i donorsku. Donorska komora koja sadrži vodeni rastvor sa ispitivanim molekulima je na vrhu PAMPA sistema, dok akceptorska komora koja sadrži vodeni pufer se nalazi na dnu (**Slika 11**). Ove komore su razdvojene filter membranom obloženom smešom lipida, i u ovakvom sistemu se odvija difuzija ispitivanog jedinjenja kroz veštačku membranu u pravcu gradijenta koncentracije, tj. iz donorske u akceptorsku komoru (**Slika 11**).¹³⁴ U PAMPA eksperimentima, proteini i drugi agensi koji vezuju supstance mogu biti dodati

u vodeni rastvor.¹³⁵ Tehnologija mikrotitarskih ploča omogućava simultano formiranje 96 permeacionih ćelija, što povećava brzinu procesa i smanjuje troškove.



Slika 11. Ispitivanje permeabilnosti primenom PAMPA testova¹³⁵

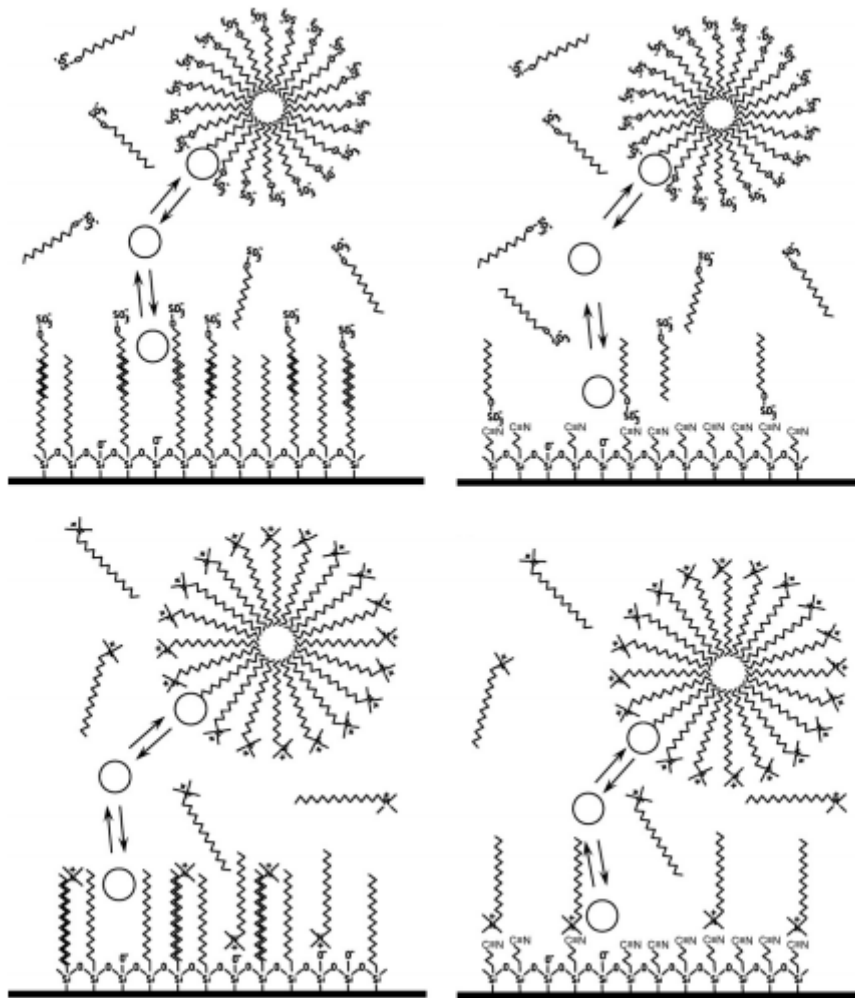
U zavisnosti od prirode veštačke membrane, ovom tehnikom se može proceniti permeabilnost kroz tri osnovne fiziološke barijere: kožu, krvno-moždanu barijeru i gastrointestinalni trakt. Neki istraživači biraju jednostavne lipidne sisteme kao modele veštačke membrane. Jedan od njih je fosfatidilholin ('lecitin jajeta') rastvoren u dodekanu jer membrane sisara sadrže ovaj lipid u velikim količinama. Takođe, pokazano je da neki rastvarači sami ('*n*-heksadekan') mogu pružiti adekvatne rezultate za jednostavno testiranje permeabilnosti.^{136,137} Najčešće lipidne komponentne membrana u PAMPA testu koji simulira krvno-moždanu barijeru su fosfatidinholin (PC), lipofosfolipid (PE), fosfatidilserin (PS) i fosfatidilinozitol (PI). Pošto se fosfolipidi nalaze u čvrstom obliku koji se neće dispergovati u filtere, obično se koriste nepolarni rastvarači za rastvaranje fosfolipida pre oblaganja filtera. Uglavnom su to ugljovodonični rastvarači kao što je *n*-dodekan.

Smatra se da na efikasnost i rezultate PAMPA metode pored sastava lipida utiče i poroznost filtera. Ovaj parametar je takođe inkorporiran u jednačinu o efektivnoj permeabilnosti.¹³⁶⁻¹⁴⁰ U većini sprovedenih eksperimenata površina filtera je 0,3 cm², debljina 125 mm, a zapremina lipida koja se nanosi 4 µL.

1.2.3.2.4 *Bioparticiona micelarna hromatografija*

Bioparticiona micelarna hromatografija (BMC) je vrsta tečne micelarne hromatografije koja se sastoji od C18 stacionarne faze i micelarne mobilne faze koja sadrži surfaktant u koncentraciji koja je iznad kritične micelarne koncentracije (eng. *Critical Micellar Concentration*, CMC). Pri ovoj koncentraciji dolazi do agregacije monomera surfaktanata i formiranja micela, i ovakav sistem pokazuje svojstva značajno drugačija od konvencionalnih RP-HPLC sistema koji kao mobilnu fazu koriste smeše voda-organski rastvarač. Surfaktanti koje se koriste mogu biti katjonski, anjonski, cviterjonski i nejonski.

Glavni nedostatak ove metode je taj što analiza jako hidrofobnih jedinjenja u ovim sistemima može biti veoma spora, i stoga je u praksi potrebno dodati malu količinu organskog rastvarača u micelarni rastvor. Organski rastvarači kao što su alkoholi kratkih i srednjih dužina lanaca i acetonitril se dodaju micelarnoj mobilnoj fazi da bi se poboljšao izgled PIK-a i smanjilo retenciono vreme. Međutim, potrebno je voditi računa o udelu organskog rastvarača u mobilnoj fazi, jer organski rastvarač smanjuje polarnost vodenog rastvora i menja strukturu micela. Stoga, dodatkom velikog procenta organskog rastvarača može doći do promene micelarnih parametara, kao što su CMC i agregacioni broj surfaktanta (broj monomera koji obrazuju micelu), kao i do degradacije micela. Maksimalna dozvoljena koncentracija zavisi od prirode organskog rastvarača i prirode surfaktanta.



Slika 12. Interakcije koje ostvaruju jedinjenja u BMC sistemu¹⁴¹

Retencioni mehanizmi u BMC su danas dobro poznati. U BMC sistemima je sekundarna ravnoteža od velike značajnosti. Primarna ravnoteža se uspostavlja između mobilne faze (voda ili smeše vode i organskog rastvarača) i stacionarne faze. Sekundarna ravnoteža se uspostavlja sa micelama mobilne faze. Na obe ravnoteže utiče veliki broj faktora kao što su priroda i koncentracija surfaktanta i aditiva (npr. soli i organski modifikatori), temperatura, jonska jačina i pH. Retenciono ponašanje ispitivanih jedinjenja u ovakvim sistemima će zavisi od interakcija koje se ostvaruju sa monomerima stacionarne faze i kao sa micelama u mobilnog fazi.¹⁴² (**Slika 12**)

BMC sistem se pod određenim eksperimentalnim uslovima može koristiti za procenu apsorpcije leka u gastrointestinalnom traktu, permeabilnost kroz kožu, distribuciju kroz KMB kao i za simulaciju drugih particionih procesa u biološkim

sistemima, jer su karakteristike BMC sistema slične biološkim membranama i ekstracelularnim fluidima.^{118,142-144} BMC sistemi koji se koriste za procenu permeabilnosti jedinjenja kroz KMB podrazumevaju upotrebu nejonskog surfaktanta, polioksietilen (23) lauril etra (Brij35), u koncentraciji 0,04 M pri pH = 7,4 i temperaturi kolone 36,5 °C.¹⁴⁵

1.2.3.3 Odnos između fizičko-hemijskih karakteristika leka i KMB permeabilnosti

Pokazano je da je nekoliko fizičko-hemijskih karakteristika značajno za dizajniranje molekula sa optimalnom KMB permeabilnošću, a to su:¹⁴⁶⁻¹⁴⁹

- lipofilnost (izražena kao logaritam oktanol/voda particioni koeficijent (clogP) ili logaritam oktanol/voda particioni koeficijent pri fiziološkom pH 7,4 (clogD))
- broj donora (HBD) i akceptora (HBA) vodoničnih veza
- polarna površina molekula (eng. *Polar Surface Area*, PSA)
- jonizaciono stanje (pKa)
- broj rotirajućih veza (eng. *The Number of Rotatable Bonds*, RBN)
- molekulska težina (eng. *Molecular Weight*, MW)

Da bi se postigao optimalni balans, potrebno je razumeti kako pojedinačne fizičko-hemijske karakteristike mogu uticati jedne na druge kao i na stepen i brzinu penetracije kroz KMB.

Lipofilnost. Lipofilnost se smatra najvažnijom fizičko-hemijskom karakteristikom lekova koja ima uticaj na njihovu distribuciju unutar CNS. Povećanje lipofilnosti često ima pozitivan uticaj na *in vitro* aktivnost i KMB permeabilnost lekova, ali takođe može negativno uticati na klirens i povećati nespecifično vezivanje za moždana tkiva, što dovodi do smanjenja slobodne koncentracije leka u mozgu. Međutim, danas je poznato da povećana lipofilnost takođe povećava rizik od loše rastvorljivosti, smanjene metaboličke stabilnosti, kao i da povećava rizik od toksičnosti usled nespecifičnog vezivanja za targete.¹⁵⁰

U studijama koje su sprovedene na lekovima koji se nalaze na tržištu je pokazano da su clogP vrednosti oko 2 optimalne da bi se smanjio njihov metabolizam i neželjeni efekti, ali i da je veća lipofilnost potrebna za veću CNS aktivnost. Takođe, uveden je i novi indikator lipofilnosti koji je fiziološki više značajniji: pH zavisni oktanol-voda

distribucionni koeficijent ($\log D$). Pokazana je dobra korelacija između $\log D$ vrednosti i KMB permeabilnosti izražene kao $\log BB$, kao i da su $\log D$ vrednosti u opsegu 1-4 značajne za optimalnu permeabilnost lekova kroz KMB.

Pored toga, uočena je dobra korelacija između nespecifičnog vezivanja za moždano tkivo i $\log P$ vrednosti u studiji koja je obuhvatala preko 300 različitih jedinjenja GlaxoSmithKline.¹⁴⁷ Ova zapažanja ukazuju da veće $\log BB$ vrednosti koje su uočene kod lipofilnijih jedinjenja su posledica povećanog nespecifičnog vezivanja za moždano tkivo. Ova studija je takođe pokazala negativnu korelaciju između frakcije nevezanog leka u plazmi ($f_{u,b}$) i $\log P$ vrednosti, što ukazuje da bi smanjenje lipofilnosti moglo predstavljati efektivnu strategiju za povećanje slobodne koncentracije leka u mozgu i postizanja željenog farmakokinetičkog profila.

Vodonične veze. Studije u kojima je korišćen PAMPA test su pokazale da molekuli koji ostvaruju više vodoničnih veza imaju smanjenu permeabilnost kroz KMB.¹⁵¹ Ovo se dešava jer tokom formiranja ovih veza, dolazi do desolvatacije molekula vode koji su potrebni za membransku permeabilnost kao i za rastvorljivost lipida. Smatra se da se ovaj efekat javlja i u biološkim membranama, pri čemu povećan potencijal za građenje vodoničnih veza takođe povećava i rizik od interakcije sa Pgp.¹⁰⁹ Shodno tome, CNS lekovi imaju manji broj donora i akceptora vodoničnih veza u poređenju sa lekovima koji ne deluju na CNS.^{152,153} Smanjenje broja donora i akceptora vodoničnih veza je često uspešna strategija za optimizaciju lekova koji deluju na CNS. Smatra se da uspešni CNS kandidati imaju manje od 3 donora vodoničnih veza, manje od 7 akceptora vodoničnih veza u ukupan broj vodoničnih veza manji od 8.¹⁴⁹

Polarna površina. Polarna površina (eng. *Polar Surface Area*, PSA) molekula je površina svih polarnih atoma, pre svega kiseonika i azota, uključujući i vodonike vezane za njih. Analizom lekova koji se nalaze na tržištu je pokazano da je PSA vrednost manja od 90 \AA^2 značajna za optimalnu KMB permeabilnost.¹⁵⁴

pKa i jonizaciono stanje. Veliki broj lekova koji deluju na CNS su baznog karaktera. Studija je pokazala da srednja pKa vrednost lekova koji deluju na CNS i koji se nalaze na tržištu je 8,4.¹⁴⁶ Predložen je optimalni raspon pKa vrednosti za CNS lekove

i iznosi 7,5-10,5.¹⁴⁹ Ipak, istraživanja pokazuju da bi gornja granica trebala biti manja od $pK_a < 8$ da bi se izbegle moguće interakcije sa Pgp.¹⁰⁸

Molekulska fleksibilnost i rotirajuće veze. Pokazano je da povećanje molekulske fleksibilnosti ima negativan uticaj na pasivnu permeabilnost. Pretpostavlja se da broj ovih veza bi trebao biti manji od 8 da bi se jedinjenje smatralo uspešnim CNS kandidatom.¹⁴⁹

Molekulska težina. Lekovi koji deluju na CNS su manji od lekova koji deluju na periferiji. Srednja vrednost MW lekova koji deluju na CNS i koji se nalaze na tržištu je 310 Da, dok je srednja MW za lekove koji se primenjuju oralnim putem (uključujući i CNS lekove) 377 Da.^{146,153} Smanjenje molekulske težine često ima pozitivni uticaj i na druge parametre, kao što su rotirajuće veze, PSA i clogP i često se ovaj pristup koristi u optimizaciji lekova koji deluju na CNS.

1.3 FORMIRANJE, PROCENA KVALITETA I VALIDACIJA QSPR MODELA

QSPR (eng. *Quantitative structure – property relationship*) modeli predstavljaju matematičke jednačine u kojima analizirana osobina ili aktivnost ispitivanih jedinjenja koreliše sa strukturnim i fizičko-hemijskim karakteristikama tih jedinjenja izraženim u formi deskriptora. Sam postupak formiranja ovih modela podrazumeva sledeće korake:

- (1) izračunavanje molekulskih deskriptora
- (2) formiranje modela primenom odgovarajuće statističke metode

Različite regresione i klasifikacione metode se koriste za građenje ovih modela. Regresione metode omogućavaju kvantitativno predviđanje odgovora, dok klasifikacione metode omogućavaju klasifikaciju jedinjenja u nekoliko grupa ili klastera u zavisnosti od vrednosti njihovog odgovora. Najčešće korišćeni pristupi zasnovani na regresiji su: multipla linearna regresija (eng. *Multiple Linear Regression*, MLR) i metoda najmanjih kvadrata (eng. *Partial Least Squares*, PLS). Pored ovih konvencionalnih metoda, metode zasnovane na mašinskom učenju (eng. *Machine Learning Tools*) se koriste u razvoju novih QSPR modela. Neke od njih, kao što su veštačke neuronske mreže (eng. *Artificial Neural Networks*, ANNs) i metoda podržavajućih vektora (eng. *Support Vector Machine*,

SVM) su veoma efikasne u razvoju prediktivnih modela, posebno kada je odnos između fiziko-hemijskih osobina ispitivanih jedinjenja i ispitivanog odgovora nelinearan.¹⁵⁵

1.3.1 Molekulski deskriptori

Deskriptori predstavljaju fizičko-hemijske karakteristike molekula predstavljene u numeričkom obliku, koje se koriste u QSPR studijama. Molekulski deskriptori se mogu podeliti na:

- konstitucionalne (strukturne)
- topološke
- geometrijske
- termodinamičke
- elektronske

Konstitucionalni su jednostavni, najčešće korišćeni deskriptori koji opisuju strukturu jedinjenja, ali ne sadrže informacije o topologiji molekula. Najčešće korišćeni konstitucionalni deskriptori su broj atoma, broj veza u molekulu, vrste atoma, broj prstena i molekulska težina. Topološki deskriptori se zasnivaju na molekulskim grafovima i opisuju povezanost atoma u molekulu. Topološki indeksi sadrže informacije o molekulskoj veličini, obliku, grananju, prisustvu heteroatoma i višestrukih veza u molekulu. Veliki broj ovih deskriptora je danas u upotrebi, među kojima se najviše koriste Wiener index,¹⁵⁶ indeks povezivanja (eng. *Connectivity Indices*, CI),¹⁵⁷ Kier oblik (eng. *Kier shape*),¹⁵⁸ Balaban J indeks¹⁵⁹ i Zagreb indeks.¹⁶⁰ Geometrijski deskriptori pri izračunavanju uzimaju u obzir trodimenzionalnu strukturu molekula i sadrže informacije o molekulskoj veličini, obliku i distribuciji atoma. Za izračunavanje ovog tipa deskriptora potrebno je prethodno geometrijski optimizovati jedinjenja i stoga nisu jednostavni za izračunavanje. Neki od ovih deskriptora su WHIM, MoRSE, GETAWAY, itd.¹⁶¹ Termodinamički deskriptori ukazuju na povezanost hemijske strukture i određene fizičko-hemijske karakteristike jedinjenja. U ove deskriptore spadaju HF (eng. *Heat of Formation*), molRef (eng. *Molar refractivity*), AlogP, itd. Elektronski deskriptori se koriste da opišu elektronske karakteristike molekula, atoma ili molekulskih fragmenata, i u ove deskriptore spadaju dipolni momenat, HOMO (eng. *Highest Occupied Molecular Orbital*) i LUMO (eng. *Lowest Unoccupied Molecular Orbital*) energije.

1.3.2 Odabir odgovarajućih deskriptora

Odabir odgovarajućih deskriptora iz velikog skupa za pravljenje modela je važan korak u QSPR modelovanju. Takođe, potrebno je voditi računa i o broju deskriptora koji će se koristiti za formiranje modela. Upotrebom velikog broja deskriptora za građenje modela povećava se rizik od slučajne korelacije i ovakve modele je često teško interpretirati. Sa druge strane, ako je broj deskriptora mali, nemoguće je formirati optimalne modele za predviđanje željene karakteristike jedinjenja.

Selektovanje deskriptora se može vršiti korak po korak na osnovu prethodno definisanih kriterijuma za njihovo uključivanje i/ili isključivanje (*F to enter* i *F to remove* kriterijumi). Danas su dosta u upotrebi i genetski algoritmi i faktorske analize.¹⁶²⁻¹⁶⁴

1.3.3 Multipla linearna regresija

Multipla linearna regresija ili MLR¹⁶⁵ je najčešće korišćena metoda u QSPR analizama upravo zbog svoje jednostavnosti, reproducibilnosti i lakoće u interpretaciji. Opšta jednačina za MLR je

$$Y = a_0 + a_1 \times X_1 + a_2 \times X_2 + a_3 \times X_3 + \dots + a_n \times X_n \quad (1)$$

gde je Y ispitivani odgovor ili zavisna varijabla. X_1, X_2, \dots, X_n su vrednosti deskriptora (ili nezavisne varijable) u modelu sa odgovarajućim regresionim koeficijentima a_1, a_2, \dots, a_n , dok je a_0 konstanta modela. Doprinos svakog deskriptora na vrednost zavisne varijable zavisi od vrednosti odgovarajućih koeficijenata. Svaki koeficijent regresije bi trebalo da bude značajan pri $p < 0,05$ što se može proveriti korišćenjem 't' testa.

Deskriptori prisutni u MLR modelu ne bi trebalo da budu visoko korelisani. Za statistički značaj model, odnos između broja zavisne varijable i broja deskriptora bi trebao da bude najmanje 1:5.¹⁶⁵

1.3.4 Metoda parcijalnih najmanjih kvadrata

Metoda parcijalnih najmanjih kvadrata ili PLS je bolji izbor od MLR u studijma gde se modeli formiraju koristeći manji broj jedinjenja i deskriptore koji pokazuju visoku interkorelaciju.

Pre analize, obično dolazi do transformacije originalnih X i Y varijabli kako bi njihova distribucija bila simetrična. Varijable odgovora (Y) se obično logaritamski transformišu, dok se X varijable skaliraju na odgovarajući način. Zatim, u PLS modelovanju dolazi do formiranja latentnih varijabli (LV), koje predstavljaju linearne kombinacije originalnih varijabli i koje objašnjavaju osnovne varijacije koje su moguće prilikom modelovanja odgovara.¹⁶⁶⁻¹⁶⁸

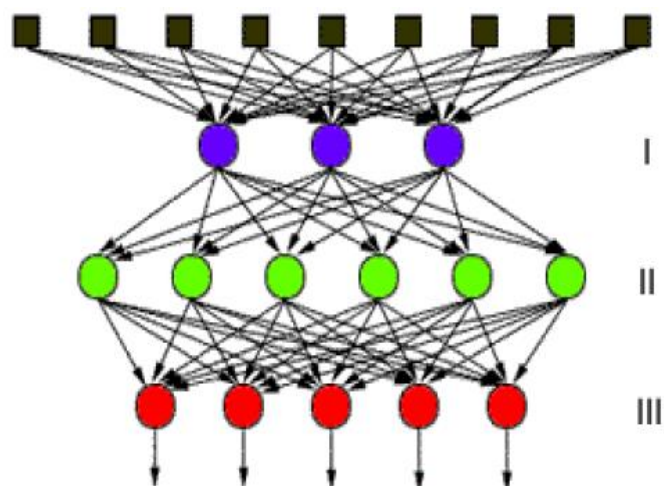
Značajnost svake varijable (X_k) u ovoj metodi je izražena kao VIP_k (eng. *Variable Importance for the Projection*, VIP) parametar. VIP_k parametar se koristi da ukaže koji deskriptori najrelevantnije opisuju ispitivani odgovor jednjenja (Y vrednost). Deskriptori sa VIP vrednošću većom od 1 su najznačajniji za objašnjenje regresionog modela zbog njihovog najvećeg uticaja na Y vrednost. Deskriptori sa $1,0 > VIP > 0,5$ imaju umeren uticaj na Y vrednost, dok se deskriptori sa VIP vrednošću manjom od 0,5 smatraju nerelevantnim i nisu uzeti u razmatranje prilikom građenja modela.¹⁶⁷ PLS jednačina se može izraziti u istom obliku kao MLR, tako da se može lako uvideti doprinos pojedinačnih deskriptora na odgovor.

1.3.5 Veštačke neuronske mreže (ANN)

ANN su matematičke metode koja se zasnivaju na mašinskom učenju. Osnovne gradivne jedinice veštačkih neuronskih mreža su perceptroni (neuroni) koji su međusobno povezani u kompleksne mreže i organizovani u tri sloja:¹⁶⁹ (Slika 13)

- ulazni sloj kod kog je broj čvorova jednak broju odabranih deskriptora
- skriveni sloj čiji se optimalni broj čvorova određuje tokom procesa treniranja
- izlazni sloj koji sadrži jedan čvor koji predstavlja ispitivanu osobinu ili aktivnost jednjenja

Ovakav tip mreže se zove višeslojni perceptron (eng. *Multilayer Perceptrons*, MLP). Svaki perceptron prihvata impulse od ulaznih susednih perceptrona koji imaju odgovarajući težinski koeficijent i izračunava izlaznu vrednost. Težine se menjaju tokom faze treniranja jer mreža tada ‘uči’ kako da poveže ulazne i izlazne podatke, pre nego što se testira na novom skupu podataka.¹⁷⁰



Slika 13. Primer veštačke neuronske mreže (ANN) sa jednim skrivenim slojem: (I) – ulazni sloj; (II) – skriveni sloj; (III) – izlazni sloj

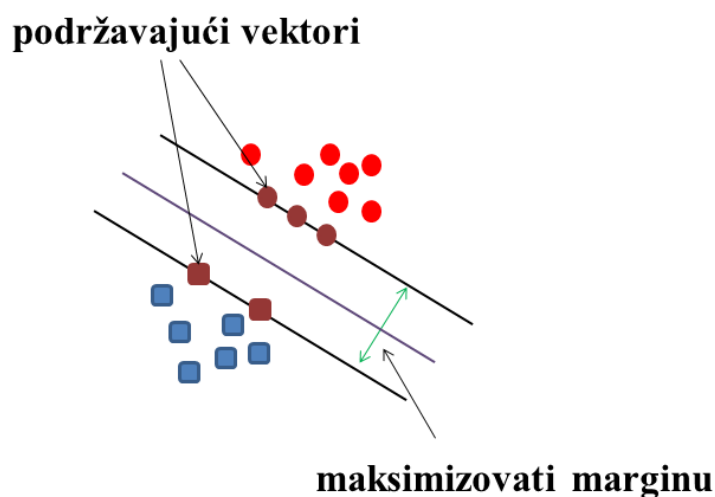
Sam proces formiranja modela se sprovodi u dve faze (faza propagacije i faze popravke težinskih koeficijenata u mreži) koje se ponavljaju sve dok se ne formira zadovoljavajući model.¹⁷¹

- Faza propagacije unapred (eng. *Feedforward network*) – u ovoj fazi mreža se trenira ili ‘uči’. Ulazni podaci se „propuštaju“ kroz mrežu, koji potom dalje pobuđuju slojeve skrivenih jedinica, da bi na kraju završili u izlaznom sloju.
- Faza propagacije unazad (eng. *Backpropagation*) – u ovoj fazi se računaju razlike u ispitivanom odgovoru jedinjenja koji mreža generiše i odgovoru koji bi trebalo da generiše.
- Faza popravke težinskih koeficijena u mreži na osnovu razlika u odgovorima koje su dobijene u fazi propagacije unazad. Najpre se ispravljaju težinski koeficijenti bliže izlaznom sloju krećući se ka ulaznom sloju, redukujući razliku između stvarnih i željenih rezultata, sve dok se ove dve vrednosti ne poklope.

Iako je dosta u upotrebi, ANN metoda ima svoje nedostatke. Ova metoda je osetljiva na pretreniranje (eng. *overfitting*) što dovodi do formiranja modela koji je previše prilagođen trening skupu i slabije predviđa Y vrednost na test skupu koji mu je nepoznat.

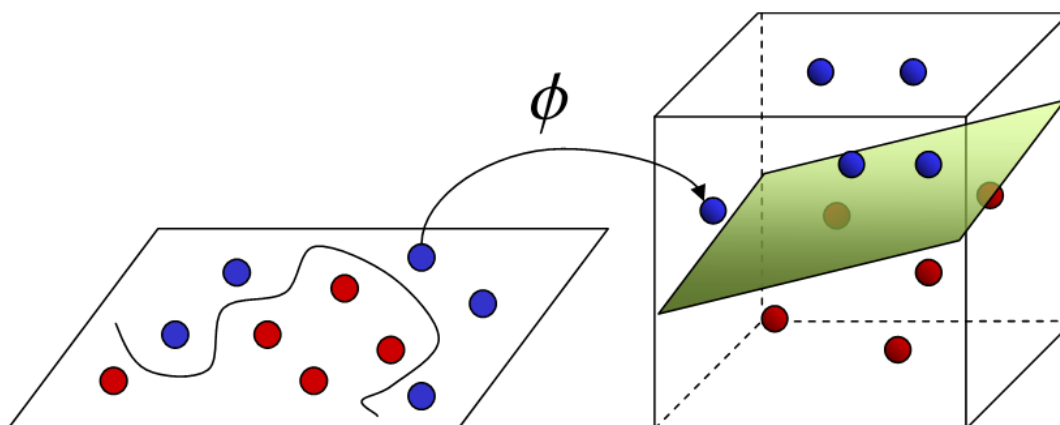
1.3.6 Metoda podržavajućih vektora (SVM)

SVM je algoritam mašinskog učenja sa nadgledanjem.¹⁷² Funkcija algoritma je da u vektorskom prostoru gde su podaci predstavljeni kao tačke koje imaju svoje koordinate x_i i vrednost y_i , pronađe ravan koja će optimalno da razdvaja date podatke u dve klase, tako da se svaka klasa u celosti nalazi na suprotnim stranama separacione hiper-ravni. Ovo se postiže povećanjem margina između hiper-ravni i tačaka, poznatih kao podržavajući vektori, koje se nalaze blizu potencijane linije razdvajanja. (Slika 14)



Slika 14. Primer separacione hiper-ravni i margine

Međutim, formiranje separacione hiper-ravni nije uvek moguće kod modela koji nisu linearno razdvojivi. Ovaj problem se može prevazići mapiranjem podataka u visokodimenzionalni prostor koristeći nelinearnu funkciju koja se naziva jezgro (eng. *kernel*).¹⁷² (Slika 15)



Slika 15. Preslikavanje podataka iz nelinearnog u višedimenzionalni prostor u kom je moguće linearno razdvajanje¹⁷³

Jezgra koja se koriste u SVM su linearno, polinomijalno, Gausovo, Laplasijanovo jezgro i jezgro hiperboličke tangente (sigmoidno), pri čemu je najviše korišćeno Gausovo jezgro koje predstavlja funkciju sličnosti između dve tačke.

Metoda podržavajućih vektora se pored klasifikacionih analiza, može koristiti i u regresionim analizama za predviđanje vrednosti zavisne varijable.^{174,175}

1.3.7 Validacija QSPR modela

Validacija formiranih QSPR modela je neophodna da bi se ispitala njihova moć predviđanja za nova netestirana jedinjenja. Čak i ako postoji visoka korelacija između eksperimentalnih podataka i onih predviđenih modelom, to ne ukazuje na dobru sposobnost predviđanja formiranih QSPR modela iz nekoliko razloga. Povećanjem broja deskriptora u QSAR modelima povećava se rizik od slučajne korelacije.¹⁷⁶ Sa druge strane, moguće je dobiti modele koji dobro korelišu sa eksperimentalnim podacima, ali uvek postoji verovatnoća da je model pretreniran. Stoga je za procenu kvaliteta modela potrebno uzeti u obzir i interne i eksterne parametere validacije.

1.3.8 Interna validacija

Interna validacija se sprovodi na jedinjenjima iz trening seta i služi za procenu preciznosti predviđanja modela. Najčešće korišćeni parametri interne validacije su:

- R^2 , koeficijent determinacije formiranog modela. Ovaj parametar se računa metodom najmanjih kvadrata između modelom predviđenih i eksperimentalnih vrednosti jedinjenja iz trening seta i ukazuje na kvalitet podešenosti modela, odnosno koliko dobro model reprodukuje eksperimentalne podatke.

$$R^2 = \frac{\sum(Y_{training} - \bar{Y}_{training})^2}{\sum(Y_{training} - \bar{Y}_{training})^2} \quad (2)$$

$Y_{training}$ su eksperimentalno određene vrednosti, $\hat{Y}_{training}$ su vrednosti predviđene modelom, a $\bar{Y}_{training}$ su odgovarajuće srednje vrednosti.

- Q^2 , interni validacioni parametar. Ovaj parametar služi za procenu prediktivne moći modela i izračunava se koristeći tehniku ukrštene validacije *Leave-One-Out* (LOO) gde se svako jedinjenje iz trening seta po jednom eliminiše dok se ostala jedinjenja koriste za formiranje modela. Vrednost eliminisanog jedinjenja se predviđa koristeći tako formirani model. Procedura se ponavlja sve dok sva jedinjenja iz trening seta nisu eliminisana po jednom i vrednosti njihovih zavisnih varijabli predviđene tako formiranim modelima.^{165,177} Prediktivna moć modela se procenjuje koristeći *PRESS* (Predviđena suma kvadrata) i Q^2 parametre, gde $e_{(i)}$ predstavlja razliku između eksperimentalnih i predviđenih Y vrednosti:

$$PRESS = \sum_{i=1}^n e_{(i)}^2 \quad (3)$$

$$Q^2 = 1 - \frac{PRESS}{\sum (Y_{obs(training)} - \bar{Y}_{training})^2} \quad (4)$$

$Y_{obs(training)}$ su eksperimentalno dobijene vrednosti jedinjenja iz trening seta, a $\bar{Y}_{training}$ je njihova srednja vrednost. QSPR modeli sa Q^2 vrednošću većom ili jednakom 0,5 se smatraju da imaju dobar prediktivni kapacitet.

$$RMSE = \sqrt{\frac{PRESS}{n}} \quad \bullet \quad \text{RMSEE je greška predviđanja modela za jedinjenja iz trening seta.} \quad (5)$$

Gde se *PRESS* izračunava iz jednačine (3), a n predstavlja broj jedinjenja u trening setu.

1.3.9 Eksterna validacija

Internom validacijom se ne može proceniti kakva je sposobnost predviđanja određenog modela za sasvim novi set jedinjenja. Stoga se u eksternoj validaciji, raspoloživi set jedinjenja deli na trening i test set. Model se formira koristeći trening set, dok se za eksternu validaciju koristi test set, to jest jedinjenja koja nisu korišćena za pravljenje modela. Eksternom validacijom se omogućava da se razvijeni QSAR modeli mogu koristiti u predviđanju aktivnosti ili određenih karakteristika novih, netestiranih jedinjenja.¹⁷⁸ Parametri eksterne validacije su:

- R^2_{pred} , eksterni validacioni parametar. Ovaj parametar ukazuje na stepen korelacije između eksperimentalnih i modelom predviđenih vrednosti za jedinjenja iz test seta.

$$R^2_{pred} = 1 - \frac{PRESS}{\sum (Y_{obs(test)} - \bar{Y}_{training})^2} \quad (6)$$

Gde su $Y_{obs(test)}$ eksperimentalno dobijene vrednosti zavisno promenljive jedinjenja iz test seta i $\bar{Y}_{training}$ je njihova srednja vrednost. PRESS je izračunat za test set koristeći jedničinu (3). QSPR modeli sa R^2_{pred} vrednošću većom ili jednakom 0,5 se smatraju da imaju dobar prediktivni kapacitet.

- RMSEP je greška predviđanja modela za jedinjenja iz test seta. PRESS se izračunava na osnovu jednačine (3), dok n predstavlja broj jedinjenja u test setu.

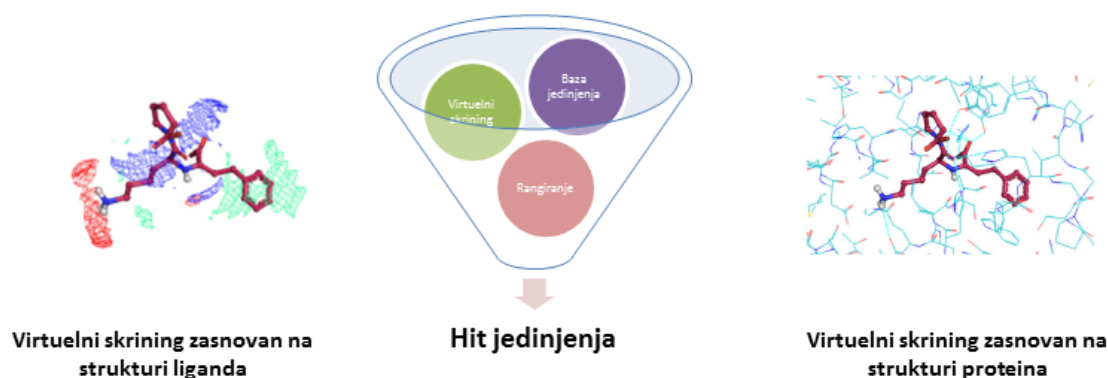
Značajnost dobijenih modela se takođe procenjuje korišćenjem F - testa, na osnovu odnosa MS regresija/ MS rezidual i p - vrednosti koja ukazuje da li je model sa datom F - vrednošću možda rezultat slučajnosti. Značajni modeli bi trebali imati p - vrednost manju od 0,05.¹⁶⁷

1.4 VIRTUELNI SKRINING

Metode virtuelnog skrininga (eng. *VirtualScreening*, VS) se danas koriste u ranoj fazi potrage za novim lekovima i služe za pretraživanje baza podataka hemijskih

jedinjenja u cilju selektovanja manjeg broja kandidata koji će imati najveću verovatnoću da ispolje željenu biološku aktivnost.¹⁷⁹ Dva najčešće korišćena pristupa su:¹⁸⁰ (Slika 16)

- VS zasnovan na ligandu (eng. *Ligand-Based Virtual Screening*, LBVS)
- VS zasnovan na strukturi proteina (eng. *Structure-Based Virtual Screening*, SBVS)



Slika 16. Shematski prikaz dva pristupa VS: VS zasnovan na ligandu (LBVS) i VS zasnovan na strukturi proteina (SBVS)

LBVS se primenjuje kada kristalna struktura proteina nije dostupna i selektovanje jedinjenja iz virtuelne biblioteke se vrši na osnovu njihove fizičko-hemijske sličnosti sa poznatim aktivnim jedinjenjem. Ova metoda se zasniva na principu da jedinjenja sa sličnim fizičko-hemijskim karakteristikama ispoljavaju sličnu biološku aktivnost (eng. *Similar Property Principle*).¹⁸¹

Sa druge strane, SBVS se zasniva na dokingu jedinjenja iz virtuelne biblioteke unutar aktivnog mesta receptora. Strukture proteina su obično dobijene rendgenskom kristalografijom ili nuklearnom magnetnom rezonancijom. U slučajevima kada kristalna struktura proteina nije poznata mogu se koristiti njihovi homologni modeli.¹⁸² Za razliku od LBVS u kom dolazi do identifikovanja strukturno sličnih liganada, u SBVS je moguće selektovati jedinjenja sa novim skafoldom ili funkcionalnim grupama. U oba pristupa jedinjenja se rangiraju na osnovu njihove sličnosti sa template koristeći različite skorove.

Pored pojedinačnih pristupa, različite kombinovane tehnike VS su dosta u upotrebi poslednjih godina: sekvencionalne, paralelne i hibridne.^{179,183} Prednost kombinovanih LBVS i SBVS tehnika je to što uzimaju u obzir sve dostupne hemijske i biološke informacije i na taj način se prevazilaze nedostaci pojedinačnih metoda.¹⁸⁴

Pored navedenih primena, metode skrininga se mogu koristiti i za profilisanje i anti-target modelovanje da bi se izbegli neželjeni efekti jedinjenja koji su posledica njihovog nespecifičnog vezivanja za proteine (eng. *off-target activity*).¹⁸⁵

1.4.1 Metode *in silico* identifikovanja novih bioloških targeta liganada (eng. *off-targets*)

Selektivnost liganada je značajna da bi se izbegli sporedni neželjeni efekti i ozbiljne neželjene reakcije, ali određivanje kompletnog profila selektivnosti za bioaktivna jedinjenja eksperimentalnim putem nije moguće. Metode *in silico* identifikovanja *off-targeta* omogućavaju predviđanje novih bioloških targeta malih molekula na osnovu njihove strukture uz pomoć računarskih metoda. Četiri najčešće korišćena pristupa su:

- traženje jedinjenja po sličnosti u strukturi (eng. *chemical similarity searching*)
- mašinsko učenje (eng. *machine learning*)
- spektar bioaktivnosti (eng. *bioactivity spectra*)
- ukršteni doking (eng. *cross-docking*).

Za razliku od navedenih pristupa koji se zasnivaju na ligandu, ukršteni doking uzima u obzir trodimenzionalnu strukturu proteina i pokazuje određene prednosti.¹⁸⁶ Ova metoda daje uvid u način vezivanja liganada za receptore i daje informacije za dalju optimizaciju vodećeg jedinjenja. Do danas je zabeleženo nekoliko uspešnih primena ove metode u pronalaženju novih *off-targeta*.^{187,188} Jedna od prvih primena inverznog dokinga je bila identifikacija proteinskih targeta za prirodne produkte.^{189,190}

Osim za otkrivanje novih targeta za već postojeće lekove i prirodna jedinjenja, ukršteni doking se koristi da objasni polifarmakologiju i mehanizam delovanja jedinjenja, u pronalaženju novih alternativnih indikacija za lekove, i detektovanju neželjenih efekata i toksičnosti lekova. Međutim, ova metoda ima i svoje nedostatke. Priprema baze proteina je dugotrajna i nemoguće je uzeti u obzir njihovu fleksibilnost. Takođe, teško je normalizovati doking skorove za rangiranje targeta.

