

UNIVERZITET U BEOGRADU

FARMACEUTSKI FAKULTET

Slavica V. Filipić

**KVANTITATIVNI ODNOSI STRUKTURE,
AKTIVNOSTI I RETENCIONIH OSOBINA
LIGANADA IMIDAZOLINSKIH I ALFA₂
ADRENERGIČKIH RECEPTORA**

doktorska disertacija

Beograd, 2013.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF PHARMACY

Slavica V. Filipić

**QUANTITATIVE STRUCTURE
ACTIVITY/RETENTION RELATIONSHIPS OF
IMIDAZOLINE AND ALPHA₂ ADRENERGIC
RECEPTORS LIGANDS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2013.

MENTORI:

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

dr sc. Katarina Nikolić, viši naučni saradnik
Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet

ČLANOVI KOMISIJE:

dr sc. Sote Vladimirov, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet

dr sc. Irena Vovk, viši naučni saradnik
Hemijski institut, Ljubljana, Slovenija

dr sc. Gordana Popović, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet

Datum odbrane: _____

Ova doktorska disertacija je urađena na Katedri za farmaceutsku hemiju Farmaceutskog fakulteta u Beogradu i u Laboratoriji za prehrambenu hemiju Hemijskog instituta u Ljubljani.

Pre svega želim da izrazim najtopliju zahvalnost i poštovanje mentoru ovog rada prof. dr Agbaba Danici na poverenju koje mi je ukazano. Posebno se zahvaljujem na izboru teme, slobodi koju sam imala u radu, dragocenim savetima, idejama, preduzimljivosti, kao i strpljenju i nesebičnoj pomoći i zalaganju u svim fazama izrade i pisanja doktorske disertacije.

Neizmernu zahvalnost dugujem i svom mentoru dr Katarini Nikolić na svemu što me je naučila, na bezgraničnoj pomoći, strpljenju, savetima, ohrabrenjima i dragocenom vremenu i trudu koji mi je posvetila tokom izrade i pisanja doktorske disertacije.

Veliku zahvalnost dugujem dr Ireni Vovk na saradnji i pruženoj mogućnosti da deo eksperimentalnog rada ove doktorske disertacije odradim u Laboratoriji za prehrambenu hemiju Hemijskog instituta u Ljubljani. Zahvaljujem se i dr Mitji Križmanu na velikoj pomoći tokom realizacije eksperimenata, kao i ostalim istraživačima te laboratorije na ukazanom gostoprimstvu, pomoći i druženju. Vreme provedeno u Ljubljani bilo je dragoceno iskustvo za mene.

Zahvaljujem se prof. dr Soteu Vladimirovu na svesrdnoj pomoći i korisnim savetima tokom završne izrade doktorske disertacije.

Izuzetnu zahvalnost dugujem prof. dr Gordani Popović na nesebičnoj pomoći tokom određivanja kiselinsko-baznih konstanti jonizacije i pisanja disertacije, kao i na rečima podrške i ohrabrenja koje su mi puno značile.

Želim da se zahvalim i svojim kolegama sa Katedre za farmaceutsku hemiju, a naročito Milkici, Branki, Jeleni, Nikolini, Bojanu, Mariji i Vladi sa kojima je rad lepši i lakši.

Najveću zahvalnost dugujem svojoj porodici, a posebno mojoj Bani, na bezuslovnoj ljubavi, zaštiti i podršci koju su mi pružili.

KVANTITATIVNI ODNOSI STRUKTURE, AKTIVNOSTI I RETENCIONI OSOBINA LIGANADA IMIDAZOLINSKIH I ALFA₂ ADRENERGIČKIH RECEPTORA

REZIME

Na osnovu farmakoloških studija do danas je izvršena karakterizacija tri osnovne klase imidazolinskih receptora: I₁-, I₂- i I₃-IR. Aktivacija I₁-imidazolinskih i α₂-adrenergičkih receptora (α₂-AR) je odgovorna za centralnu inhibiciju simpatikusa i sniženje krvnog pritiska. Jedinjenja sa većom selektivnošću za I₁-receptore, kao što su moksonidin i rilmenidin, pokazala su manji stepen neželjenih efekata koji nastaju aktivacijom α₂-adrenergičkih receptora.

U ovoj doktorskoj disertaciji izvršeno je ispitivanje kvantitativnih odnosa strukture, aktivnosti i selektivnosti liganada imidazolinskih i α₂-adrenergičkih receptora, kao i ispitivanje kvantitativnih odnosa strukture i retencije/pokretljivosti ovih jedinjenja u reverzno-faznoj tečnoj hromatografiji i kapilarnoj elektroforezi (CE). Formirani su odgovarajući matematički modeli na osnovu kojih je moguće izvršiti predviđanje biološke aktivnosti i retencije/pokretljivosti novih jedinjenja, potencijalnih liganada imidazolinskih i α₂-adrenergičkih receptora.