2 CILJ

Ciljevi ove doktorske disertacije su:

1. Ispitivanje permeabilnosti liganada α_2 -adrenergičkih i/ili imidazolinskih receptora i lekova koji deluju na CNS kroz KMB

- Ispitivanje lipofilnosti α_2 -adrenergičkih i/ili imidazolinskih receptora primenom reverzno-fazne tečne hromatografije pod visokim pritiskom
 - Procena permeabilnosti liganada α_2 -adrenergičkih i/ili imidazolinskih receptora kroz KMB primenom *in vitro* tehnika (PAMPA i bioparticiona micelarna hromatografija)
 - Formiranje i validacija QSPR modela korišćenjem različitih skupova deskriptora u cilju identifikacije funkcionalnih grupa najznačajnijih za permeabilnost kroz KMB
2. Razvoj i primena kombinovanog VS pristupa zasnovanog na ligandu i strukturi proteina u cilju identifikacije novih I₁-IR agonista koji će se, kao i rilmenidin, vezivati za nisharin i ispoljavati antiproliferativnu i proapoptotsku aktivnost
- Izvršiti pretragu baze jedinjenja koristeći srednji kvazivalentni broj i selektovati ona koja pokazuju sličnost u strukturi sa rilmenidinom
 - Razvoj i primena kombinovanog virtuelnog skrininga zasnovanog na ligandu i na strukturi proteina koji će da filtrira samo ona jedinjenja iz baze koja pokazuju veliku sličnost sa rilmenidinom i/ili aktivnim centrom nisharina uzimajući u obzir GRID molekulska interakciona polja
3. Sinteza liganada selektovanih primenom kombinovanog VS protokola
- Sinteza liganada pod mikrotalasnim uslovima korišćenjem mikrotalasnog reaktora *CEM Microwave Synthesizer-Discover*
 - Prečišćavanje sintetisanih jedinjenja primenom *flash* hromatografije i odgovarajuće smeše rastvarača
 - Potvrda hemijske strukture sintetisanih jedinjenja primenom ¹H NMR i ¹³C NMR spektroskopije i HRMS eksperimentom
4. *In vitro* ispitivanje afiniteta sintetisanih jedinjenja na α_2 -adrenergičkim receptorima
- Određivanje afiniteta vezivanja (K_i) liganda primenom testa kompetitivnog vezivanja

- Određivanje potentnosti agonista (EC_{50}) i njihove efikasnosti (intrizičke aktivnosti) primenom testa vezivanja [^{35}S]GTP γ S
5. *In vitro* ispitivanje aktivnosti sintetisanih jedinjenja na K562 ćelijskoj liniji
- Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (IC_{50}) upotrebom MTT-testa
 - Ispitivanje antiproliferativnih osobina najaktivnijeg jedinjenja kao i sposobnosti indukcije apoptoze
 - a. Ispitivanje uticaja najaktivnijeg jedinjenja na ćelijski ciklus K562 ćelija
 - b. Ispitivanje sinergizma najaktivnijeg jedinjenja sa doksorubicinom na K562 ćelijskoj liniji
6. Ispitivanje selektivnosti liganada α_2 -adrenergičkih i/ili imidazolinskih receptora i pronalaženje novih potencijalnih targeta ove grupe jedinjenja primenom inverznog dokinga
- Identifikacija GPCR receptora kao potencijalnih novih targeta sa kojima ligandi imidazolinskih receptora ostvaruju značajne interakcije

3 EKSPERIMENTALNI DEO

3.1 Opšti podaci

3.1.1 Hemikalije i reagensi

- Standardi ispitivanih supstanci:

agmatin-sulfat, brimonidin-tartarat, bromazepam, venlafaksin-hidrohlorid, gvanabenz, gvanfacin-hidrohlorid, efaroksan-hidrohlorid, ziprasidon-hidrohlorid, idazoksan-hidrohlorid, karbamazepin, klozapin, klonazepam, klonidin-hidrohlorid, ksilometazolin-hidrohlorid, lamotrigin, levetiracetam, levomepromazin-hidrohlorid, lorazepam, oksazepam, olanzapin, moksonidin-hidrohlorid, maprotilin-hidrohlorid, mianserin-hidrohlorid, nafazolin-hidrohlorid, oksimetazolin-hidrohlorid, prazepam, rezerpin, rilmenidin-hemifumarat, risperidon, sertralin-hidrohlorid, tetrahidrozolin-hidrohlorid, tizanidin-hidrohlorid, topiramet, fluoksetin-hidrohlorid, harman, harmin i citalopram-hidrobromid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD); trimazolin-hidrohlorid (Zdravlje, Leskovac, Srbija); amilorid-hidrohlorid (Galenika, Beograd, Srbija); viloksazin (Hemofarm, Vršac, Srbija).

- Polazne supstance za sintezu:

4-hidroksi-6-metil-2-piron, izobutilamin, pentilamin, izopentilamin, benzilamin, 2-(2-hloretil)-piperidin hidrohlorid, karbazol, benzimidazol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD).

- Supstance i rastvori korišćeni u održavanju ćelijskih linija:

Ćelijske linije korišćene u ovoj disertaciji su K562 (ćelije hronične mijeloidne leukemije) (American Type Culture Collection, Rockville, MD) i CHO (rekombinantne ćelije ovarijuma kineskog hrčka) (K1) koje ekspimiraju cDNK koji kodira humani α_{2A} adrenergički receptor (American Type Culture Collection, Manassas, VA, SAD).

Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medijum (Gibco, Grand Island, SAD); α -minimalni esencijalni medijum (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, SAD), 10% inaktivisani teleći fetalni serum (eng. *Fetal Calf Serum*, FCS) pH 7,2; 5% inaktivisani goveđi fetalni serum (eng. *Fetal Bovine Serum*, FBS); penicilin (192 IU/ml); penicilin (50 IU/ml); streptomycin (200 μ g/ml); streptomycin (50 μ g/ml); G418 (200 μ g/ml); 4-(2-hidroksietil)-piperazine-1-etansulfonična kiselina (HEPES) (25 mM); L-glutamine (3 mM); [3 H]RS-79948-197 (GE Healthcare, London, U.K.)

- Enzimi:

Enzimi korišćeni u ovoj disertaciji su rekombinantni humani Src (Upstate, Lake Placid, Njujork, SAD) i Abl (Promega Biosciences, LLC, Promega France, Promega Corporation, Australija) enzimi.

- Metanol HPLC čistoće (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- Acetonitril HPLC čistoće (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- Trietilamin HPLC čistoće (Merck, Darmstadt, Nemačka)
- 85 % ortofosforna kiselina (Merck, Darmstadt, Nemačka)
- Sirćetna kiselina, $\geq 99,8$ % (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- 25 % Amonijum hidroksid (Carlo Erba, Milano, Italija)
- Dodekan, $\geq 99,9$ % (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- Dimetilsulfoksid, DMSO, $\geq 99,9$ % (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- Natrijum-hlorid, $\geq 99,0$ % (J.T. Baker, Deventer, Holandija)
- Dinatrijum-hidrogenfosfat, $\geq 99,0$ % (Merck, Darmstadt, Nemačka)
- Kalijum-dihidrogenfosfat, $\geq 99,5$ % (Merck, Darmstadt, Nemačka)
- Natrijum-dihidrogenfosfat, dihidrat, $\geq 99,0$ % (Merck, Darmstadt, Nemačka)
- Natrijum hidroksid, $\geq 99,0$ % (Merck, Darmstadt, Nemačka)
- Kalijum-nitrat, $\geq 99,0$ % (Merck, Darmstadt, Nemačka)
- Dimetoksietan (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- Polarni lipidi mozga svinje (eng. *porcine Polar Brain Lipid*, PBL) (catalog no. 141101C), Avanti Polar Lipids, Inc. (Alabaster, AL)
- Polioksietilen(23) lauril etar, Brij 35 (Sigma Aldrich, Steinheim, Nemačka)
- [^3H]RS-79948-197 (GE Healthcare, London, UK)

3.1.2 Oprema

- HPLC aparat Dionex Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific, Germering, Nemačka)
- HPLC aparat Agilent Technologies 1200 Series sistem (Santa Klara, KA, SAD)

- UHPLC-MS-MS aparat – tečni hromatograf spregnut sa triplkvadripolskim masenim detektorom (Thermo Fisher Scientific Inc., Madison, WI, SAD)
- Agilent 11000 HPLC sistem sa Applied Biosystem/MDS SCIEX MS detektorom opremljen sa API 150EX jonizacionim izvorom (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, SAD)
- Mikrotalasni reaktor CEM Microwave Synthesizer-Discover model (Metjuz, Severna Karolina, SAD)
- NMR BRUKER AVANCE (Bruker Biospin GmbH, Rheinstetten, Nemačka)
- LTQ ORBITRAP XL (Thermo Fisher Scientific Inc., Madison, WI, SAD) za određivanje preciznih masa
- Kolona Zorbax Eclipse Plus-C18 250 x 4,6 mm; dijametar čestica 5 µm (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, SAD)
- Kolona Zorbax Extend-C18 150 x 4,6 mm; dijametar čestica 5 µm (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, SAD)
- Analitička vaga METLLER (Ciri, Švajcarska)
- Analitička vaga Adventurer™-Pro (Ohaus Corporation, Pine Brook, SAD)
- Ultrazvučno kupatilo USK (EI Niš, Niš, Srbija)
- TKA sistem za prečišćavanje vode (Niederelberg, Nemačka)
- pH metar Radiometer model PHM 240 pH/ION-meter (Radiometer, Kopenhagen, Danska)
- Ultra-Turrax homogenizator
- Protočni citometar Fluorescence Activated Sorting Cells-FACS Calibur, (BectonDickinson, San Diego, CA, USA)
- Svetlosni brojač Wallac 1450 MicroBeta (Perkin Elmer Wallac)
- Vakuumski kolektor Millipore MultiScreen (Millipore Corporation, Bedford, MA, SAD)
- Hidrofilne PVDF (eng. *Polyvinylidene Fluoride*) mikrofiltracione ploče sa 96 odeljaka MultiScreen-HV Filter Plate, 0,45 µm (catalog no. MAHVN4510) (Millipore Corporation, Bedford, MA, SAD)
- Filtracione ploče od staklenih vlakana sa 96 odeljaka Millipore MultiScreen MSFBN (Millipore Corporation, Bedford, MA, SAD)

- Mikrotitar ploče sa ravnim dnom sa 96 odeljaka, NUNC (Thermo Scientific, Roskilde, Danska)
- Aluminijske folije obložene silika gelom (SUPELCO Analytical, Sigma-Aldrich)
- BD Falcon 12 × 75 mm polistirenske epruvete, 5 mL
- Petri šolje (dimenzije 60 × 15 mm, NUNC)

3.1.3 Računarski programi

- ChemBioDraw Ultra 13.0 (CambridgeSoft Corporation, <http://www.cambridgesoft.com>)
- ChemBio3D Ultra 13.0 (CambridgeSoft Corporation, <http://www.cambridgesoft.com>)
- MarvinSketch 6.1.0 (ChemAxon, 2013, <http://www.chemaxon.com>)
- Dragon 6.0 (TALETE srl, 2010, <http://www.talete.mi.it>)
- ADMET Predictor 6.5 (Simulation Plus Inc., 2013, <http://www.simulations-plus.com>)
- STATISTICA 4.0 (StatSoft Inc., 1998, <http://www.statsoft.com>)
- SIMCA P+ 12.0 (Umetrics AB, 2008, <http://www.umetrics.com>)
- Microsoft Office Excel (Microsoft Corporation, 2010, <http://www.microsoft.com>)
- ACD/i-Lab softver (ACD/labs, Advanced Chemistry Development, <http://www.acdlabs.com>)
- AQVN/EIIP Calculator (Centre for Multidisciplinary Research Institute of Nuclear Sciences VINCA, <http://www.vin.bg.ac.rs/180/tools/formcalc.php>)
- SMIlib 2.0 (Modlab group, <http://gecco.org.chemie.uni-frankfurt.de>)
- FLAP 1.0.0 (Molecular Discovery Ltd, 2009, <http://www.moldiscovery.com>)
- GraphPad Prism 5.04 (GraphPad Software, Inc., <https://www.graphpad.com>)
- CalcuSyn softver (Biosoft, <http://www.biosoft.com/w/calculusyn.htm>)
- CellQuest softver (Department of flow and image cytometry, http://www.rpciflow.org/analysis_software.html)
- Aggregator Advisor (<http://advisor.bkslab.org/search/>)
- Maestro softver (Schrödinger 2015-3, <https://www.schrodinger.com/glide>)

- Glide softver (Schrödinger 2015-3, <https://www.schrodinger.com/glide>)

3.2 Procena permeabilnosti kroz krvno-moždanu barijeru primenom PAMPA testa

3.2.1 Priprema rastvora

Fosfatom puferovan fiziološki rastvor pH 7,4. Rastvori se 2,38 g dinatrijum-hidrogenfosfata (Na_2HPO_4), 0,19 g kalijum-dihidrogenfosfata (KH_2PO_4) i 8,0 g natrijum-

hlorida (NaCl) u vodi. Dopuni se do 1000,0 mL istim rastvaračem. Podesi se pH ukoliko je potrebno.

Osnovni rastvor ispitivanih jedinjenja u DMSO ($c = 0,5 \text{ mg/mL}$). U odmerni sud od 5 mL prenese se masa koja odgovara 2,5 mg ispitivanog jedinjenja i dopuni DMSO do oznake.

Radni rastvor ispitivanih jedinjenja ($c = 25 \text{ }\mu\text{g/mL}$). U odmerni sud od 10 mL prenese se 0,5 ml osnovnog rastvora u DMSO i dopuni *fosfatom puferovanim fiziološkim rastvorom pH 7,4* do crte.

Rastvor membrane u dodekanu (20 mg/mL). Pipetom se odmeri 8 mL polarnih lipida mozga svinje koncentracije 25 mg/mL i prenese u odmerni sud od 10 mL. Nakon toga odmerni sud se dopuni dodekanom do oznake.

3.2.2 Izvođenje PAMPA testa

Efektivne permeabilnosti 40 jedinjenja (18 liganada α_2 -adrenergičkih i/ili imidazolinskih receptora i 22 leka koja deluju na CNS) kroz KMB su ispitane koristeći PAMPA test, po protokolu koji je već opisan u literaturi.¹³¹

Permeabilnosti ovih jedinjenja su analizirane na hidrofilnim PVDF mikrofiltracionim pločama koje se sastoje od 96 odeljaka. U svaki odeljak donorske ploče se prenese po 300 μL *radnog rastvora ispitivanih jedinjenja*, dok se u odeljke akceptorske ploče prenese po 300 μL *fiziološkog rastvora puferovanog fosfatom pH 7,4*. Filter membrana koja razdvaja ova dva tipa odeljaka se impregnira sa 4 μL *rastvora membrane u dodekanu*. Akceptorska ploča se pažljivo stavi na donorsku ploču, pri čemu se formira PAMPA sistem koji se poklopi parafilnom i poklopcem da bi se sprečilo isparavanje rastvarača i ostavi 18 sati na sobnoj temperaturi.

Nakon ovog perioda inkubacije PAMPA sistem se rastavlja, i koncentracije ispitivanih jedinjenja u akceptorskim i donorskim pločama, kao i u polaznim rastvorima se određuju primenom standardne analitičke HPLC metode sa UV detektorom. Uzorci jedinjenja koja ne apsorbuju u UV oblasti su analizirani LC-MS metodom.

3.2.3 Hromatografske metode određivanja koncentracija ispitivanih jedinjenja

Dionex Ultimate 3000 opremljen sa UV/VIS detektorom je korišćen za određivanje koncentracija ispitivanih jedinjenja u donorskim i akceptorskim pločama, kao i u polaznim rastvorima. Ispitivanje je izvršeno na koloni Zorbax Eclipse Plus C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm). Injekciona zapremina je iznosila 2 µL, protok mobilne faze 1 mL min⁻¹ i jedinjenja su detektovana na UV talasnim dužinama 230, 254 i 280 nm. Optimalni uslovi za separaciju 18 liganada α₂-adrenergičkih i/ili imidazolinskih receptora su dobijeni korišćenjem smeše acetonitril-trietilamin fosfatni pufer (pH = 4; 25 mM) kao mobilne faze na 25 °C, dok su 22 leka koja deluju na CNS ispitana koristeći kao mobilnu fazu smešu metanol-amonijum acetatni pufer (pH = 3,9; 5 mM) na 22-24 °C.¹⁹¹

Uzorci jedinjenja kao što su rilmenidin, topiramat, fluoksetin i lamotrigin, koja slabo apsorbuju ili ne apsorbuju u UV oblasti, su analizirani na UHPLC-MS-MS aparatu-tečnom hromatografu spregnutim sa triplkvadripolskim masenim detektorom.

3.2.4 Izračunavanje PAMPA parametara

Uzorci su analizirani u triplikatu i zabeležene su njihove prosečne vrednosti. Efektivna permeabilnost ispitivanih jedinjenja (P_e) je izračunata primenom jednačina 7 i 8 uzimajući u obzir izo-pH uslove i zadržavanje jedinjenja u membrani:¹³⁵

$$V_a C_a(t) + V_d C_d(t) = V_d C_d(0)(1 - R) \quad (7)$$

$$P_e = \frac{-2.303V_d}{A(t-\tau_{lag})} \left(\frac{1}{1+r_v} \right) \log_{10} \left[1 - \left(\frac{1+r_v^{-1}}{1-R} \right) \frac{C_a(t)}{C_d(0)} \right] \quad (8)$$

V_a – zapremina rastvora u akceptorskim odeljcima (mL) - 300µL;

V_d – zapremina rastvora u donorskim odeljcima (mL) - 300µL;

A – filtraciona površina (cm²) – 0,28 cm²;

t – period inkubacije (s) – 64 800 s;

$C_a(t)$ – koncentracija jedinjenja u akceptorskom odeljku nakon perioda inkubacije t ;

$C_d(t)$ – koncentracija jedinjenja u donorskom odeljku nakon perioda inkubacije t ;

$C_d(0)$ – koncentracija jedinjenja u donorskom odeljku na početku inkubacije t_0 ;

R – frakcija jedinjenja koja se zadržava u membrani;

r_v – odnos zapremina donoskog (300 μL) i akceptorskog odeljka (300 μL) - $V_d/V_a = 1$;

τ_{lag} – vreme potrebno da se membrana zasiti ispitivanom supstancom. Relativno je kratko ako se uporedi sa periodom inkubacije t , tako da u eksperimentima može zanemariti (oko 20 minuta za eksperimente u kojima nema mućkanja PAMPA ploča).¹⁹²

Uzimajući u obzir sve navedene konstante kao i činjenicu da je za ispitivane ligande pokazano da se ne zadržavaju u membrani, finalna jednačina za izračunavanje KMB permeabilnosti je:

$$P_e = -1,9039 * 10^{-5} \log_{10} \left[1 - 2 * \frac{C_d(t)}{C_d(0)} \right] \quad (9)$$

3.2.5 Odabir dominantnih tautomernih oblika i optimizacija jedinjenja

Dvodimenzionalne strukture ispitivanih jedinjenja su generisane primenom ChemBioDraw Ultra 13.0 softvera. Njihovi dominantni molekulski/katjonski oblici na $\text{pH} = 7,4$ su određeni korišćenjem MarvinSketch 6.1.0 softvera.¹⁹³ Geometrija odabranih molekulskih/katjonskih oblika ispitivanih jedinjenja je optimizovana primenom B3LYP/6-31G (d,p) nivoa *Density Functional Theory* (DTF)^{194,195} u ChemBio3D Ultra 13.0 programu.¹⁹⁶

Pojedini liganadi α_2 -adrenergičkih i/ili imidazolinskih receptora kao što su moksonidin, klonidin, tizanidin, rilmenidin i brimonidin na ovoj pH vrednosti mogu biti prisutni u dva tautomerna oblika, amino i imino. Da bi se dobili precizniji rezultati odabir dominantnih tautomernih oblika je izvršen upoređivanjem vrednosti njihovih SCF energija (eng. *Self Consistent Field Energy*) nakon optimizacije. Tako su moksonidin-imin i tizanidin-amin odabrani kao dominantni tautomeri oblici na osnovu nižih vrednosti njihovih SCF energija. Za amino i imino tautomere brimonidina, klonidina i rilmenidina dobijene vrednosti SCF energija su bile ekvivalentne pa su oba tautomera oblika ovih jedinjenja bila uključena u građenje matematičkih modela.

3.2.6 Molekulski deskriptori

Geometrijski, konstitucijski, fizičko-hemijski, termodinamički i elektronski deskriptori optimizovanih struktura ispitivanih jedinjenja su izračunati u ChemBio3D Ultra 13.0, Dragon 6.0¹⁹⁷ i ADMET Predictor 6.5¹⁹⁸ programima. Takođe, HOMO i LUMO energije jedinjenja izračunate u ChemBio3D Ultra 13.0 su korišćene za izračunavanje kvantno-hemijskih molekularskih deskriptora kao što su hemijski potencijal (μ), elektronegativnost (χ), *hardness* (otpornost na transfer elektrona) (η), *softness* (hemijaska reaktivnost, sposobnost delokalizacije naelektrisanja) (S) i indeks elektrofiliteta.¹⁹⁹⁻²⁰¹

Da bi se izbeglo pretreniranje QSPR modela, deskriptori sa konstantnim vrednostima nisu uključeni u njihovo formiranje. Takođe, izračunata je interkorelacija između deskriptora. Parovi molekularskih deskriptora sa interkorelacijom većom od 0,99 (za PLS analizu) i 0,90 (za *postupnu* MLR i ANN analizu) su ispitani i oni koji imaju veću uticaj na zavisnu varijablu ($\log P_e$) su korišćeni za građenje QSPR modela, dok su ostali eliminisani iz grupe. Na kraju, ukupan broj deskriptora koji je korišćen u QSPR studiji je bio 1101.

3.2.7 QSPR modelovanje

Kvantitativnim odnosom strukture i permeabilnosti (eng. *Quantitative Structure-Permeability Relationship*, QSPR) ispitana je korelacija između logaritma efektivne KMB permeabilnosti ($\log P_e$) testiranih jedinjenja i izračunatih konstitucijskih, geometrijskih, fizičko-hemijskih i elektronskih deskriptora korišćenjem različitih statističkih metoda (PLS, *postupna* MLR i ANN). $\log P_e$ je korišćen kao zavisna varijabla (Y), dok su izračunati molekularski parametri predstavljali nezavisne varijable (X) u QSPR studiji. PLS regresiona analiza je izvedena korišćenjem SIMCA P+ 12.0 programa, dok su MLR i PLS modeli formirani u STATISTICA Neural Network 4.0.

Analiza glavnih komponenti (eng. *Principal Component Analysis*, PCA) je sprovedena uzimajući u obzir sve izračunate deskriptore i četiri jedinjenja uključujući rezerpin, levetiracetam, agmatin i amilorid su identifikovana kao *outlier*-i. Na osnovu PCA plota i uzimajući u obzir $\log P_e$ vrednosti, set od preostalih 36 jedinjenja je podeljen na trening set koji je korišćen za formiranje MLR-QSPR($\log P_e$) i PLS-QSPR($\log P_e$) modela (23 jedinjenja-bromazepam, karbamazepin, citalopram, klonazepam, klozapin,

efaroksan, gvanabenz, harman, harmin, klonidin, lamotrigin, maprotilin, moksonidin, oksazepam, oksimetazolin, prazepam, risperidon, tizanidin, topiramet, trimazolin, venlafaksin i viloksazin) i test set korišćen za validaciju modela (13 jedinjenja-brimonidin, fluoksetin, gvanfacin, idazoksan, ksilometazolin, levomepromazin, lorazepam, nafazolin, olanzapin, rilmenidin, sertralin, tetrahidrozolin i ziprasidon). Prilikom formiranja trening i test seta vođeno je računa da su jedinjenja iz oba seta homogeno distribuirana na PCA plotu, kao i da pokrivaju isti opseg $\log P$ vrednosti.

Najznačajniji deskriptori selektovani *postupnom* MLR metodom su korišćeni kao ulazne varijable (eng. *inputs*) za ANN modelovanje. Jedinjenja korišćena kao test set u MLR-QSPR($\log P_e$) i PLS-QSPR($\log P_e$) modelima, su u ANN studiji podeljena u dve grupe: verifikacioni set (7 jedinjenja-brimonidin, fluoksetin, idazoksan, ksilometazolin, lorazepam, nafazolin i tetrahidrozolin) i test set (6 jedinjenja-gvanfacin, levomepromazin, olanzapin, sertralin, rilmenidin i ziprasidon), dok je trening set ostao isti.

3.3 Procena permeabilnosti kroz krvno-moždanu barijeru primenom bioparticione micelarne hromatografije

3.3.1 Priprema rastvora

Osnovni rastvor ispitivanih jedinjenja (1 mg/mL). U odmerni sud od 5 mL prenese se masa koja odgovara 5 mg ispitivanog jedinjenja i dopuni metanolom do oznake.

Radni rastvor ispitivanih jedinjenja (0,1 mg/mL). U odmerni sud od 10 mL prenese se 1mL osnovnog rastvora i dopuni metanolom do crte.

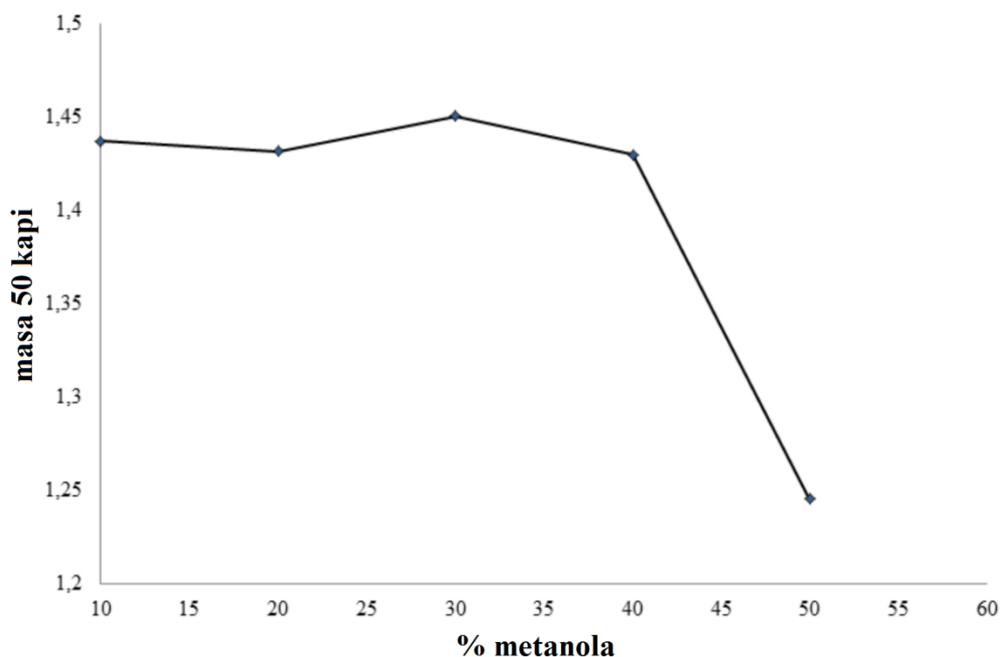
Priprema rastvora pufera pH 7,4. U odmerni sud od 500 mL prenese se 0,68466 g natrijum-dihidrogenfosfata, monohidrata ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$) i 3,77 mL rastvora 1M natrijum hidroksida (NaOH) i dopuni vodom do crte. Jonska jačina dobijenog rastvora iznosi 25 mmol/L.

Rastvor 0,04 M Brij 35 u puferu pH = 7,4. Odmeri se 48 g Brij 35 u 1000 mL pufera pH = 7,4 i rastvori uz zagrevanje na magnetnoj mešalici.

3.3.2 Određivanje optimalnog sadržaja metanola u mobilnoj fazi BMC sistema

Da bi se formirale micelle u BMC sistemu, a u isto vreme dobila zadovoljavajuća retenciona vremena i izgled PIK-ova potrebno je voditi računa o optimalnom udelu organske komponente u mobilnoj fazi. Visok procenat organskog rastvarača može da dovede do raspadanja micela u ovom sistemu.¹⁴¹ Kada se kao surfaktant koristi negativno naelektrisan natrijum dodecil sulfat (eng. *sodium dodecyl sulfate*, SDS), dezintegracija micela se javlja u prisustvu 1-propanola u koncentraciji 22%, etanola u koncentraciji 30% i metanola u koncentraciji 40% kao organskih komponenti mobilne faze.^{141,202}

Optimalni sadržaj metanola u sistemu koji kao surfaktant sadrži nenaelektrisan Brij 35 određen je primenom jednostavnog testa koji se zasniva na merenju mase 50 kapi smeša koje sadrže različiti odnos metanola i micelnog rastvora 0,04 M Brij 35 u puferu pH 7,4 (10%, 20%, 30%, 40% i 50%).^{141,203} Dobijeni rezultati su prikazani na **Slici 17**.



Slika 17. Mase 50 kapi smeša koje sadrže različiti odnos metanola i micelnog rastvora 0,04 M Brij 35 u puferu pH 7,4

Koncentracija metanola pri kojoj dolazi do naglog pada mase 50 kapi označava koncentraciju ovog rastvarača koja dovodi do destrukcije micela. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da pri koncentraciji metanola od 10 % do 40% u mobilnoj fazi BMC sistema dolazi do formiranja micela Brij 35 monomera, čime se omogućava simuliranje bioloških uslova KMB prilikom izvođenja eksperimenata.

3.3.3 Izvođenje BMC ispitivanja

Agilent Technologies 1200 Series sistem je korišćen za ispitivanje retencionog ponašanja liganada α_2 -adrenergičkih i/ili imidazolinskih receptora i lekova koji deluju na CNS. Ispitivanje je izvršeno na koloni Zorbax Extend-C18 (150 x 4,6 mm; 5 μ m), pri protoku mobilne faze 1 mL min⁻¹, temperaturi 36,5 °C i UV detekciji na 210 nm. Mobilna faza koja sadrži metanol i 0,04 M micelarni rastvor Brij 35 u puferu pH 7,4 u odnosu 20:80 (v/v) je korišćena u ovoj disertaciji.¹⁴⁵ Retencioni faktori ispitivanih jedinjenja su izračunati prema formuli:

$$k = \frac{t_r - t_0}{t_0} \quad (10)$$

t_r – retenciono vreme ispitivanog jedinjenja;

t_0 – „mrtvo vreme“. Za određivanje „mrtvog vremena“ kao marker korišćen je rastvor kalijum-nitrata (KNO₃) u metanolu, jer se ova supstanca ne zadržava u koloni.

3.3.4 Optimizacija jedinjenja i izračunavanje molekulskih deskriptora

Odabir dominantnih tautomernih oblika, proces minimizacije energije ispitivanih jedinjenja i izračunavanje geometrijskih, termodinamičkih, fizičko-hemijskih i elektronskih deskriptora optimizovanih struktura je opisano u poglavlju 3.2.5 *Odabir dominantnih tautomernih oblika i optimizacija jedinjenja.*

3.3.5 QSPR modelovanje

Kvantitativnim odnosom strukture i retencije (eng. *Quantitative structure-retention relationship*, QSRR) utvrđene su matematičke veze između retencionih faktora ispitivanih jedinjenja u BMC sistemu i izračunatih molekulskih parametara. Logaritmi retencionih faktora ($\log k_{\text{BMC}}$) liganada α_2 -adrenergičkih/imidazolinskih receptora i CNS

lekova je korišćen kao zavisna varijabla (Y), dok su izračunati molekularni parametri selektovani kao nezavisne varijable (X) u QSRR studiji. PLS model je formiran koristeći SIMCA P+ 12.0 program, dok je STATISTICA Neural Network 4.0 korišćena za postupnu MLR, SVM and ANN analizu.

Na osnovu PCA plota, uzimajući u obzir sve izračunate deskriptore, amilorid je identifikovan kao *outlier*. Set od preostalih 30 jedinjenja je podeljen na trening set od 20 jedinjenja (bromazepam, klonazepam, efaroksan, fluoksetin, gvanabenz, harmin, idazoksan, klonidin, ksilometazolin, moksonidin, nafazolin, oksazepam, olanzapin, prazepam, rilmenidin, risperidon, tizanidin, trimazolin, viloksazin i ziprasidon) i test set od 10 jedinjenja (brimonidin, karbamazepin, citalopram, klozapin, gvanfacin, harman, lamotrigin, lorazepam, mianserin i tetrahidrozolin) vodeći računa da su jedinjenja iz oba seta homogeno distribuirana na PCA plotu i da pokrivaju isti opseg $\log k_{BMC}$ vrednosti. Isti trening i test set su korišćeni za građenje i validaciju PLS-QSPR, postupnog MLR, SVM i ANN modela. Kod ANN modelovanja test set je dodatno podeljen na verifikacioni (brimonidin, citalopram, klozapin, harman, lorazepam i tetrahidrozolin) i test set (karbamazepin, gvanfacin, lamotrigin i mianserin).

3.4 Procena lipofilnosti primenom reverzno-fazne tečne hromatografije (RP-HPLC)

3.4.1 Priprema rastvora

Priprema osnovnih (1 mg/mL) i radnih rastvora (0,1 mg/mL) ispitivanih jedinjenja je opisana u poglavlju 3.3.1 Priprema rastvora.

3.4.2 Izvođenje RP-HPLC ispitivanja

Agilent Technologies 1200 Series sistem je korišćen za ispitivanje retencionog ponašanja liganada α_2 -adrenergičkih/imidazolinskih receptora i lekova koji deluju na CNS u reverzno-faznoj tečnoj hromatografiji pod visokim pritiskom. Ispitivanje je izvršeno na koloni Zorbax Extend-C18 (150 x 4,6 mm; 5 μ m), pri protoku mobilne faze 1 mL/min, temperaturi 36,5 °C i UV detekciji 210 nm, kao i u BMC sistemu. Najmanje pet mobilnih faza metanol-pufer sa udelom metanola od 55-75 % je korišćeno za određivanje retencionog faktora (k) ispitivanih jedinjenja prema jednačini 10. Na osnovu linearne zavisnosti logaritma retencionog faktora $\log k$ i zapreminskog udela metanola u mobilnoj fazi (ϕ) izračunata je vrednost $\log k_w$:

$$\log k = \log k_w + S\varphi \quad (11)$$

U datoj jednačini vrednost $\log k_w$ predstavlja odsečak, dok konstanta S odgovara nagibu linearne krive. $\log k_w$ predstavlja hromatografski dobijen parametar lipofilnosti i može se koristiti za procenu lipofilnosti ispitivanih molekula. Takođe, iz odnosa odsečka ($\log k_w$) i nagiba (S) izračunat je i izokraski parametar (φ_0) koji ukazuje na hidrofobnost ispitivanih jedinjenja.²⁰⁴

$$\varphi_0 = \frac{-\log k_w}{S} \quad (12)$$

3.5 Kombinovani VS protokol zasnovan na ligandu i strukturi proteina za identifikaciju novih liganada imidazolinskih (I₁) receptora

3.5.1 Set jedinjenja

Baza jedinjenja korišćena za *in silico* skrining je sadržala više od 9×10^6 molekula. Bazu su činila virtuelna jedinjenja generisana primenom Smi-Lab softvera,²⁰⁵ kao i jedinjenja koja već bila sintetisana i dostupna.²⁰⁶ Kao ulazne varijable za Smi-Lab softver korišćene su različite komercijalno dostupne polazne supstance, čijim kombinovanjem su generisani novi molekuli.

3.5.2 Heminformatički skrining

Virtuelni skrining korišćen u ovoj disertaciji se zasniva na kombinaciji različitih metoda. Na početku ovog višestepenog skrining procesa izvršena je pretraga baze jedinjenja po sličnosti u strukturi sa rilmenidinom korišćenjem srednjeg kvazivalentnog broja Z^* (eng. *average quasi-valence number*, AQVN) i selektivano je 3005 jedinjenja. U prethodnim studijama je pokazano da postoji visoka korelacija između biološke aktivnosti organskih molekula i njihovih AQVN vrednosti i potencijal elektron-jon interakcija (eng. *electron-ion interaction potential*, EIIP).²⁰⁷ Molekulski deskriptor Z^* je izračunat korišćenjem FormCal kompjuterske alatke prema jednačini:^{207,208}

$$Z^* = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^m n_i Z_i \quad (13)$$

Z_i – valentni broj atoma koji je i -ta komponenta molekula;

n_i – broj atoma i -te komponente;

m – broj komponenti molekula;

N – ukupan broj atoma u molekulu.

Izračunavanje EIIP vrednosti za organske molekule, je zasnovano isključivo na bruto hemijskoj formuli, što za posledicu ima da su EIIP vrednosti dva izomera nekog organskog molekula jednake. Z^* vrednosti rilmenidina i 28 agonista I₁-IR su korišćene da bi se definisali domeni za filtriranje hit jedinjenja.

3.5.3 Virtuelni skrining zasnovan na ligandu i strukturi proteina

Nakon heminformatičkog skrininga i filtriranja jedinjenja na osnovu vrednosti njihovog srednjeg kvazivalentnog, softver FLAP 1.0.0 (eng. *Fingerprint for Ligands and Proteins*)^{209,210} je korišćen za izvođenje virtuelnog skrininga zasnovanog na ligandu i na strukturi proteina u cilju pronalaska novih I₁-IR liganada sa antiproliferativnom/proapoptotskom aktivnošću. Paralelnom primenom ove dve različite FLAP metode omogućeno je pronalaženje novih strukturno različitih hit jedinjenja sa željenom biološkom aktivnošću.

3.5.3.1 Formiranje FLAP baze

Pored molekula prethodno selektovanih heminformatičkim skriningom, FLAP bazi je dodat 21 agonista I₁-IR sa eksperimentalno određenim pK_i vrednostima većim od 6 (**Tabela 6**). Ovi agonisti su u VS protokolu označeni kao aktivna jedinjenja.

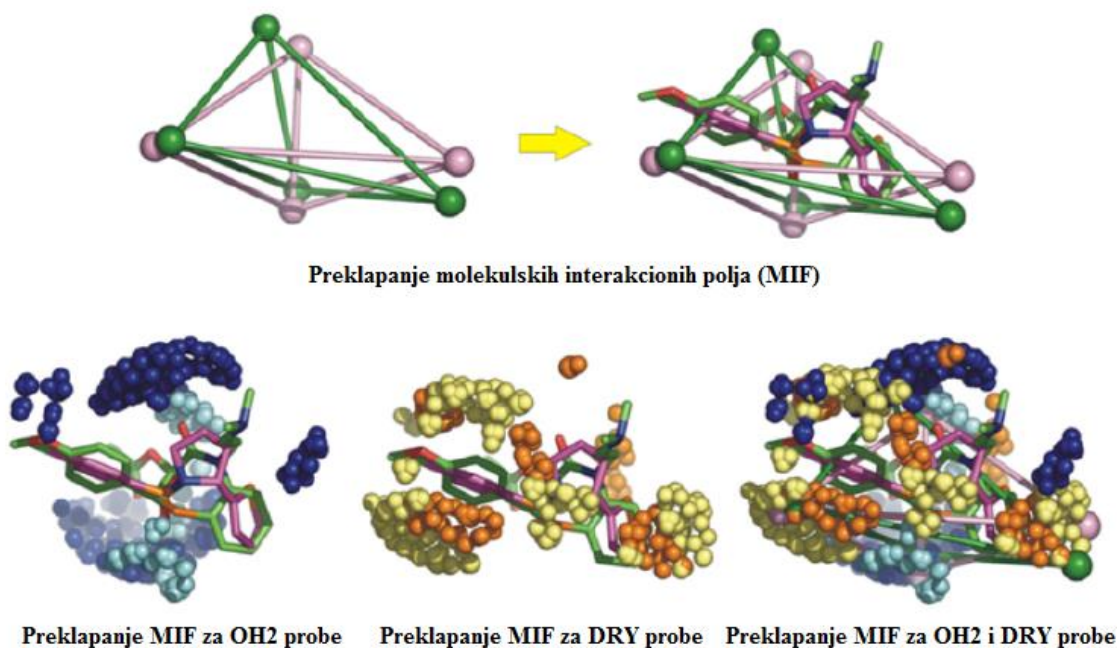
Geometrija svih jedinjenja je optimizovana primenom molekularno mehaničkog MM3 polja sile,²¹¹ pri čemu je za svaki ligand generisano do 25 konformera sa srednjom kvadratnom greškom (eng. *root-mean-square deviation*, RMSD) manjom od 0.3 Å. Za svaki konformer su izračunata GRID molekulska interakciona polja (eng. *Molecular Interaction Fields*, MIF) koristeći 4 različite probe (H, O, N1 i DRY) koje opisuju:²¹²

- H proba - sterne interakcije liganda sa receptorom
- O proba - interakcije sa akceptorima vodoničnih veza
- N1 proba - interakcije sa donorima vodoničnih veza
- DRY proba - hidrofobne interakcije

3.5.3.2 FLAP virtuelni skrining

U skriningu zasnovanom na ligandu (eng. *Ligand Based Virtual Screening*, LBVS), jedinjenja iz FLAP baze su rangirana na osnovu njihove sličnosti u strukturi sa rilmenidinom (ChEMBL289480), dok su u skriningu zasnovanom na strukturi proteina (eng. *Structure Based Virtual Screening*, SBVS) rangirana na osnovu njihovog poklapanja sa aktivnim mestom nisharina uzimajući u obzir GRID molekulska interakciona polja. Pošto kristalografska struktura nisharina nije poznata, u ovoj disertaciji je korišćen homologni model ovog proteina.⁶⁰ Vezujući džep proteina je identifikovan korišćenjem *FLAPsite* algoritma za detekciju džepova.²¹³

Dva tipa skorova su korišćena da bi se kvantifikovala pomenuta sličnost uključujući *Probe* skorove koji predstavljaju stepen preklapanja molekulskih interakcionih polja za svaku probu pojedinačno (H, O, N1 i DRY) kao i njihove kombinacije, i *Distance* skorove koji se zasnivaju se na *Probe* skorovima i predstavljaju ukupnu različitost između liganda i modela jedinjenja/aktivnog mesta proteina. Pored toga, FLAP izračunava i skorove kao što su *Glob-Prod* koji se dobija sabiranjem skorova svih pojedinačnih GRID proba i *Glob-Sum* koji se dobija množenjem skorova svih pojedinačnih GRID proba (**Slika 18**).



Slika 18. Primeri preklapanja molekulskih interakcionih polja za različite probe (FLAP manual)

Svi skorovi su rangirani u opsegu od 0.0 (nizak stepen sličnosti između liganda i modela jedinjenja/aktivnog mesta proteina) do 1.0 (visok stepen sličnosti između liganda i modela jedinjenja/aktivnog mesta proteina) osim *Distance* skora gde 0.0 predstavlja visoku sličnost u strukturama.²¹⁴

3.5.3.3 Analiza rezultata virtuelnog skrininga

Rezultati VS su analizirani korišćenjem *enrichment faktora* (EF) i površinom ispod ROC krive (eng. *Area Under the ROC Curve*, AUROC). EF je kumulativni plot koji ukazuje koliki je procenat aktivnih jedinjenja (y-osa) među molekulima koja su top rangirana datom VS metodom u odnosu na njihov procenat u celom setu jedinjenja (x-osa). EF_{x%} ukazuje da se EF vrednost odnosi na procenat aktivnih jedinjenja u X% cele baze za seriju rangiranih liganada.

Sa druge strane, ROC kriva predstavlja meru sposobnost modela da grupiše aktivna jedinjenja u vrhu liste rangiranih liganada u odnosu na netestirana jedinjenja (lažno pozitivna, mamci). AUC vrednost 1 odgovara idealnom slučaju u kom su sva poznata aktivna jedinjenja rangirana iznad mamaca. Za efikasan model potrebno je da vrednost AUC bude viša od 0,5 dok vrednosti jednake ili manje 0,5 ukazuje na slučajno razdvajanje aktivnih jedinjenja i mamaca. Za rangiranje liganada u FLAP softveru bira se onaj skor koji daje najvišu AUC vrednost.²¹⁵

3.6 Sinteza

Sinteza jedinjenja selektovih VS protokolom je sprovedena pod mikrotalasnim uslovima korišćenjem mikrotalasnog reaktora *CEM Microwave Synthesizer-Discover*. Proizvodi reakcije su praćeni tankoslojnom hromatografijom na talasnim dužinama 254 i 365 nm pri čemu su korišćene aluminijumske folije obložene silika gelom i kao mobilna faza smeša CH₂Cl₂ i MeOH u odnosu 9:1. Gde je bilo potrebno, intermedijeri i finalni produkti su prečišćeni korišćenjem *flash* hromatografije (silikagel, 0,040-0,063 mm) i odgovarajuće smeše rastvarača.

¹H NMR spektri finalnih produkata su snimljeni na BRUKER AVANCE spektrometru na 400 i 300 MHz, dok su ¹³C NMR spektri snimljeni na istom uređaju na

100.6 MHz koristeći tetrametilsilan (TMS) kao interni standard. HPLC/MS analiza je sprovedena korišćenjem Waters Symmetry C18 kolone (3,5 μ m, 4,6 mm x 75 mm) i Agilent 11000 HPLC sistema sa Applied Biosystem/MDS SCIEX MS detektorom opremljenim sa API 150EX jonizacionim izvorom. HRMS eksperimenti su izvedeni korišćenjem LTQ ORBITRAP XL THERMO uređaja.

3.6.1 Opsta procedura za sintezu jedinjenja 2a-d

Smeša 4-hidroksi-6-metil-2-pirona **1** (500 mg; 3,96 mmol) i izobutilamina (394 μ l; 3,96 mmol; za **2a**) ili pentilamina (459,6 μ l; 3,96 mmol; za **2b**) ili izopentilamina (459,6 μ l; 3,96 mmol; za **2c**) ili benzilamina (432,6 μ l; 3,96 mmol; za **2d**) u vodi (16 mL) se meša 12 sati pod reflusom. Nakon ovog perioda reakciona smeša se hladi do sobne temperature. Čvrsta masa se filtrira pod vakuumom, ispira sa dietiletom i prečišćava *flash* hromatografijom koristeći silikagel i kao mobilnu fazu smešu dihlormetana i metanola u odnosima od 99:1 do 95:5.

3.6.2 Opsta procedura za sintezu jedinjenja 3a-i

U mikrotalasnu tubu od 10 mL se prenese smeša intermedijera **2a-d** (0,51 mmol) i odgovarajućeg amina (0,77 mmol) u dimetoksietanu (1mL). Reakciona smeša se zagreva 40 min na 120 °C u mikrotalasnom uređaju (*maximum power input*: 300 W; maksimalni pritisak: 250 psi; uz mešanje). Nakon hlađenja do sobne temperature reakciona smeša se uparava do suva pod sniženim pritiskom i prečišćava *flash* hromatografijom koristeći silikagel i kao mobilni fazu smešu dihlormetan i metanola u odnosima od 99:1 do 98:2.

3.6.3 Opsta procedura za sintezu jedinjenja 5 i 7

Sinteza jedinjenja **5** i **7** je prethodno publikovana i opisana u literaturi.²¹⁶ Ukratko, karbazol **4** ili benzimidazol **6** (3 mmol) su dodati na 0 °C suspenziji natrijum hlorida (60% disperzija u mineralnom ulju, 8,97 mmol) u suvom DMF (15 mL). Reakciona smeša se meša 15 min na istoj temperaturi i zatim dodaje 2-(2-hloretil)-piperidin hidrohlorid (3,88 mmol) u porcijama. Reakciona smeša se meša 48 sati na sobnoj temperaturi do utroška polaznog materijala. Nakon hlađenja vodom (20 mL), smeša je ekstrahovana etil acetatom (3 x 10 mL), organski slojevi su isprani vodom (3 x 10 mL), osušeni anhidridovanim Na₂SO₄ i koncentrisani pod sniženim pritiskom. Smeša je zatim prečišćena *flash* hromatografijom koristeći silikagel i kao mobilnu fazu smešu dihlormetana i metanola u

odnosu 9:1 za jedinjenje 5 i smešu petroleum etara i etil acetata u odnosu 9:1 za jedinjenje 7.

3.7 Procena afiniteta na α_2 -adrenergičkim receptorima

3.7.1 Ćelijska kultura

Ćelije ovarijuma kineskog hrčka (eng. *Chinese Hamster Ovary*, CHO) (K1 strain) koje eksprimiraju cDNK koji kodira humani α_{2A} -adrenergički receptor su dobijene na način opisan u literaturi.²¹⁷

CHO ćelije se kultivišu i čuvaju u α -esencijalnom medijumu kom su dodati 26 mM natrijum-hidrogenkarbonat (NaHCO₃), 5% inaktivisani goveđi fetalni serum-FBS, penicilin (50 IU/ml), streptomycin (50 μ g/ml) i 200 μ g/ml G418. Ispitana je sposobnost ovih kultivisanih ćelija da vežu radioligand [³H]RS-79948-197 koji je antagonist α_2 -adrenergičkog receptora. Konfluentne ćelije su sakupljene i prebačene u ohlađeni fosfatom puferovan fiziološki rastvor, peletovane i zamrznute na -70 °C.

3.7.2 Priprema membrane

Sve procedure pripreme membrane se izvode na ledu. Peleti CHO ćelija su otopljeni, suspendovani u hipotoničnom liziranom puferu (10 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, 0,32 mM saharoza, pH 7,4) i homogenizovani korišćenjem Ultra-Turrax homogenizera (3 \times 10 s na 8000 rpm). Homogenat je centrifugiran na 180g 15 min da bi se uklonili ćelijski nukleusi, netaknute ćelije i agregati. Supernatanti su zatim sakupljeni, pomešani i centrifugirani na 50,200g tokom 30 min. Pelet je ispran TE puferom (10 mM Tris, 0,1 mM EDTA) i recentrifugiran na način koji je prethodno opisan. Membrane su suspendovane u TE puferu i čuvane na -70 °C do upotrebe. Koncentracije proteina su određene Bradford metodom koristeći albumin seruma govečeta kao standard.²¹⁸

3.7.3 Test vezivanja [³⁵S]GTPγS

Agonistom indukovana stimulacija vezivanja [³⁵S]GTPγS je merena na način koji je opisan u literaturi.²¹⁹ Ovim biološkim testom ispitana je potentnost agonista (EC₅₀), kao i njihova efikasnost (intrizička aktivnost u poređenju sa prirodnim punim agonistom adrenalinom).

Ukratko, membrane su otopljene i razblažene vezujućim puferom (25 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 5 mM MgCl₂, 20 mM NaCl, 1 μM GDP, 1 mM DTT, 30 μM askorbinske kiseline, pH 7,4). Inkubacija je izvedena na pločama sa filterima od staklenih vlakana od 96 odeljaka (Millipore MultiScreen MSFBN). Uzorci koji su sadržali 5 μg proteina membrane su inkubirani sa 7 ili 8 serija razblaženja ispitivanih jedinjenja i 0,1 nM [³⁵S]GTPγS. Reakcije su zaustavljene nakon 30 min inkubacije na RT brzom filtracijom pod vakuumom koristeći Millipore MultiScreen Vacuum Manifold. Filter ploče su isprane tri puta ledeno hladnim puferom (20 mM Tris, 1 mM EDTA, 5 mM MgCl₂, pH 7,4). Filteri su osušeni i po 50 μL SuperMix scintilacionog koktela je dodato u svaki odeljak. Radioaktivnost je izmerena korišćenjem Wallac 1450 Betaplate scintilacionog brojača. Svi eksperimenti su izvedeni u duplikatu i ponovljeni najmanje tri puta. EC₅₀ vrednosti agonista i njihove efikasnosti su analizirane GraphPad Prism softverom.

3.7.4 Testovi kompetitivnog vezivanja

Testovi kompetitivnog vezivanja su izvedeni korišćenjem MultiScreen Vacuum Manifold sistema i Millipore MultiScreen MSFBN ploča od 96 odeljaka koje imaju filtere od staklenih vlakana. Ukupna zapremina uzorka u ovom eksperimentu je iznosila 180 μL i sastojala se od 8 različitih serijskih razblaženja kompetitivnih liganada, preparata ćelijske membrane koji sadrže 10 μg proteina po uzorku, 0,2 nM [³H]RS-79948-197 i 50 mM kalijum fosfatnog pufera pH 7,4 kao medijuma. Nespecifično vezivanje je ispitano u paralelnim odeljcima u prisustvu 100 μM oksimetazolina. Reaktivnost vezivanja je izmerena korišćenjem Wallac 1450 MicroBeta scintilacionog brojača. Svi eksperimenti su izvedeni u duplikatu i ponovljeni najmanje tri puta. Afinitet vezivanja (K_i) svakog liganda je izračunat korišćenjem nelinearne regresione analize (GraphPad Prism), pretpostavljajući da postoji samo jedno vezivno mesto. Za pretvaranje IC₅₀ vrednosti u K_i vrednosti, korišćena je Cheng-Prusoff jednačina.²²⁰

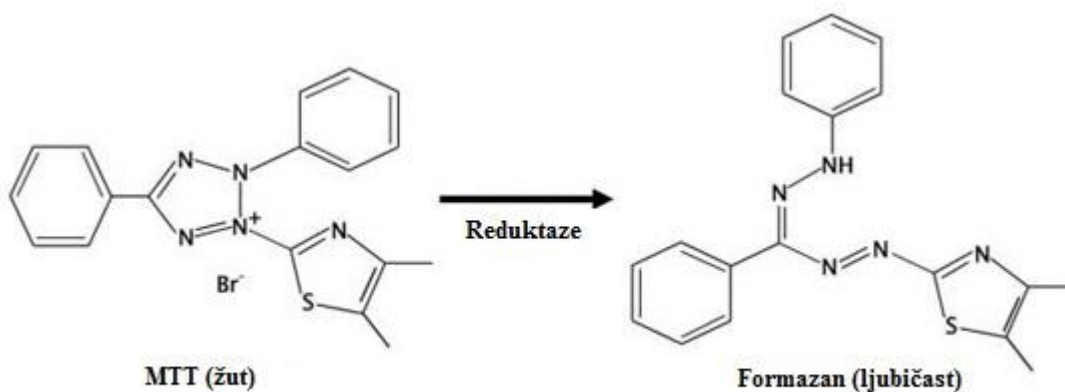
3.8 Ispitivanje antiproliferativne i proapoptotske aktivnosti

3.8.1 Čelijska kultura

Humane ćelije hronične mijeloidne leukemije K562 su čuvane u RPMI-1640 medijumu sa 10% inaktivisanim telećim fetalnim serumom-FCS na 37 °C, u atmosferi 5% CO₂ i uslovima povećane vlažnosti. Hranljivi medijum RPMI-1640 je pripremljen u sterilnoj dejonizovanoj vodi, kome su dodati penicilin (192 IU/mL), streptomycin (200 µg/mL), 4-(2-hidroksietil)-piperazin-1-etansulfonska kiselina (HEPES) (25 mM), L-glutamin (3 mM) i 10% toplotom inaktiviran FCS (pH 7,2).

3.8.2 Ispitivanje citotoksičnosti i kombinacioni index (eng. *Combination Index, CI*)

Citotoksičnost jedinjenja na K562 ćelijama je izmerena korišćenjem MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijum bromid) testa, kog je razvio Mosmann²²¹ a modifikovali Ohno i Abe²²² (Slika 19). MTT test se koristi za kvantifikaciju ćelijske proliferacije. Ova metoda je bazirana na redukciji tetrazolijumskih soli do intenzivno obojenih formazana u metabolički aktivnim ćelijama. Stoga se ove soli koriste kao kolorimetrijski reagensi za citohemijsku kvantifikaciju broja metabolički aktivnih ćelija.



Slika 19. Hemijska struktura MTT i njegovog metaboličkog produkta - formazana

Citotoksičnost je ispitana koristeći ploče koje se sastoje 96 odeljaka. Po dodavanju serija razblaženja ispitivanih jedinjenja ćelije su inkubirane 72 sata na 37 °C, u atmosferi 5% CO₂ i uslovima povećane vlažnosti. Nakon ovog tretmana po 20 µL MTT je dodato u svaki odeljak. Uzorci su inkubirani još 4 sata, nakon čega je dodato po 100 µL 10% SDS da bi se prekinula redukcija MTT-a u formazan. Absorbanca je izmerena naredni dan na 570 nm. Da bi se kvantifikovalo ćelijsko preživljavanje (%S), absorbanca uzorka koji sadrži gajene ćelije u prisustvu različitih koncentracija ispitivanih jedinjenja je podeljena sa apsorbancom kontrolnog uzorka koji sadrži gajene ćelije u hranljivom medijumu, i pomnožena sa 100. IC₅₀ vrednost je koncentracija jedinjenja koja inhibira ćelijsko preživljavanje za 50% ako se uporedi sa netretiranim kontrolnim ćelijama.²²³

$$\% S = \frac{[At - Ab]}{[Ac - Ab]} * 100 \quad (14)$$

At – srednja vrednost očitane apsorbance tretiranih ćelija;

Ab – srednja vrednost očitane apsorbance blanka (ispitivana supstanca u podlozi);

Ac – srednja vrednost očitane apsorbance kontrolnih (netretiranih) ćelija;

IC₅₀ vrednost je izračunata matematičkim modelovanjem korišćenjem sigmoidalne krive u GraphPad Prism 5.04 programu. Kao pozitivna kontrola u ovom eksperimentu korišćena je so, rilmenidin hemifumarat (prod. no. R134), dok je kao negativna kontrola korišćen efaroksan hidrohlorid (prod. no. E3263).

Da bi se ispitali citotoksični efekti kombinacije lekova, izračunat je CI Chou-Talalay metodom²²⁴ koristeći CalcuSyn softver. CI omogućava kvantitativno definisanje interakcija lekova, i to na sledeći način: antagonizam (CI > 1), aditivni efekat (CI = 1) i sinergizam (CI < 1).

3.8.3 Citometrijska analiza apoptoze ćelija

Procenat apoptotičkih K562 ćelija tretiranih ispitivanim supstancama je određivan protočnom citometrijom. Uzorci su pripremljeni po instrukcijama proizvođača. U ovom eksperimentu korišćen je aneksin V-FITC kit koji se vezuje za eksprimirane

fosfatidilserine rano apoptotičkih ćelija, dok PI (propidijum jodid) boji ćelije koje imaju povećanu membransku permeabilnost, tj. ćelije kasne apoptoze i nekrotične ćelije. Aneksin V+/PI- ćelije su definisane kao rano apoptotičke ćelije.

3.8.3.1 *Test formiranja kolonija*

Nakon 24 sata tretmana K562 ćelija jedinjenjem **5**, ćelije su isprane PBS-om i resuspendovane u Cell Resuspension rastvoru. Nakon toga $0,5 \times 10^4$ /mL tretiranih K562 ćelija je pomešano sa 1 mL humanog metilceluloznog kompletnog medjuma. Ćelije su onda prebačene u 35 mm Petri šolje. Kolonije (> 50 ćelija) K562 ćelija su brojane 7 dana. Svi testovi su izvedeni u duplikatu.

3.8.4 **Ispitivanje specifičnosti antitumorskog dejstva**

Kako bismo utvrdili da celularni efekti jedinjenja **5** nisu posledica agregacije ili nespecifičnog delovanja, ispitana je njegoa aktivnost na dva nezavisna targeta (Src i Abl).

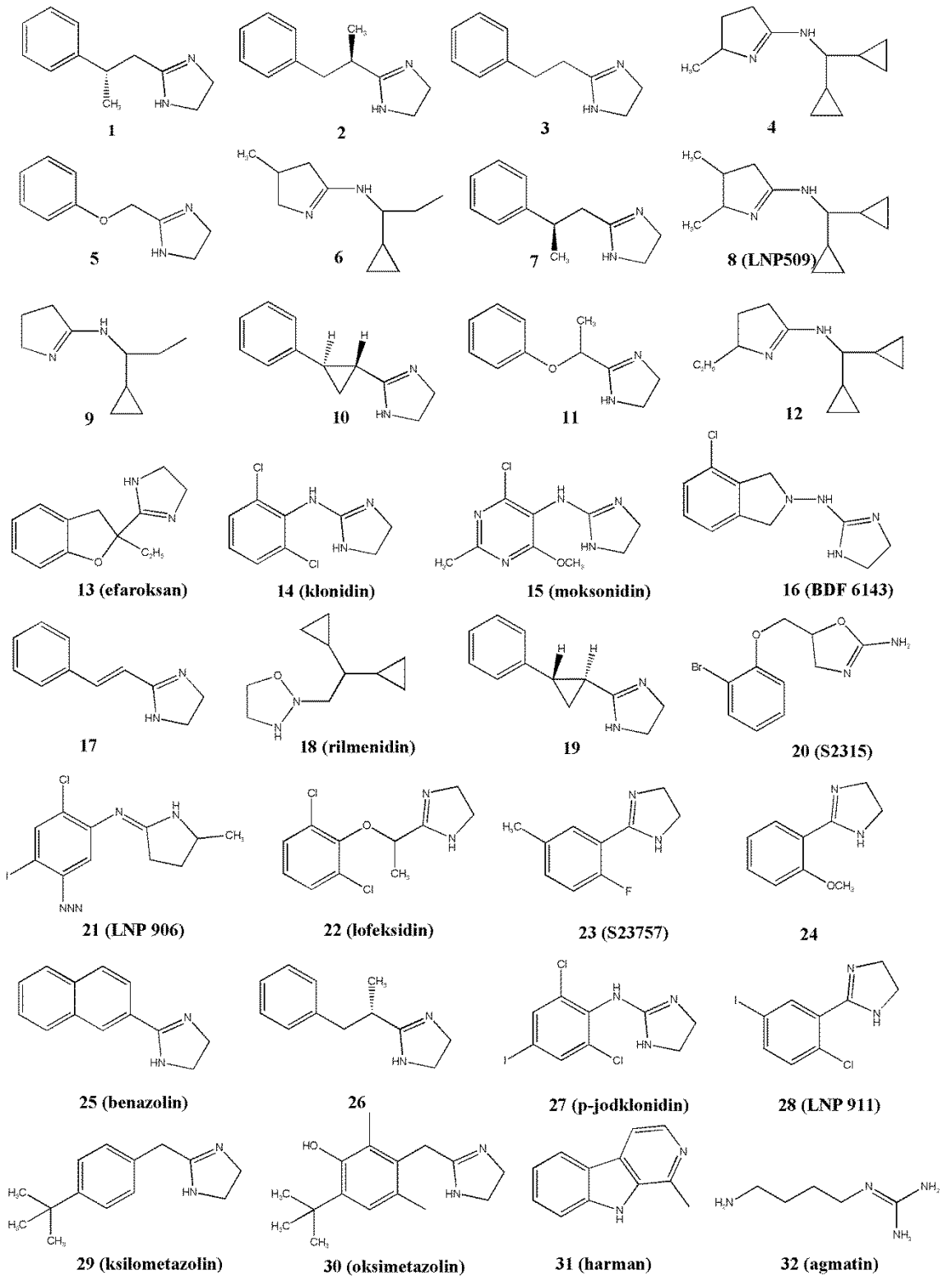
Enzimski test na izolovanom Src. Aktivnost enzima je merena u filter-vezujućem testu. Reakcije su izvedene u zapremini od 10 mL koristeći 10 mM MOPS (pH 7), 2 mM EDTA, 10 mM MgAc, 17,5 mM beta-glicerol fosfat, 0,001% NP40 150 μ M specifični Src peptini supstrat (KVEKIGEGTYGVVYK) i u prisustvu 0,125 pMol Src i 10 μ M [γ -32P]-ATP.

Enzimski test na izolovanom Abl. Aktivnost enzima je merena filter-vezujućim testom koristeći Abl specifični peptidni supstrat. Reakcije su sprovedene u zapremini od 10 mL koristeći 8 mM MOPS (pH 7,2), 2,8 mM EDTA, 7 mM EGTA, 17,5 mM beta-glicerol fosfat, 0,25 mg/mL BSA, 70 mM DTT, 10 mM MgCl, 0,0013% NP-40, 10 μ M [γ -32P]-ATP, 50 μ M peptida, 0,022 μ M c-Abl.

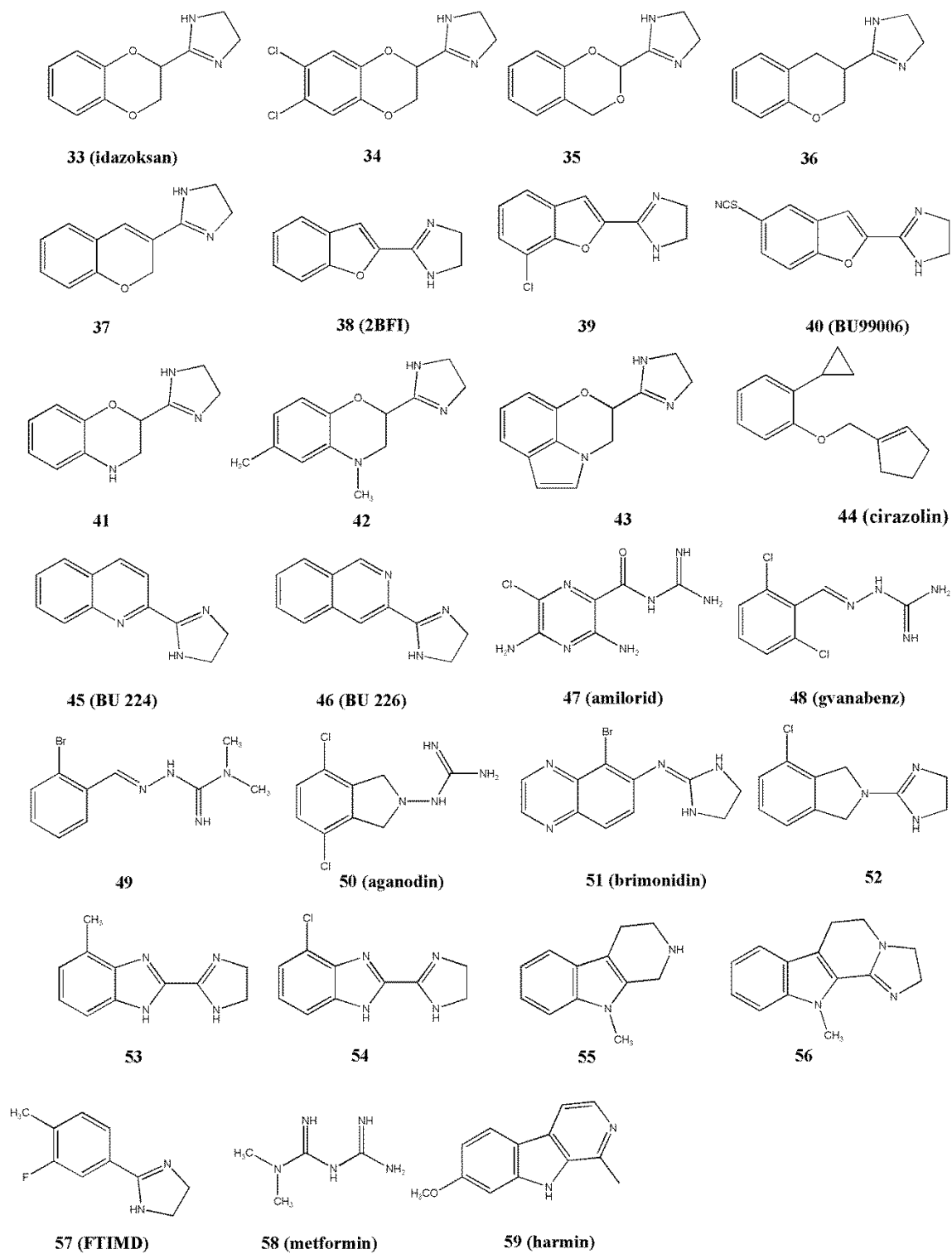
3.9 Predviđanje novih bioloških targets (*off target-a*) za ligande imidazolinskih receptora

3.9.1 Priprema seta jedinjenja

Ispitivani set jedinjenja se sastojao od 59 liganda α_2 -adrenergičkih i/ili imidazolinskih receptora sa pK_i (I₁-IR i/ili I₂-IR) vrednošću većom od 5 i jedinjenja **5** prethodno selektovanog VS protokolom koje je pokazalo značajnu antiproliferativnu/proapoptotsku aktivnost delujući na nisharin (**Slika 20, 21**).



Slika 20. Strukture liganada I₁ – imidazolinskog receptora korišćene u *off-target* studiji



Slika 21. Strukture liganada I₂ – imidazolinskog receptora korišćene u *off-target* studiji

Da bi se preciznije procenilo da li se ligandi imidazolinskih receptora pored α_2 -adrenergičkih receptora vezuju i za neke druge G-protein kuplovane receptore (eng. G Protein Coupled Receptors, GPCRs) za svako jedinjenje iz ispitivanog seta je generisano po 50 mamaca.²²⁵ U studiju su pored ispitivanih jedinjenja i njihovih mamaca bili uključeni i ligandi GPCRs koji su korišćeni kao test set u cilju validacije metode.

Strukture ispitivanih jedinjenja su minimizovane u LigPrep, Maestro (Schrödinger Release 201-1) koristeći OPLS3 (eng. *Optimized Potentials for Liquid Simulations*) polje sile i njihova moguća naelektrisanja i tautomerni oblici na pH 7 ± 2 su generisani koristeći Epik algoritam.

3.9.2 Priprema proteina

Set od 399 humanih GPCRs koji obuhvata kristalne strukture i homologne modele je preuzet sa GPCRDB (gpcrdb.org). 3D strukture ovih proteina su optimizovane (PROKA pH = 7) i minimizovane koristeći OPLS3 polje sile u *Maestro*-u. Takođe, molekuli vode su uklonjeni iz proteina i dodati su polarni vodonici.^{226,227}

3.9.3 *In silico* doking

Vezivanje liganada α_2 -adrenergičkih i/ili imidazolinskih receptora za GPCRs je ispitano korišćenjem *Glide* softvera (eng. Grid-based Ligand Interaction Docking with Energetics), *Schrödinger 2015-3*.^{228,229} *Glide* je korišćen za pripremu koordinata vezujućeg mesta proteina, generisanje grid fajlova i automatizaciju *in silico* dokinga.

Kod proteina čija je kristalna struktura poznata grid fajlovi su postavljeni oko liganda koji se nalazi u kompleksu sa datim proteinom, dok je kod homolognih modela Site Map algoritam korišćen za definisanje aktivnog mesta. Energije vezivanja ispitivanih liganada za proteine su dobijene koristeći Glide Score (*Gscore*) skoring funkciju pri standardnoj preciznosti (eng. *Standard Precision*, SP) i vrednosti dielektične konstante 2.0.^{228,229} *Gscore* je dobijen na osnovu sledeće jednačine:

$$GScore = 0,065 * vdW + 0,130 * Coul + Lipo + HBond + Metal + BuryP + RotB + Site \quad (15)$$

- vdW- Van der Valsova energija. Ovaj parametar se izračunava za redukovana jonska naelektrisanja na grupama kao što su metali, karboksilati i gvanidinijum jon.
- Coul- Kulonova energija. Ovaj parametar se izračunava za redukovana jonska naelektrisanja na grupama kao što su metali, karboksilati i gvanidinijum jon.
- Lipo – lipofilni parametar dobijen iz hidrofobnog grid potencijala. Ukazuje na hidrofobne interakcije.
- Hbond- parametar koji ukazuje na vodonične veze, i podeljen je na različite komponente koje zavise od toga da li su i donor i akceptor neutralni, ili je jedan naelektrisan a drugi neutralan, ili su oba naelektrisana.
- Metal- parametar koji ukazuje na prisustvo metala. Samo su interakcije sa anjonskim akceptorskim atomima uključene.
- BuryP – penali za 'zakopane' polarne grupe
- RotB- penali za 'zamrznute' rotirajuće veze
- Site- polarne interakcije u aktivnom mestu proteina. Ovaj parametar ukazuje na prisustvo polarnih atoma koji ne ostvaruju vodonične veze u hidrofobnom regionu.

Izračunate su energije vezivanja ispitivanih liganada imidazolinskih receptora, njihovih mamca i odgovarajućih GPCRs liganda za 399 humanih GPCRs, i na osnovu vrednosti dobijenih *Gscore*-ova ova jedinjenja su rangirana prema njihovim afinitetu za dati target.

4 REZULTATI I DISKUSIJA

Znajući da je ciljno mesto dejstva liganada I_1 i I_2 receptora CNS, dizajn imidazolina sa optimalnom KMB permeabilnošću je važan korak u razvoju novih lekova. Takođe, pored pasivne difuzije potrebno je ispitati i uticaj aktivnog transporta na njihov prolazak kroz KMB, jer prisustvo različitih transportera može imati uticaj na željene koncentracije leka u moždanom tkivu.

4.1 *In silico* predviđanje afiniteta ispitivanih jedinjenja za P-gp

P-gp je transporter koji je eksprimiran u visokom stepenu na luminalnoj strani vaskularnog endotela krvnih sudova u mozgu gde olakšava transport jedinjenja ka cerebrospinalnoj tečnosti (eng. *Cerebrospinal Fluid*, CSF). Stoga, kao što je već napomenuto jedno od glavnih ograničenja nećelijskih *in vitro* metoda za procenu KMB permeabilnosti je to što ne uzimaju u obzir aktivni transport i prisustvo transportera prilikom procene permeabilnosti.

Koristeći različite programe, kao što su ADMET prediktor 6.5 i ACD/i-Lab softver (ACD/labs, Advanced Chemistry Development), pokazano je da ispitivani ligandi α_2 -adrenergičkih i/ili imidazolinskih receptora nisu supstrati za P-gp (**Tabela 1**). Takođe, za neka jedinjenja, kao što su amilorid, klonidin, gvanabenz i gvanfacin, ova predviđanja su i eksperimentalno potvrđena.^{152,230-233} Stoga se pretpostavlja da se necelularne *in vitro* metode kao što su PAMPA i BMC mogu koristiti za tačno predviđnje KMB permeabilnosti ove grupe jedinjenja.

4.2 Farmakokinetički parametri penetracije kroz KMB

Farmakokinetika prolaska kroz KMB liganada α_2 -adrenergičkih i/ili imidazolinskih receptora je analizirana i upoređena sa kinetikom lekova koji deluju na CNS uzimajući u obzir nekoliko parametara:

- frakciju slobodnog leka u plazmi (nevezanog za proteine plazme) (F_u)
- stepen penetracije leka kroz KMB (log PS)
- stepen raspodele leka između moždanog tkiva i plazme (eng. *brain/plasma equilibration rate*) ($PS \times f_{u,brain}$)

Predviđene frakcije ispitivanih jedinjenja koje se ne vezuju za proteine u plazmi date su u **Tabeli 1**. Ove vrednosti su dobijene korišćenjem ACD/I-Lab softvera. Pokazano je da ligandi α_2 -adrenergičkih i/ili imidazolinskih receptora pokazuju različit afinitet vezivanja za proteine plazme ($F_u = 7 - 82 \%$), baš kao i lekovi koji deluju na CNS sistem ($F_u = 1 - 51 \%$). Harman ($\approx 93 \%$; $F_u = 7 \%$), harmin ($\approx 94 \%$; $F_u = 6 \%$) i nafazolin ($\approx 94 \%$; $F_u = 6 \%$) se vezuju u najvećem procentu za proteine plazme, dok amilorid pokazuje nizak stepen vezivanja ($\approx 18 \%$; $F_u = 82 \%$). Drugi značajni analizirani farmakokinetički parametri su stepen penetracije leka kroz KMB ($\log PS$) i stepen raspodele leka između moždanog tkiva i plazme ($\log (PS \times f_{u,brain})$) (**Tabela 1**). Stepenom penetracije leka u moždano tkivo se meri permeabilnost KMB, pri čemu se uzima u obzir pasivna transcelularna difuzija leka kroz KMB kao i mogući uticaj aktivnog transporta.²³⁴ Stepem raspodele leka između moždanog tkiva i plazme ($\log (PS \times f_{u,brain})$) je parametar koji uzima u obzir stepen penetracije leka kroz KMB kao i frakciju slobodnog leka u plazmi. Opseg $\log (PS \times f_{u,brain})$ vrednosti liganada α_2 -adrenergičkih i/ili imidazolinskih receptora je od -3,4 do -2,4, i poklapa se sa opsegom jedinjenja koja deluju na CNS (od -3,7 do -2,2), osim amilorida koji je izuzetak (-5,3). Može se zaključiti da farmakokinetički parametri prolaska kroz KMB liganada imidazolinskih receptora se ne razlikuju od parametara lekova koji deluju na CNS tako da se ova jedinjenja mogu zajedno analizirati u *in vitro* i QSPR studijama.