QSAR (*Quantitative Structure Activity Relationship*) analizom su definisani molekularni parametri odgovorni za postizanje visokog afiniteta vezivanja jedinjenja za I₁-imidazolinske receptore kao i za postizanje I₁/α₂-selektivnosti. Dobijeni rezultati su ukazali da porast lipofilnosti (logD_{7,4}) i molarne refraktivnosti, zajedno sa smanjenjem naelektrisanja na atomima azota heterociklusa dovodi do snažnijeg afiniteta ka I₁-IR, dok su lipofilnost (logP) i HOMO energija važni deskriptori I₁/α₂-selektivnosti.

Izvršena je optimizacija eksperimentalnih uslova za brzo i efikasno razdvajanje smeše 11 imidazolinskih i α₂-adrenergičkih liganada metodom kapilarne elektroforeze. Ispitan je uticaj koncentracije i pH vrednosti pufera, temperature, napona i različitih koncentracija α-, β- i γ-ciklodekstrina (CD) na elektroforetsku pokretljivost i rezoluciju jedinjenja u smeši. Na početku teorijske studije, sa ciljem da se dobiju informacije o interakcijama između analita i ciklodekstrina u datim elektroforetskim sistemima,

kompleksiranje analiziranih liganada sa α -, β - i γ -CD je ispitano semi-empirijskim PM3 metodom. Primenom linearnih i nelinearnih statističkih metoda formirani su QSMR (*Quantitative Structure Mobility Relationship*) modeli kojima su definisani kvantitativni odnosi između hemijske strukture i elektroforetske pokretljivosti jedinjenja u prisustvu α -, β - i γ -CD. Formirani QSMR modeli ukazali su na važnu ulogu deskriptora ligand-ciklodekstrin kompleksa u predviđanju migracionog ponašanja ispitivanih jedinjenja u datom elektroforetskom sistemu. Predložen je i *multi-target* QSMR model koji može biti korišćen u inicijalnoj fazi razvoja metode kao brz *screening* model za procenu migracionog vremena srodnih antihipertenziva u prisustvu α -, β - ili γ -CD i za odabir optimalnog ciklodekstrina kojim se postiže razdvajanje analiziranih jedinjenja.

Ispitan je uticaj stepena jonizacije (kisele, neutralne i bazne sredine) liganada imidazolinskih i α -adrenergičkih receptora na retenciju u reverzno-faznoj tečnoj hromatografiji pod visokim pritiskom (RP-HPLC) i pokretljivost u kapilarnoj elektroforezi. Najznačajniji molekularni deskriptori u formiranim QSRR (*Quantitative Structure Retention Relationship*) modelima ukazali su da se važni podaci o retencionom ponašanju mogu dobiti na osnovu 0D-, 1D- i 2D-deskriptora koji nose informacije o hemijskom sastavu jedinjenja, molekularnim osobinama (lipofilnosti) i račvanju molekule. Sa druge strane, pouzdano predviđanje elektroforetske pokretljivosti može se izvršiti računanjem odgovarajućih 2D- i 3D-deskriptora od kojih većina daje informacije o molekularnoj veličini i kompleksnosti, kao i o uticaju naelektrisanja i elektronskih osobina na migraciono ponašanje.

Ispitana je korelacija retencionih parametara određenih RP-HPLC metodom pri tri različite pH vrednosti (4,4; 7,4 i 9,1) sa teorijski izračunatim parametrima lipofilnosti ($\log D_{4,4}$, $\log D_{7,4}$ i $\log D_{9,1}$). Dobijeni rezultati su ukazali da se ovaj pristup može primeniti za preliminarnu procenu lipofilnih karakteristika srodnih jedinjenja.

Metodom kapilarne elektroforeze određene su kiselinsko-bazne konstante jonizacije 10 liganada imidazolinskih i α_2 -adrenergičkih receptora na osnovu kojih je moguće precizno odrediti stepen jonizacije leka pri različitim fiziološkim i analitičkim pH vrednostima.