Tabela 1. Farmakokinetički parametri prolaska kroz KMB liganada imidazolinskih receptora i lekova koji deluju na CNS

Jedinjenja	log PS (ACD/i-Lab softver)	log (PS x $f_{u,brain}$) (ACD/i-Lab softver)	F_u (ACD/i-Lab softver)	Supstratrat za P-gp (ACD/i-Lab softver)	Supstratrat za P-gp (ADMET Predictor) 6.5
Amilorid	-5.3	-5.3	0.82	Nije supstrat	Nije supstrat
Brimonidin	-3	-3.4	0.31	Nije supstrat	Nije supstrat
Bromazepam	-1.6	-2.2	0.21	/	/
Karbamazepin	-1.6	-2.3	0.25	/	/
Citalopram	-3	-3.1	0.49	/	/
Klonazepam	-1.5	-2.4	0.08	/	/
Klonidin	-2	-2.8	0.11	Nije supstrat	Nije supstrat
Klozapin	-1.5	-2.6	0.07	/	/
Efaroksan	-2.1	-3	0.26	Nije supstrat	Nije supstrat
Fluoksetin	-1.5	-3.2	0.02	/	/
Guanabenz	-2.1	-2.9	0.26	Nije supstrat	Nije supstrat
Gvanfacin	-2.3	-2.9	0.16	Nije supstrat	Nije supstrat
Harman	-1.4	-2.4	0.07	Nije supstrat	Nije supstrat
Harmin	-1.4	-2.5	0.06	Nije supstrat	Nije supstrat
Idazoksan	-2.6	-3	0.33	Nije supstrat	Nije supstrat
Lamotrigin	-2.1	-2.8	0.17	/	/
Lorazepam	-1.5	-2.4	0.07	/	/
Mianserin	-1.1	-2.5	0.12	/	/
Moksonidin	-3.1	-3.2	0.44	Nije supstrat	Nije supstrat
Nafazolin	-1.6	-3	0.06	Nije supstrat	Nije supstrat
Olanzapin	-3.6	-3.7	0.51	/	/
Oksazepam	-1.7	-2.4	0.04	/	/
Prazepam	-1.1	-2.7	0.02	/	/
Rilmidenin	-2.1	-2.6	0.77	Nije supstrat	Nije supstrat
Risperidon	-2.9	-3.1	0.26	/	/
Tetrahidrozolin	-1.8	-2.9	0.22	Nije supstrat	Nije supstrat
Tizanidin	-2.8	-3.2	0.46	Nije supstrat	Nije supstrat
Trimazolin	-1.7	-3	0.4	Nije supstrat	Nije supstrat
Viloksazin	-2.5	-2.8	0.34	/	/
Ksilometazolin	-1.5	-3.2	0.17	Nije supstrat	Nije supstrat
Ziprasidon	-1.2	-2.9	0.01	/	/

4.3 Određivanje stepena permeabilnosti kroz krvno-moždanu barijeru PAMPA metodom

4.3.1 PAMPA rezultati

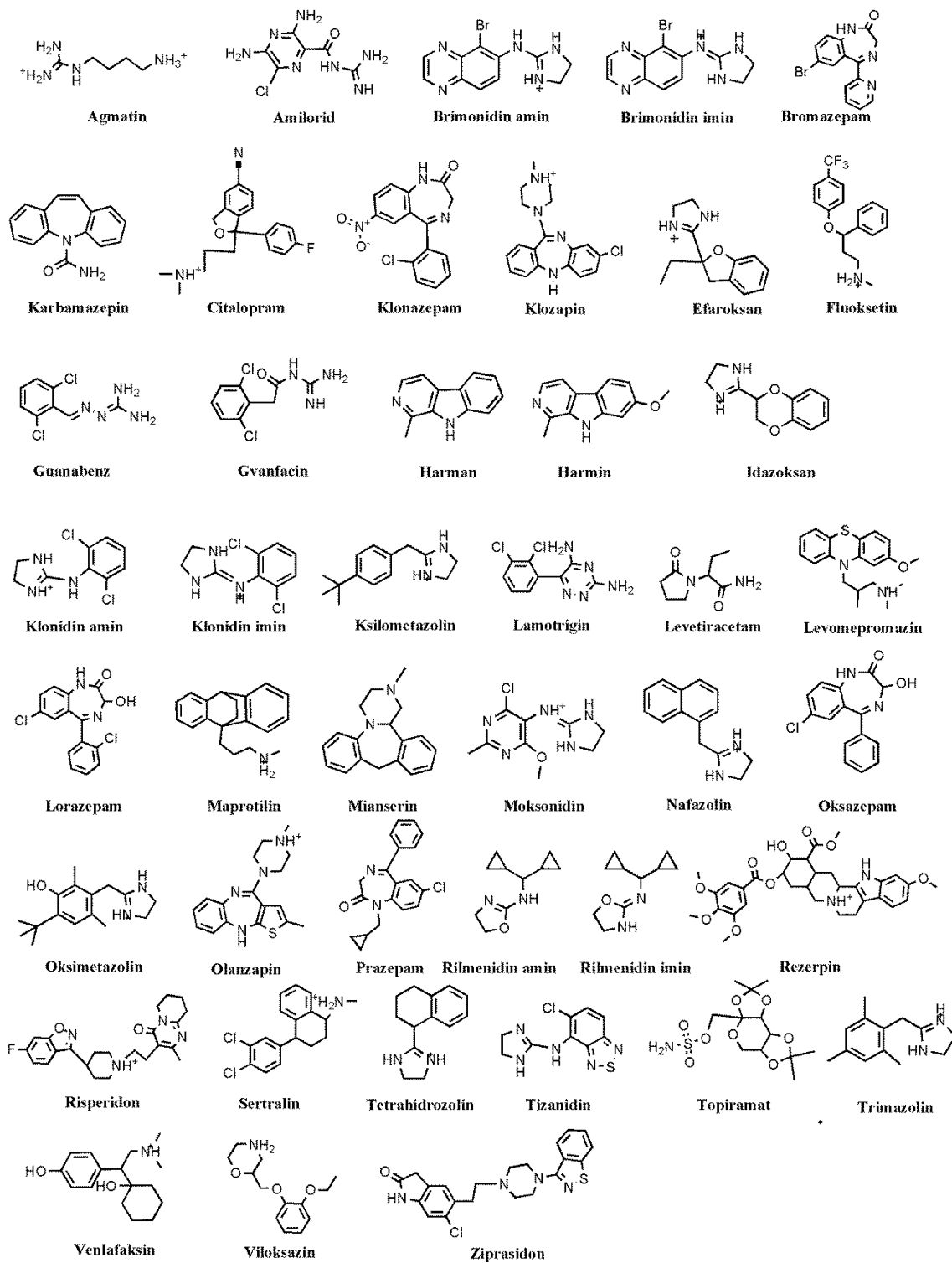
PAMPA test je korišćen da bi se odredile efektivne permeabilnosti (P_e) 40 ispitivanih jedinjenja (18 liganada α_2 -adrenergičkih i/ili imidazolinskih receptora i 22 leka koja deluju na CNS) (**Tabela 2**).

Tabela 2. Izračunati PAMPA parametri α_2 -adrenergičkih i/ili imidazolinskih receptora i lekova koja deluju na CNS

Jedinjenja	Pe (10^{-6} cm/s)	Log Pe
Agmatin	$3,3 \times 10^{-3} \pm 0,0006$	$-8,48 \pm 0,09$
Amilorid	$8,3 \times 10^{-4} \pm 0,00$	$-9,08 \pm 0,00$
Brimonidin	$1,78 \pm 0,11$	$-5,75 \pm 0,03$
Bromazepam	$1,94 \pm 0,03$	$-5,71 \pm 0,01$
Karbamazepin	$3,78 \pm 0,07$	$-5,42 \pm 0,01$
Citalopram	$9,45 \pm 0,79$	$-5,02 \pm 0,04$
Klonazepam	$3,98 \pm 0,88$	$-5,40 \pm 0,08$
Klozapin	$8,34 \pm 0,86$	$-5,08 \pm 0,04$
Efaroksan	$4,92 \pm 0,77$	$-5,31 \pm 0,07$
Fluoksetin	$9,89 \pm 0,89$	$-5,00 \pm 0,04$
Gvanabenz	$5,67 \pm 0,72$	$-5,25 \pm 0,05$
Gvanfacin	$5,21 \pm 0,78$	$-5,28 \pm 0,05$
Harman	$7,48 \pm 0,90$	$-5,13 \pm 0,05$
Harmin	$7,17 \pm 1,29$	$-5,14 \pm 0,07$
Idazoksan	$5,08 \pm 0,00$	$-5,29 \pm 0,00$
Klonidin	$3,67 \pm 0,36$	$-5,44 \pm 0,04$
Ksilometazolin	$8,88 \pm 0,08$	$-5,05 \pm 0,00$
Lamotrigin	$0,97 \pm 0,00$	$-6,01 \pm 0,00$
Levetiracetam	$0,06 \pm 0,00$	$-7,22 \pm 0,00$
Levomepromazin	$8,38 \pm 0,01$	$-5,08 \pm 0,00$
Lorazepam	$8,35 \pm 0,34$	$-5,08 \pm 0,02$
Maprotilin	$5,99 \pm 0,62$	$-5,22 \pm 0,05$
Mianserin	$9,08 \pm 0,11$	$-5,04 \pm 0,01$
Moksonidin	$1,86 \pm 0,07$	$-5,73 \pm 0,02$
Nafazolin	$4,31 \pm 0,24$	$-5,37 \pm 0,02$
Oksazepam	$8,23 \pm 0,57$	$-5,08 \pm 0,03$
Oksimetazolin	$2,02 \pm 0,11$	$-5,69 \pm 0,02$
Olanzapin	$5,51 \pm 0,07$	$-5,26 \pm 0,01$
Prazepam	$8,61 \pm 0,41$	$-5,07 \pm 0,02$
Rezerpin	$2,75 \pm 0,25$	$-5,56 \pm 0,04$
Rilmenidin	$7,26 \pm 0,68$	$-5,14 \pm 0,04$
Risperidon	$3,81 \pm 0,12$	$-5,42 \pm 0,01$
Sertralin	$6,66 \pm 0,64$	$-5,18 \pm 0,04$
Tetrahidrozolin	$3,23 \pm 0,19$	$-5,49 \pm 0,02$
Tizanidin	$3,39 \pm 0,17$	$-5,47 \pm 0,02$
Topiramat	$0,54 \pm 0,11$	$-6,27 \pm 0,09$
Trimazolin	$3,92 \pm 0,01$	$-5,41 \pm 0,00$
Venlafaksin	$13,35 \pm 0,93$	$-4,87 \pm 0,03$

Viloxazin	$6,47 \pm 0,15$	$-5,19 \pm 0,01$
Ziprasidon	$8,27 \pm 0,66$	$-5,08 \pm 0,03$

Ovaj parametar ukazuje na stepen penetracije jedinjenja kroz KMB, pri čemu veće P_e ($\log P_e$) vrednosti znače veći stepen penetracije i obrnuto. Strukture ispitivanih jedinjenja su prikazane na **Slici 22**.



Slika 22. Strukturne formule liganda α_2 -adrenergičkih i/ili imidazolinskih receptora i lekova koja deluju na CNS u dominantnim molekulskim/katjonskim oblicima na pH 7,4

Prema *Mensch-u* i njegovim saradnicima jedinjenja se mogu podeliti u tri klase:^{131,235}

- jedinjenja sa visokom permeabilnošću kroz KMB (**CNS+**) ($> 4.0 \times 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$)
- jedinjenja sa niskom permeabilnošću kroz KMB (**CNS-**) ($< 2.0 \times 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$)
- jedinjenja koja se ne mogu klasifikovati ni u jednu od ove dve grupe (**CNS +/-**) (od 2.0 do $4.0 \times 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$).

Većina ispitivanih liganada α_2 -adrenergičkih i/ili imidazolinskih receptora pokazuje visok stepen penetracije kroz KMB ($> 4.0 \times 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$). Brimonidin ($1,94 \text{ cm s}^{-1}$) i moksonidin ($1,83 \text{ cm s}^{-1}$) imaju niske, dok agmatin ($0,0033 \text{ cm s}^{-1}$) i amilorid ($0,000827 \text{ cm s}^{-1}$) imaju zanemarljive P_e vrednosti ($< 2.0 \times 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$). Klonidin ($3,67 \times 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$), oksimetazolin ($2,02 \times 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$), tetrahidrozolin ($3,23 \times 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$), tizanidin ($3,39 \times 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$) i tramazolin ($3,92 \times 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$) su jedinjenja koja se ne mogu klasifikovati ni u jednu od ove dve grupe (od 2.0 do $4.0 \times 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$). Međutim, vrednosti efektivnih permeabilnosti klonidina, oksimetazolina i tramazolina se nalaze na granicama intervala, tako da se klonidin i tramazolin mogu smatrati kao jedinjenja sa visokom a oksimetazolin kao jedinjenje sa niskom permeabilnošću kroz KMB.

4.3.2 QSPR analiza PAMPA rezultata

4.3.2.1 QSPR studija

U cilju formiranja QSPR modela koji će se koristiti za predviđanje KMB permeabilnosti novih liganada α_2 -adrenergičkih i/ili imidazolinskih receptora korišćena su tri različita seta deskriptora:

- Prvi set se sastojao od ADMET prediktor deskriptora (**Model-1**)
- Drugi set se sastojao od deskriptora dobijenih korišćenjem Dragon 6.0 i ChemBio3D Ultra 13.0 softvera (**Model-2**)
- Treći set se sastojao od svih izračunatih deskriptora (ADMET prediktor, Dragon i ChemBio3D) (**Model-3**)

Metoda parcijalnih najmanjih kvadrata (PLS), *postupna* multilinearna regresiona analiza (MLR) i veštačke neuronske mreže (ANN) su korišćeni da bi se formirali QSPR modeli.

PLS analiza je izvedena korišćenjem SIMCA P⁺ 12.0 programa. Selekcija varijabli je vršena na osnovu njihovih VIP vrednosti, pri čemu su varijable sa najmanjim VIP

vrednostima uklanjane iz modela. Svaki put kada je novi PLS model formiran, njegovi statistički parametri (R^2 , Q^2 , F odnos, p -vrednost, RMSEE) su upoređivani sa parametrima prethodnog modela. Ista procedura je ponavljana za svaki set deskriptora dok nisu dobijeni najbolji modeli. Takođe, u ovoj disertaciji primenjen je i test permutacije zavisne varijable (eng. *The response permutation test; Y scrambling*) da bi se ispitala robusnost modela, kao i da li je model posledica slučajne korelacije. Ovaj test se zasniva na ponavljanoj randomizaciji zavisne varijable (Y) u trening setu izabranog modela, pri čemu nezavisne varijable ostaju konstantne. Zatim je izvršena analiza novih modela i izračunati njihovi R^2 i Q^2 parametri. Vrednosti ovih parametara moraju biti značajno niže od R^2 i Q^2 izabranog modela koji se u tom slučaju može smatrati pouzdanim.^{167,236} Izračunati statistički parametri za formirane PLS/QSPR modele su dati u **Tabeli 3**.

Postupno MLR modelovanje je izvedeno da bi se procenila linearna zavisnost između tri različita seta deskriptora i logaritma efektivne permeabilnosti ($\log P_e$) ispitivanih jedinjenja. Korišćena je postupna procedura za selektovanje deskriptora korak po korak na osnovu prethodno definisanih kriterijuma (*F to enter* i *F to remove* kriterijumi). Izračunati statistički parametri za MLR-QSPR modele, kao i odgovarajuće regresione jednačine su prikazani u **Tabeli 3**.

Najznačajniji deskriptori selektovani postupnom MLR metodom su korišćeni kao ulazne varijable za ANN modelovanje.²³⁷ Parametri kao što su optimalan broj čvorova u skrivenom sloju, broj epoha, *momentum* (α) i koeficijent učenja (eng. *learning rate*) (η) su predhodno optimizovani tokom inicijalnog treniranja mreže uzimajući u obzir greške predviđanja za trening, verifikacioni i test set. Finalna struktura izabranih modela (broj čvorova u ulaznom sloju-broj čvorova u skrivenom sloju-broj čvorova u izlaznom sloju) je bila 5-5-1 za ANN/QSPR-Model-1, 4-6-1 za ANN/QSPR-Model-2 i 2-4-1 za ANN/QSPR-Model-3. Pretreniranje ANN modela je sprečeno praćenjem srednje kvadratne greške (eng. *Root Mean Square Error*, RMSE) trening i verifikacionog seta. Formirani ANN modeli sa različitim brojem izabranih parametara su analizirani i optimalan model je izabran upoređujući vrednosti izračunatih statističkih parametara (Q^2 , R^2_{pred} , r , RMSEE, RMSEP). Izračunati statistički parametri za ANN/QSPR modele su prikazani u **Tabeli 3**.

Tabela 3. Statistički parametri formiranih PLS/QSPR, MLR/QSPR i ANN/QSPR modela

Model	Selektovani deskriptori	RMSEE	RMSEP	Q^2	R	R^2_{pred}	R^2	F	p	R^2_{inte}	Q^2_{inte}	F_{enter}	F_{remove}
Model 1 PLS	$\log Pe = f(\text{NPA_Q2, M_PRX, HBDnch, HBA, S} + \log P, \text{NPA_Q3})$	0.182	0.214	0.636	0.497	0.273	0.681	17.438	$4.134e^{-005}$	0.0146	-0.165	/	/
Model 2 PLS	$\log Pe = f(\text{P_VSA_p_2, ATSC2e, P_VSA_e_3, Mor11s, P_VSA_LogP_5})$	0.143	0.165	0.717	0.788	0.569	0.806	25.330	$3.300e^{-006}$	0.011	-0.204	/	/
Model 3 PLS	$\log Pe = f(\text{M_PRX, HBA, SpMax_EA(bo), Mor11s, H-047, P_VSA_LogP_5})$	0.144	0.160	0.776	0.727	0.596	0.803	34.582	$3.224e^{-007}$	0.025	-0.190	/	/
Model 1 MLR	$\text{LogPe} = -5.082 - 0.083\text{HBA} - 0.091\text{NPA_Q2}$	0.182	0.226	0.524	0.361	0.198	0.683	33.592	$2e^{-08}$	/	/	5	1
Model 2 MLR	$\text{LogPe} = -6.3431 - 0.0078\text{P_VSA_logP_4} + 0.825\text{SpMin2_Bh}(e) - 0.1028\text{R5s} + 0.255\text{Mor19m}$	0.125	0.202	0.780	0.667	0.357	0.850	26.968	$1e^{-07}$	/	/	6	1
Model 3 MLR	$\text{LogPe} = -5.045 - 0.005\text{P_VSA_logP_4} - 0.291\text{HBDch} + 0.489\text{MATS7e} + 0.148\text{Mor16m} - 0.055\text{Mor11s}$	0.101	0.129	0.793	0.848	0.737	0.903	33.592	$2e^{-08}$	/	/	7	1
Model 1 ANN	$\log Pe = f(\text{NPA_Q2, HBAn})$	0.185	0.210	0.320	0.557	0.307	/	/	/	/	/	/	/
Model 2 ANN	$\log Pe = f(\text{P_VSA_LogP_4, SpMin2_Bh}(e), \text{R5s, Mor19m})$	0.114	0.142	0.787	0.829	0.681	/	/	/	/	/	/	/

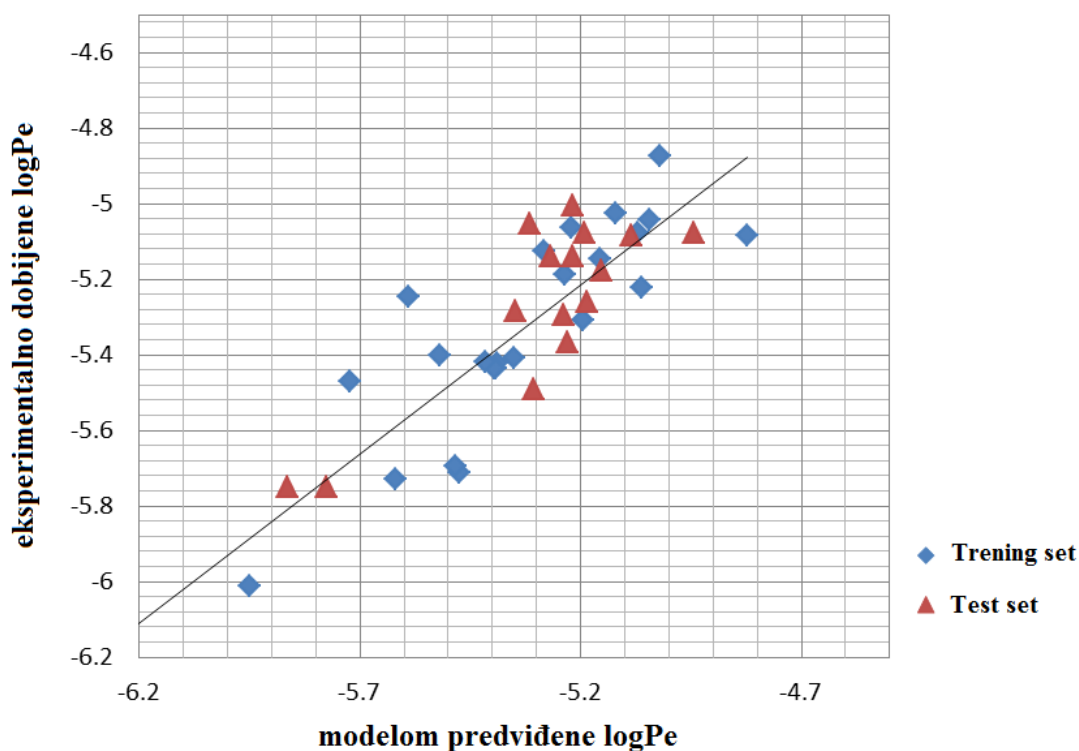
Model 3
ANN

$\log Pe = f(\text{P_VSA_LogP_4, HBDnch, MATS7e, Mor11s, Mor16m})$

0.100 0.121 0.760 0.854 0.770 / / / / / / /

4.3.2.2 Analiza izabranih QSPR modela

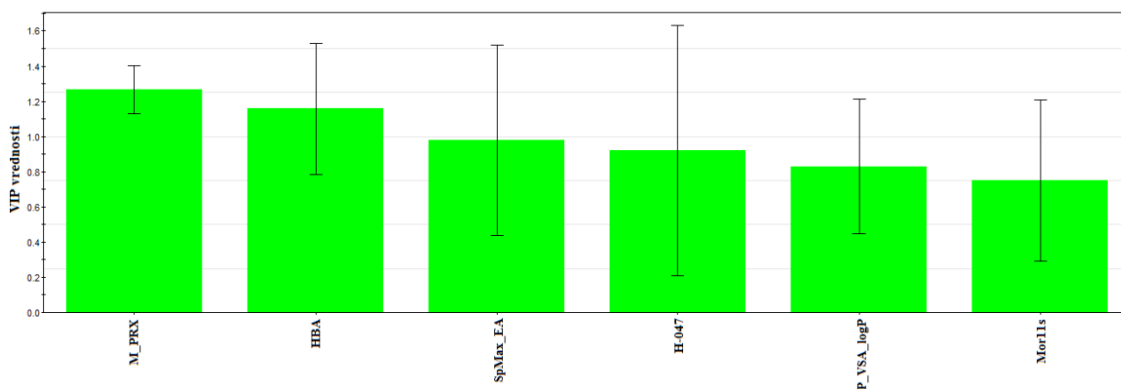
Formirani PLS/QSPR-Model-3 (napravljen od ADMET prediktor, DRAGON i ChemBio 3D deskriptora) i PLS/QSPR-Model-2 (napravljen od DRAGON i ChemBio 3D deskriptora) su pokazali zadovoljavajuću sposobnost predviđanja stepena penetracije ispitivanih jedinjenja kroz KMB, dok PLS/QSPR-Model-1 (napravljen od ADMET prediktor deskriptora) nije pokazao zadovoljavajuću tačnost predviđanja za jedinjenja iz test seta (R^2_{pred} vrednost iznosi 0,273). Takođe, upoređivanjem modela pokazano je da je PLS/QSPR-Model-3 superiorniji od PLS/QSPR-Modela-2 zbog većih vrednosti Q^2 i R^2_{pred} parametara. Odnos između eksperimentalnih i PLS/QSPR-Modelom-3 predviđenih $\log P_e$ vrednosti je prikazan na **Slici 23**.



Slika 23. Odnos između eksperimentalnih i PLS/QSPR-Modelom-3 predviđenih $\log P_e$ vrednosti

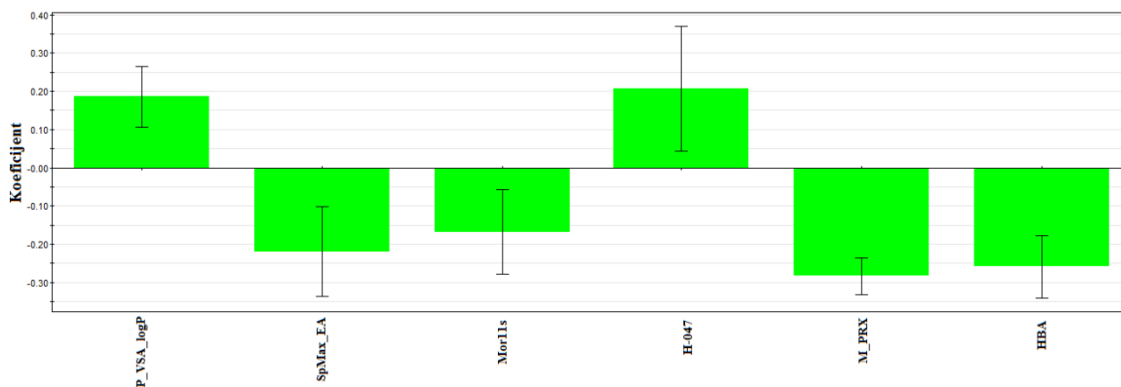
Izabrani PLS/QSPR-Model-3 se sastojao od šest deskriptora: M_PRX, HBA, SpMax_EA(bo), Mor11s, H-047 i P_VSA_LogP_5. VIP vrednosti ovih deskriptora su u

opsegu od 0,749 do 1,265 (**Slika 24**), i utvrđeno je da M_PRX deskriptor ima najveći uticaj na permeabilnost ispitivanih jedinjenja, dok je uticaj Mor11s deskriptora najmanji.



Slika 24. VIP vrednosti deskriptora PLS/QSPR-Modela-3

Takođe, sa koeficijent plot može se videti da određeni deskriptori, kao što su H-047 i P_VSA_Log_5, imaju pozitivan uticaj na $\log P_e$. Stoga, povećanje njihove vrednosti imaće pozitivan uticaj na stepen penetracije ispitivanih jedinjenja kroz KMB. Negativan koeficijent SpMax_EA(bo), Mor 11s, M_PRX i HBA deskriptora ukazuje da su oni u negativnoj korelaciji sa permeabilnošću jedinjenja kroz KMB (**Slika 25**).

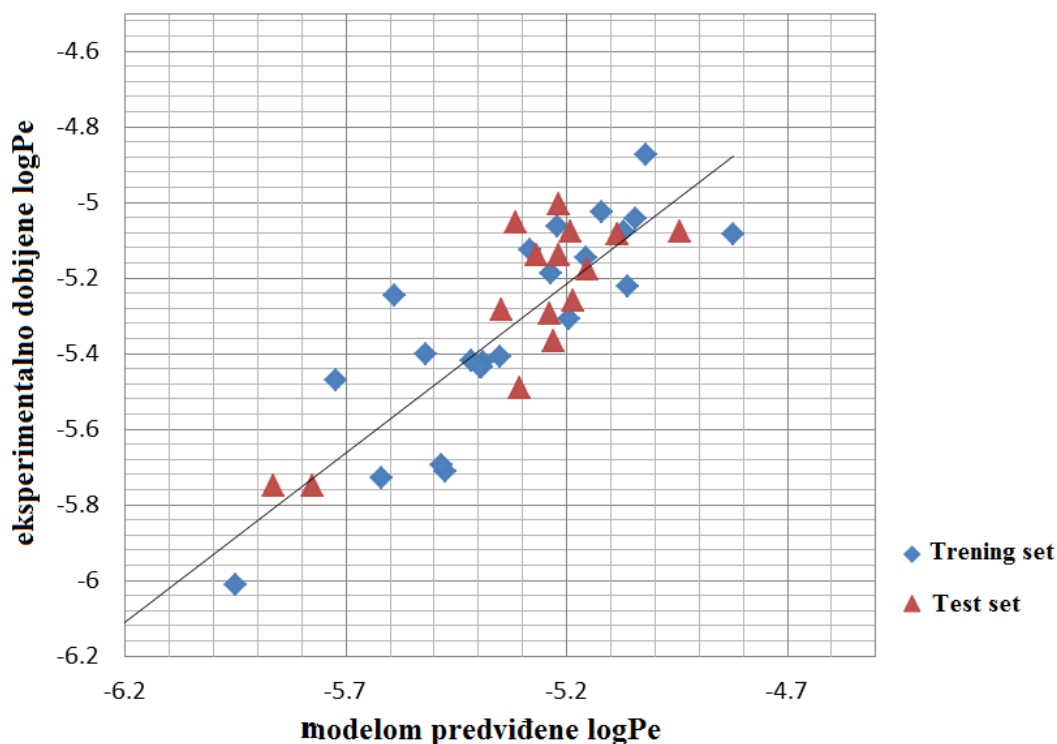


Slika 25. Koficijent plot deskriptora PLS/QSPR-Modela-3

M_PRX pripada MlogP Moriguchi deskriptorima.²³⁸ Ovaj deskriptor uzima u obzir udaljenost azota (N) i kiseonika (O) u molekulu, gde je $X-Y = 2$ i $X-A-Y = 1$ (X,Y može biti N ili O i A može biti C, S ili P) sa korekcijom (-1) za karboksamide/sulfonamide.²³⁹ HBA predstavlja broj akceptora vodoničnih veza u

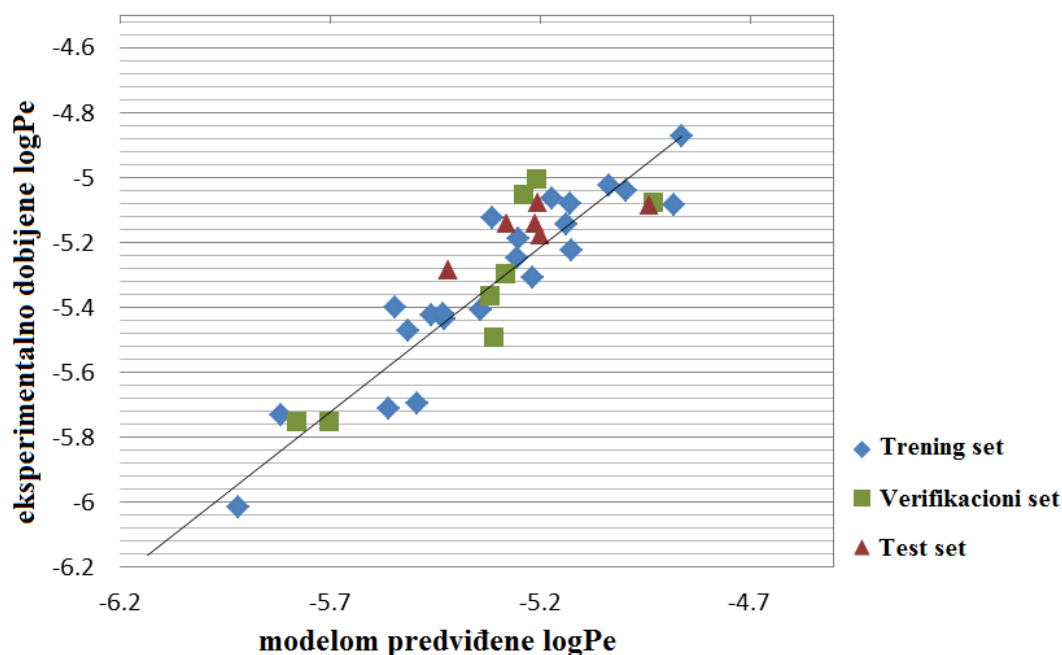
molekulu.²³⁸ SpMax_-EA(bo) je *2D edge adjacency indices* deskriptor.¹⁹⁷ Ovaj topološki deskriptor sadrži informacije o povezanosti ivica u molekulskom grafu. H-047 je deskriptor¹⁹⁷ koji klasifikuje vodonikove atome u zavisnosti od hibridizacionog i oksidacionog stanja ugljenikovog atoma za koji su vezani.²⁴⁰ Mor 11s je trodimenzionalni MoRSE (eng. *Molecule Representation of Structures based on Electron diffraction*) deskriptor i predstavlja signal 11/ponderisan I-stanjem.^{161,241} P_VSA_LogP_5 je P_VSA-like (Property labeled Van der Waals Surface Area) deskriptor¹⁹⁷ i predstavlja sumu van der Waals-ovih površina onih atoma u molekulu koji imaju Ghose-Crippen $\log P$ (o/w) vrednost u opsegu od 0 do 0,25.²⁴² Jedinjenja sa najvećom vrednošću ovog deskriptora su fluoksetin, klorzapin i citalopram. Pretpostavlja se da je to posledica prisustva fluora ili hlora u njihovoj strukturi.

U MLR/QSPR modelima deskriptori su selektovani postupnom metodom. Upoređivanjem njihovih statističkih parametara MLR/QSPR-Model-3 je izabran kao najbolji, jer MLR/QSPR-Model-2 i MLR/QSPR-Model-1 nisu pokazali prihvatljivu tačnost predviđanja KMB permeabilnosti za jedinjenja iz test seta (R^2_{pred} vrednosti iznose 0,357 i 0,198). Odnos između eksperimentalnih i MLR/QSPR-Modelom-3 predviđenih $\log P_e$ vrednosti je prikazan na **Slici 26**.



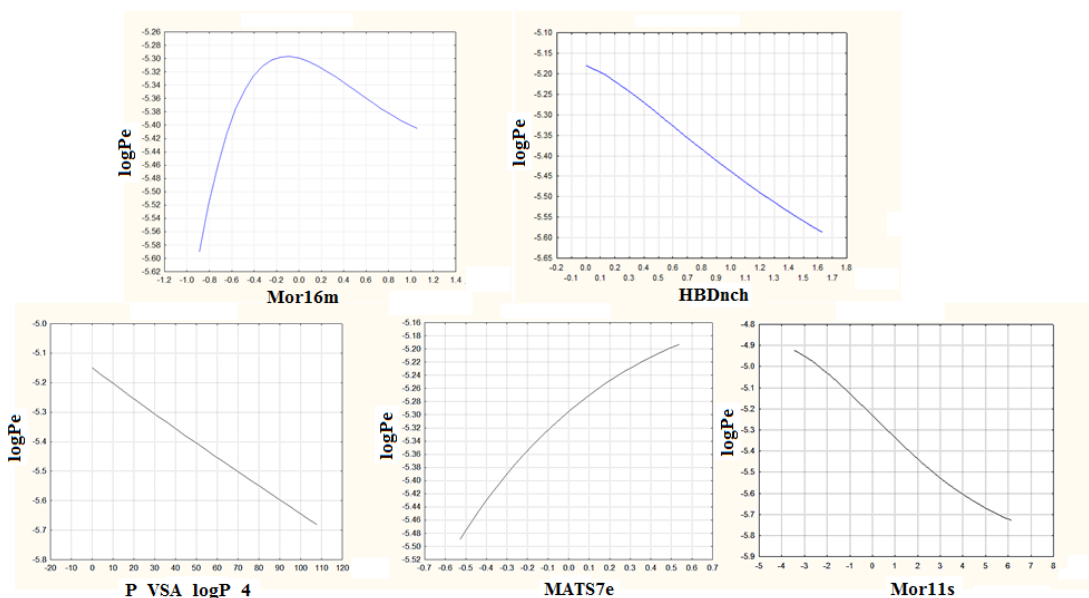
Slika 26. Odnos između eksperimentalnih i MLR/QSPR-Modelom-3 predviđenih $\log P_e$ vrednosti

Deskriptori selektovani postupnom MLR metodom su dalje korišćeni za nelinearno ANN/QSPR modelovanje. Iako su oba modela, ANN/QSPR-Model-2 i ANN/QSPR-Model-3 izabrana kao optimalna, ANN/QSPR-Model-3 je superiorniji zbog boljih statističkih vrednosti RMSEE, RMSEP, r i R^2_{pred} parametara. Model napravljen od ADMET deskriptora je pokazao lošu prognostičku sposobnost za jedinjenja i iz trening i iz test seta (Q^2 : 0,320 i R^2_{pred} : 0,307). Odnos između eksperimentalnih i ANN/QSPR-Modelom-3 predviđenih $\log P_e$ vrednosti je prikazan na **Slici 27**.



Slika 27. Odnos između eksperimentalnih i ANN/QSPR-Modelom-3 predviđenih $\log P_e$ vrednosti

Upoređivanjem optimalnih linearnih (MLR/QSPR-Model-3 i PLS/MLR-Model-3) i nelinearnih (ANN/QSPR-Model-3) metoda pokazano je da je ANN metoda superiornija od PLS i *postupne* MLR u modelovanju $\log P_e$ vrednosti. Iako su sva tri modela pokazala zadovoljavajuću sposobnost predviđanja $\log P_e$ vrednosti, ANN/QSPR-Model-3 je izabran kao najpouzdaniji zbog najtačnijeg predviđanja permeabilnosti jedinjenja iz test seta ($R^2_{\text{pred}} = 0,770$). To znači da odnos između izabranih deskriptora (P_VSA_LogP_4, HBDnch, MATS7e, Mor11s and Mor16m) i efektivne permeabilnosti ($\log P_e$) nije apsolutno linearan i da postoje neke nelinearnosti u sistemu koje se mogu bolje modelovati nelinearnim funkcijama **Slika 28**.



Slika 28. Grafici odgovora deskriptora ANN/QSPR-Modela-3

Analizirajući deskriptore u izabranom ANN/QSPR-Modelu-3 (P_VSA_LogP_4, HBDnch, MATS7e, Mor11s, Mor16m), identifikovane su najznačajnije strukturne karakteristike ove grupe lekova koje utiču na njihovu penetraciju kroz KMB.

P_VSA_LogP_4 predstavlja zbir van der Waals-ovih površina svih atoma u molekulu sa Ghose-Crippen $\log P(o/w)$ vrednošću u rasponu od -0,25 do 0.²⁴² Negativan znak pokazuje da je ovaj deskriptor u negativnoj korelaciji sa permeabilnošću liganada α_2 -adrenergičkih i/ili imidazolinskih receptora i strukturno sličnih jedinjenja kroz KMB. Jedinjenja sa najvećom vrednošću ovog deskriptora su brimonidin i bromazepam, pa se pretpostavlja da prisustvo broma u molekulskoj strukturi smanjuje stepen penetracije kroz KMB, i da je to razlog zašto je brimonidin prethodno klasifikovan kao jedinjenje sa niskom KMB penetracijom. HBDch predstavlja zbir NPA parcijalnih atomskih naelektrisanja na azotu.²³⁸ Ovaj deskriptor je u negativnoj korelaciji sa KMB permeabilnošću ispitivanih jedinjenja. Najveću vrednost ovog deskriptora imaju jedinjenja kao što su lamotrigin, gvanabenz i gvanfacin usled prisustva gvanidinske ili aminogvanidinske funkcionalne grupe u svojoj strukturi. Ove funkcionalne grupe su takođe karakteristične za agmatin i amilorid, jedinjenja koja nisu uključena u građenje modela i koja su klasifikovana kao jedinjenja koja ne prolaze KMB. MATS7e je dvodimenzionalni autokorelacioni deskriptor (*Moran autocorrelation-lag 7/weighted by*

Sanderson electronegativity) čije izračunavanje uzima u obzir molekulski graf osiromašen vodonikom.²⁴³ Dvodimenzionalni autokorelacioni deskriptori se izračunavaju sumiranjem određenih karakteristika dva atoma koja se nalaze na definisanoj topološkoj udaljenosti. Moran-ov indeks se izračunava koristeći sledeću jednačinu:

$$\text{MATS}(l, p_k) = \frac{N \sum_{ij} \delta_{ij}(p_{ki} - \overline{p_{ij}})(p_{kj} - \overline{p_{ij}})}{2L \sum_i (p_i - \overline{p_k})} \quad (16)$$

gde su p_{ki} i p_{kj} su određene karakteristike (k) atoma i i j . $\overline{p_k}$ je srednja vrednost karakteristike (k), a $\delta(l, d_{ij})$ je *dirac-delta* funkcija definisana kao:

$$\delta(l, d_{ij}) = \begin{cases} 1 \dots \text{if } \dots d_{ij} = l \\ 0 \dots \text{if } \dots d_{ij} \neq l \end{cases} \quad (17)$$

MATS7e deskriptor ukazuje na ulogu fizičko-hemijskih karakteristika jedinjenja, kao što je elektronegativnost, na njihovu permeabilnost kroz KMB. Ovaj deskriptor je u pozitivnoj korelaciji sa $\log P_e$ vrednošću što pokazuje da prisustvo strukturnih fragmenata dužine 7 kod kojih terminalni atomi imaju visoku elektronegativnost povećava permeabilnost liganada α_2 -adrenergičkih i/ili imidazolinskih receptora i strukturno sličnih jedinjenja kroz KMB. Tako da uvođenje elektronegativnih supstituenata kao što je hlor ili metoksi grupa u aromatični prsten imaće pozitivan uticaj na KMB permeabilnost ispitivanih jedinjenja. Mor 11s i Mor 16m su 3D-MoRSE deskriptori. Ovi deskriptori su izvedeni iz simulacije IR spektra koristeći generalizovanu difrakcionu funkciju i ne zavise od veličine molekula. Izračunavaju se na osnovu sledeće jednačine:^{244,245}

$$I(s) = \sum_{i=1}^{A-1} \sum_{j=i+1}^A w_i \cdot w_j \cdot \frac{\sin(s \cdot r_{ij})}{s \cdot r_{ij}} \quad (18)$$

gde je $I(s)$ rasuti elektronski intenzitet, w je određena karakteristika atoma, r_{ij} je udaljenost između atoma i i j , s je izmereni ugao rasipanja i A je broj aroma.

Mor 16m predstavlja signal 16 korigovan atomskom masom, i ovaj descriptor je u pozitivnoj korelaciji sa KMB permeabilnošću ispitivanih jedinjenja. Mor 11s je signal 11 korigovan I stanjem, i ovaj parametar je u negativnoj korelaciji sa KMB permeabilnošću. Jedinjenja sa najvišom vrednošću ovog deskriptora su topiramata, trimazolin i ksilometazolin, što ukazuje da prisustvo nekoliko metil ili izobutil grupa u molekularnoj strukturi utiče na vrednost ovog parametra.

Formirani QSPR modeli prikazuju kvantitativnu vezu između izračunatih molekularskih deskriptora i $\log P_e$ vrednosti liganada α_2 -adrenergičkih i/ili imidazolinskih receptora i lekova koji deluju na CNS. Ovi modeli se mogu koristiti za predviđnje $\log P_e$ vrednosti novih jedinjenja koja su strukturno slična ispitivanim jedinjenjima i takođe ukazati na strukturne modifikacije u cilju povećanja njihove permeabilnosti kroz KMB.

4.4 Određivanje permeabilnosti kroz krvno-moždanu barijeru BMC i RP-HPLC

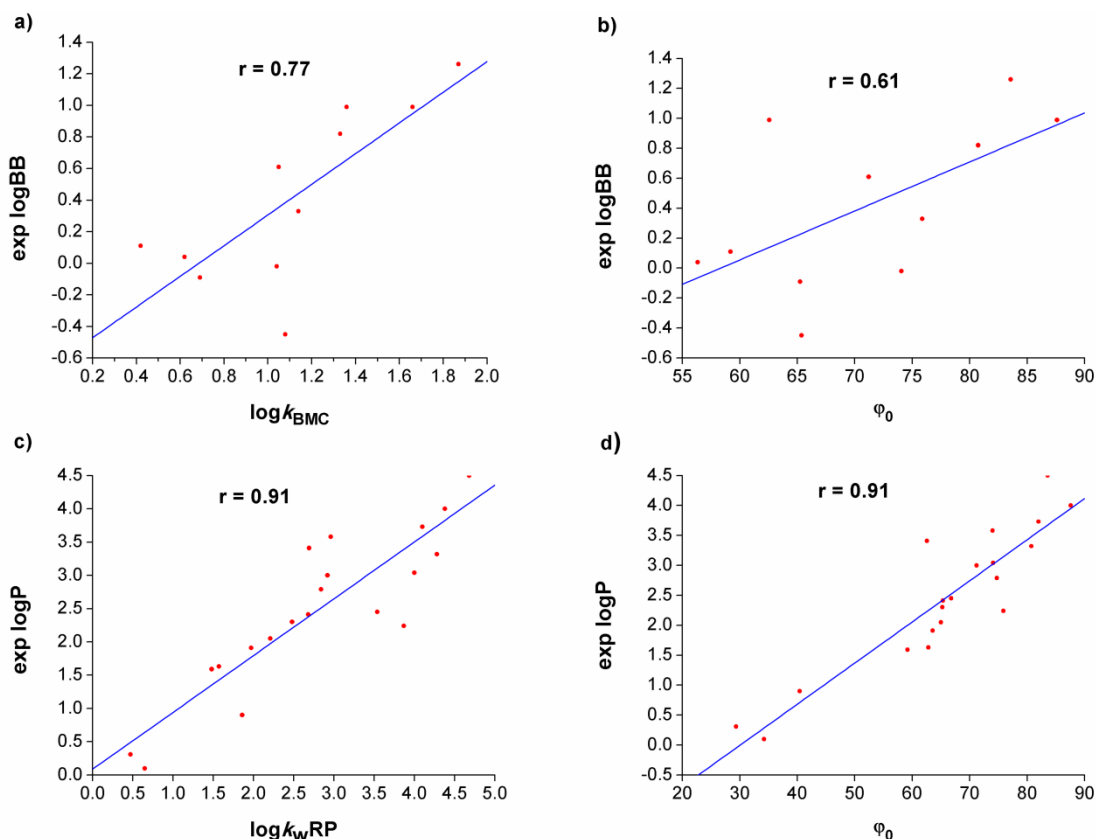
Pošto ispitivani ligandi α_2 -adrenergičkih i/ili imidazolinskih receptora nisu supstrati za efluks transportere, kao što je Pgp, može se zaključiti da je lipofilnost/hidrofilnost ove grupe jedinjenja značajna za njihovu penetraciju kroz KMB. BMC ($\log k_{\text{BMC}}$) i RP-HPLC ($\log k_w$, S, φ_0) hromatografski parametri su određeni za 16 liganada α_2 -adrenergičkih i/ili imidazolinskih receptora i 15 lekova koja deluju na CNS i prikazani su u **Tabeli 4**.

Tabela 4. Eksperimentalne $\log BB$ vrednosti, BMC i RP-HPLC retencioni parametri, i izračunate $\log P$ vrednosti liganada α_2 -adrenergičkih i/ili imidazolinskih receptora i lekova koji deluju na CNS

Jedinjenje	$exp \log BB$	$log k_{BMC}$	$log k_{wRP}$	S	φ_0	$exp \log P$	$\log P$ ACD/i-Lab
<i>Amilorid</i>	/	0,36	$0,65 \pm 0,61$	$-0,019 \pm 0,006$	34,21	0,1	-0,55
<i>Bromazepam</i>	/	0,74	$2,21 \pm 0,09$	$-0,034 \pm 0,002$	65	2,05	2,04
<i>Klonazepam</i>	$-0,45^{246}$	1,08	$2,68 \pm 0,32$	$-0,041 \pm 0,005$	65,37	2,41	2,57
<i>Klonidin</i>	$0,11^{247}$	0,42	$1,48 \pm 0,12$	$-0,025 \pm 0,002$	59,2	1,59	1,95
<i>Efaroksan</i>	/	0,52	$1,90 \pm 0,20$	$-0,026 \pm 0,003$	73,08	/	2,27
<i>Fluoksetin</i>	$1,26^{248}$	1,87	$4,68 \pm 0,04$	$-0,056 \pm 0,001$	83,57	4,5	4,64
<i>Gvanabenz</i>	/	0,92	$2,41 \pm 0,15$	$-0,035 \pm 0,002$	68,86	/	1,55
<i>Harmin</i>	/	1,04	$2,96 \pm 0,15$	$-0,040 \pm 0,002$	74	3,58	3,16
<i>Idazoksan</i>	/	0,58	$1,57 \pm 0,12$	$-0,025 \pm 0,002$	62,8	1,63	1,31
<i>Moksonidin</i>	/	-0,46	$1,86 \pm 0,82$	$-0,046 \pm 0,045$	40,43	0,9	0,67
<i>Nafazolin</i>	/	0,79	$1,76 \pm 0,41$	$-0,024 \pm 0,007$	73,33	/	2,8
<i>Oksazepam</i>	$0,61^{249}$	1,05	$2,92 \pm 0,10$	$-0,041 \pm 0,002$	71,22	3	2,73
<i>Olanzapin</i>	$0,33^{250}$	1,14	$3,87 \pm 0,14$	$-0,051 \pm 0,002$	75,88	2,24	2,04
<i>Prazepam</i>	/	1,45	$4,10 \pm 0,17$	$-0,050 \pm 0,002$	82	3,73	3,84
<i>Rilmenidin</i>	/	1,24	$4,33 \pm 0,58$	$-0,092 \pm 0,026$	47,07	/	2,03
<i>Risperidon</i>	$-0,02^{251}$	1,04	$4,00 \pm 0,16$	$-0,054 \pm 0,003$	74,07	3,04	2,97
<i>Tizanidin</i>	/	0,30	$1,14 \pm 0,13$	$-0,021 \pm 0,002$	54,29	/	1,68
<i>Trimazolin</i>	/	0,66	$1,41 \pm 0,38$	$-0,019 \pm 0,006$	74,21	/	2,57
<i>Viloksazin</i>	/	0,78	$2,07 \pm 0,11$	$-0,032 \pm 0,001$	64,69	/	1,53
<i>Ksilometazolin</i>	/	1,41	$3,41 \pm 0,48$	$-0,044 \pm 0,002$	77,5	/	4,14
<i>Ziprasidon</i>	/	1,31	$4,74 \pm 0,18$	$-0,058 \pm 0,003$	81,72	/	4,03
<i>Brimonidin</i>	/	-0,09	$0,47 \pm 0,08$	$-0,016 \pm 0,001$	29,38	0,31	1,47
<i>Karbamazepin</i>	$-0,09^{252}$	0,69	$2,48 \pm 0,15$	$-0,038 \pm 0,002$	65,26	2,3	2,23
<i>Citalopram</i>	$0,99^{253}$	1,36	$2,69 \pm 0,78$	$-0,043 \pm 0,001$	62,56	3,41	3,89
<i>Klozapin</i>	$0,82^{254}$	1,33	$4,28 \pm 0,19$	$-0,053 \pm 0,002$	80,75	3,32	3,09
<i>Gvanfacin</i>	/	0,91	$1,97 \pm 0,14$	$-0,031 \pm 0,002$	63,55	1,91	1,33

Harman	/	1,07	2,84 ± 0,13	-0,038 ± 0,002	74,74	2,79	2,89
Lamotrigin	0,04 ²⁵⁵	0,62	1,69 ± 0,74	-0,030 ± 0,012	56,33	/	2,12
Lorazepam	/	1,07	3,54 ± 0,28	-0,053 ± 0,005	66,79	2,45	2,52
Mianserin	0,99 ²⁴⁹	1,66	4,38 ± 0,16	-0,050 ± 0,002	87,6	4	3,49
Tetrahidrozin	/	0,29	1,1 ± 0,20	-0,015 ± 0,003	73,33	/	2,66

Do danas su poznate eksperimentalne $\log BB$ vrednosti 11 ispitivanih jedinjenja (Tabela 4).²⁴⁶⁻²⁵⁵ Iako su ispitivana jedinjenja bila strukturno različita, retencioni faktori dobijeni u BMC sistemu su pokazali relativno visoku korelaciju ($r = 0,77$) sa eksperimentalnim $\log BB$ vrednostima, što ukazuje na dobru sposobnost predviđanja ove *in vitro* metode (**Slika 29**).



Slika 29. Vrednosti koeficijenta korelacije između (a) eksperimentalnih $\log BB$ i $\log k_{BMC}$ vrednosti, (b) eksperimentalnih $\log BB$ i φ_0 vrednosti, (c) eksperimentalnih $\log P$ i $\log k_{wRP}$ vrednosti, i (d) eksperimentalnih $\log P$ i φ_0 vrednosti

Sa druge strane, retencioni faktori dobijeni u RP-HPLC sistemu su pokazali nižu korelaciju sa $\log BB$ vrednostima ($r(\log k_{wRP}/\log BB) = 0,58$; $r(S/\log BB) = -0,50$; $r(\varphi_0/\log BB) = 0,61$), pri čemu je najviša dobijena sa faktorom hidrofobnosti (**Slika 29**). Ovo znači da RP-HPLC retencioni faktori nisu pouzdan parametar za procenu KMB permeabilnosti liganada α_2 -adrenergičkih i/ili imidazolinskih receptora i lekova koji deluju na CNS, i da je potrebno da se razmatraju zajedno sa drugim fizičko-hemijskim karakteristikama jedinjenja koja su značajna za optimalnu izloženost moždanog tkiva leku.¹⁴⁶ Međutim, retencioni parametri dobijeni u ovom sistemu su pokazali visoku korelaciju sa eksperimentalno dobijenim $\log P$ vrednostima ($r(\log k_{wRP} / \exp(\log P)) = 0,91$; $r(\varphi_0 / \exp(\log P)) = 0,91$) (**Slika 29**), kao i $\log P$ vrednostima dobijenim koristeći ACD/i-Lab softver ($r(\log k_{wRP} / \log P_{ACD/i-Lab}) = 0,70$; $r(\varphi_0 / \log P_{ACD/i-Lab}) = 0,78$). Ove značajne korelacije ukazuju na to da

se ovi parametri mogu koristiti kao merilo lipofilnosti liganada α_2 -adrenergičkih i/ili imidazolinskih receptora i lekova koji deluju na CNS.

4.4.1 QSPR studija

Pošto se BMC retencioni faktor može smatrati pouzdanim parametrom za procenu KMB permeabilnosti liganada α_2 -adrenergičkih i/ili imidazolinskih receptora i lekova koji deluju na CNS, korišćen je kao zavisna varijabla u QSPR studijama da ukaže na molekulske karakteristike jedinjenja koje su značajne za njihovu adekvatnu penetraciju kroz KMB.

Četiri različite statističke metode, PLS, *postupna* MLR, SVM i ANN, su korišćene da bi se formirali pouzdani matematički modeli. Deskriptori prethodno selektovani postupnom MLR metodom su predstavljali ulazne varijable u metodi podržavajućih vektora (eng. *Support Vector Machine*, SVM) i ANN modelovanju.²³⁷

U SVM studiji, korišćena je funkcija radijalne raspodele (eng. *radial basis function*, RBF) kao kernel i vrednosti selektovanih deskriptora su normalizovane u opsegu od -1 do 1.²⁵⁶ Pošto izvođenje regresione SVM zavisi od kombinacije nekoliko parametara, prilikom treniranja mreže primenjena je grid pretraga uporedo sa desetstrukom unakrsnom validacijom da bi se optimizovali parametri najboljeg modela i sprečilo pretreniranje. U finalnom modelu, greška ukrštene validacije je iznosila 0,053, parametar kapaciteta (C), epsilon (ϵ) i gama (γ) su iznosili 2, 0,5 i 0,25, a broj podržavajućih vektora je iznosio 3. Jedinjenja korišćena kao test set u postupnom MLR, PLS i SVM modelovanju su u ANN studiji podeljena u dva seta: verifikacioni (brimonidin, citalopram, klopazipin, harman, lorazepam i tetrahidrozolin) i test set (karbamazepin, gvanfacin, lamotrigin i mianserin). Parametri kao što su optimalan broj čvorova u skrivenom sloju (4:3:1), broj epoha (200), *momentum* ($\alpha = 0,4$) i koeficijent učenja ($\eta = 0.01$) su prethodno optimizovani u inicijalnom treniranju mreže. Statistički parametri izračunati za PLS/QSPR- $\log k_{BMC}$, MLR/QSPR- $\log k_{BMC}$, ANN/QSPR- $\log k_{BMC}$ i SVM/QSPR- $\log k_{BMC}$ modele su prikazani u **Tabeli 5**.

Tabela 5. Selektovani molekularni deskriptori i izračunati statistički parametri za PLS/QSPR- $\log k_{\text{BMC}}$, MLR/QSPR- $\log k_{\text{BMC}}$, ANN/QSPR- $\log k_{\text{BMC}}$ i SVM/QSPR- $\log k_{\text{BMC}}$ modele

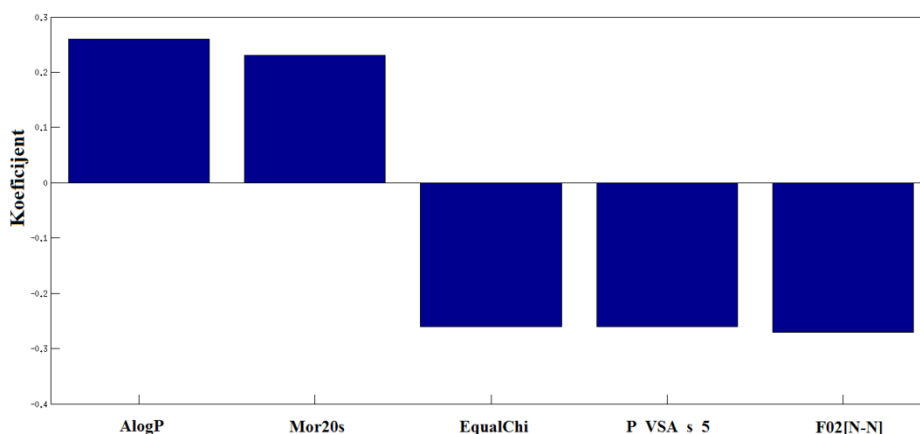
Model	Izabrani deskriptori	R ²	R	Q ² _{LOO}	RMSEE	F	P	r	Q ² _{ext}	RMSEP	R ² _{inter}	Q ² _{inter}
		<i>Training set</i>						<i>Test set</i>				
PLS	$\log k_{\text{BMC}}=f(\text{F02}[\text{N-N}], \text{ALOGP}, \text{EqualChi}, \text{P_VSA_s_5}, \text{Mor20s})^a$	0,851	/	0,824	0,186	44,426	$6,86e^{-08}$	0,765	0,749	0,281	0,025	-0,207
MLR	$\text{Log}k_{\text{BMC}}=1.577-0.017\text{P_VSA_s_5}+0.339\text{VE1_RG}-0.01\text{P_VSA_p_2}-0.868\text{GATS1e})^b$	0,853	/	0,743	0,184	24,759	$6,71e^{-07}$	0,821	0,825	0,235	/	/
SVM	$\log k_{\text{BMC}}=f(\text{P_VSA_s_5}, \text{VE1_RG}, \text{P_VSA_p_2}, \text{GATS1e})^b$	/	0,822	/	0,272	/	/	0,733	0,650	0,284	/	/
ANN	$\log k_{\text{BMC}}=f(\text{P_VSA_s_5}, \text{VE1_RG}, \text{P_VSA_p_2}, \text{GATS1e})^b$	/	0,814	0,713	0,293	/	/	0,628	0,495	0,389	/	/

Upoređujući rezultate ANN modela sa rezultatima dobijenim koristeći SVM, pokazano je da je SVM pristup tačniji od ANN u predviđanju permeabilnosti liganada α_2 -adrenergičkih i/ili imidazolinskih receptora kroz KMB. Ovo je verovatno posledica malog seta jedinjenja korišćenog u ovoj studiji.

4.4.2 Tumačenje izabranih QSPR modela

Poređenjem formiranih PLS/QSPR- $\log k_{\text{BMC}}$, MLR/QSPR- $\log k_{\text{BMC}}$, SVN/QSPR- $\log k_{\text{BMC}}$ i ANN/QSPR- $\log k_{\text{BMC}}$ modela, pokazano je da su PLS/QSPR- $\log k_{\text{BMC}}$, MLR/QSPR- $\log k_{\text{BMC}}$, SVN/QSPR- $\log k_{\text{BMC}}$ modeli bili superiorniji od ANN/QSPR- $\log k_{\text{BMC}}$ uzimajući u obzir vrednosti njihovih statističkih parametara (**Tabela 5**). Iako su sva tri modela pokazala značajnu preciznost u predviđanju $\log k_{\text{BMC}}$ vrednosti, MLR/QSPR- $\log k_{\text{BMC}}$ model je izabran kao najpouzdaniji zbog najbolje sposobnosti predviđanja $\log k_{\text{BMC}}$ vrednosti za jedinjenja iz test seta.

PLS/QSPR- $\log k_{\text{BMC}}$ model se sastojao od pet varijabli: F02[N-N], ALOGP, EqualChi, P_VSA_s_5 i Mor20s (**Tabela 5**). VIP vrednosti ovih deskriptora su u opsegu od 0,906 do 1,048. Na osnovu koeficijent plot, može se videti da ALOGP i Mor20s imaju pozitivan uticaj, dok F02[N-N], EqualChi i P_VSA_s_5 deskriptori imaju negativan uticaj na retenciono vreme jedinjenja u BMC sistemu (**Slika 30**).

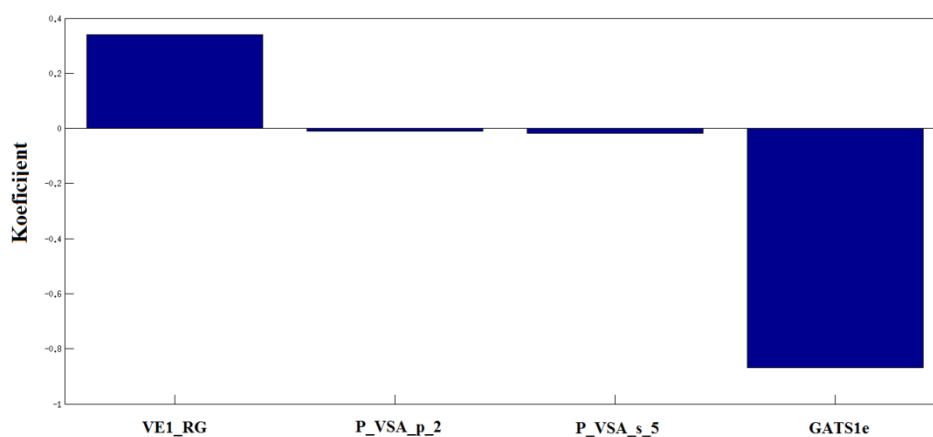


Slika 30. Koeficijent plot deskriptora PLS/QSPR- $\log k_{\text{BMC}}$ modela

Pošto su $\log k_{\text{BMC}}$ i $\log BB$ u dobroj korelaciji ($r = 0,77$), može se zaključiti da će povećanje ALOGP ili Mor20s vrednosti liganada dovesti do povećanja stepena njihove

penetracije kroz KMB, dok će povećanje vrednosti F02[N-N], EqualChi ili P_VSA_s_5 deskriptora imati negativan uticaj na penetraciju ovih jedinjenja kroz KMB.

Optimalan MLR/QSPR- $\log k_{\text{BMC}}$ model se sastojao od četiri deskriptora: P_VSA_s_5 (P_VSA-like deskriptori), VE1_RG (3D deskriptori zasnovani na matriksu), P_VSA_p_2 (P_VSA-like deskriptori), i GATS1e (2D autokorelacije). Svi selektovani deskriptori, osim VE1_RG su u negativnoj korelaciji sa BMC retencionim faktorom (Slika 31).



Slika 31. Koeficijent plot deskriptora MLR/QSPR- $\log k_{\text{BMC}}$ modela

P_VSA_s_5 i P_VSA_p_2 pripadaju P_VSA-like deskriptorima. P_VSA_s_5 je zbir van der Waals-ovih površina atoma sa I-stanjem u opsegu od 0 do 0,25. Jedinjenja sa najvećom vrednošću ovog deskriptora su brimonidin i bromazepam, što znači da prisustvo broma u molekularnoj strukturi smanjuje penetraciju liganada α_2 -adrenergičkih i/ili imidazolinskih receptora kroz KMB, što je pokazano i PAMPA metodom. P_VSA_p_2 je zbir van der Waals-ovih površina atoma sa polarnošću u opsegu od 0,4 do 1. Negativna korelacija ovog deskriptora sa Y vrednošću ukazuje da prisustvo polarnih grupa kao što je hidroksi grupa u molekularnoj strukturi imaće negativan uticaj na $\log k_{\text{BMC}}$ vrednosti. VE1_RG deskriptor uzima u obzir recipročnu vrednost kvadrata rastojanja između atomskog para i pripada grupi deskriptora koji se baziraju na trodimenzionalnom matriksu molekula. Ovo znači da je veličina molekula (molekulski volumen) parametar koji značajno utiče na penetraciju ispitivanih jedinjenja kroz KMB, i jedinjenja sa većom vrednošću ovog deskriptora prolaze u većem stepenu kroz KMB. GATS1e (eng. *Geary autocorrelations*) deskriptor se bazira na razlikama između Sanderson elektronegativnosti

atoma koji se nalaze na topološkoj udaljenosti od 1 veze. Međutim, GATS deskriptori su osetljivi na promene u okruženju atoma, kao što je na primer račvanje molekula.¹⁹⁷ Ovaj deskriptor ukazuje na uticaj elektronskih karakteristika ispitivanih jedinjenja na njihovu permeabilnost kroz KMB, pri čemu prisustvo elektronegativnih grupa može imati negativan uticaj na KMB penetraciju.

Formirani QSPR- $\log k_{BMC}$ modeli se mogu koristiti umesto *in vitro* metoda za predviđanje permeabilnosti liganada α_2 -adrenergičkih i/ili imidazolinskih receptora i strukturno sličnih jedinjenja kroz KMB. Ovi modeli omogućuju optimizaciju strukture novih kandidata lekova i eliminaciju jedinjenja sa niskom permeabilnošću pre sinteze.

4.5 VIRTUELNI SKRINING

Da bi se identifikovali novi I₁-IR agonisti sa proapoptotskom i antiproliferativnom aktivnošću razvijen je kombinovani VS protokol. U ovom protokolu izvršena je pretraga baze jedinjenja na osnovu sličnosti u strukturi sa rilmenidinom koristeći srednji kvazivalentni broj (eng. *Average Quasivalence Number*, AQVN), i zatim su korišćene metode virtuelnog skrininga zasnovane na ligandu (rilmenidinu) i strukturi proteina (nisharina).

Ovom kombinacijom različitih tehnika selektovano je jedanaest jedinjenja koja su se strukturno razlikovala od već poznatih I₁-IR agonista. Izabrani ligandi su sintetisani i biološki ispitani.

4.5.1 Heminformatički skrining

Koristeći AQVN i EIIP parametare predložen je jednostavan kriterijum za definisanje biološki značajnog hemijskog prostora. Pokazano je da je 92,5 % od 45 miliona jedinjenja iz PubChem baze homogeno distribuirano unutar AQVN intervala (2,4 – 3,3). Nedavno su publikovana istraživanja gde su selektovani novi inhibitori HIV i Ebola virusa primenom traženja jedinjenja po sličnosti u strukturi uz pomoć AQVN i EIIP deskriptora u kombinaciji sa drugim komplementarnim VS pristupima.^{207,257}

U ovoj disertaciji, definisan je filter koristeći AQVN deskriptor za brzi *in silico* predskringing velikih biblioteka jedinjenja u cilju identifikacije novih analoga rilmenidina. AQVN vrednost rilmenidina iznosi 2,4828, dok je filter za skrining definisan širenjem oblasti oko rilmenidinove AQVN vrednosti tako da obuhvata 20% AQVN prostora u kom se nalaze I₁-IR agonisti publikovani u literaturi (**Tabela 6**). Stoga je AQVN domen za filtriranje novih jedinjenja strukturno sličnih rilmenidinu iznosio 2,4296 - 2,5025. (**Slika 32**)

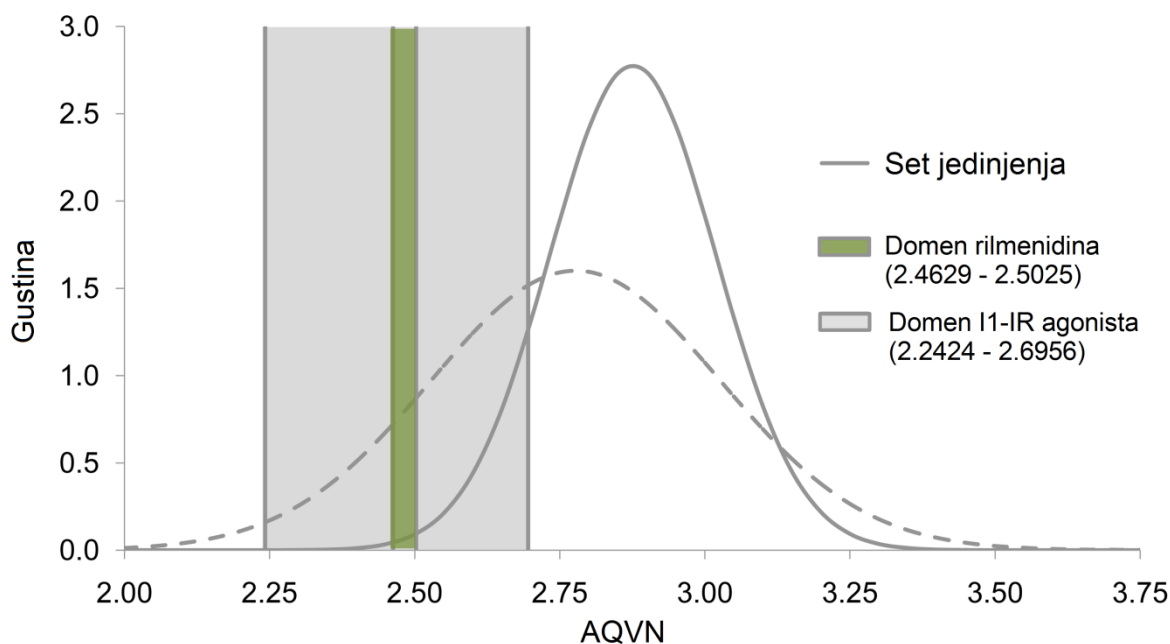
Tabela 6. Affiniteti vezivanja I₁- IR liganada ($pK_i = \log(1/K_i)$) korišćenih u VS studiji

ChEMBLID	Smiles	pK _i	Korišćeni radioligand, Membrana/Ćelija	AQVN vrednost
CHEMBL40393	<chem>CC1C(NC(C3CC3)C2CC2)=NCC1</chem>	4 ²⁷	[³ H] klonidin, hromafinske ćelije goveda	2.294118
CHEMBL40287	<chem>C12CCCCC1CC(NC(C4CC4)C3CC3)=N2</chem>	4 ²⁷	[³ H] klonidin, hromafinske ćelije goveda	2.292683
CHEMBL1907831	<chem>CC(CC2=NCCN2)C1=CC=CC=C1</chem>	5,14 ²⁵⁸	[¹²⁵ I]PIC, PC12	2.466667
CHEMBL2092861	<chem>CC(C2=NCCN2)CC1=CC=CC=C1</chem>	5,20 ²⁵⁸	[¹²⁵ I]PIC, PC12	2.466667
CHEMBL14210	<chem>C1(CCC2=NCCN2)=CC=CC=C1</chem>	5,43 ²⁵⁸	[¹²⁵ I]PIC, PC12	2.518519
CHEMBL157351	<chem>N#CSC1CCC2OC(CC2C1)C3=NCCN3</chem>	5,60 ²⁵⁸	[³ H] klonidin, hromafinske ćelije goveda	2.740741
CHEMBL40337	<chem>CC1CCC(NC(C3CC3)C2CC2)=N1</chem>	5,80 ²⁷	[³ H] klonidin, hromafinske ćelije goveda	2.294118
CHEMBL10316	<chem>C12=CC=CC=C1OC(C3=NCCN3)CO2</chem>	5,90 ²⁵⁹	[¹²⁵ I]PIC, PC12	2.740741
CHEMBL14640	<chem>C1(OCC2=NCCN2)=CC=CC=C1</chem>	6,15 ²⁵⁸	[¹²⁵ I]PIC, PC12	2.720000
/	<chem>CC.CCC(C2CC2)NC1=NCC(C)C1</chem>	6,19 ²⁷	[³ H] klonidin, hromafinske ćelije goveda	2.242424
CHEMBL2092860	<chem>C[C@H](CC2=NCCN2)C1=CC=CC=C1</chem>	6,23 ²⁵⁸	[¹²⁵ I]PIC, PC12	2.466667
CHEMBL288193	<chem>CC1C(C)N=C(NC(C3CC3)C2CC2)C1.C</chem>	6,27 ²⁷	[³ H] klonidin, hromafinske ćelije goveda	2.27027
/	<chem>CCC(C2CC2)NC1=NCCC1</chem>	6,29 ²⁷	[³ H] klonidin, hromafinske ćelije goveda	2.266667
CHEMBL93846	<chem>[H][C@]1(C3=NCCN3)C[C@@]([H])1C2=CC=CC=C2</chem>	6,46 ²⁵⁸	[¹²⁵ I]PIC, PC12	2.571429
CHEMBL273486	<chem>CC(C2=NCCN2)OC1=CC=CC=C1</chem>	6,51 ²⁵⁸	[¹²⁵ I]PIC, PC12	2.642857

CHEMBL40399	<chem>CCC1CCC(NC(C3CC3)C2CC2)=N1</chem>	6,77 ²⁷	[³ H] klonidin, hromafinske čelije goveda	2.27027
CHEMBL134	<chem>C1C1=CC=CC(C1)=C1NC2=NCCN2</chem>	6,90 ³⁴	[¹²⁵ I]PIC, PC12	3.217391
CHEMBL1162366	<chem>C1C1=C2C(CN(NC3=NCCN3)C2)=CC=C1</chem>	7,55 ³⁴	[¹²⁵ I]PIC, PC12	3.071429
CHEMBL276970	<chem>C1(/C=C/C2=NCCN2)=CC=CC=C1</chem>	7,72 ²⁵⁸	[¹²⁵ I]PIC, PC12	2.640000
CHEMBL289480	<chem>C1(NC(C3CC3)C2CC2)NCCO1</chem>	7,90 ³⁴	[¹²⁵ I]PIC, PC12	2.482759
CHEMBL94022	<chem>[H][C@]1(C3=NCCN3)C[C@@]([H])1C2=CC=CC=C2</chem>	7,93 ²⁵⁸	[¹²⁵ I]PIC, PC12	2.571429
/	<chem>BrC1=CC=CC=C1OCC2CN=C(N)O2</chem>	8,19 ²⁷	[³ H] klonidin, plazma membrane čelija centralnog dela nadbubrežne žlezde	3.076923
CHEMBL17860	<chem>CC(OC2=C(C1)C=CC=C2C1)C1=NCCN1</chem>	8,25 ³⁴	[¹²⁵ I]PIC, PC12 [³ H] klonidin, plazma	3.071429
CHEMBL268734	<chem>FC(C=CC(C)=C2)=C2C1=NCCN1</chem>	8,28 ²⁹	membrane čelija centralnog dela nadbubrežne žlezde [³ H] klonidin, plazma	2.833333
/	<chem>COC1=CCCC=C1C2=NCCN2</chem>	8,53 ²⁷	membrane čelija centralnog dela nadbubrežne žlezde	2.592593
CHEMBL266155	<chem>C12=CC=CC=C1C=CC(C3=NCCN3)=C2</chem>	8,89 ³⁴	[¹²⁵ I]PIC, PC12	2.740741
CHEMBL1907832	<chem>C[C@H](C2=NCCN2)CC1=CC=CC=C1</chem>	8,97 ²⁵⁸	[¹²⁵ I]PIC, PC12	2.466667
CHEMBL360803	<chem>C1C1=CC(I)=CC(C1)=C1/N=C2NCCN\2</chem>	9,10 ³⁴	[¹²⁵ I]PIC, PC12	3.076923
CHEMBL2058635	<chem>C1C1=C(NC2=NC(C)CC2)C=CC(I)=C1</chem>	9,75 ³⁴	[¹²⁵ I]PIC, PC12	2.437500

Filtriranje biblioteke jedinjenja je izvršeno na osnovu njihovih AQVN vrednosti, pri čemu su selektovana ona jedinjenja čija se vrednost ovog deskriptora nalazila u prethodno definisanom

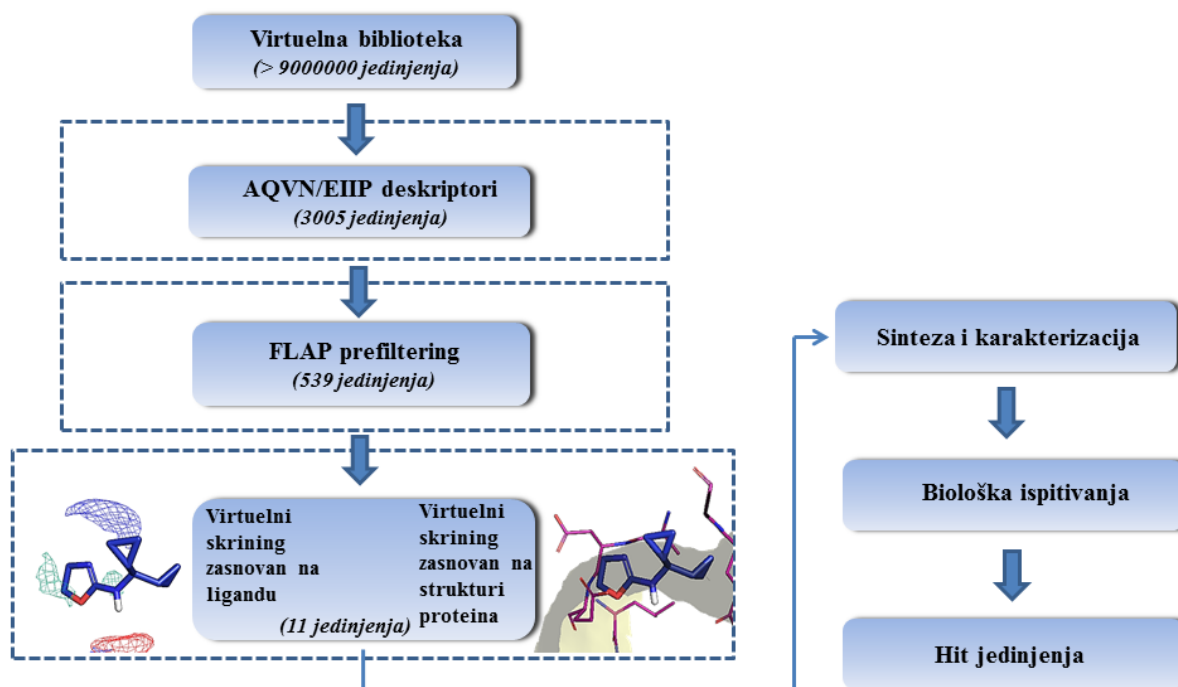
domenu. Ovom metodom je izvojeno 3005 liganada koja su zatim analizirani kombinovanim virtuelnim skriningom koji se zasniva na strukturi liganda i strukturi proteina.



Slika 32. Distribucija jedinjenja na osnovu njihovih AQVN vrednosti. 10,47% jedinjenja iz ispitivane baze jedinjenja je unutar domena definisanog za I₁-IR agoniste. Set je sadržao 3005 jedinjenja.

4.5.2 Virtuelni skrining zasnovan na ligandu i strukturi proteina

Do danas je zabeležen veliki broj uspešnih primena FLAP softvera za identifikaciju liganada G-protein kuplovanih receptora.^{209,213,160} Međutim, ovo je prva primena VS protokola u cilju pronalaženja novih I₁-IR agonista sa potencijalnom proapoptotskom i antiproliferativnom aktivnošću. Primenjen je kombinovani virtuelni skrining zasnovan na ligandu i na strukturi proteina koji prilikom filtriranja uzima u obzir različite hemijske i biološke karakteristike jedinjenja i targeta.²⁶¹ (Slika 33)



Slika 33. Shematski prikaz VS protokola za identifikaciju novih I₁-IR agonista sa potencijalnom proapoptotskom i antiproliferativnom aktivnošću

Nakon filtriranja virtuelne biblioteke jedinjenja (više od 9×10^6 jedinjenja) na osnovu AQVN deskriptora, preostala baza je sadržala 3005 strukturno različitih jedinjenja. Zatim je sproveden FLAP prefiltering da bi se rangirala i selektovala samo ona jedinjenja koja pokazuju visoku sličnost FLAP otisaka prstiju sa rilmenidinom. 539 top rangiranih jedinjenja je selektovano na osnovu njihovih Glob-Sum vrednosti ($> 0,01$). (**Slika 33**)

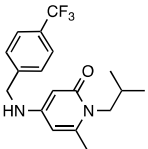
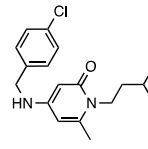
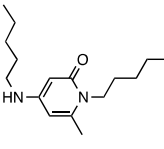
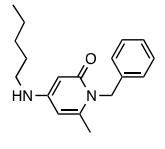
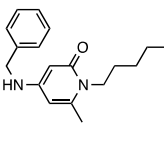
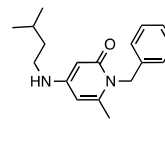
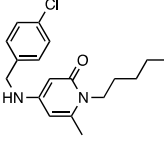
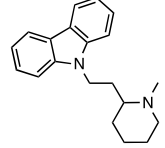
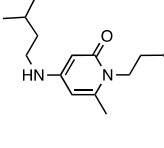
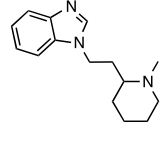
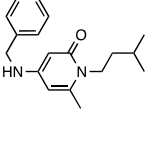
Set jedinjenja koji je sadržao 21 I₁-IR agonistu ($pK_i > 7$) i 539 prefiltriranih jedinjenja su bili izloženi daljim VS studijama koje su se zasnivale na ligandu i strukturi proteina. Rezultati skrininga su analizirani korišćenjem enrichment faktora i AUC.

U prvom koraku, primenjen je VS zasnovan na ligandu da bi se procenila sličnost između aktivnih i netestiranih jedinjenja iz FLAP baze sa rilmenidinom uzimajući u obzir GRID molekulska interakciona polja. Različiti skorovi sličnosti koji odgovaraju preklapanjima ovih polja, kao i njihove kombinacije, su generisane za svaki molekul. Drugi skrining je sproveden primenom metode koja je zasnovana na strukturi homolognog modela nisharina.⁶⁰ Predviđeni

aktivni centar ovog modela je korišćen za skrining FLAP baze uzimajući u obzir sličnost između GRID molekulskih interakcionih polja aktivnog mesta proteina i liganda.