Ključne reči: imidazolinski receptori, α_2 -adrenergički receptori, QSAR, QSMR, QSRR, kapilarna elektroforeza, kiselinsko-bazne konstante jonizacije, RP-HPLC

Naučna oblast: Farmacija

Uža naučna oblast: Farmaceutska-medicinska hemija i strukturna analiza

UDK broj: 543.54 : 547.78 (043.3)

615.2/.3 (043.3)

QUANTITATIVE STRUCTURE ACTIVITY/RETENTION RELATIONSHIPS OF IMIDAZOLINE AND ALPHA₂ ADRENERGIC RECEPTORS LIGANDS

ABSTRACT

Earlier pharmacological studies allowed characterization of the three main imidazoline receptors classes: I₁-, I₂- and I₃-IR. Activation of both I₁-imidazoline receptors and α₂-adrenergic receptors (α₂-AR) is responsible for central sympathoinhibitory action and lowering of the blood pressure. Compounds such as moxonidine and rilmenidine are more selective for I₁-imidazoline receptors and have produced less side effects than clonidine and other nonselective imidazoline receptors ligands.

In the framework of this doctoral dissertation, quantitative structure activity/selectivity relationships of imidazoline and α₂-adrenergic receptors ligands, as well as quantitative structure retention/mobility relationships of these compounds in the reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) and in capillary electrophoresis (CE) were performed. Appropriate mathematical models able to predict biological activity and retention/mobility of newly synthesized compounds, potential ligands of imidazoline and α₂-adrenergic receptors were developed.

QSAR (*Quantitative Structure Activity Relationship*) analysis was used to define molecular parameters responsible for a high I₁-receptors binding affinity and high I₁/α₂-selectivity. The theoretical approach indicates that an increase in lipophilicity (logD_{7,4}) and molar refractivity together with a decrease in an average N-charge in the heterocyclic moiety are responsible for a better binding affinity of an active site in the I₁-receptors, whereas lipophilicity (logP) and HOMO energy are the important descriptors of the I₁/α₂-selectivity.

Optimization of the experimental conditions for a rapid and efficient separation of 11 imidazoline and α₂-adrenergic receptors ligands was performed by capillary electrophoresis. An influence of the buffer pH and concentration, temperature, voltage and various concentrations of α-, β- and γ-cyclodextrins (CD) on the electrophoretic mobility and resolution of compounds in the mixture has been examined. At the

beginning of this theoretical study and in order to generate information about interactions occurring between analytes and cyclodextrins in the given CE systems, complexation of ligands with α -, β -, and γ -CD was examined by a semi-empirical PM3 method. Linear and nonlinear methodologies have been applied to building the QSMR (*Quantitative Structure Mobility Relationship*) models, with an aim to define quantitative relationships between the chemical structure and the electrophoretic mobility of the investigated compounds in the presence of α -, β - and γ -cyclodextrin. Optimal QSMR models revealed an important role of the ligand-CD complex descriptors in predicting the migration behavior of the analyzed compounds in the given CE systems. At an initial step of the development of the CE method, the proposed multi-target QSMR model can be used as a fast screening model for an assessment of the migration time of the related antihypertensives in the presence of three different cyclodextrins, and for selection of the best cyclodextrin for the separation of the analyzed compounds.

An impact of the ionization degree (under the acidic, neutral and basic conditions) of imidazoline and α -adrenergic receptors ligands on the retention in the reversed-phase liquid chromatography and on mobility in capillary electrophoresis has been examined. The most significant molecular descriptors in the selected QSRR (*Quantitative Structure Retention Relationship*) models pointed out that an important knowledge concerning the retention behaviour can be derived from the 0D-, 1D- and 2D-descriptors, which provide an information about chemical composition of the compounds, their molecular properties (lipophilicity), and molecular branching. On the other hand, a reliable prediction of electrophoretic mobility can be performed by calculating the appropriate 2D- and 3D-descriptors, which provide an information on molecular size and complexity, and also on the influence of the charge transfer and the electronic properties on the migration behaviour.

Correlations between the retention parameters obtained by the RP-HPLC technique at the three different pH values (4,4; 7,4 and 9,1) and the calculated lipophilicity parameters ($\log D_{4,4}$, $\log D_{7,4}$ and $\log D_{9,1}$) were examined. The presented approach can be applied for preliminary assessment of lipophilic properties of the related compounds.

Capillary electrophoresis was applied to determine the acid-base ionization constants of 10 imidazoline and α_2 -adrenergic receptors ligands. On the basis of the results obtained, it is possible to accurately determine the degree of drug ionization at the different physiological and analytical pH values.

Keywords: imidazoline receptors, α_2 -adrenergic receptors, QSAR, QSMR, QSRR, capillary electrophoresis, acid-base ionization constants, RP-HPLC

Scientific field: Pharmacy

Narrow scientific field: Pharmaceutical-medicinal chemistry and structural analysis

UDK number: 543.54 : 547.78 (043.3)

615.2/.3 (043.3)

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Alfa₂ adrenergički receptori	2
1.2. Otkriće i uloga imidazolinskih receptora	3
1.3. Ligandi imidazolinskih i alfa₂ adrenergičkih receptora	5
1.3.1. Endogeni ligandi imidazolinskih receptora	6
1.3.2. Ligandi I ₁ -imidazolinskih receptora.....	7
1.3.3. Ligandi I ₂ -imidazolinskih receptora.....	10
1.3.4. Ligandi I ₃ -imidazolinskih receptora.....	13
1.4. Analitičke metode u analizi liganada imidazolinskih i alfa adrenergičkih receptora	14
1.4.1. Primena kapilarne elektroforeze u analizi farmaceutski aktivnih supstanci.....	14
1.4.1.1. Uloga ciklodekstrina u separacionim metodama.....	15
1.4.1.2. Određivanje kiselinsko-baznih konstanti jonizacije metodom kapilarne elektroforeze.....	16
1.4.2. Primena reverzno-fazne tečne hromatografije u određivanju lipofilnosti.....	19
1.5. Primena teorijskih metoda u ispitivanju biološke aktivnosti i retencionih osobina liganada imidazolinskih i alfa adrenergičkih receptora	22
1.5.1. Vrste teorijskih metoda u molekulskom modeliranju	23
1.5.1.1. Molekulska-mehaničke metode	25
1.5.1.2. Semi-empirijske metode	25
1.5.1.3. <i>Ab initio</i> metode	26
1.5.1.4. <i>Density functional theory</i> (DFT) metode	26
1.5.2. Kvantitativni odnosi strukture i aktivnosti (QSAR) liganada imidazolinskih i α_2 -adrenergičkih receptora	27
1.5.3. Kvantitativni odnosi strukture i retencije/pokretljivosti (QSRR/QSMR) liganada imidazolinskih i α -adrenergičkih receptora	29

1.6. Formiranje modela, procena kvaliteta i validacija QSAR/QSPR modela	32
1.6.1. Odabir molekuskog seta podataka i izračunavanje molekulskih deskriptora	32
1.6.1.1. Molekulski deskriptori	33
1.6.2. Statističke metode za formiranje QSAR/QSPR modela	35
1.6.2.1. Multilinearna regresija	35
1.6.2.2. Metoda parcijalnih najmanjih kvadrata	35
1.6.2.3. Veštačke neuronske mreže	36
1.6.3. Validacija modela	38
2. CILJ RADA	39
3. EKSPERIMENTALNI DEO	42
3.1. QSAR studije imidazolinskih i α_2-adrenergičkih liganada	43
3.1.1. Biološki podaci	43
3.1.2. Optimizacija konformacije ispitivanih jedinjenja i izračunavanje molekulskih deskriptora	44
3.1.3. Optimizacija aktivnog domena IRAS-a	45
3.2. Separacione metode u analizi liganada imidazolinskih i alfa adrenergičkih receptora	46
3.2.1. Oprema, hemikalije i računarski programi.....	46
3.2.1.1. Oprema	46
3.2.1.2. Hemikalije	47
3.2.1.3. Računarski programi	47
3.2.2. QSMR studija liganada imidazolinskih i α_2 -adrenergičkih receptora u prisustvu α -, β - i γ -ciklodekstrina	49
3.2.2.1. Priprema rastvora	49
3.2.2.2. Elektroforetski uslovi	51
3.2.2.3. Odabir dominantnih tautomernih oblika	51
3.2.2.4. Optimizacija ligand-ciklodekstrin kompleksa	52
3.2.2.5. Molekulski deskriptori	54
3.2.3. QSRR i QSMR studija liganada imidazolinskih i alfa adrenergičkih receptora	56