Na osnovu dobijenih vrednosti AUC i enrichment faktora, pokazano je da H*DRY*H ($AUC_{LBVS} = 1,00$; $EF_{1\%LBVS} = 100\%$) i H ($AUC_{SBVS} = 0,991$; $EF_{1\%SBVS} = 100\%$) skorovi u VS studijama zasnovanim na ligandu i strukturi proteina, efikasno prave razliku između 21 poznata aktivna liganada I₁-IR i netestiranih jedinjenja u FLAP bazi na šta ukazuje visoka tačnost VS protokola. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da su sterna efekti i hidrofobne interakcije značajne za aktivnost jedinjenja na nisharinu. Jedanaest potencijalnih hit jedinjenja koja su imala H skor veći od 0,65 u VS baziranom na strukturi proteina i H*DRY*H skor veći od 0,1 u VS baziranom na ligandu su selektovana, sintetisana²¹⁶ i testirana *in vitro* na K562 ćelijama (**Tabela 7**).

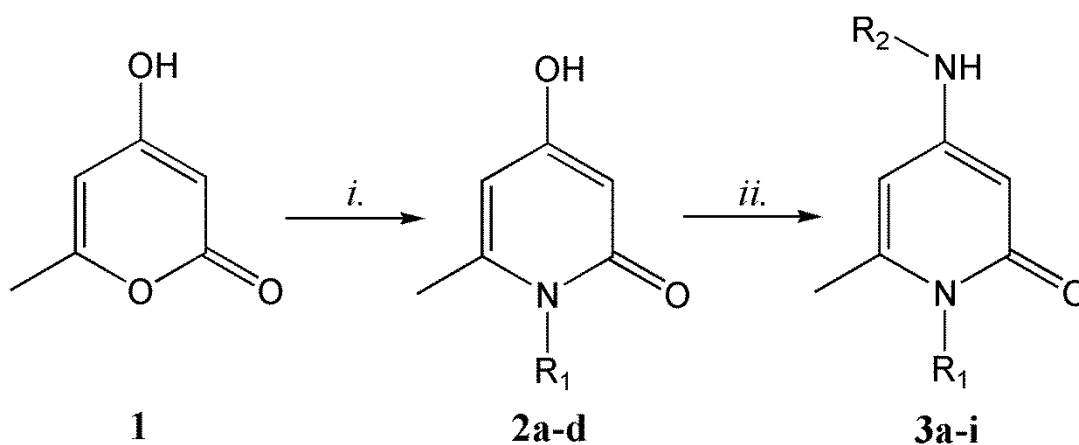
Tabela 7. Strukture i antiproliferativne vrednosti (IC_{50}) na K562 ćelijama jedinjenja selektovanih VS protokolom

Jedinjenja	Strukture	IC_{50} (μ M)	Jedinjenja	Strukture	IC_{50} (μ M)
3a		222	3g		224
3b		115	3h		140
3c		>300	3i		>300
3d		>300	5		70
3e		128	7		>300
3f		>300			

4.6 Sinteza selektovanih hit jedinjenja

Za sintezu jedinjenja **3a-i**, korišćen je komercijalno dostupan prekursor 4-hidroksi-6-metil-2-piron **1** i odgovarajući amini pri čemu su kao intermedijeri dobijeni *N*-supstituisani piridinoni **2a-d**.

Piridinoni **2a-d** su zatim pod mikrotalasnim uslovima supstituisani na položaju C4 sa odgovarajućim alkil- i arilaminima, i jedinjenja **3a-i** su dobijena sa prihvatljivim prinosima nakon prečišćavanja *flash* hromatografijom na koloni (**Slika 34**).



2a: R₁ = izobutil

2b: R₁ = pentil

2c: R₁ = izopentil

2d: R₁ = benzil

3a: R₁ = izobutil, R₂ = 4-CF₃-benzil

3b: R₁ = pentil, R₂ = pentil

3c: R₁ = pentil, R₂ = benzil

3d: R₁ = pentil, R₂ = 4-Cl-benzil

3e: R₁ = izopentil, R₂ = izopentil

3f: R₁ = izopentil, R₂ = benzil

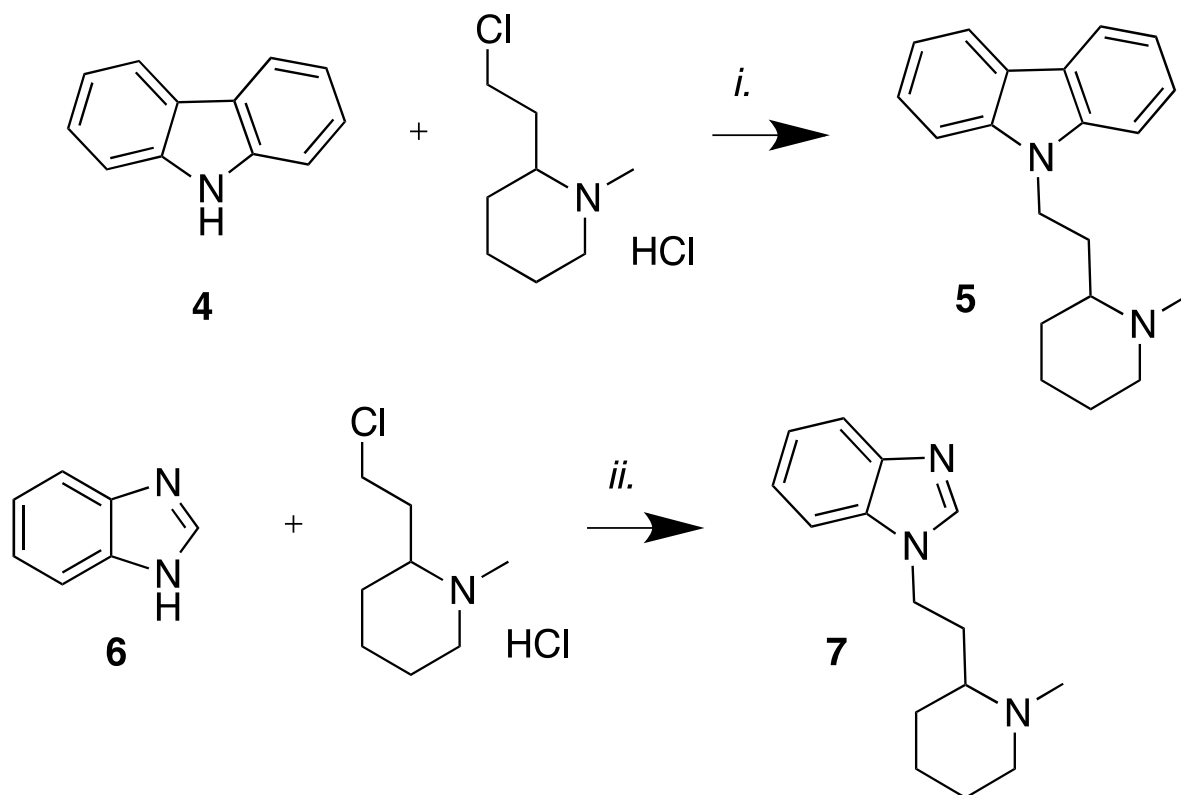
3g: R₁ = izopentil, R₂ = 4-Cl-benzil

3h: R₁ = benzil, R₂ = pentil

3i: R₁ = benzil, R₂ = izopentil

Slika 34. Reakcioni uslovi: *i.* R¹-NH₂, H₂O, refluks, 12 h; *ii.* R²-NH₂, DME, MW, 120 °C, 40 min

Sa druge strane, jedinjenja **5** i **7** su dobijena koristeći karbazol **4** ili benzimidazol **6** i 2-(2-hloretil)-piperidin hidrohlorid.²¹⁶ (Slika 35)



Slika 35. Reakcioni uslovi: *i.* NaH, DMF, refluks, 48 h

4-hidroksi-1-izobutil-6-metilpiridin-2(1H)-on (2a). (prinos 90%). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.30 (s, 1H), 6.05 (s, 1H), 5.95 (s, 1H), 3.83-3.82 (m, 2H), 2.34 (s, 3H), 2.21-2.14 (m, 1H), 0.94 (d, *J* = 6.5 Hz, 6H). MS (ESI) *m/z* 182.2 [M + H]⁺, 204.3 [M + Na]⁺.

4-hidroksi-6-metil-1-pentilpiridin-2(1H)-on (2b). (prinos 79%). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.32 (s, 1H), 5.98 (s, 1H), 5.91 (s, 1H), 3.96-3.91 (m, 2H), 2.34 (s, 3H), 1.67-1.62 (m, 2H), 1.37-1.32 (m, 4H), 0.93-0.89 (m, 3H). MS (ESI) *m/z* 196.4 [M + H]⁺, 218.4 [M + Na]⁺.

4-hidroksi-1-izopentil-6-metilpiridin-2(1H)-on (2c). (prinos 83%). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.32 (s, 1H), 5.73 (s, 1H), 5.47 (s, 1H), 3.86-3.80 (m, 2H), 2.29 (s, 3H), 1.65-1.56

(m, 1H), 1.41-1.34 (m, 2H), 0.91 (d, $J = 6.6$ Hz, 6H). MS (ESI) m/z 196.2 $[M + H]^+$, 218.3 $[M + Na]^+$.

1-benzil-4-hidroksi-6-metilpiridin-2(1H)-on (2d). (prinos 89%). 1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 10.31 (s, 1H), 7.36-7.26 (m, 5H), 5.54 (s, 1H), 5.47 (s, 1H), 4.25 (d, $J = 5.3$ Hz, 2H), 2.27 (s, 3H). MS (ESI) m/z 216.2 $[M + H]^+$, 238.3 $[M + Na]^+$.

1-izobutil-6-metil-4-((4-(trifluorometil)benzil)amino)piridin-2(1H)-on (3a). (prinos 29%). 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.60 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H), 7.42 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H), 5.53 (s, 1H), 5.46 (s, 1H), 4.59 (s, 1H), 4.36 (d, $J = 5.2$ Hz, 2H), 3.76-3.74 (m, 2H), 2.27 (s, 3H), 2.20-2.13 (m, 1H), 0.94 (d, $J = 6.6$ Hz, 6H). ^{13}C NMR (100.6 MHz, $CDCl_3$) δ 164.9, 154.2, 145.6, 142.3, 128.0, 127.5 (2C), 125.7 (2C), 125.6, 99.3, 91.8, 50.2, 46.4, 28.1, 20.9, 20.1 (2C). HRMS (ESI) izračunato za $C_{18}H_{21}F_3N_2O$ $[M + H]^+$ 339.1606, dobijeno 339.17022.

6-metil-1-pentil-4-(pentilamino)piridin-2(1H)-on (3b). (prinos 35%). 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 5.46 (s, 1H), 5.40 (s, 1H), 4.33-4.32 (m, 1H), 3.88-3.82 (m, 2H), 3.05-2.98 (m, 2H), 2.32 (s, 3H), 1.64-1.51 (m, 4H), 1.34-1.28 (m, 8H), 0.90-0.86 (m, 6H). ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 164.7, 154.8, 144.5, 99.5, 90.4, 43.4, 42.6, 29.3, 29.1, 28.9, 28.6, 22.4, 22.3, 20.3, 14.0, 13.9. HRMS (ESI) izračunato za $C_{16}H_{28}N_2O$ $[M + H]^+$ 265.2202, dobijeno 265.22899.

4-(benzilamino)-6-metil-1-pentilpiridin-2(1H)-on (3c). (prinos 31%). 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.36-7.26 (m, 5H), 5.52 (s, 1H), 5.51 (s, 1H), 4.53 (s, 1H), 4.25 (d, $J = 5.4$ Hz, 2H), 3.90-3.86 (m, 2H), 2.27 (s, 3H), 1.65-1.63 (m, 2H), 1.36-1.34 (m, 4H), 0.93-0.90 (m, 3H). ^{13}C NMR (100.6 MHz, $CDCl_3$) δ 164.6, 154.5, 144.9, 137.9, 128.8 (2C), 127.6, 127.5 (2C), 99.3, 91.4, 47.0, 43.6, 29.2, 28.8, 22.5, 20.4, 14.0. HRMS (ESI) izračunato za $C_{18}H_{24}N_2O$ $[M + H]^+$ 285.1889, dobijeno 285.19052.

4-((4-hlorobenzil)amino)-6-metil-1-pentilpiridin-2(1H)-on (3d). (prinos 32%). 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.30 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.23 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 5.51 (s, 1H), 5.43 (s, 1H), 4.57 (s, 1H), 4.21 (d, $J = 5.4$ Hz, 2H), 3.92-3.84 (m, 2H), 2.27 (s, 3H), 1.65-1.62 (m, 2H), 1.36-1.34 (m, 4H), 0.92-0.89 (m, 3H). ^{13}C NMR (100.6 MHz, $CDCl_3$) δ 164.5, 154.3, 145.0, 136.4, 133.3, 128.9 (2C), 128.7 (2C), 99.3, 91.5, 46.2, 43.6, 29.1, 28.8, 22.5, 20.4, 14.0. HRMS (ESI) izračunato za $C_{18}H_{23}ClN_2O$ $[M + H]^+$ 319.1499, dobijeno 319.15063.

1-izopentil-4-(izopentilamino)-6-metilpiridin-2(1H)-one (3e). (prinos 33%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 5.45 (s, 1H), 5.44 (s, 1H), 3.98 (s, 1H), 3.94-3.90 (m, 2H), 3.09-3.05 (m, 2H), 2.27 (s, 3H), 1.74-1.64 (m, 2H), 1.55-1.45 (m, 4H), 0.97 (d, *J* = 6.6 Hz, 6H), 0.94 (d, *J* = 6.6 Hz, 6H). ¹³C NMR (100.6 MHz, CDCl₃) δ 164.6, 154.6, 144.6, 99.4, 90.7, 42.1, 40.9, 37.9, 37.8, 26.5, 25.9, 22.5 (2C), 22.4 (2C), 20.2. HRMS (ESI) izračunato za C₁₆H₂₈N₂O [M + H]⁺ 265.2202, dobijeno 265.22951.

4-(benzilamino)-1-izopentil-6-metilpiridin-2(1H)-on (3f). (prinos 28%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.35-7.26 (m, 5H), 5.52 (s, 1H), 5.49 (s, 1H), 4.61 (s, 1H), 4.24 (d, *J* = 5.4 Hz, 2H), 3.92-3.88 (m, 2H), 2.26 (s, 3H), 1.73-1.64 (m, 1H), 1.54-1.48 (m, 2H), 0.97 (d, *J* = 6.6 Hz, 6H). ¹³C NMR (100.6 MHz, CDCl₃) δ 164.5, 154.6, 144.8, 137.9, 128.7 (2C), 128.5, 127.5 (2C), 99.4, 91.3, 46.9, 42.1, 37.8, 26.5, 22.5 (2C), 20.3. HRMS (ESI) izračunato za C₁₈H₂₄N₂O [M + H]⁺ 285.1889, dobijeno 285.19034.

4-((4-chlorobenzil)amino)-1-isopentil-6-metilpiridin-2(1H)-one (3g). (prinos 33%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.32-7.22 (m, 4H), 5.52 (s, 1H), 5.48 (s, 1H), 4.55 (s, 1H), 4.24 (d, *J* = 5.4 Hz, 2H), 3.93-3.89 (m, 2H), 2.28 (s, 3H), 1.72-1.67 (m, 1H), 1.55-1.49 (m, 2H), 0.97 (d, *J* = 6.6 Hz, 6H). ¹³C NMR (100.6 MHz, CDCl₃) δ 164.4, 154.3, 144.9, 136.4, 133.3, 128.9 (2C), 128.7 (2C), 99.3, 91.5, 46.2, 42.2, 37.8, 26.5, 22.5 (2C), 20.3. HRMS (ESI) izračunato za C₁₈H₂₃ClN₂O [M + H]⁺ 319.1499, dobijeno 319.15082.

1-benzil-6-metil-4-(pentilamino)piridin-2(1H)-on (3h). (prinos 31%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.27-7.14 (m, 5H), 5.54 (s, 1H), 5.49 (s, 1H), 5.25 (d, *J* = 5.4 Hz, 2H), 4.30 (s, 1H), 3.10-3.05 (m, 2H), 2.12 (s, 3H), 1.61-1.59 (m, 2H), 1.34-1.27 (m, 4H), 0.93-0.89 (m, 3H). ¹³C NMR (100.6 MHz, CDCl₃) δ 165.0, 155.0, 145.3, 137.7, 128.6 (2C), 126.9, 126.3 (2C), 99.8, 90.0, 46.0, 42.7, 29.2, 28.6, 22.4, 20.5, 14.0. HRMS (ESI) izračunato za C₁₈H₂₄N₂O [M + H]⁺ 285.1889, dobijeno 285.19074.

1-benzil-4-(izopentilamino)-6-metilpiridin-2(1H)-on (3i). (prinos 36%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.30-7.13 (m, 5H), 5.55 (s, 1H), 5.54 (s, 1H), 5.24 (d, *J* = 5.4 Hz, 2H), 4.30 (s, 1H), 3.19-3.07 (m, 2H), 2.12 (s, 3H), 1.67-1.66 (m, 1H), 1.52-1.46 (m, 2H), 0.94 (d, *J* = 6.4 Hz, 6H). ¹³C NMR (100.6 MHz, CDCl₃) δ 165.0, 154.9, 145.4, 137.7, 128.6 (2C), 126.9, 126.3 (2C), 99.8, 90.0, 46.0, 40.9, 37.8, 25.9, 22.5 (2C), 20.5. HRMS (ESI) izračunato za C₁₈H₂₄N₂O [M + H]⁺ 285.1889, dobijeno 285.19088.

9-(2-(1-metilpiperidin-2-il)etil)-9H-karbazol (5). (Prinos 53%). ¹H NMR (CDCl₃-400 MHz) δ 1.36-1.40 (m, 1H), 1.65-1.68 (m, 3H), 1.82-1.85 (m, 2H), 2.07-2.3 (m, 4H), 2.37 (s, 3H), 2.92-2.97 (m, 1H), 4.36-4.48 (m, 2H), 7.24,7.52 (m, 6H), 8.12 (d, J = 8 Hz, 2H). ¹³C NMR (CDCl₃-100.6 MHz) δ 24.2, 25.3, 30.5, 31.4, 35.5, 39.2, 42.7, 56.9, 61.7, 108.5, 118.8, 120.4, 123.0, 125.7, 140.2. HRMS (ESI) izračunato za C₂₀H₂₄N₂ [M + H]⁺ 293.1939, dobijeno 293.20123.

1-(2-(1-metilpiperidin-2-il)etil)-1H-benzo[d]imidazol (7). (Prinos 72%). ¹H-NMR (CDCl₃-300 MHz) δ 1.27-1.77 (m, 6H), 2.02-2.20 (m, 4H), 2.30 (s, 3H), 2.86-2.94 (m, 1H), 4.15-4.36 (m, 2H), 7.20-7.34 (m, 2H), 7.39-7.44 (m, 1H), 7.80- 7.85 (m, 1H), 7.93 (s, 1H). ¹³C-NMR (CDCl₃-100.6 MHz) δ 24.2, 25.1, 30.2, 32.9, 41.3, 42.5, 56.7, 61.1, 64.4, 88.8, 109.6, 120.4, 122.1, 122.9, 142.8. HRMS (ESI) izračunato za C₁₅H₂₁N₃ [M + H]⁺ 244.1735, dobijeno 244.18082.

4.7 Određivanje afiniteta vezivanja liganada na humanim α_{2A} adrenergičkim receptorima

Metodom kompetitivnog vezivanja koristeći [3H]RS79948-197 ispitan je afinitet vezivanja jedanaest selektovanih hit jedinjenja, rilmenidina i efaroksana, na humanim α_{2A} adrenergičkim receptorima. (Tabela 8). Afiniteti vezivanja K_i (nM) i njihovi 95% intervali pouzdanosti su dobijeni iz 3 do 6 nezavisna eksperimenta, uzimajući u obzir da postoji samo jedno mesto vezivanja na receptoru.

Tabela 8. Afiniteti vezivanja (K_i), agonistička svojstva i intrizička aktivnost ispitivanih jedinjenja na humanim α_{2A} -adrenergičkim receptorima

Jedinjenje	K_i (nM) ^a	p <i>K</i> _i	pEC ₅₀	Intrizička aktivnost ^b (% adrenalinove)
3a	58 000 (20 000-170 000)	4,23	n.d.	-6 ± 2
3b	62 000 (27 000-150 000)	4,21	n.d.	-18 ± 3
3c	41 000 (22 000-80 000)	4,39	n.d.	-12 ± 4
3d	80 000 (24 000-270 000)	4,10	n.d.	0 ± 4
3e	52 000 (15 000-430 000)	4,28	n.d.	-17 ± 4
3f	27 000 (8 100-130 000)	4,57	n.d.	-10 ± 2
3g	99 000 (40 000-250 000)	4,00	n.d.	-1 ± 4
3h	110 000 (44 000-300 000)	3,96	n.d.	-8 ± 5

3i	110 000 (67 000-1100 000)	3,96	n.d.	-2 ± 1
5	1 200 (540-3000)	5,92	n.d.	-3 ± 2
7	11 000 (3 900-36 000)	4,96	n.d.	-6 ± 1
Adrenalin	160 (67-430)	6,80	7,52 ± 0,07	100
Rilmenidin	300 (170-520)	6,52	6,75 ± 0.07	54 ± 4
Efaroksan	4,4 (2,7-6,9)	8,36	n.d.	-13 ± 2
Klonidin	28 (16-48)	7,55	7,52 ± 0,1	41 ± 6
Deksmedetomidin	2,5 (1,6-3,9)	8,60	8,67 ± 0,04	63 ± 3
Atipamezol	1,2 (0,77-2,0)	8,92	n.d.	<i>n.d.</i>

n.d. znači 'nedefinisano' za jedinjenja koja nisu pokazala agonističku aktivnost u funkcionalnim testovima

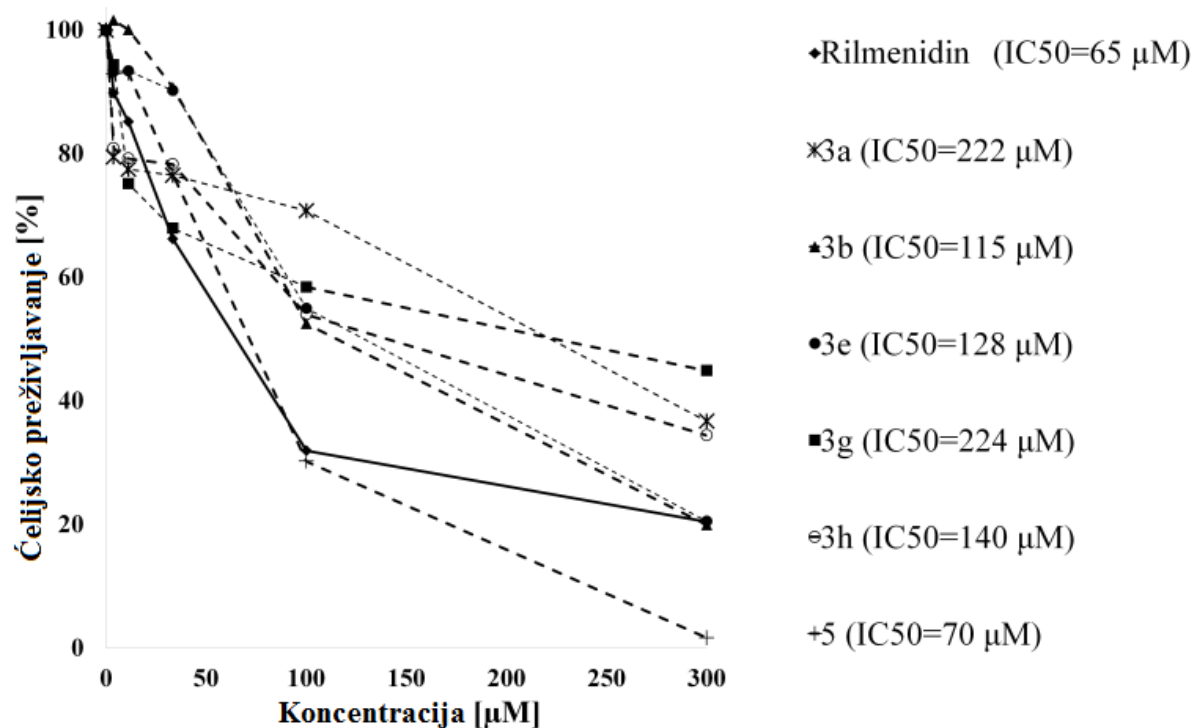
Ni jedno od jedanaest selektovanih hit jedinjenja nije pokazalo značajan afinitet na humanim α_{2A} adrenergičkim receptorima, najveća vrednost je zabeležena kod jedinjenja **5** i **7** (K_i 1,2 i 11 μ M). Kao pozitivna kontrola u ovom biološkom testu korišćeni su poznati ligandi α_{2A} adrenergičkih receptora: adrenalin, deksmedetomidin, klonidin i atipamezol. Pokazano je da se efaroksan ($K_i = 4,4$ nM) vezuje relativno visokim afinitetom za α_{2A} adrenergičke receptore u poređenju sa klonidinom ($K_i = 28$ nM) i rilmenidinom ($K_i = 300$ nM).

Da bi se odredila agonistička svojstva (potentnost agonista) i intrizička aktivnost ovih jedinjenja na rekombinantnim humanim α_{2A} adrenergičkim receptorima sproveden je funkcionalni eksperiment vezivanja [35 S]GTP γ S. Vrednosti intrizičke aktivnosti jedinjenja u **Tabeli 8** su prikazane u odnosu na punog agonistu adrenalin (100%), dok su agonistička svojstva izražena kao pEC₅₀ vrednost, koja predstavlja negativan logaritam koncentracije liganda (nM) koja dovodi do 50% maksimalnog uočenog agonističkog efekta. Vrednosti su dobijene iz 3 do 5 nezavisna eksperimenta i rezultati ukazuju da je rilmenidin, kao i klonidin, parcijalni agonista α_{2A} adrenergičkih receptora ali da je njegova agonistička potentnost niža od klonidinove. Ni jedno od hit jedinjenja nije pokazalo agonistička svojstva na humanim α_{2A} adrenergičkim receptorima, dok su neka od njih pokazala nisku negativnu intrizičku aktivnost pri visokim koncentracijama, verovatno delujući kao slabi inverzni agonisti na α_{2A} adrenergičkim receptorima.

4.8 Ispitivanje citotoksičnosti

In vitro citotoksična aktivnost ispitivanih jedinjenja ispitana je MTT testom na K562 ćelijama. K562 ćelije su tretirane različitim koncentracijama ispitivanih jedinjenja u opsegu 3,7 – 300 μM , i nakon 48 h primećeno je da šest jedinjenja (**3a**, **3b**, **3e**, **3g**, **3h** i **5**) ispoljava citotoksičnu aktivost pri srednjim i visokim mikromolarnim koncentracijama (**Slika 36**).

Rezultati ispitivanja su izraženi kao IC_{50} vrednost, koja je izračunata iz grafika preživljavanja ćelija kao koncentracija ispitivanog jedinjenja pri kojoj dolazi do smanjenja preživljavanja ćelija za 50%.



Slika 36. Krive preživljavanja K562 ćelija tretiranih rilmenidinom i sa šest novih jedinjenja (**3a**, **3b**, **3e**, **3g**, **3h**, **5**) nakon 48 sati

Tretman ćelija jedinjenjem **5** imao je najveći efekat na preživljavanje ($IC_{50} = 70 \mu M$). Ostali ispitivani ligandi (**3a**, **3b**, **3c**, **3g** i **3h**) pokazali nisku antitumorsku aktivnost na K562 ćelijskoj liniji, sa IC_{50} vrednostima većim od $100 \mu M$.

U prethodnim studijama ispitana je antitumorska aktivnost agoniste, parcijalnog agoniste i antagoniste I_1 -imidazolinskog receptora (rilmenidina, moksonidina i efaroksana) na ovoj ćelijskoj liniji i pokazano je da agonista rilmenidin indukuje apoptozu pri koncentraciji $IC_{50} = 50 \mu M$, dok antagonista efaroksan i parcijalni agonista moksonidin indukuju apoptozu pri koncentracijama većim od $300 \mu M$ (**Tabela 9**).⁶⁰ Upoređivanjem efekta jedinjenja **5** sa efektom agoniste I_1 -imidazolinskog receptora na vijabilitet.^{58,75,262} i apoptozu K562 ćelija (**Tabela 9**), ovo jedinjenje je identifikovano kao novo hit jedinjenje.

Tabela 9. Koncentracije liganada imidazolinskih receptora koji indukuju smrt ćelija K562 ćelijske linije

Jedinjenje	Antiproliferativna/Proapoptotska koncentracija (μM)
Rilmenidin	50
Moksonidin	>300
Efaroksan	-
Jedinjenje 5	70

Da bi dobio uvid u mehanizam koji leži u osnovi antitumorske aktivnosti, bilo je potrebno ispitati uticaj jedinjenja **5** na ćelijski ciklus i njegovu sposobnost da izazove ćelijsku smrt, odnosno apoptozu.

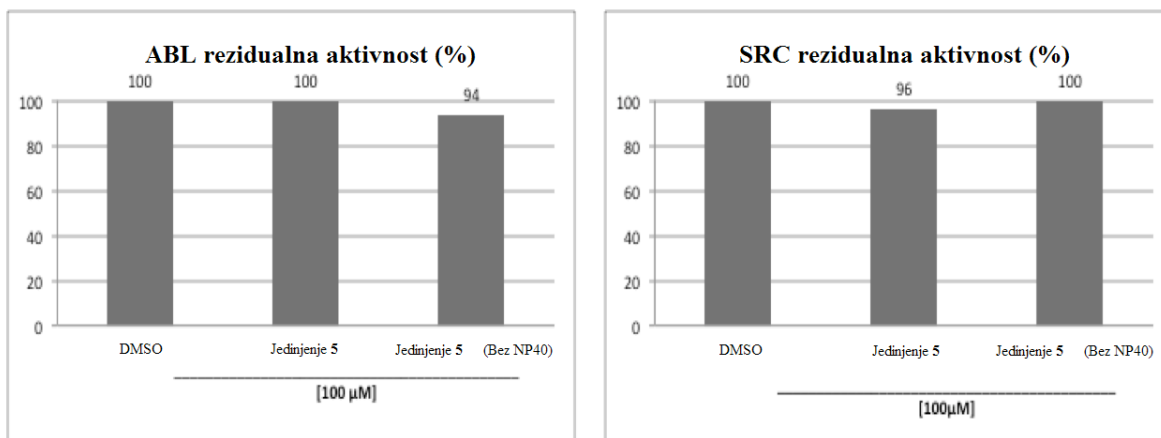
Proapoptotska aktivnost jedinjenja **5** se manifestuje povećanjem broja ranih apoptotskih ćelija u odnosu na kontrolnu grupu. Nakon 48 h kontinuiranog tretmana K562 ćelija uočeno je da je jedinjenje **5** (40%) dvostruko efikasnije od rilmenidina (20%) u indukovanju ćelijske smrti. Citometrijskom analizom je primećeno jedinjenje **5** dovodi do akumulacije ćelija u sub-G1 fazi, smanjenja procenta ćelija u G1 i S fazi ćelijskog ciklusa, kao i do značajnog smanjenja udela ćelija u S i G2/M fazi u odnosu na netretiranje ćelije (kontrolu).

Pored proapoptotske aktivnosti za koju je pokazano da leži u osnovi antitumorske aktivnosti jedinjenja 5, antiproliferativni efekat ovog jedinjenja je takođe potvrđen testom inhibicije formiranja kolonija u polučvrstoj metilceluloznoj podlozi. Nakon inkubacije K562 ćelija sa jedinjenjem 5 u koncentracijama 50 μM i 70 μM tokom 24 h, uočeno je da dolazi do inhibicije formiranja kolonija ćelija na dozno zavisani način. Takođe, primećena je značajna inhibicija rasta ćelija od pri IC_{50} koncentraciji ovog jedinjenja.

4.8.1 Ispitivanje specifičnosti antitumorskog dejstva jedinjenja 5 na K562 ćelijama

Poznato je da mali hidrofobni molekuli mogu da formiraju submikrometerske agregate u vodenim rastvorima.^{263,264} Ovi agregati nespecifično inhibiraju enzime i druge proteine što dovodi do identifikovanja lažno pozitivnih 'hit' jedinjenja u biohemijskim analizama.²⁶⁵

Kako bismo utvrdili da celularni efekti jedinjenja 5 nisu posledica agregacije ili nespecifičnog delovanja, ispitana je njegova aktivnost na dva nezavisna targeta (Src i Abl). Inhibitorna aktivnost jedinjenja 5 je ispitana pri koncentraciji (100 μM) sa ili bez prisustva deterdženta (NP40) u reakcionoj smeši (**Slika 37**).



Slika 37. Inhibitorni efekat jedinjenja 5 na Src i Abl kinazama je prikazan kao % rezidualne aktivnosti pri koncentraciji inhibitora 100 μM

Kao što se može videti nije uočeno da jedinjenje **5** inhibira selektovane kinaze, ni u prisustvu, ni u odsustvu deterdženta u reakcionoj smeši. Osim *in vitro* eksperimenta, *Aggregator advisor* server²⁶⁶ je korišćen za procenu sličnosti u strukturi jedinjenja **5** i poznatih agregatora koji se nalaze u bazi podataka, pri čemu je pokazano da ne postoji strukturna sličnost ovih jedinjenja.

Dobijeni *in vitro* i *in silico* rezultati isključuju efekte agregacije ili nespecifičnu aktivnost jedinjenja **5**, ukazujući da je uočena antitumorska aktivnost jedinjenja **5** posledica specifičnog delovanja na I₁-IR signalni put.

4.8.2 Sinergističko delovanje jedinjenja 5 i doksorubicina na K562 ćelije

K562 je ćelijska linija hronične mijeloidne leukemije, koje je relativno neosetljiva na apoptozu indukovanu lekovima koji oštećuju DNK, kao što je doksorubicin.⁶⁸ Prethodno je pokazano da kombinovana primena rilmenidina i doksorubicina sinergistički povećava osetljivost K562 ćelija na apoptozu u poređenju sa samim doksorubicinom (44% naspram 10%).⁷⁵

U ovoj disertaciji K562 ćelije su tretirane jedinjenjem **5**, doksorubicinom pri IC₅₀ 1 μM i njihovom kombinacijom, nakon čega je određen procenat apoptotičnih ćelija protočnom citometrijom. Rezultati pokazuju da sama primena doksorubicina je dovela jedino do povećanja procenta ranoapoptotičnih ćelija i to 20%, dok tretman K562 ćelija kombinovanom primenom jedinjenja **5** i doksorubicina dovodi do značajnog povećanja populacije ranoapoptotičnih ćelija i to 64% dok su populacije kasnoapoptotičnih i nekrotičnih ćelija skoro nestale .

Na osnovu prethodnih rezultata, a u cilju ispitivanja mehanizma interakcije jedinjenja **5** i doksorubicina izračunat je Chou-Talalay kombinatorni indeks. U ovom eksperimentu korišćen je fiksni molarni odnos jedinjenja **5** i doksorubicina (70:1), što je u skladu sa ovom metodom (**Tabela 10**).

Tabela 10. Vrednosti kombinacionog indeksa (CI) za kombinovanu terapiju jedinjenja **5** i doksorubicina pri molarnom odnosu 70:1²²⁴

Jedinjenje 5 (μM)	Doksorubicin (μM)	Stepen inhibicije (%)	CI
25	0.36	45.75	0.877
50	0.7	68.62	0.511
70	1.0	72.21	0.617
100	1.4	78.21	0.688

Dobijene CI vrednosti su bile značajno manje od 1 u celom opsegu ispitivanih koncentracija, što ukazuje na jak sinergistički efekat jedinjenja 5 i doksorubicina. Sličan, ali slabiji, sinergizam je prethodno pokazan kod rilmenidina.⁷⁵

4.9 Potencijalno novi targeti (*off-target-i*) liganada α_2 -adrenergičkih i/ili imidazolinskih receptora

Prvobitne studije o I_1 -IR signalnim putevima su se bazirale na hipotezi da ovaj receptor pripada familiji G protein kuplovanih receptora (eng. *G-Protein Coupled Receptors*, GPCRs). Ipak

pokazano je da stimulisanjem govedih ćelija nadbubrežne žlezde klonidinom ne dolazi do akumulacije ni cAMP ni inozitol fosfata čime je ova tvrdnja opovrgnuta.²⁶⁷ Kasnije su Wu i saradnici uočili da IRAS ima uticaj na signalizaciju μ opioidnih receptora (MOR) koji su GPCR i koji kada se aktiviraju smanjuju aktivnost cAMP i ERK1/2 kao i ulazak Ca^{2+} u ćelije.²⁶⁸ Zanimljivo je da agmatin, endogeni ligand I_1 receptora, inhibira naloksonom, antagonistom MOR, indukovano povećanje cAMP i Ca^{2+} u opioidnim receptorima. Takođe, zabeleženo je imidazolinski ligandi mogu da interaguju sa pojedinim podtipovima GPCR lipofosfolipidnih receptora i smatra se da dejstvo imidazolinskih receptora u PC12 ćelijama se dešava upravo aktiviranjem ovog tipa receptora.²⁶²

Imajući u vidu da se imidazolinski ligandi pored imidazolinskih receptora koji su ciljno mesto njihovog dejstva vezuju i za GPCR receptore, u ovoj disertaciji je primenjena metoda virtuelnog skrininga u cilju identifikacije novih 'off targets' ove grupe jedinjenja kao i jedinjenja 5 prethodno identifikovanog kao 'hit' za nisharin. U ovoj metodi, poznatoj kao virtuelni skrininga targeta (eng. *virtual target screening*) ili metoda reverznog dokinga, koristeći Glide softver analiziran je set od 399 GPCRs i 3264 molekula (64 liganda imidazolinskih receptora i 3200 mamaca) i na osnovu vrednosti doking skorova identifikovani su ligandi i proteini koji potencijalno ostvaruju značajne interakcije.

Pravilna priprema baze proteina kao i baze ispitivanih jedinjenja je bila od velikog značaja za poboljšanje tačnosti i primenljivosti metode reverznog dokinga. Pored optimizacije i minimizacije, definisanje odgovarajućeg vezujućeg mesta ispitivanih proteina je bilo značajno da bi rezultati dokinga bili tačni i pouzdani.

Dokovane poze ispitivanih jedinjenja su rangirane koristeći Glide skoring funkciju i proteini su selektovani kao potencijalni *off-targeti* ako su imidazolinski ligandi bili rangirani u top 1% ukupne baze koja je sadržala približno 3264 jedinjenja i ako je skor energije vezivanja tih liganada dobijen doking metodom bio kvantitativno uporediv sa skorom liganda iz njegove kristalne strukture.¹⁸⁶ (**Tabela 11**)

Tabela 11. Najznačajniji rezultati inverznog virtuelnog skrininga su prikazani u Tabeli.