3.2.3.1.	Priprema rastvora pufera za CE i HPLC analizu	56
3.2.3.2.	Priprema rastvora za HPLC analizu	56
3.2.3.3.	Priprema rastvora za kapilarnu elektroforezu	57
3.2.3.4.	Određivanje $\log K_w$ vrednosti reverzno-faznom tečnom hromatografijom pod visokim pritiskom	59
3.2.3.5.	Određivanje efektivne elektroforetske pokretljivosti metodom kapilarne elektroforeze	60
3.2.3.6.	Optimizacija konformacije ispitivanih jedinjenja i izračunavanje molekulskih deskriptora	61
3.2.4.	Određivanje kiselinsko-baznih konstanti jonizacije metodom kapilarne elektroforeze	62
3.2.4.1.	Priprema rastvora analiziranih supstanci	62
3.2.4.2.	Priprema rastvora pufera	63
3.2.4.2.1.	<i>Priprema acetatnog pufera (CH_3COOH/CH_3COONa)</i>	63
3.2.4.2.2.	<i>Priprema fosfatnog pufera (Na_2HPO_4/NaH_2PO_4)</i>	65
3.2.4.2.3.	<i>Priprema boratnog pufera (H_3BO_3/NaH_2BO_3)</i>	66
3.2.4.2.4.	<i>Priprema fosfatnog pufera (Na_2HPO_4/Na_3PO_4)</i>	67
3.2.4.3.	Određivanje efektivne elektroforetske pokretljivosti ...	68
3.2.4.4.	Teorija kiselinsko-bazne ravnoteže	69
3.3.	Statističke analize korišćene u QSAR/QSRR/QSMR studijama i validacija modela	72
3.3.1.	Statističke analize	72
3.3.1.1.	Multilinearna regresiona analiza (MLR)	72
3.3.1.2.	Postupna Multilinearna regresiona analiza (postupna MLR)	72
3.3.1.3.	Metoda parcijalnih najmanjih kvadrata (PLS)	73
3.3.1.4.	Veštačke neuronske mreže (ANN)	74
3.3.2.	Procena pouzdanosti predviđanja i validacija modela	75
3.4.	Hemijske strukture ispitivanih jedinjenja.....	79
4.	REZULTATI I DISKUSIJA.....	83
4.1.	QSAR studije imidazolinskih i α_2-adrenergičkih liganada	84
4.1.1.	QSAR studija liganada imidazolinskih i α_2 -adrenergičkih receptora	87

	čiji su afiniteti za I ₁ -receptore određeni na humanim trombocitima u prisustvu radioliganda [¹²⁵ I] <i>p</i> -jodoklonidina.....	
4.1.2.	QSAR studija liganada imidazolinskih i α ₂ -adrenergičkih receptora čiji su afiniteti za I ₁ -receptore određeni na PC12 ćelijama u prisustvu radioliganda [¹²⁵ I] LNP 911	92
4.1.3.	Virtuelni <i>Docking</i>	96
4.2.	QSMR studija liganada imidazolinskih i α₂-adrenergičkih receptora u prisustvu α-, β- i γ-ciklodekstrina	98
4.2.1.	Preliminarna QSMR studija	98
4.2.1.1.	Optimizacija eksperimentalnih uslova	98
4.2.1.2.	Molekulsko modeliranje i primena MLR u QSMR analizi	101
4.2.2.	QSMR liganada imidazolinskih i α ₂ -adrenergičkih receptora u kapilarnoj elektroforezi u prisustvu α-, β- i γ-ciklodekstrina	107
4.2.2.1.	Optimizacija eksperimentalnih uslova i molekulsko modeliranje	108
4.2.2.2.	Postupna MLR, PLS i ANN-QSMR studija	113
4.2.2.3.	<i>Multi-target</i> QSMR studija	122
4.3.	QSRR i QSMR studije liganada imidazolinskih i alfa adrenergičkih receptora	127
4.3.1.	Određivanje log <i>K_w</i> HPLC metodom	128
4.3.2.	Određivanje efektivne elektroforetske pokretljivosti metodom kapilarnom elektroforezom	131
4.3.3.	Primena postupnog MLR i PLS metoda u QSRR/QSMR analizi	132
4.3.3.1.	QSRR analiza	134
4.3.3.2.	QSMR analiza	143
4.3.4.	Korelacija log <i>K_w</i> i log <i>D</i> /log <i>P</i>	153
4.3.4.1.	Korelacija log <i>K_w</i> i nagiba (<i>S</i>)	157
4.4.	Određivanje kiselinsko-baznih konstanti jonizacije metodom kapilarne elektroforeze	159
5.	ZAKLJUČAK	165
6.	LITERATURA	171
7.	PRILOZI.....	199

Prilog A : Tabele sa vrednostima molekulskih deskriptora koji su korišćeni za formiranje odabranih QSMR i QSRR modela	200
Prilog B : Spisak publikovanih radova i saopštenja.....	210
8. BIOGRAFIJA	212

LISTA SKRAĆENICA:

AM1 - *Austin Model 1*

ANN - *Artificial Neural Network* (veštačke neuronske mreže)

AR - Adrenergički receptori

B3LYP - *Becke 3-parameter, Lee, Yang and Parr*

BP - *Back propagation*

CD - Ciklodekstrin

CDS - *Clonidine Displacing Substances*

CE - *Capillary Electrophoresis* (kapilarna elektroforeza)

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

CZE - *Capillary Zone Electrophoresis* (kapilarna zonska elektroforeza)

DFT - *Density Functional Theory*

EOF - *Electroosmotic flow* (elektroosmotski protok)

HF - *Hartree-Fock*

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

IBS - *Imidazoline binding site* (imidazolinsko vezujuće mesto)