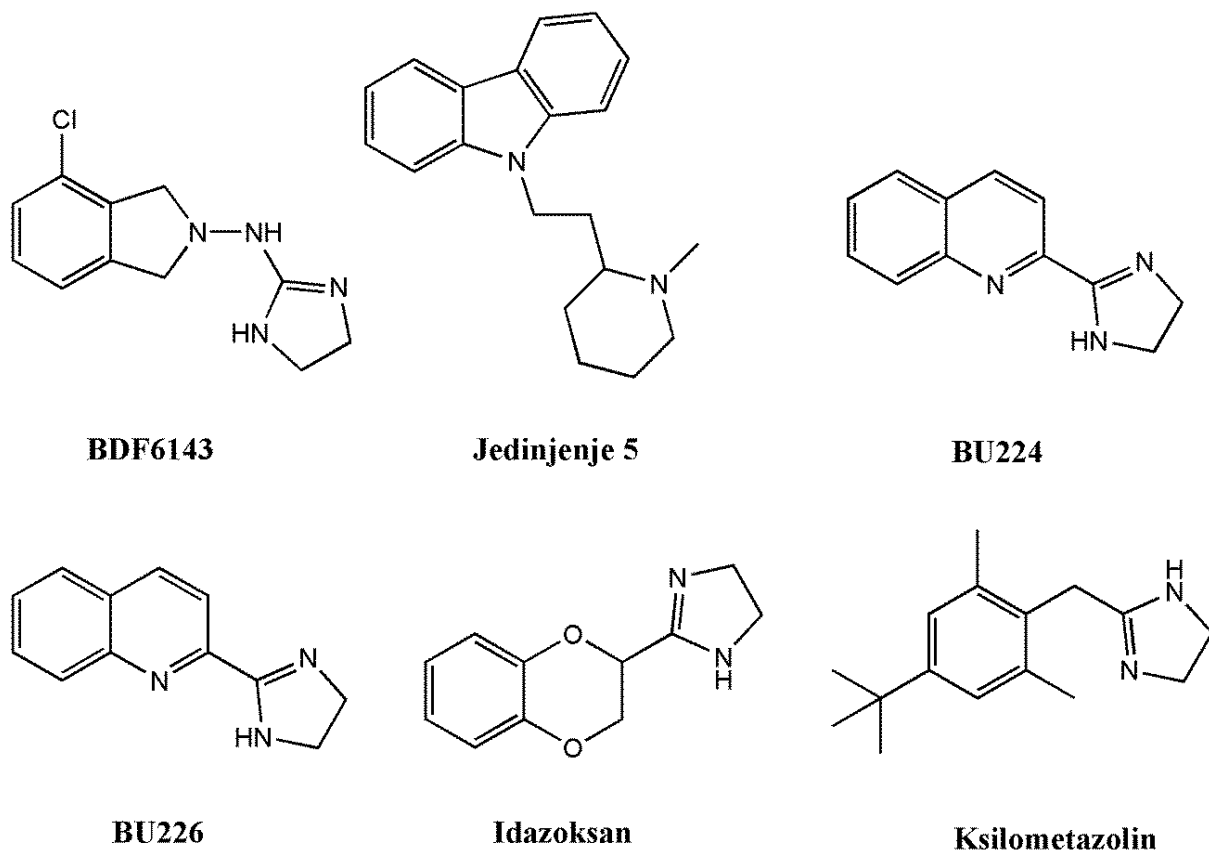
Protein	PDB ^a	Jedinjenje	Gscore
Beta adrenergički			

Adrb1	HM	BDF6143	-7.53
Adrb2	3D4S	5a	-8,17
Adrb2	3D4S	Timolol maleat	-7,82 (rmsd = 0,72)
Adrb2	3D4S	BDF6143	-7,75
Adrb3	HM	BDF6143	-7.39
Adrb3	HM	5a	-7.21
Dopaminski			
Drd3	3PBL	5a	-7.4
Drd3	3PBL	BDF6143	-6,98
Drd3	3PBL	Etiklopid	-6,45 (rmsd = 1,26)
Drd5	HM	5a	-8,04
Drd5	HM	BDF6143	-7,28
Muskarinski			
Acm1	5CXV	Tiotropium	-12.42 (rmsd = 0,85)
Acm1	5CXV	5a	-10.14
Acm2	4MQS	Iperokso	-9,34 (rmsd = 0,09)
Acm2	3UON	BU224	-9,33
Acm2	3UON	BU226	-9,30
Acm2	3UON	Idazoksan	-9.06
Acm3	HM	Ksilometazolin	-8.65
Acm4	DSG	Tiotropium	-12,75 (rmsd = 0,84)
Acm4	5DSG	5a	-11.25
Acm4	5DSG	Ksilometazolin	-9.72
Acm5	HM	5a	-9,07

^a HM-homologni model

Na osnovu dobijenih *in silico* rezultata beta adrenergički, dopaminski i muskarinski receptori su selektovani kao potencijalni 'off targeti' za određene ligande imidazolinskih i/ili α_2 -adrenergičkih receptora i jedinjenja 5. Jedinjenje **5** i BDF6143 su pokazali visok afinitet za β adrenergičke (Adrb1, Adrb2 Adrb3) i dopaminske (Drd3 i Drd5) receptore (**Slika 38**). Rezultati dobijeni korišćenjem kristalne strukture Adrb2 (**3D4S**) i Drd3 (**3PBL**) receptora su pokazali da su Gscore-ovi ovih liganada približno jednaki Gscore-ovima jedinjenja iz njihove kristalne

strukture: antagoniste β adrenergičkih receptora-timolol maleata i antagoniste dopaminskih receptora-etikloprida.



Slika 38. Strukturne formule liganada imidazolinskih receptora i jedinjenja 5 identifikovana ukrštenim dokingom sa potencijalnom aktivnošću na GPCR receptorima

Takođe, u ovoj doking studiji su identifikovani i muskarinski receptori kao potencijalni targeti za imidazoline. Na osnovu izračunatih Gscore-ova jedinjenja kao što su BU224, BU226 i idazoksan su pokazala visok afiniteta za podtip Acm 2 (**4MQS**), dok su ksilometazolin i jedinjenje 5 pokazali visok za podtipove Acm 1 (**5CXV**) i Acm 4 (**DSG**). Kao standardi za poređenje afiniteta vezivanja ispitivanih jedinjenja za date kristalne strukture korišćen je antagonista tiotropijum za Acm 1 i Acm 4, dok je za Acm 2 korišćen agonista iperokso.

Rezultati ove studije mogu biti korisni za razumevanje potencijalnih neželjenih efekata ovih jedinjenja, ili u pronalaženju njihovih novih terapijskih primena. Za rilmenidin, antihipertenzivni lek koji se nalazi na tržištu i koji se selektivan agonista I₁ receptora, pokazano je da ima nizak afinitet ka svim GPCR čime se potvrđuje validnost ove metode.

5 ZAKLJUČAK

In vitro procena permeabilnosti kroz KMB liganada α_2 -adrenergičkih i/ili imidazolinskih receptora i CNS lekova je izvršena primenom PAMPA i bioparticione micelarne hromatografije. QSPR/QSRR analizom ovih rezultata formirani su modeli koji se mogu koristiti kao brze skrining alatke za procenu KMB permeabilnosti novih jedinjenja pre njihove sinteze. Na osnovu modela

identifikovane su i funkcionalne grupe jedinjenja koje imaju najveći uticaj na njihovu KMB permeabilnost. Pokazano je da promene koje bi trebalo da poboljšaju permeabilnost su: (1) uvođenje elektronegativnih atoma u aromatičnu strukturu, (2) supstitucija atoma broma ili hidroksilnih grupa njihovim izosterima (npr. fluorom ili hlorom), (3) uvođenje voluminoznijih grupa kao i atoma koji imaju visoku Sanderson elektronegativnost. Sa druge, strane prisustvo gvanidinske ili aminogvanidinske grupe, kao i metil i izobutil grupa pokazano je da ima negativan uticaj na KMB permeabilnost.

Na osnovu dobijenih PAMPA rezultata imidazolini su klasifikovani u 3 grupe:

- jedinjenja sa visokom permeabilnošću kroz KMB (efaroksan, gvanabenz, gvanfacin, harman, harmin, idazoksan, ksilometazolin, nafazolin i rilmenidin)
- jedinjenja sa niskom permeabilnošću kroz KMB (brimonidin, moksonidin, agmatin i amilorid)
- jedinjenja koja se ne mogu klasifikovati ni u jednu od ove dve grupe (klonidin, oksimetazolin, tetrahidrozolin, tizanidin i tramazolin)

Pored PAMPA i BMC metoda, retenciono ponašanje liganada α_2 -adrenergičkih i/ili imidazolinskih receptora i lekova koji deluju na CNS je ispitano primenom konvencionalne RP-HPLC metode. Iako su retencioni faktori dobijeni u ovom sistemu pokazali nisku korelaciju sa eksperimentalnim $\log BB$ vrednostima, uočena je visoka korelacija sa eksperimentalno dobijenim $\log P$ vrednostima i $\log P$ vrednostima dobijenim koristeći ACD/i-Lab softver. Stoga se smatra da se ovaj retencioni faktor može koristiti kao pouzdan parametar lipofilnosti liganada α_2 -adrenergičkih i/ili imidazolinskih receptora i lekova koji deluju na CNS.

Takođe, u ovoj disertaciji je dodatno ispitan i odnos između strukture jedinjenja i aktivnosti koji leži u osnovi proapoptotske aktivnosti rimenidina. Identifikovana su nova jedinjenja sa drugačijom hemijskom strukturom, a koja pokazuju aktivnost i mehanizam dejstva kao i rilmenidin.

U cilju identifikacije novih jedinjenja razvijen je VS protokol koji uključuje filtriranje baze na osnovu vrednosti AQVN deskriptora koji se računa za dalekodosežne međumolekulske interakcije organskih molekula i primenu kombinovanih metoda virtuelnog skrininga koje su zasnovane na ligandu (rilmenidinu) i strukturi proteina (nisharina).

Od 11 kandidata selektovanih ovom metodom, *in vitro* testiranjima je pokazano je da jedinjenje **5** najaktivnije i da je njegova citotoksična aktivnost slična rilmenidinovoj. Ovo jedinjenje dovodi do akumulacije ćelija u sub-G1 fazi i smanjenja procenta ćelija u G1 i S fazi ćelijskog ciklusa. Pored apoptotske aktivnosti ispitana je i antiproliferativna aktivnost jedinjenja **5** gde je uočena značajna inhibicija formiranja kolonija K562 ćelija na dozno zavisani način. Ni jedno od 11 selektovanih i sintetisanih jedinjenja nije pokazalo značajan afinitet na rekombinantnim humanim α_{2A} adrenergičkim receptorima, što ukazuje na njihovu selektivnost.

Jedinjenje **5** je pokazalo i jaku sinergističku aktivnost sa doksorubicinom u indukovanju apoptoze u poređenju sa samim doksorubicinom. Ovo ukazuje na mogućnost korišćenja jedinjenja **5** i njegovih derivata u daljim ispitivanjima slabo poznatih I₁-IR signalnih puteva ili kao polaznih jedinjenja za razvoj adjuvantnih agenasa koji se mogu koristiti u konvencionalnim terapijama za lečenje tumora koju imaju smanjenu osetljivost na lekove slične doksorubicinu.

Jedan od ciljeva ove disertacije je bio i otkrivanje novih *off-targeta* liganada α_2 -adrenergičkih i/ili imidazolinskih receptora primenom inverznog dokinga. Identifikovano je nekoliko GPCR receptora koji su potencijalni '*off target-i*' imidazolinskih liganada. Beta adrenergički, dopaminski i muskarinski receptori su selektovani kao potencijalni '*off targeti*' za određene ligande imidazolinskih i/ili α_2 -adrenergičkih receptora kao što su BDF6143, BU224, BU226, ksilometazolin i jedinjenje **5**. Dobijeni rezultati mogu biti korisni u razumevanju potencijalnih neželjenih efekata ovih jedinjenja, ili u pronalaženju njihovih novih terapijskih primena.

6 LITERATURA

1. Eglén, R.M., Hudson, A.L., Kendall, D.A., Nutt, D.J., Morgan, N.G., Wilson, V.G., Dillon, M.P., 1998. “Seeing through a glass darkly”: casting light on imidazoline “I” sites. *Trends Pharmacol. Sci.* 19, 381–390.
2. Head, G., Mayorov, D., 2006. Imidazoline Receptors, Novel Agents and Therapeutic Potential. *Cardiovascular & Hematological Agents in Medicinal Chemistry* 4, 17–32.
<https://doi.org/10.2174/187152506775268758>

3. Bousquet, P., Feldman, J., Schwartz, J., 1984. Central cardiovascular effects of alpha adrenergic drugs: differences between catecholamines and imidazolines. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 230, 232–236.
4. Tibirica, E., Feldman, J., Bousquet, P., 1988. Differences in the ability of yohimbine to antagonize the hypotensive effect of clonidine in normotensive and spontaneously hypertensive anesthetized rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 244, 1062–1066.
5. Regunathan, S., Reis, D.J., 1996. Imidazoline Receptors and Their Endogenous Ligands. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 36, 511–544.
<https://doi.org/10.1146/annurev.pa.36.040196.002455>
6. Ruiz, J., Barinagarrementeria, G., Martín-Gómez, J.I., Callado, L.F., Meana, J.J., 2002. Characterization of [³H]idazoxan binding sites on human platelets. *Platelets* 13, 241–246.
<https://doi.org/10.1080/0953371027000>
7. Bousquet, P., 2001. I1 receptors, cardiovascular function, and metabolism. *American Journal of Hypertension* 14, S317–S321. [https://doi.org/10.1016/S0895-7061\(01\)02238-5](https://doi.org/10.1016/S0895-7061(01)02238-5)
8. Bousquet, P., Schwartz, J., 1983. Alpha-adrenergic drugs. Pharmacological tools for the study of the central vasomotor control. *Biochem. Pharmacol.* 32, 1459–1465.
9. Bousquet, P., Feldman, J., Schwartz, J., 1984. Central cardiovascular effects of alpha adrenergic drugs: differences between catecholamines and imidazolines. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 230, 232–236.
10. Ernsberger, P., Giuliano, R., Willette, R.N., Reis, D.J., 1990. Role of imidazole receptors in the vasodepressor response to clonidine analogs in the rostral ventrolateral medulla. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 253, 408–418.
11. Delbarre, B., Schmitt, H., 1971. Sedative effects of alpha-sympathomimetic drugs and their antagonism by adrenergic and cholinergic blocking drugs. *Eur. J. Pharmacol.* 13, 356–363.
12. De Sarro, G.B., Ascioti, C., Froio, F., Libri, V., Nisticò, G., 1987. Evidence that locus coeruleus is the site where clonidine and drugs acting at alpha 1- and alpha 2-adrenoceptors affect sleep and arousal mechanisms. *Br. J. Pharmacol.* 90, 675–685.
13. Chan, S.L., Morgan, N.G., 1998. σ Receptor ligands and imidazoline secretagogues mediate their insulin secretory effects by activating distinct receptor systems in isolated islets. *European Journal of Pharmacology* 350, 267–272. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(98\)00263-5](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(98)00263-5)
14. Chan, S.L., 1998. Clonidine-displacing substance and its putative role in control of insulin secretion: a minireview. *Gen. Pharmacol.* 31, 525–529.
15. Chu, T.C., Socci, R.R., Ogidigben, M.J., Potter, D.E., 1997. Potential Mechanisms of Moxonidine-Induced Ocular Hypotension: Role of Norepinephrine. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics* 13, 489–496. <https://doi.org/10.1089/jop.1997.13.489>

16. Roegel, J.C., Yannoulis, N., De Jong, W., Feldman, J., Bousquet, P., 1998. Preventive effect of rilmenidine on the occurrence of neurogenic ventricular arrhythmias in rabbits. *J Hypertens Suppl* 16, S39-43.
17. Roegel, J.-C., Yannoulis, N., De Jong, W., Monassier, L., Feldman, J., Bousquet, P., 1996. Inhibition of centrally induced ventricular arrhythmias by rilmenidine and idazoxan in rabbits. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 354, 598–605.
<https://doi.org/10.1007/BF00170834>
18. Dardonville, C., Rozas, I., 2004. Imidazoline binding sites and their ligands: an overview of the different chemical structures. *Med Res Rev* 24, 639–661. <https://doi.org/10.1002/med.20007>
19. Bousquet, P., Feldman, J., Bloch, R., Schwartz, J., 1981. The nucleus reticularis lateralis: a region highly sensitive to clonidine. *Eur. J. Pharmacol.* 69, 389–392.
20. Li, G., Regunathan, S., Barrow, C., Eshraghi, J., Cooper, R., Reis, D., 1994. Agmatine: an endogenous clonidine-displacing substance in the brain. *Science* 263, 966–969.
<https://doi.org/10.1126/science.7906055>
21. Atlas, D., Burstein, Y., 1984. Isolation and partial purification of a clonidine-displacing endogenous brain substance. *Eur. J. Biochem.* 144, 287–293.
22. Musgrave, I.F., Badoer, E., 2000. Harmane produces hypotension following microinjection into the RVLM: possible role of I(1)-imidazoline receptors. *Br. J. Pharmacol.* 129, 1057–1059.
<https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0703142>
23. MacMillan, L.B., Hein, L., Smith, M.S., Piascik, M.T., Limbird, L.E., 1996. Central hypotensive effects of the alpha2a-adrenergic receptor subtype. *Science* 273, 801–803.
24. Farsang, C., Kapocsi, J., 1999. Imidazoline receptors: from discovery to antihypertensive therapy (facts and doubts). *Brain Res. Bull.* 49, 317–331.
25. Edwards, L.P., Brown-Bryan, T.A., McLean, L., Ernsberger, P., 2012. Pharmacological properties of the central antihypertensive agent, moxonidine. *Cardiovasc Ther* 30, 199–208.
<https://doi.org/10.1111/j.1755-5922.2011.00268.x>
26. van Zwieten, P.A., 2001. Centrally acting imidazoline I1-receptor agonists: do they have a place in the management of hypertension? *Am J Cardiovasc Drugs* 1, 321–326.
<https://doi.org/10.2165/00129784-200101050-00002>
27. Schann, S., Bruban, V., Pompermayer, K., Feldman, J., Pfeiffer, B., Renard, P., Scalbert, E., Bousquet, P., Ehrhardt, J.D., 2001. Synthesis and biological evaluation of pyrrolinic isosteres of rilmenidine. Discovery of cis-/trans-dicyclopropylmethyl-(4,5-dimethyl-4,5-dihydro-3H-pyrrol-2-yl)-amine (LNP 509), an I1 imidazoline receptor selective ligand with hypotensive activity. *J. Med. Chem.* 44, 1588–1593.
28. Urosevic, D., Dragan, U., Schann, S., Stephan, S., Ehrhardt, J.-D., Jean-Daniel, E., Bousquet, P., Pascal, B., Greney, H., Hugues, G., 2004. LNP 906, the first high-affinity photoaffinity ligand

selective for I1 imidazoline receptors. *Br. J. Pharmacol.* 142, 609–617.

<https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705784>

29. Bruban, V., Feldman, J., Greney, H., Dontenwill, M., Schann, S., Jarry, C., Payard, M., Boutin, J., Scalbert, E., Pfeiffer, B., Renard, P., Vanhoutte, P., Bousquet, P., 2001. Respective contributions of alpha-adrenergic and non-adrenergic mechanisms in the hypotensive effect of imidazoline-like drugs. *Br. J. Pharmacol.* 133, 261–266. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0704080>
30. Fellmann, L., Regnault, V., Greney, H., Gasparik, V., Muscat, A., Max, J.-P., Gigou, L., Oréa, V., Chetrite, G., Pizard, A., Niederhoffer, N., Julien, C., Lacolley, P., Fève, B., Bousquet, P., 2013. A new pyrroline compound selective for I1-imidazoline receptors improves metabolic syndrome in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 346, 370–380. <https://doi.org/10.1124/jpet.113.205328>
31. Separovic, D., Kester, M., Ernsberger, P., 1996. Coupling of I1-imidazoline receptors to diacylglyceride accumulation in PC12 rat pheochromocytoma cells. *Mol. Pharmacol.* 49, 668–675.
32. Dupuy, L., Urosevic, D., Greney, H., Quaglia, W., Pignini, M., Brasili, L., Dontenwill, M., Bousquet, P., 2004. I1 imidazoline receptor-mediated effects on apoptotic processes in PC12 cells. *Cell Death Differ.* 11, 1049–1052. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401447>
33. Zhang, J., El-Mas, M.M., Abdel-Rahman, A.A., 2001. Imidazoline I(1) receptor-induced activation of phosphatidylcholine-specific phospholipase C elicits mitogen-activated protein kinase phosphorylation in PC12 cells. *Eur. J. Pharmacol.* 415, 117–125.
34. Greney, H., Ronde, P., Magnier, C., Maranca, F., Rascente, C., Quaglia, W., Giannella, M., Pignini, M., Brasili, L., Lugnier, C., Bousquet, P., Dontenwill, M., 2000. Coupling of I(1) imidazoline receptors to the cAMP pathway: studies with a highly selective ligand, benazoline. *Mol. Pharmacol.* 57, 1142–1151.
35. Zhang, J., Abdel-Rahman, A.A., 2005. Mitogen-activated protein kinase phosphorylation in the rostral ventrolateral medulla plays a key role in imidazoline (i1)-receptor-mediated hypotension. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 314, 945–952. <https://doi.org/10.1124/jpet.105.087510>
36. Edwards, L., Fishman, D., Horowitz, P., Bourbon, N., Kester, M., Ernsberger, P., 2001. The I1-imidazoline receptor in PC12 pheochromocytoma cells activates protein kinases C, extracellular signal-regulated kinase (ERK) and c-jun N-terminal kinase (JNK). *J. Neurochem.* 79, 931–940.
37. Edwards, L., Ernsberger, P., 2003. The I(1)-imidazoline receptor in PC12 pheochromocytoma cells reverses NGF-induced ERK activation and induces MKP-2 phosphatase. *Brain Res.* 980, 71–79.
38. Ernsberger, P., 1999. The I1-imidazoline receptor and its cellular signaling pathways. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 881, 35–53.

39. Evinger, M.J., Ernsberger, P., Regunathan, S., Reis, D.J., 1995. Regulation of phenylethanolamine N-methyltransferase gene expression by imidazoline receptors in adrenal chromaffin cells. *J. Neurochem.* 65, 988–997.
40. Martín-Gómez, J.I., Ruiz, J., Callado, L.F., Garibi, J.M., Aguinaco, L., Barturen, F., Javier Meana, J., 1996. Increased density of I2-imidazoline receptors in human glioblastomas. *Neuroreport* 7, 1393–1396.
41. Tesson, F., Limon-Boulez, I., Urban, P., Puype, M., Vandekerckhove, J., Coupry, I., Pompon, D., Parini, A., 1995. Localization of I2-imidazoline binding sites on monoamine oxidases. *J. Biol. Chem.* 270, 9856–9861.
42. Tesson, F., Prip-Buus, C., Lemoine, A., Pegorier, J.P., Parini, A., 1991. Subcellular distribution of imidazoline-guanidinium-receptive sites in human and rabbit liver. Major localization to the mitochondrial outer membrane. *J. Biol. Chem.* 266, 155–160.
43. Limon, I., Coupry, I., Lanier, S.M., Parini, A., 1992. Purification and characterization of mitochondrial imidazoline-guanidinium receptive site from rabbit kidney. *J. Biol. Chem.* 267, 21645–21649.
44. Wang, H., Regunathan, S., Meeley, M.P., Reis, D.J., 1992. Isolation and characterization of imidazoline receptor protein from bovine adrenal chromaffin cells. *Mol. Pharmacol.* 42, 792–801.
45. Halaris, A., Piletz, J.E., 2003. Relevance of imidazoline receptors and agmatine to psychiatry: a decade of progress. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1009, 1–20.
46. Kimura, A., Tyacke, R.J., Robinson, J.J., Husbands, S.M., Minchin, M.C.W., Nutt, D.J., Hudson, A.L., 2009. Identification of an imidazoline binding protein: creatine kinase and an imidazoline-2 binding site. *Brain Res.* 1279, 21–28. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.04.044>
47. Morgan, N.G., Chan, S.L., 2001. Imidazoline binding sites in the endocrine pancreas: can they fulfil their potential as targets for the development of new insulin secretagogues? *Curr. Pharm. Des.* 7, 1413–1431.
48. Clews, J., Morgan, N.G., Ramsden, C.A., 2010. ChemInform Abstract: Preparation of the I3 Imidazoline Receptor Antagonist KU14R and Related 2,3-Dihydrobenzo[b]furan Derivatives. *ChemInform* 32, no-no. <https://doi.org/10.1002/chin.200146106>
49. Plant, T.D., Henquin, J.C., 1990. Phentolamine and yohimbine inhibit ATP-sensitive K⁺ channels in mouse pancreatic beta-cells. *Br. J. Pharmacol.* 101, 115–120.
50. Proks, P., Ashcroft, F.M., 1997. Phentolamine block of KATP channels is mediated by Kir6.2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 11716–11720.
51. Mukai, E., Ishida, H., Horie, M., Noma, A., Seino, Y., Takano, M., 1998. The antiarrhythmic agent cibenzoline inhibits KATP channels by binding to Kir6.2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 251, 477–481. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.9492>

52. Efanov, A.M., Zaitsev, S.V., Mest, H.J., Raap, A., Appelskog, I.B., Larsson, O., Berggren, P.O., Efendic, S., 2001. The novel imidazoline compound BL11282 potentiates glucose-induced insulin secretion in pancreatic beta-cells in the absence of modulation of K(ATP) channel activity. *Diabetes* 50, 797–802.
53. Chan, S.L., Pallett, A.L., Clews, J., Ramsden, C.A., Morgan, N.G., 1997. Evidence that the ability of imidazoline compounds to stimulate insulin secretion is not due to interaction with σ receptors. *European Journal of Pharmacology* 323, 241–244. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(97\)00133-7](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(97)00133-7)
54. Efendic, S., Efanov, A.M., Berggren, P.-O., Zaitsev, S.V., 2002. Two Generations of Insulinotropic Imidazoline Compounds. *Diabetes* 51, S448–S454. <https://doi.org/10.2337/diabetes.51.2007.S448>
55. Høy, M., Olsen, H.L., Andersen, H.S., Bokvist, K., Buschard, K., Hansen, J., Jacobsen, P., Petersen, J.S., Rorsman, P., Gromada, J., 2003a. Imidazoline NNC77-0074 stimulates insulin secretion and inhibits glucagon release by control of Ca(2+)-dependent exocytosis in pancreatic alpha- and beta-cells. *Eur. J. Pharmacol.* 466, 213–221.
56. Høy, M., Olsen, H.L., Bokvist, K., Petersen, J.S., Gromada, J., 2003b. The imidazoline NNC77-0020 affects glucose-dependent insulin, glucagon and somatostatin secretion in mouse pancreatic islets. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 368, 284–293. <https://doi.org/10.1007/s00210-003-0797-1>
57. Brenner, M.B., Gromada, J., Efanov, A.M., Bokvist, K., Mest, H.-J., 2003. Restoration of first-phase insulin secretion by the imidazoline compound LY374284 in pancreatic islets of diabetic db/db mice. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1009, 332–340.
58. Aceros, H., Farah, G., Noiseux, N., Mukaddam-Daher, S., 2014. Moxonidine modulates cytokine signalling and effects on cardiac cell viability. *Eur. J. Pharmacol.* 740, 168–182. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.06.047>
59. McLean, L.S., Crane, L., Baziard-Mouysset, G., Edwards, L.P., 2014. Antiproliferative effect induced by novel imidazoline S43126 in PC12 cells is mediated by ROS, stress activated MAPKs and caspases. *Pharmacol Rep* 66, 937–945. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2014.06.003>
60. Nikolic, K., Veljkovic, N., Gemovic, B., Srdic-Rajic, T., Agbaba, D., 2013. Imidazoline-1 receptor ligands as apoptotic agents: pharmacophore modeling and virtual docking study. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 16, 298–319.
61. Smith, R.J., Aston-Jones, G., 2011. $\alpha(2)$ Adrenergic and imidazoline receptor agonists prevent cue-induced cocaine seeking. *Biol. Psychiatry* 70, 712–719. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2011.06.010>
62. Boronat, M.A., Olmos, G., García-Sevilla, J.A., 1998. Attenuation of tolerance to opioid-induced antinociception and protection against morphine-induced decrease of neurofilament proteins by

idazoxan and other I2-imidazoline ligands. *Br. J. Pharmacol.* 125, 175–185.

<https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0702031>

63. Callado, L.F., Martín-Gómez, J.I., Ruiz, J., Garibi, J.M., Meana, J.J., 2004. Imidazoline I(2) receptor density increases with the malignancy of human gliomas. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 75, 785–787.
64. Deininger, M.W., Goldman, J.M., Melo, J.V., 2000. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood* 96, 3343–3356.
65. Kantarjian, H., Sawyers, C., Hochhaus, A., Guilhot, F., Schiffer, C., Gambacorti-Passerini, C., Niederwieser, D., Resta, D., Capdeville, R., Zoellner, U., Talpaz, M., Druker, B., Goldman, J., O'Brien, S.G., Russell, N., Fischer, T., Ottmann, O., Cony-Makhoul, P., Facon, T., Stone, R., Miller, C., Tallman, M., Brown, R., Schuster, M., Loughran, T., Gratwohl, A., Mandelli, F., Saglio, G., Lazzarino, M., Russo, D., Baccarani, M., Morra, E., International STI571 CML Study Group, 2002. Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia. *N. Engl. J. Med.* 346, 645–652. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa011573>
66. Saußebe, S., Silver, R.T., 2015. Management of chronic myeloid leukemia in blast crisis. *Ann. Hematol.* 94 Suppl 2, S159-165. <https://doi.org/10.1007/s00277-015-2324-0>
67. Bedi, A., Barber, J.P., Bedi, G.C., el-Deiry, W.S., Sidransky, D., Vala, M.S., Akhtar, A.J., Hilton, J., Jones, R.J., 1995. BCR-ABL-mediated inhibition of apoptosis with delay of G2/M transition after DNA damage: a mechanism of resistance to multiple anticancer agents. *Blood* 86, 1148–1158.
68. De Oliveira, F., Chauvin, C., Ronot, X., Mousseau, M., Leverve, X., Fontaine, E., 2006. Effects of permeability transition inhibition and decrease in cytochrome c content on doxorubicin toxicity in K562 cells. *Oncogene* 25, 2646–2655. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209293>
69. Hortobágyi, G.N., 1997. Anthracyclines in the treatment of cancer. An overview. *Drugs* 54 Suppl 4, 1–7. <https://doi.org/10.2165/00003495-199700544-00003>
70. Weiss, R.B., 1992. The anthracyclines: will we ever find a better doxorubicin? *Semin. Oncol.* 19, 670–686.
71. Gianni, L., Dombernowsky, P., Sledge, G., Martin, M., Amadori, D., Arbuck, S.G., Ravdin, P., Brown, M., Messina, M., Tuck, D., Weil, C., Winograd, B., 2001. Cardiac function following combination therapy with paclitaxel and doxorubicin: an analysis of 657 women with advanced breast cancer. *Ann. Oncol.* 12, 1067–1073.
72. Seidman, A., Hudis, C., Pierri, M.K., Shak, S., Paton, V., Ashby, M., Murphy, M., Stewart, S.J., Keefe, D., 2002. Cardiac dysfunction in the trastuzumab clinical trials experience. *J. Clin. Oncol.* 20, 1215–1221. <https://doi.org/10.1200/JCO.2002.20.5.1215>
73. Zhang, Y.-F., Wang, J.-C., Bian, D.-Y., Zhang, X., Zhang, Q., 2010. Targeted delivery of RGD-modified liposomes encapsulating both combretastatin A-4 and doxorubicin for tumor therapy: in

vitro and in vivo studies. *Eur J Pharm Biopharm* 74, 467–473.
<https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2010.01.002>

74. Misra, R., Sahoo, S.K., 2011. Coformulation of Doxorubicin and Curcumin in Poly(D, L - lactide- *co* -glycolide) Nanoparticles Suppresses the Development of Multidrug Resistance in K562 Cells. *Molecular Pharmaceutics* 8, 852–866. <https://doi.org/10.1021/mp100455h>
75. Srdic-Rajic, T., Nikolic, K., Cavic, M., Djokic, I., Gemovic, B., Perovic, V., Veljkovic, N., 2016. Rilmenidine suppresses proliferation and promotes apoptosis via the mitochondrial pathway in human leukemic K562 cells. *Eur J Pharm Sci* 81, 172–180.
<https://doi.org/10.1016/j.ejps.2015.10.017>
76. de Visser, S.J., van der Post, J.-P., Nanhekhan, L., Schoemaker, R.C., Cohen, A.F., van Gerven, J.M.A., 2002. Concentration-effect relationships of two rilmenidine single-dose infusion rates in hypertensive patients. *Clin. Pharmacol. Ther.* 72, 419–428.
<https://doi.org/10.1067/mcp.2002.127638>
77. de Visser, S.J., van Gerven, J.M., Schoemaker, R.C., Cohen, A.F., 2001. Concentration-effect relationships of two infusion rates of the imidazoline antihypertensive agent rilmenidine for blood pressure and development of side-effects in healthy subjects. *Br J Clin Pharmacol* 51, 423–428.
78. Zaitseva, I.I., Størting, J., Mandrup-Poulsen, T., Berggren, P.-O., Zaitsev, S.V., 2008. The imidazoline RX871024 induces death of proliferating insulin-secreting cells by activation of c-jun N-terminal kinase. *Cell. Mol. Life Sci.* 65, 1248–1255. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-7564-x>
79. Alahari, S.K., Lee, J.W., Juliano, R.L., 2000. Nischarin, a novel protein that interacts with the integrin alpha5 subunit and inhibits cell migration. *J. Cell Biol.* 151, 1141–1154.
80. Dontenwill, M., Piletz, J.E., Chen, M., Baldwin, J., Pascal, G., Ronde, P., Dupuy, L., Greney, H., Takeda, K., Bousquetd, P., 2003. IRAS is an anti-apoptotic protein. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1009, 400–412.
81. Keller, B., García-Sevilla, J.A., 2015. Immunodetection and subcellular distribution of imidazoline receptor proteins with three antibodies in mouse and human brains: Effects of treatments with I1- and I2-imidazoline drugs. *J. Psychopharmacol. (Oxford)* 29, 996–1012.
<https://doi.org/10.1177/0269881115586936>
82. Piletz, J.E., Deleersnijder, W., Roth, B.L., Ernsberger, P., Zhu, H., Ziegler, D., 2003. IRAS splice variants. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1009, 419–426.
83. Maziveyi, M., Alahari, S.K., 2015. Breast Cancer Tumor Suppressors: A Special Emphasis on Novel Protein Nischarin. *Cancer Research* 75, 4252–4259. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-1395>

84. Lim, K.-P., Hong, W., 2004. Human Nischarin/imidazoline receptor antisera-selected protein is targeted to the endosomes by a combined action of a PX domain and a coiled-coil region. *J. Biol. Chem.* 279, 54770–54782. <https://doi.org/10.1074/jbc.M411315200>
85. Ding, Y., Milosavljevic, T., Alahari, S.K., 2008. Nischarin inhibits LIM kinase to regulate cofilin phosphorylation and cell invasion. *Mol. Cell. Biol.* 28, 3742–3756. <https://doi.org/10.1128/MCB.01832-07>
86. Jain, P., Baranwal, S., Dong, S., Struckhoff, A.P., Worthylake, R.A., Alahari, S.K., 2013. Integrin-binding protein nischarin interacts with tumor suppressor liver kinase B1 (LKB1) to regulate cell migration of breast epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 288, 15495–15509. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.418103>
87. Kuijl, C., Pilli, M., Alahari, S.K., Janssen, H., Khoo, P.-S., Ervin, K.E., Calero, M., Jonnalagadda, S., Scheller, R.H., Neefjes, J., Junutula, J.R., 2013. Rac and Rab GTPases dual effector Nischarin regulates vesicle maturation to facilitate survival of intracellular bacteria. *EMBO J.* 32, 713–727. <https://doi.org/10.1038/emboj.2013.10>
88. Sano, H., Liu, S.C.H., Lane, W.S., Piletz, J.E., Lienhard, G.E., 2002. Insulin receptor substrate 4 associates with the protein IRAS. *J. Biol. Chem.* 277, 19439–19447. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111838200>
89. Alahari, S.K., Reddig, P.J., Juliano, R.L., 2004. The integrin-binding protein Nischarin regulates cell migration by inhibiting PAK. *EMBO J.* 23, 2777–2788. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600291>
90. Zhang, J., Abdel-Rahman, A.A., 2008. Inhibition of nischarin expression attenuates rilmenidine-evoked hypotension and phosphorylated extracellular signal-regulated kinase 1/2 production in the rostral ventrolateral medulla of rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 324, 72–78. <https://doi.org/10.1124/jpet.107.129049>
91. Li, J., He, X., Dong, R., Wang, Y., Yu, J., Qiu, H., 2015. Frequent Loss of NISCH Promotes Tumor Proliferation and Invasion in Ovarian Cancer via Inhibiting the FAK Signal Pathway. *Molecular Cancer Therapeutics* 14, 1202–1212. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-14-0911>
92. Baranwal, S., Wang, Y., Rathinam, R., Lee, J., Jin, L., McGoey, R., Pylayeva, Y., Giancotti, F., Blobel, G.C., Alahari, S.K., 2011. Molecular characterization of the tumor-suppressive function of nischarin in breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 103, 1513–1528. <https://doi.org/10.1093/jnci/djr350>
93. Chen, J., Feng, W.-L., Mo, W.-J., Ding, X.-W., Xie, S.-N., 2015. Expression of integrin-binding protein Nischarin in metastatic breast cancer. *Mol Med Rep* 12, 77–82. <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.3373>
94. Shackelford, D.B., Shaw, R.J., 2009. The LKB1-AMPK pathway: metabolism and growth control in tumour suppression. *Nat. Rev. Cancer* 9, 563–575. <https://doi.org/10.1038/nrc2676>

95. Gastonguay, A., Berg, T., Hauser, A.D., Schuld, N., Lorimer, E., Williams, C.L., 2012. The role of Rac1 in the regulation of NF- κ B activity, cell proliferation, and cell migration in non-small cell lung carcinoma. *Cancer Biol. Ther.* 13, 647–656. <https://doi.org/10.4161/cbt.20082>
96. Reddig, P.J., Xu, D., Juliano, R.L., 2005. Regulation of p21-activated kinase-independent Rac1 signal transduction by nischarin. *J. Biol. Chem.* 280, 30994–31002. <https://doi.org/10.1074/jbc.M502546200>
97. Pardridge, W.M., 2005. The blood-brain barrier: bottleneck in brain drug development. *NeuroRx* 2, 3–14. <https://doi.org/10.1602/neurorx.2.1.3>
98. Stewart, P.A., Wiley, M.J., 1981. Developing nervous tissue induces formation of blood-brain barrier characteristics in invading endothelial cells: a study using quail--chick transplantation chimeras. *Dev. Biol.* 84, 183–192.
99. Dincić, E., Jovicić, A., Magdić, B., Popović, P., Dordević, D., Raicević, R., 2002. [The blood-brain barrier]. *Vojnosanit Pregl* 59, 633–641.
100. Fabry, Z., Fitzsimmons, K.M., Herlein, J.A., Moninger, T.O., Dobbs, M.B., Hart, M.N., 1993. Production of the cytokines interleukin 1 and 6 by murine brain microvessel endothelium and smooth muscle pericytes. *J. Neuroimmunol.* 47, 23–34.
101. Meyer, J., Rauh, J., Galla, H.J., 1991. The susceptibility of cerebral endothelial cells to astroglial induction of blood-brain barrier enzymes depends on their proliferative state. *J. Neurochem.* 57, 1971–1977.
102. Miller, D.W., 1999. Immunobiology of the blood-brain barrier. *J. Neurovirol.* 5, 570–578.
103. Clark, D.E., 2003. In silico prediction of blood–brain barrier permeation. *Drug Discovery Today* 8, 927–933. [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(03\)02827-7](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(03)02827-7)
104. Gabathuler, R., 2010. Approaches to transport therapeutic drugs across the blood–brain barrier to treat brain diseases. *Neurobiology of Disease* 37, 48–57. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.07.028>
105. International Transporter Consortium, Giacomini, K.M., Huang, S.-M., Tweedie, D.J., Benet, L.Z., Brouwer, K.L.R., Chu, X., Dahlin, A., Evers, R., Fischer, V., Hillgren, K.M., Hoffmaster, K.A., Ishikawa, T., Keppler, D., Kim, R.B., Lee, C.A., Niemi, M., Polli, J.W., Sugiyama, Y., Swaan, P.W., Ware, J.A., Wright, S.H., Yee, S.W., Zamek-Gliszczynski, M.J., Zhang, L., 2010. Membrane transporters in drug development. *Nat Rev Drug Discov* 9, 215–236. <https://doi.org/10.1038/nrd3028>
106. Cordon-Cardo, C., O’Brien, J.P., Casals, D., Rittman-Grauer, L., Biedler, J.L., Melamed, M.R., Bertino, J.R., 1989. Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 695–698.