IC - Infra crvena spektroskopija

I-IR/ α_2 -AR - ligandi imidazolinskih i α_2 -adrenergičkih receptora

IRAS - *Imidazoline Receptor Antisera-Selected*

IR - Imidazolinski receptori

LBDD - *Ligand-Based Drug Design*

LOO-CV - *Leave-One-Out Cross Validation*

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

MAO - Monoamino oksidaza

MLP - *Multilayer Perceptrons* (višeslojni perceptron)

MLR - *Multilinear regression* (multilinearna regresija)

mQSMR - *multi-target Quantitative Structure Mobility Relationships*

NMR - Nuklearna magnetna rezonanca

ODS - Oktadecilsilika

PCM - *Polarizable Continuum Model*

PIC - *p-iodoclonidine (p-jodoklonidin)*

PLS - *Partial Least Squares* (analiza parcijalnih najmanjih kvadrata)

PM3 - *Parametrized Model 3*

PMIX - *Principal Moment of Inertia X* (glavni moment inercije X)

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

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

QSAR - *Quantitative Structure Activity Relationships* (kvantitativni odnosi strukture i aktivnosti)

QSMR - *Quantitative Structure Mobility Relationships* (kvantitativni odnosi strukture i pokretljivosti)

QSRR - *Quantitative Structure Retention Relationships* (kvantitativni odnosi strukture i retencije)

RMT - *Relative Migration Time* (relativno migraciono vreme)

RP-HPLC - *Reverzno-fazna tečna hromatografija pod visokim pritiskom*

SAS - *Solvent Accessible Surface Area* (površina dostupna rastvaraču)

SBDD - *Structure-Based Drug Design*

SCF - *Self Consistent Field Energy*

SEV - *Solvent-Excluded Volume*

ShpA - *Shape Attribute* (karakteristika oblika)

UFF - *Universal Force Field*

UV - *spektrofotometrija u ultraljubičastoj oblasti*

VIP - *Variable Importance in the Projection*

1. UVOD

1.1. ALFA₂ ADRENERGIČKI RECEPTORI

Alfa₂ adrenergički receptori (α_2 -AR) pripadaju porodici Gi/Go-protein membranskih receptora i mogu se podeliti na tri podtipa: α_{2A} -, α_{2B} - i α_{2C} -adrenergičke receptore. Stimulacija α_{2A} -podtipa adrenergičkih receptora ima najveći klinički značaj i odgovorna je za većinu klasičnih efekata α_2 -agonista, uključujući hipotenziju, sedaciju i analgeziju.^{1,2}

Primena α_2 -agonista u lečenju esencijalne hipertenzije i efikasnost ovih lekova, u literaturi poznatih kao antihipertenziva sa centralnim dejstvom, bila je predmet brojnih ispitivanja, a jedinjenja kao što su klonidin, guanfacin i metildopa se koriste više od dve dekade u kliničkoj praksi. Dugo se smatralo da je stimulacija α_{2A} -AR u centralnom nervnom sistemu (meduli oblongati) glavni mehanizam dejstva ovih lekova, međutim, stimulacija perifernih presinaptičkih α_{2A} -autoreceptora koja dovodi do inhibicije oslobađanja noradrenalina iz simpatičkih nervnih završetaka takođe doprinosi ukupnom smanjenju simpatičke aktivnosti.³ Uprkos dobroj efikasnosti, profil neželjenih dejstava bio je razlog zbog kojeg su ovi lekovi potisnuti drugim grupama antihipertenziva kao što su inhibitori angiotenzin konvertujućeg enzima (ACE inhibitori) ili antagonisti angiotenzinskih receptora (AT_1 -antagonisti). Najčešća neželjena dejstva povezana sa aktivacijom α_2 -AR su sedacija i suva usta.¹

Pokušaji da se modifikuju osobine α_2 -agonista nisu dali značajnije rezultate jer su antihipertenzivno dejstvo i glavni neželjeni efekti ovih lekova posredovani preko istog podtipa α_2 -receptora. Kao posledica toga, α_2 -agonisti se ne mogu smatrati prvom linijom u terapiji hronične hipertenzije. Saznanja o značaju imidazolinskih receptora (IR) u regulaciji krvnog pritiska i uvođenje u terapiju druge generacije antihipertenziva sa centralnim dejstvom, kao što su moksonidin i rilmenidin, koji su pokazali veću selektivnost ka imidazolinskim I_1 -receptorima u odnosu na α_2 -adrenergičke receptore i manje neželjenih dejstava u poređenju sa klonidinom,⁴ dalo je nove mogućnosti unapređenja terapije centralnim antihipertenzivima.⁵

1.2. OTKRICE I ULOGA IMIDAZOLINSKIH RECEPTORA

Kada su pre više od dve decenije *Bousquet* i saradnici došli do otkrića da klonidin i njemu srodni antihipertenzivi ostvaruju svoje farmakološko dejstvo u centralnom nervnom sistemu interakcijom ne samo sa α_2 -adrenergičkim receptorima već i sa imidazolinskim vezujućim mestom (*Imidazoline binding site*, IBS) započeto je testiranje imidazolinske hipoteze. Takva imidazolin vezujuća mesta ili imidazolin/gvanidin receptorska mesta, danas u literaturi nazvana imidazolinski receptori, se farmakološki razlikuju od α_2 -adrenergičkih receptora po tome što se ne mogu aktivirati kateholaminima.^{6,7} Brojne studije su sprovedene u cilju ispitivanja međusobne zavisnosti i interakcija I-IR i α_2 -AR na ćelijskom nivou.⁶⁻⁹ Sposobnost različitih imidazolinskih derivata i srodnih jedinjenja da se vežu za I-IR i α_2 -AR ukazuje da oba receptorska sistema pokazuju značajnu analogiju u strukturi vezujućih mesta. Iz tog razloga relativno male promene u strukturi liganda mogu izazvati značajne promene u afinitetu i selektivnosti za I-IR i α_2 -AR.⁹

Na osnovu biohemijskih i farmakoloških studija, do danas je izvršena karakterizacija tri osnovne klase imidazolinskih receptora u zavisnosti od njihovog afiniteta vezivanja za različite radioligande: I₁-imidazolinski receptori (I₁-IR) učestvuju u centralnoj inhibiciji simpatikusa koja dovodi do sniženja krvnog pritiska; I₂-imidazolinski receptori (I₂-IR) predstavljaju alosterno mesto vezivanja monoamino oksidaze B (MAO B) i I₃-imidazolinski receptori (I₃-IR) regulišu sekreciju insulina iz β -ćelija pankreasa.¹⁰⁻¹³

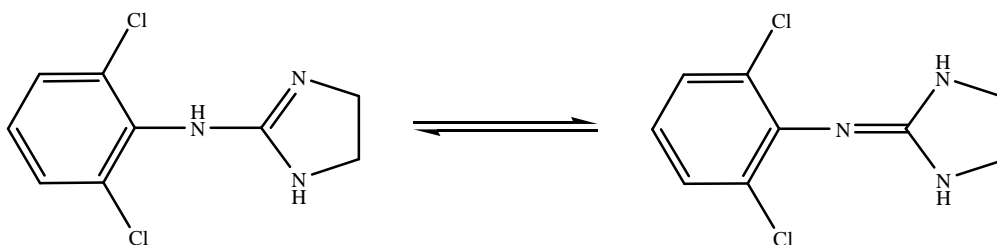
Prema imidazolinskoj hipotezi hipotenzivni efekat klonidinu, rilmenidinu i moksiniidinu-srodnih centralnih antihipertenziva nastaje kao rezultat aktivacije i neadrenergičkih I₁-imidazolinskih receptora i α_2 -adrenergičkih receptora u primarnom regulatoru simpatikusa rostralnoj ventrolateralnoj meduli (*Rostral Ventrolateral Medulla*, RVLM), dok sedativno sporedno dejstvo ovih centralnih antihipertenziva nastaje usled aktivacije samo α_2 -AR u *locus coeruleus*-u.^{5,6,8,14,15} Pored toga ustanovljeno je da postoji pozitivna korelacija između jačine centralnog hipotenzivnog dejstva i afiniteta za imidazolinske receptore.⁸ Druga generacija antihipertenziva sa centralnim dejstvom, kao što su rilmenidin i moksonidin, pokazala je veću I₁-IR/ α_2 -AR selektivnost pa samim tim i manje neželjenih efekata kao što su sedacija, bradikardija i

suva usta, nego klonidin koji u najvećoj meri aktivira α_2 -AR.^{8,15,16} Najveći broj dosadašnjih istraživanja ukazuje da je optimalna ravnoteža u aktivaciji I₁-IR i α_2 -adrenergičkih receptora neophodna za postizanje snažnog centralnog hipotenzivnog dejstva liganada koji poseduju afinitet za oba tipa receptora, imidazolinske i α_2 -adrenergičke receptore.¹⁷

Kritički osvrti na mehanizam dejstva imidazolinskih lekova izneli su argumente i za i protiv imidazolinske hipoteze,³ uprkos svemu do danas je izvršena sinteza i ispitivanje velikog broja liganada imidazolinskih i α_2 -adrenergičkih receptora (I-IR/ α_2 -AR ligandi).^{18,19} Pored toga, razvijeni su i visokoselektivni I₁-IR ligandi, koji nemaju afinitet za α_2 -AR, kao potencijalno veoma korisni agensi za ispitivanje imidazolinskog receptorskog sistema i u istraživanju novih terapeutika čije dejstvo se zasniva samo na aktivaciji I₁-IR.