107. Sharom, F.J., 1997. The P-glycoprotein efflux pump: how does it transport drugs? *J. Membr. Biol.* 160, 161–175.
108. Didziapetris, R., Japertas, P., Avdeef, A., Petrauskas, A., 2003. Classification analysis of P-glycoprotein substrate specificity. *J Drug Target* 11, 391–406. <https://doi.org/10.1080/10611860310001648248>
109. Hitchcock, S.A., 2012. Structural modifications that alter the P-glycoprotein efflux properties of compounds. *J. Med. Chem.* 55, 4877–4895. <https://doi.org/10.1021/jm201136z>
110. Kageyama, T., Nakamura, M., Matsuo, A., Yamasaki, Y., Takakura, Y., Hashida, M., Kanai, Y., Naito, M., Tsuruo, T., Minato, N., Shimohama, S., 2000. The 4F2hc/LAT1 complex transports L-DOPA across the blood-brain barrier. *Brain Res.* 879, 115–121.
111. del Amo, E.M., Urtti, A., Yliperttula, M., 2008. Pharmacokinetic role of L-type amino acid transporters LAT1 and LAT2. *Eur J Pharm Sci* 35, 161–174. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2008.06.015>
112. Abbott, N.J., 2004. Prediction of blood–brain barrier permeation in drug discovery from in vivo, in vitro and in silico models. *Drug Discovery Today: Technologies* 1, 407–416. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2004.11.014>
113. Abbott, N.J., Rönnbäck, L., Hansson, E., 2006. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 41–53. <https://doi.org/10.1038/nrn1824>
114. Gumbleton, M., Audus, K.L., 2001. Progress and limitations in the use of in vitro cell cultures to serve as a permeability screen for the blood-brain barrier. *J Pharm Sci* 90, 1681–1698.
115. Lundquist, S., Renftel, M., 2002. The use of in vitro cell culture models for mechanistic studies and as permeability screens for the blood-brain barrier in the pharmaceutical industry-- background and current status in the drug discovery process. *Vascul. Pharmacol.* 38, 355–364.
116. Terasaki, T., Ohtsuki, S., Hori, S., Takanaga, H., Nakashima, E., Hosoya, K., 2003. New approaches to in vitro models of blood–brain barrier drug transport. *Drug Discovery Today* 8, 944–954. [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(03\)02858-7](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(03)02858-7)
117. Garberg, P., Ball, M., Borg, N., Cecchelli, R., Fenart, L., Hurst, R.D., Lindmark, T., Mabondzo, A., Nilsson, J.E., Raub, T.J., Stanimirovic, D., Terasaki, T., Öberg, J.-O., Österberg, T., 2005. In vitro models for the blood–brain barrier. *Toxicology in Vitro* 19, 299–334. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2004.06.011>
118. Escuder-Gilabert, L., Molero-Monfort, M., Villanueva-Camañas, R.M., Sagrado, S., Medina-Hernández, M.J., 2004. Potential of biopartitioning micellar chromatography as an in vitro technique for predicting drug penetration across the blood-brain barrier. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 807, 193–201. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2004.04.004>
119. Reichel, A., Begley, D.J., 1998. Potential of immobilized artificial membranes for predicting drug penetration across the blood-brain barrier. *Pharm. Res.* 15, 1270–1274.

120. Yoon, C.H., Kim, S.J., Shin, B.S., Lee, K.C., Yoo, S.D., 2006. Rapid Screening of Blood-Brain Barrier Penetration of Drugs Using the Immobilized Artificial Membrane Phosphatidylcholine Column Chromatography. *Journal of Biomolecular Screening* 11, 13–20. <https://doi.org/10.1177/1087057105281656>
121. Pardridge, W.M., 2004. Log(BB), PS products and in silico models of drug brain penetration. *Drug Discov. Today* 9, 392–393. [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(04\)03065-X](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(04)03065-X)
122. Reichel, A., Begley, D.J., Abbott, N.J., 2003. An overview of in vitro techniques for blood-brain barrier studies. *Methods Mol. Med.* 89, 307–324. <https://doi.org/10.1385/1-59259-419-0:307>
123. Dai, H., Marbach, P., Lemaire, M., Hayes, M., Elmquist, W.F., 2003. Distribution of STI-571 to the brain is limited by P-glycoprotein-mediated efflux. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 304, 1085–1092. <https://doi.org/10.1124/jpet.102.045260>
124. Polli, J.W., Baughman, T.M., Humphreys, J.E., Jordan, K.H., Mote, A.L., Salisbury, J.A., Tippin, T.K., Serabjit-Singh, C.J., 2003. P-glycoprotein Influences the Brain Concentrations of Cetirizine (Zyrtec®), a Second-Generation Non-Sedating Antihistamine. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 92, 2082–2089. <https://doi.org/10.1002/jps.10453>
125. Pastan, I., Gottesman, M.M., Ueda, K., Lovelace, E., Rutherford, A.V., Willingham, M.C., 1988. A retrovirus carrying an MDR1 cDNA confers multidrug resistance and polarized expression of P-glycoprotein in MDCK cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 4486–4490.
126. Hurst, R.D., Fritz, I.B., 1996. Properties of an immortalised vascular endothelial/glioma cell co-culture model of the blood-brain barrier. *J. Cell. Physiol.* 167, 81–88. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4652\(199604\)167:1<81::AID-JCP9>3.0.CO;2-8](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4652(199604)167:1<81::AID-JCP9>3.0.CO;2-8)
127. Ramsohoye, P.V., Fritz, I.B., 1998. Preliminary characterization of glial-secreted factors responsible for the induction of high electrical resistances across endothelial monolayers in a blood-brain barrier model. *Neurochem. Res.* 23, 1545–1551.
128. Stewart, B.H., Chan, O.H., 1998. Use of immobilized artificial membrane chromatography for drug transport applications. *J Pharm Sci* 87, 1471–1478.
129. Pidgeon, C., Ong, S., Liu, H., Qiu, X., Pidgeon, M., Dantzig, A.H., Munroe, J., Hornback, W.J., Kasher, J.S., Glunz, L., 1995. IAM chromatography: an in vitro screen for predicting drug membrane permeability. *J. Med. Chem.* 38, 590–594.
130. Kerns, E.H., Di, L., Petusky, S., Farris, M., Ley, R., Jupp, P., 2004. Combined application of parallel artificial membrane permeability assay and Caco-2 permeability assays in drug discovery. *J Pharm Sci* 93, 1440–1453. <https://doi.org/10.1002/jps.20075>
131. Di, L., Kerns, E.H., Fan, K., McConnell, O.J., Carter, G.T., 2003. High throughput artificial membrane permeability assay for blood–brain barrier. *European Journal of Medicinal Chemistry* 38, 223–232. [https://doi.org/10.1016/S0223-5234\(03\)00012-6](https://doi.org/10.1016/S0223-5234(03)00012-6)

132. Kansy, M., Fischer, H., Kratzat, K., Senner, F., Wagner, B., Parrilla, I., 2001. High-Throughput Artificial Membrane Permeability Studies in Early Lead Discovery and Development, in: Testa, B., van de Waterbeemd, H., Folkers, G., Guy, R. (Eds.), *Pharmacokinetic Optimization in Drug Research*. Verlag Helvetica Chimica Acta, Zürich, pp. 447–464. <https://doi.org/10.1002/9783906390437.ch24>
133. Kansy, M., Senner, F., Gubernator, K., 1998. Physicochemical high throughput screening: parallel artificial membrane permeation assay in the description of passive absorption processes. *J. Med. Chem.* 41, 1007–1010. <https://doi.org/10.1021/jm970530e>
134. Thompson, M., Lennox, R.B., McClelland, R.A., 1982. Structure and electrochemical properties of microfiltration filter-lipid membrane systems. *Analytical Chemistry* 54, 76–81. <https://doi.org/10.1021/ac00238a024>
135. Avdeef, A., 2003. *Absorption and Drug Development*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA. <https://doi.org/10.1002/047145026X>
136. Faller, B., Wohnsland, F., 2001. Physicochemical Parameters as Tools in Drug Discovery and Lead Optimization, in: Testa, B., van de Waterbeemd, H., Folkers, G., Guy, R. (Eds.), *Pharmacokinetic Optimization in Drug Research*. Verlag Helvetica Chimica Acta, Zürich, pp. 255–273. <https://doi.org/10.1002/9783906390437.ch16>
137. Wohnsland, F., Faller, B., 2001. High-throughput permeability pH profile and high-throughput alkane/water log P with artificial membranes. *J. Med. Chem.* 44, 923–930.
138. Bermejo, M., Avdeef, A., Ruiz, A., Nalda, R., Ruell, J.A., Tsinman, O., González, I., Fernández, C., Sánchez, G., Garrigues, T.M., Merino, V., 2004. PAMPA—a drug absorption in vitro model 7. Comparing rat in situ, Caco-2, and PAMPA permeability of fluoroquinolones. *Eur J Pharm Sci* 21, 429–441. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2003.10.009>
139. Ruell, J.A., Tsinman, K.L., Avdeef, A., 2003. PAMPA—a drug absorption in vitro model. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 20, 393–402. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2003.08.006>
140. Nielsen, P.E., Avdeef, A., 2004. PAMPA—a drug absorption in vitro model 8. Apparent filter porosity and the unstirred water layer. *Eur J Pharm Sci* 22, 33–41. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2004.02.003>
141. Ruiz-Angel, M.J., Torres-Lapasió, J.R., García-Alvarez-Coque, M.C., Carda-Broch, S., 2008. Retention mechanisms for basic drugs in the submicellar and micellar reversed-phase liquid chromatographic modes. *Anal. Chem.* 80, 9705–9713. <https://doi.org/10.1021/ac801685p>
142. Molero-Monfort, M., Martín-Biosca, Y., Sagrado, S., Villanueva-Camañas, R.M., Medina-Hernández, M.J., 2000. Micellar liquid chromatography for prediction of drug transport. *J Chromatogr A* 870, 1–11.

143. Martínez-Pla, J.J., Martín-Biosca, Y., Sagrado, S., Villanueva-Camañas, R.M., Medina-Hernández, M.J., 2003. Biopartitioning micellar chromatography to predict skin permeability. *Biomed. Chromatogr.* 17, 530–537. <https://doi.org/10.1002/bmc.281>
144. Escuder-Gilabert, L., Martínez-Pla, J.J., Sagrado, S., Villanueva-Camañas, R.M., Medina-Hernández, M.J., 2003. Biopartitioning micellar separation methods: modelling drug absorption. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 797, 21–35.
145. Stępnik, K.E., Malinowska, I., 2013. The use of biopartitioning micellar chromatography and immobilized artificial membrane column for in silico and in vitro determination of blood-brain barrier penetration of phenols. *J Chromatogr A* 1286, 127–136. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.02.071>
146. Wager, T.T., Chandrasekaran, R.Y., Hou, X., Troutman, M.D., Verhoest, P.R., Villalobos, A., Will, Y., 2010. Defining desirable central nervous system drug space through the alignment of molecular properties, in vitro ADME, and safety attributes. *ACS Chem Neurosci* 1, 420–434. <https://doi.org/10.1021/cn100007x>
147. Waring, M.J., 2009. Defining optimum lipophilicity and molecular weight ranges for drug candidates-Molecular weight dependent lower logD limits based on permeability. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 19, 2844–2851. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2009.03.109>
148. Gleeson, M.P., 2008. Generation of a set of simple, interpretable ADMET rules of thumb. *J. Med. Chem.* 51, 817–834. <https://doi.org/10.1021/jm701122q>
149. Pajouhesh, H., Lenz, G.R., 2005. Medicinal chemical properties of successful central nervous system drugs. *NeuroRx* 2, 541–553. <https://doi.org/10.1602/neurorx.2.4.541>
150. Leeson, P.D., Springthorpe, B., 2007. The influence of drug-like concepts on decision-making in medicinal chemistry. *Nat Rev Drug Discov* 6, 881–890. <https://doi.org/10.1038/nrd2445>
151. Veber, D.F., Johnson, S.R., Cheng, H.-Y., Smith, B.R., Ward, K.W., Kopple, K.D., 2002. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *J. Med. Chem.* 45, 2615–2623.
152. Mahar Doan, K.M., Humphreys, J.E., Webster, L.O., Wring, S.A., Shampine, L.J., Serabjit-Singh, C.J., Adkison, K.K., Polli, J.W., 2002. Passive permeability and P-glycoprotein-mediated efflux differentiate central nervous system (CNS) and non-CNS marketed drugs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 303, 1029–1037. <https://doi.org/10.1124/jpet.102.039255>
153. Leeson, P.D., Davis, A.M., 2004. Time-related differences in the physical property profiles of oral drugs. *J. Med. Chem.* 47, 6338–6348. <https://doi.org/10.1021/jm049717d>
154. van de Waterbeemd, H., Camenisch, G., Folkers, G., Chretien, J.R., Raevsky, O.A., 1998. Estimation of blood-brain barrier crossing of drugs using molecular size and shape, and H-bonding descriptors. *J Drug Target* 6, 151–165. <https://doi.org/10.3109/10611869808997889>

155. Borman, S., 1990. New QSAR Techniques Eyed For Environmental Assessments: Expert system, spectroscopy method use readily available data to develop quantitative structure-activity relationships for broad compound classes. *Chemical & Engineering News* 68, 20–23. <https://doi.org/10.1021/cen-v068n008.p020>
156. Wiener, H., 1947. Structural determination of paraffin boiling points. *J. Am. Chem. Soc.* 69, 17–20.
157. Randic, M., 1975. Characterization of molecular branching. *Journal of the American Chemical Society* 97, 6609–6615. <https://doi.org/10.1021/ja00856a001>
158. Kier, L.B., 1987. Indexes of molecular shape from chemical graphs. *Med Res Rev* 7, 417–440.
159. Balaban, A.T., 1982. Highly discriminating distance-based topological index. *Chemical Physics Letters* 89, 399–404. [https://doi.org/10.1016/0009-2614\(82\)80009-2](https://doi.org/10.1016/0009-2614(82)80009-2)
160. Khalifeh, M.H., Yousefi-Azari, H., Ashrafi, A.R., 2009. The first and second Zagreb indices of some graph operations. *Discrete Applied Mathematics* 157, 804–811. <https://doi.org/10.1016/j.dam.2008.06.015>
161. Todeschini, R., Consonni, V., 2000. *Handbook of Molecular Descriptors: Todeschini/Handbook, Methods and Principles in Medicinal Chemistry*. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Germany. <https://doi.org/10.1002/9783527613106>
162. Smialowski, P., Frishman, D., Kramer, S., 2010. Pitfalls of supervised feature selection. *Bioinformatics* 26, 440–443. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp621>
163. Zheng, null, Tropsha, null, 2000. Novel variable selection quantitative structure--property relationship approach based on the k-nearest-neighbor principle. *J Chem Inf Comput Sci* 40, 185–194.
164. O'Boyle, N.M., Palmer, D.S., Nigsch, F., Mitchell, J.B., 2008. Simultaneous feature selection and parameter optimisation using an artificial ant colony: case study of melting point prediction. *Chem Cent J* 2, 21. <https://doi.org/10.1186/1752-153X-2-21>
165. Snedecor, G.W. and Cochran, W.G. 1967. *Statistical Methods*. Oxford and IBH Publishing Co., New Delhi.
166. Eriksson, L., Umetrics AB (Eds.), 2013. *Basic principles and applications, third revised edition. ed, Multi- and megavariate data analysis*. Umetrics, Umeå.
167. Eriksson L., Johansson E., et al. 2001. *Multi- and Megavariate Data Analysis. Basic Principles and Applications I*, second ed. Umetrics Academy, Umea, Sweden
168. Wold, S., Sjöström, M., Eriksson, L., 2001. PLS-regression: a basic tool of chemometrics. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 58, 109–130. [https://doi.org/10.1016/S0169-7439\(01\)00155-1](https://doi.org/10.1016/S0169-7439(01)00155-1)

169. Sivanandam, S.N., Paulraj, M., 2003. Introduction to artificial neural networks. Vikas Pub. House, New Delhi.
170. Agatonovic-Kustrin, S., Beresford, R., 2000. Basic concepts of artificial neural network (ANN) modeling and its application in pharmaceutical research. *J Pharm Biomed Anal* 22, 717–727.
171. Russell, S., Bohannon, J., 2015. Artificial intelligence. Fears of an AI pioneer. *Science* 349, 252. <https://doi.org/10.1126/science.349.6245.252>
172. Noble, W.S., 2006. What is a support vector machine? *Nat. Biotechnol.* 24, 1565–1567. <https://doi.org/10.1038/nbt1206-1565>
173. <https://www.jeremyjordan.me/support-vector-machines/>
174. Joachims, T., Finley, T., Yu, C.-N.J., 2009. Cutting-plane training of structural SVMs. *Machine Learning* 77, 27–59. <https://doi.org/10.1007/s10994-009-5108-8>
175. Hsu, C.-W., Lin, C.-J., 2002. A comparison of methods for multiclass support vector machines. *IEEE Trans Neural Netw* 13, 415–425. <https://doi.org/10.1109/72.991427>
176. Topliss, J.G., Edwards, R.P., 1979. Chance factors in studies of quantitative structure-activity relationships. *J. Med. Chem.* 22, 1238–1244.
177. Ojha, P.K., Roy, K., 2011. Comparative QSARs for antimalarial endochins: Importance of descriptor-thinning and noise reduction prior to feature selection. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 109, 146–161. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2011.08.007>
178. Roy, K., 2007. On some aspects of validation of predictive quantitative structure-activity relationship models. *Expert Opin Drug Discov* 2, 1567–1577. <https://doi.org/10.1517/17460441.2.12.1567>
179. Alvarez, J.C., 2004. High-throughput docking as a source of novel drug leads. *Current Opinion in Chemical Biology* 8, 365–370. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2004.05.001>
180. Wilson, G.L., Lill, M.A., 2011. Integrating structure-based and ligand-based approaches for computational drug design. *Future Medicinal Chemistry* 3, 735–750. <https://doi.org/10.4155/fmc.11.18>
181. Koeppen, H., Kriegl, J., Lessel, U., Tautermann, C.S., and Wellenzohn, B. (2011). “Ligand-based virtual screening,” in *Virtual Screening*, ed C. Sotriffer (Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA), 61–85.
182. N. Cavasotto, C., 2011. Homology Models in Docking and High-Throughput Docking. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 11, 1528–1534. <https://doi.org/10.2174/156802611795860951>

183. Sperandio, O., Miteva, M., Villoutreix, B., 2008. Combining Ligand- and Structure-Based Methods in Drug Design Projects. *Current Computer Aided-Drug Design* 4, 250–258. <https://doi.org/10.2174/157340908785747447>
184. Ripphausen, P., Nisius, B., Peltason, L., Bajorath, J., 2010. Quo Vadis, Virtual Screening? A Comprehensive Survey of Prospective Applications. *Journal of Medicinal Chemistry* 53, 8461–8467. <https://doi.org/10.1021/jm101020z>
185. Schuster, D., 2010. 3D pharmacophores as tools for activity profiling. *Drug Discovery Today: Technologies* 7, e205–e211. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2010.11.006>
186. Rognan, D., 2010. Structure-Based Approaches to Target Fishing and Ligand Profiling. *Mol Inform* 29, 176–187. <https://doi.org/10.1002/minf.200900081>
187. Chen, Y. Z.; Zhi, D. G. Ligand-Protein Inverse Docking and Its Potential Use in the Computer Search of Protein Targets of a Small Molecule. *Proteins* 2001, 43 (2), 217–226.
188. Rockey, W. M.; Elcock, A. H. Structure Selection for Protein Kinase Docking and Virtual Screening: Homology Models or Crystal Structures? *Curr. Protein Pept. Sci.* 2006, 7 (5), 437–457.
189. Do, Q.-T.; Lamy, C.; Renimel, I.; Sauvan, N.; André, P.; Himbert, F.; Morin-Allory, L.; Bernard, P. Reverse Pharmacognosy: Identifying Biological Properties for Plants by Means of Their Molecule Constituents: Application to Meranzin. *Planta Medica* 2007, 73 (12), 1235–1240. <https://doi.org/10.1055/s-2007-990216>.
190. Do, Q.-T.; Renimel, I.; Andre, P.; Lugnier, C.; Muller, C. D.; Bernard, P. Reverse Pharmacognosy: Application of Selnergy, a New Tool for Lead Discovery. The Example of Epsilon-Viniferin. *Curr Drug Discov Technol* 2005, 2 (3), 161–167.
191. Vučićević, K., Popović, G., Nikolic, K., Vovk, I., Agbaba, D., 2009. An Experimental Design Approach to Selecting the Optimum HPLC Conditions for the Determination of 2-Arylimidazoline Derivatives. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 32, 656–667. <https://doi.org/10.1080/10826070802711113>
192. Avdeef, A., Strafford, M., Block, E., Balogh, M.P., Chambliss, W., Khan, I., 2001. Drug absorption in vitro model: filter-immobilized artificial membranes. 2. Studies of the permeability properties of lactones in Piper methysticum Forst. *Eur J Pharm Sci* 14, 271–280.
193. MarvinChemAxon, Budapest, Hungary. www.chemaxon.com/products.html
194. Becke, A.D., 1993. Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. *The Journal of Chemical Physics* 98, 5648–5652. <https://doi.org/10.1063/1.464913>

195. Lee, null, Yang, null, Parr, null, 1988. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Phys. Rev., B Condens. Matter* 37, 785–789.
196. CambridgeSoft Corporation. 2013. ChemBio3D Ultra, Version 13.0. Cambridge, MA, USA.
197. Dragon 6. TALETE srl, Via V. Pisani, 13-20124 Milano, Italy; software available at <http://www.talete.mi.it>
198. Simulation Plus Inc., 2013, <http://www.simulations-plus.com>
199. Filipic, S., Nikolic, K., Vovk, I., Krizman, M., Agbaba, D., 2013. Quantitative structure-mobility relationship analysis of imidazoline receptor ligands in CDs-mediated CE. *Electrophoresis* 34, 471–482. <https://doi.org/10.1002/elps.201200171>
200. Iczkowski, R.P., Margrave, J.L., 1961. Electronegativity. *Journal of the American Chemical Society* 83, 3547–3551. <https://doi.org/10.1021/ja01478a001>
201. Parr, R.G., Yang, W., 1994. Density-functional theory of atoms and molecules, 1. iss. as ... paperback. ed, International series of monographs on chemistry. Oxford Univ. Press [u.a.], New York, NY.
202. Zana, R., 1995. Aqueous surfactant-alcohol systems: A review. *Advances in Colloid and Interface Science* 57, 1–64. [https://doi.org/10.1016/0001-8686\(95\)00235-I](https://doi.org/10.1016/0001-8686(95)00235-I)
203. Sansanwal PK. Effect of co-solutes on the physico-chemical properties of surfactant solutions. *J Sci Ind Res.* 2006;65(1).
204. Du, C.M., Valko, K., Bevan, C., Reynolds, D., Abraham, M.H., 1998. Rapid Gradient RP-HPLC Method for Lipophilicity Determination: A Solvation Equation Based Comparison with Isocratic Methods. *Analytical Chemistry* 70, 4228–4234. <https://doi.org/10.1021/ac980435t>
205. Schüller, A., Schneider, G., Byvatov, E., 2003. SMILIB: Rapid Assembly of Combinatorial Libraries in SMILES Notation. *QSAR & Combinatorial Science* 22, 719–721. <https://doi.org/10.1002/qsar.200310008>
206. Radi, M., Vallerini, G.P., Petrelli, A., Vincetti, P., Costantino, G., 2013. A one-pot two-step microwave-assisted synthesis of N1-substituted 5,6-ring-fused 2-pyridones. *Tetrahedron Letters* 54, 6905–6908. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2013.10.054>
207. Veljkovic, V., Mouscadet, J.-F., Veljkovic, N., Glisic, S., Debyser, Z., 2007. Simple criterion for selection of flavonoid compounds with anti-HIV activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 17, 1226–1232. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2006.12.029>
208. <http://www.vin.bg.ac.rs/180/tools/formcalc.php>

209. Cross, S., Baroni, M., Carosati, E., Benedetti, P., Clementi, S., 2010. FLAP: GRID molecular interaction fields in virtual screening. validation using the DUD data set. *J Chem Inf Model* 50, 1442–1450. <https://doi.org/10.1021/ci100221g>
210. Baroni, M., Cruciani, G., Sciabola, S., Perruccio, F., Mason, J.S., 2007. A common reference framework for analyzing/comparing proteins and ligands. Fingerprints for Ligands and Proteins (FLAP): theory and application. *J Chem Inf Model* 47, 279–294. <https://doi.org/10.1021/ci600253e>
211. Allinger, N.L., Yuh, Y.H., Lii, J.H., 1989. Molecular mechanics. The MM3 force field for hydrocarbons. 1. *Journal of the American Chemical Society* 111, 8551–8566. <https://doi.org/10.1021/ja00205a001>
212. Poongavanam, V., Kongsted, J., 2013. Virtual screening models for prediction of HIV-1 RT associated RNase H inhibition. *PLoS ONE* 8, e73478. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073478>
213. Sirci, F., Goracci, L., Rodríguez, D., van Muijlwijk-Koezen, J., Gutiérrez-de-Terán, H., Mannhold, R., 2012. Ligand-, structure- and pharmacophore-based molecular fingerprints: a case study on adenosine A(1), A (2A), A (2B), and A (3) receptor antagonists. *J. Comput. Aided Mol. Des.* 26, 1247–1266. <https://doi.org/10.1007/s10822-012-9612-8>
214. <http://www.moldiscovery.com/product/manual/flap/>
215. Jain, A.N., Nicholls, A., 2008. Recommendations for evaluation of computational methods. *J. Comput. Aided Mol. Des.* 22, 133–139. <https://doi.org/10.1007/s10822-008-9196-5>
216. Pieroni, M., Machado, D., Azzali, E., Santos Costa, S., Couto, I., Costantino, G., Viveiros, M., 2015. Rational Design and Synthesis of Thioridazine Analogues as Enhancers of the Antituberculosis Therapy. *J. Med. Chem.* 58, 5842–5853. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b00428>
217. Pohjanoksa, K., Jansson, C.C., Luomala, K., Marjamäki, A., Savola, J.M., Scheinin, M., 1997. Alpha2-adrenoceptor regulation of adenylyl cyclase in CHO cells: dependence on receptor density, receptor subtype and current activity of adenylyl cyclase. *Eur. J. Pharmacol.* 335, 53–63.
218. Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
219. Peltonen, J.M., Pihlavisto, M., Scheinin, M., 1998. Subtype-specific stimulation of [35S]GTPgammaS binding by recombinant alpha2-adrenoceptors. *Eur. J. Pharmacol.* 355, 275–279.
220. Cheng, Y., Prusoff, W.H., 1973. Relationship between the inhibition constant (K₁) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I₅₀) of an enzymatic reaction. *Biochem. Pharmacol.* 22, 3099–3108.

221. Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55–63.
222. Ohno, M., Abe, T., 1991. Rapid colorimetric assay for the quantification of leukemia inhibitory factor (LIF) and interleukin-6 (IL-6). *J. Immunol. Methods* 145, 199–203.
223. Eshkourfu, R., Čobeljić, B., Vujčić, M., Turel, I., Pevec, A., Sepčić, K., Zec, M., Radulović, S., Srdić-Radić, T., Mitić, D., Andjelković, K., Sladić, D., 2011. Synthesis, characterization, cytotoxic activity and DNA binding properties of the novel dinuclear cobalt(III) complex with the condensation product of 2-acetylpyridine and malonic acid dihydrazide. *J. Inorg. Biochem.* 105, 1196–1203. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2011.05.024>
224. Chou, T.-C., 2010. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. *Cancer Res.* 70, 440–446. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-1947>
225. <http://dude.docking.org/generate>
226. Jorgensen, W.L., Tirado-Rives, J., 1988. The OPLS [optimized potentials for liquid simulations] potential functions for proteins, energy minimizations for crystals of cyclic peptides and crambin. *Journal of the American Chemical Society* 110, 1657–1666. <https://doi.org/10.1021/ja00214a001>
227. Jorgensen, W.L., Maxwell, D.S., Tirado-Rives, J., 1996. Development and Testing of the OPLS All-Atom Force Field on Conformational Energetics and Properties of Organic Liquids. *Journal of the American Chemical Society* 118, 11225–11236. <https://doi.org/10.1021/ja9621760>
228. Halgren, T.A., Murphy, R.B., Friesner, R.A., Beard, H.S., Frye, L.L., Pollard, W.T., Banks, J.L., 2004. Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 2. Enrichment factors in database screening. *J. Med. Chem.* 47, 1750–1759. <https://doi.org/10.1021/jm030644s>
229. Friesner, R.A., Banks, J.L., Murphy, R.B., Halgren, T.A., Klicic, J.J., Mainz, D.T., Repasky, M.P., Knoll, E.H., Shelley, M., Perry, J.K., Shaw, D.E., Francis, P., Shenkin, P.S., 2004. Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy. *J. Med. Chem.* 47, 1739–1749. <https://doi.org/10.1021/jm0306430>
230. Stenberg, P., Norinder, U., Luthman, K., Artursson, P., 2001. Experimental and computational screening models for the prediction of intestinal drug absorption. *J. Med. Chem.* 44, 1927–1937.
231. Landwojtowicz, E., Nervi, P., Seelig, A., 2002. Real-time monitoring of P-glycoprotein activation in living cells. *Biochemistry* 41, 8050–8057.
232. Huwyler, J., Fricker, G., Török, M., Schneider, M., Drewe, J., 1997. Transport of clonidine across cultured brain microvessel endothelial cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 282, 81–85.

233. Wang, Q., Rager, J.D., Weinstein, K., Kardos, P.S., Dobson, G.L., Li, J., Hidalgo, I.J., 2005. Evaluation of the MDR-MDCK cell line as a permeability screen for the blood-brain barrier. *Int J Pharm* 288, 349–359. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2004.10.007>
234. Jain, R., Ellika, S.K., Scarpace, L., Schultz, L.R., Rock, J.P., Gutierrez, J., Patel, S.C., Ewing, J., Mikkelsen, T., 2008. Quantitative estimation of permeability surface-area product in astroglial brain tumors using perfusion CT and correlation with histopathologic grade. *AJNR Am J Neuroradiol* 29, 694–700. <https://doi.org/10.3174/ajnr.A0899>
235. Mensch, J., Jaroskova, L., Sanderson, W., Melis, A., Mackie, C., Verreck, G., Brewster, M.E., Augustijns, P., 2010. Application of PAMPA-models to predict BBB permeability including efflux ratio, plasma protein binding and physicochemical parameters. *Int J Pharm* 395, 182–197.
236. Tropsha, A., 2010. Best Practices for QSAR Model Development, Validation, and Exploitation. *Mol Inform* 29, 476–488. <https://doi.org/10.1002/minf.201000061>
237. Speck-Planche, A., Kleandrova, V.V., Luan, F., Cordeiro, M.N.D.S., 2012. Rational drug design for anti-cancer chemotherapy: Multi-target QSAR models for the in silico discovery of anti-colorectal cancer agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 20, 4848–4855. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2012.05.071>
238. APPENDIX D. 2008. Descriptor (Optional)-
Cadaster.<www.cadaster.eu/sites/cadaster.eu/files/challenge/Descriptors_400.pdf>
239. Moriguchi, I., Hirono, S., Liu, Q., Nakagome, I., Matsushita, Y., 1992. Simple Method of Calculating Octanol/Water Partition Coefficient. *CHEMICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN* 40, 127–130. <https://doi.org/10.1248/cpb.40.127>
240. Viswanadhan, V.N., Reddy, M.R., Bacquet, R.J., Erion, M.D., 1993. Assessment of methods used for predicting lipophilicity: Application to nucleosides and nucleoside bases. *Journal of Computational Chemistry* 14, 1019–1026. <https://doi.org/10.1002/jcc.540140903>
241. Hancock, T., Put, R., Coomans, D., Vander Heyden, Y., Everingham, Y., 2005. A performance comparison of modern statistical techniques for molecular descriptor selection and retention prediction in chromatographic QSRR studies. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 76, 185–196. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2004.11.001>
242. Labute, P., 2000. A widely applicable set of descriptors. *J. Mol. Graph. Model.* 18, 464–477.
243. Moran, P.A.P., 1950. Notes on Continuous Stochastic Phenomena. *Biometrika* 37, 17. <https://doi.org/10.2307/2332142>
244. Schuur, J.H., Selzer, P., Gasteiger, J., 1996. The Coding of the Three-Dimensional Structure of Molecules by Molecular Transforms and Its Application to Structure-Spectra Correlations and Studies of Biological Activity. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences* 36, 334–344. <https://doi.org/10.1021/ci950164c>

245. Duchowicz, P.R., Fernández, M., Caballero, J., Castro, E.A., Fernández, F.M., 2006. QSAR for non-nucleoside inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 14, 5876–5889. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2006.05.027>
246. Vyas, T.K., Babbar, A.K., Sharma, R.K., Singh, S., Misra, A., 2006. Intranasal Mucoadhesive Microemulsions of Clonazepam: Preliminary Studies on Brain Targeting. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 95, 570–580. <https://doi.org/10.1002/jps.20480>
247. Young, R.C., Mitchell, R.C., Brown, T.H., Ganellin, C.R., Griffiths, R., Jones, M., Rana, K.K., Saunders, D., Smith, I.R., 1988. Development of a new physicochemical model for brain penetration and its application to the design of centrally acting H2 receptor histamine antagonists. *Journal of Medicinal Chemistry* 31, 656–671. <https://doi.org/10.1021/jm00398a028>
248. Doran, A., 2004. THE IMPACT OF P-GLYCOPROTEIN ON THE DISPOSITION OF DRUGS TARGETED FOR INDICATIONS OF THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM: EVALUATION USING THE MDR1A/1B KNOCKOUT MOUSE MODEL. *Drug Metabolism and Disposition* 33, 165–174. <https://doi.org/10.1124/dmd.104.001230>
249. Lobell, M., Molnár, L., Keserü, G.M., 2003. Recent Advances in the Prediction of Blood–Brain Partitioning from Molecular Structure. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 92, 360–370. <https://doi.org/10.1002/jps.10282>
250. Wang, J.-S., Taylor, R., Ruan, Y., Donovan, J.L., Markowitz, J.S., Lindsay De Vane, C., 2004. Olanzapine Penetration into Brain is Greater in Transgenic Abcb1a P-glycoprotein-Deficient Mice than FVB1 (Wild-Type) Animals. *Neuropsychopharmacology* 29, 551–557. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300372>
251. Kelder, J., Grootenhuis, P.D., Bayada, D.M., Delbressine, L.P., Ploemen, J.P., 1999. Polar molecular surface as a dominating determinant for oral absorption and brain penetration of drugs. *Pharm. Res.* 16, 1514–1519.
252. Van Belle, K., Sarre, S., Ebinger, G., Michotte, Y., 1995. Brain, liver and blood distribution kinetics of carbamazepine and its metabolic interaction with clomipramine in rats: a quantitative microdialysis study. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 272, 1217–1222.
253. Uhr, M., Grauer, M.T., 2003. abcb1ab P-glycoprotein is involved in the uptake of citalopram and trimipramine into the brain of mice. *J Psychiatr Res* 37, 179–185.
254. Weigmann, H., Härtter, S., Fischer, V., Dahmen, N., Hiemke, C., 1999. Distribution of clozapine and desmethylclozapine between blood and brain in rats. *Eur Neuropsychopharmacol* 9, 253–256.
255. Sills, G.J., Kwan, P., Butler, E., de Lange, E.C.M., van den Berg, D.-J., Brodie, M.J., 2002. P-glycoprotein-mediated efflux of antiepileptic drugs: preliminary studies in mdr1a knockout mice. *Epilepsy & Behavior* 3, 427–432. [https://doi.org/10.1016/S1525-5050\(02\)00511-5](https://doi.org/10.1016/S1525-5050(02)00511-5)

256. Gholami, R., Shahraki, A.R., Jamali Paghaleh, M., 2012. Prediction of Hydrocarbon Reservoirs Permeability Using Support Vector Machine. *Mathematical Problems in Engineering* 2012, 1–18. <https://doi.org/10.1155/2012/670723>
257. Veljkovic, V., Loiseau, P.M., Figadere, B., Glisic, S., Veljkovic, N., Perovic, V.R., Cavanaugh, D.P., Branch, D.R., 2015. Virtual screen for repurposing approved and experimental drugs for candidate inhibitors of EBOLA virus infection. *F1000Research* 4, 34. <https://doi.org/10.12688/f1000research.6110.2>
258. Gentili, F., Bousquet, P., Brasili, L., Dontenwill, M., Feldman, J., Ghelfi, F., Giannella, M., Piergentili, A., Quaglia, W., Pignini, M., 2003. Imidazoline Binding Sites (IBS) Profile Modulation: Key Role of the Bridge in Determining I₁-IBS or I₂-IBS Selectivity within a Series of 2-Phenoxymethylimidazoline Analogues. *Journal of Medicinal Chemistry* 46, 2169–2176. <https://doi.org/10.1021/jm021113r>
259. Hudson, A.L., Chapleo, C.B., Lewis, J.W., Husbands, S., Grivas, K., Mallard, N.J., Nutt, D.J., 1997. Identification of ligands selective for central I₂-imidazoline binding sites. *Neurochemistry International* 30, 47–53. [https://doi.org/10.1016/S0197-0186\(96\)00037-X](https://doi.org/10.1016/S0197-0186(96)00037-X)
260. Sciabola, S., Stanton, R.V., Mills, J.E., Flocco, M.M., Baroni, M., Cruciani, G., Perruccio, F., Mason, J.S., 2010. High-throughput virtual screening of proteins using GRID molecular interaction fields. *J Chem Inf Model* 50, 155–169. <https://doi.org/10.1021/ci9003317>
261. Drwal, M.N., Griffith, R., 2013. Combination of ligand- and structure-based methods in virtual screening. *Drug Discov Today Technol* 10, e395-401. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2013.02.002>
262. Molderings, G.J., Göthert, M., von Kügelgen, I., 2007. Characterization of an antiproliferative effect of imidazoline receptor ligands on PC12 cells. *Pharmacol Rep* 59, 789–794.
263. Feng, B.Y., Shelat, A., Doman, T.N., Guy, R.K., Shoichet, B.K., 2005. High-throughput assays for promiscuous inhibitors. *Nat. Chem. Biol.* 1, 146–148. <https://doi.org/10.1038/nchembio718>
264. McGovern, S.L., Caselli, E., Grigorieff, N., Shoichet, B.K., 2002. A common mechanism underlying promiscuous inhibitors from virtual and high-throughput screening. *J. Med. Chem.* 45, 1712–1722.
265. Giannetti, A.M., Koch, B.D., Browner, M.F., 2008. Surface plasmon resonance based assay for the detection and characterization of promiscuous inhibitors. *J. Med. Chem.* 51, 574–580. <https://doi.org/10.1021/jm700952v>
266. Irwin, J.J., Duan, D., Torosyan, H., Doak, A.K., Ziebart, K.T., Sterling, T., Tumanian, G., Shoichet, B.K., 2015. An Aggregation Advisor for Ligand Discovery. *J. Med. Chem.* 58, 7076–7087. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b01105>

267. Regunathan, S., Evinger, M.J., Meeley, M.P., Reis, D.J., 1991. Effects of clonidine and other imidazole-receptor binding agents on second messenger systems and calcium influx in bovine adrenal chromaffin cells. *Biochemical Pharmacology* 42, 2011–2018.
[https://doi.org/10.1016/0006-2952\(91\)90602-2](https://doi.org/10.1016/0006-2952(91)90602-2)
268. Wu, N., Su, R.-B., Liu, Y., Lu, X.-Q., Zheng, J.-Q., Cong, B., Li, J., 2006. Modulation of agmatine on calcium signal in morphine-dependent CHO cells by activation of IRAS, a candidate for imidazoline II receptor. *European Journal of Pharmacology* 548, 21–28.
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2006.07.013>