1.3. LIGANDI IMIDAZOLINSKIH I ALFA₂ ADRENERGIČKIH RECEPTORA

Otkriće derivata imidazolina datira iz 1939. godine kada su naučnici *Ciba* i *Basel* u Švajcarskoj želeli da sintetišu novi lek koji će u svojoj strukturi kombinovati feniletilamin iz strukture adrenalina sa imidazolom iz strukture histamina. Tako je dobijen antagonist α -adrenergičkih receptora **tolazolin** koji je imao osobine perifernog vazodilatatora. Drugi otkriveni lek bio je nafazolin koji se i danas koristi kao nazalni dekongestiv. U pokušajima da se dobije novi nazalni dekongestiv hemičar *H. Stähle* je 1962. godine u Nemačkoj sintetisao jedinjenje St155. Ovo jedinjenje kasnije nazvano **klonidin** u ranim kliničkim studijama ispoljilo je snažno sedativno i hipotenzivno dejstvo suprotno očekivanoj vazokonstrikciji.³ Dodatna farmakološka istraživanja pokazala su da klonidin ima izvesno dejstvo na α_1 -adrenergičke receptore na periferiji, ali i da je snažan agonista α_2 -adrenergičkih receptora i neadrenergičkih I₁-imidazolinskih receptora u centralnom nervnom sistemu. Danas se klonidin smatra prototipom antihipertenziva sa centralnim dejstvom. Slično imidazolinskim α_1 -agonistima, klonidin ima lipofilne *orto* supstituente na benzenovom prstenu. Prisustvo dva atoma hlora u *orto* položajima povećava α_2 -adrenergičku aktivnost u odnosu na *o*-metil grupe. Najznačajnija razlika između klonidina i α_1 -agonista je zamena metilenskog mosta (CH₂) na položaju C(1) imidazolina amino grupom (NH). Ova hemijska promena čini imidazolinski prsten sastavnim delom gvanidinske grupe i neprotonovani oblik klonidina postoji kao smeša tautomernih oblika (Slika 1).²⁰

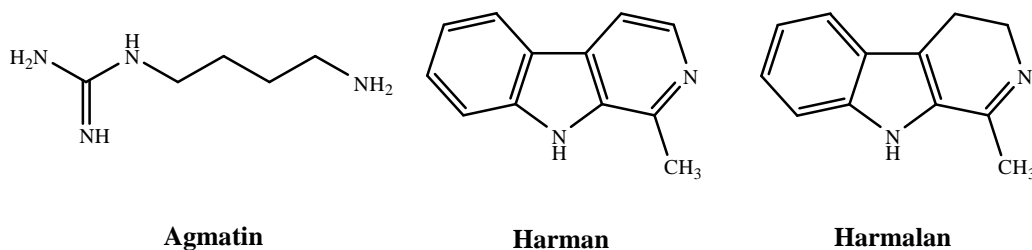


Slika 1. Tautomerni oblici klonidina.²⁰

1.3.1. Endogeni ligandi imidazolinskih receptora

Nakon sinteze klonidina usledila je sinteza i ostalih antihipertenziva sa centralnim dejstvom kao što su gvanabenz, gvanfacin, rilmenidin i moksonidin. Dalja istraživanja su dovela i do otkrića endogenih liganada imidazolinskih receptora.

Nekoliko endogenih supstanci sposobnih da istisnu [³H]-klonidin sa receptorskih mesta, a koje su nazvane *Clonidine Displacing Substances* (CDS), je prvobitno detektovano ali ne i identifikovano u mozgu pacova.^{21,22} Prvi endogeni ligand IR identifikovan 1994. u mozgu sisara je bio agmatin²³ (Slika 2.). **Agmatin** je intermedijer u biosintezi poliamina i nastaje dekarboksilacijom L-arginina pod dejstvom arginin dekarboksilaze. Pokazuje veći afinitet za I₁-IR u odnosu na I₂-IR i α₂-AR (pK_i I₁=7,48; pK_i I₂<5, pK_i α₂<5)¹⁸ (Tabela 1.). Činjenica da se agmatin sintetiše u mozgu, skladišti u sinaptičkim vezikulama neurona, inaktivira preuzimanjem u nervne završetke, degradira pod dejstvom specifičnog enzima agmatinaze, oslobađa iz terminalnih aksona depolarizacijom, vezuje za sve podtipove α₂-AR i I-IR, ukazuje da bi agmatin i sam mogao biti neurotransmiter.^{24, 25}

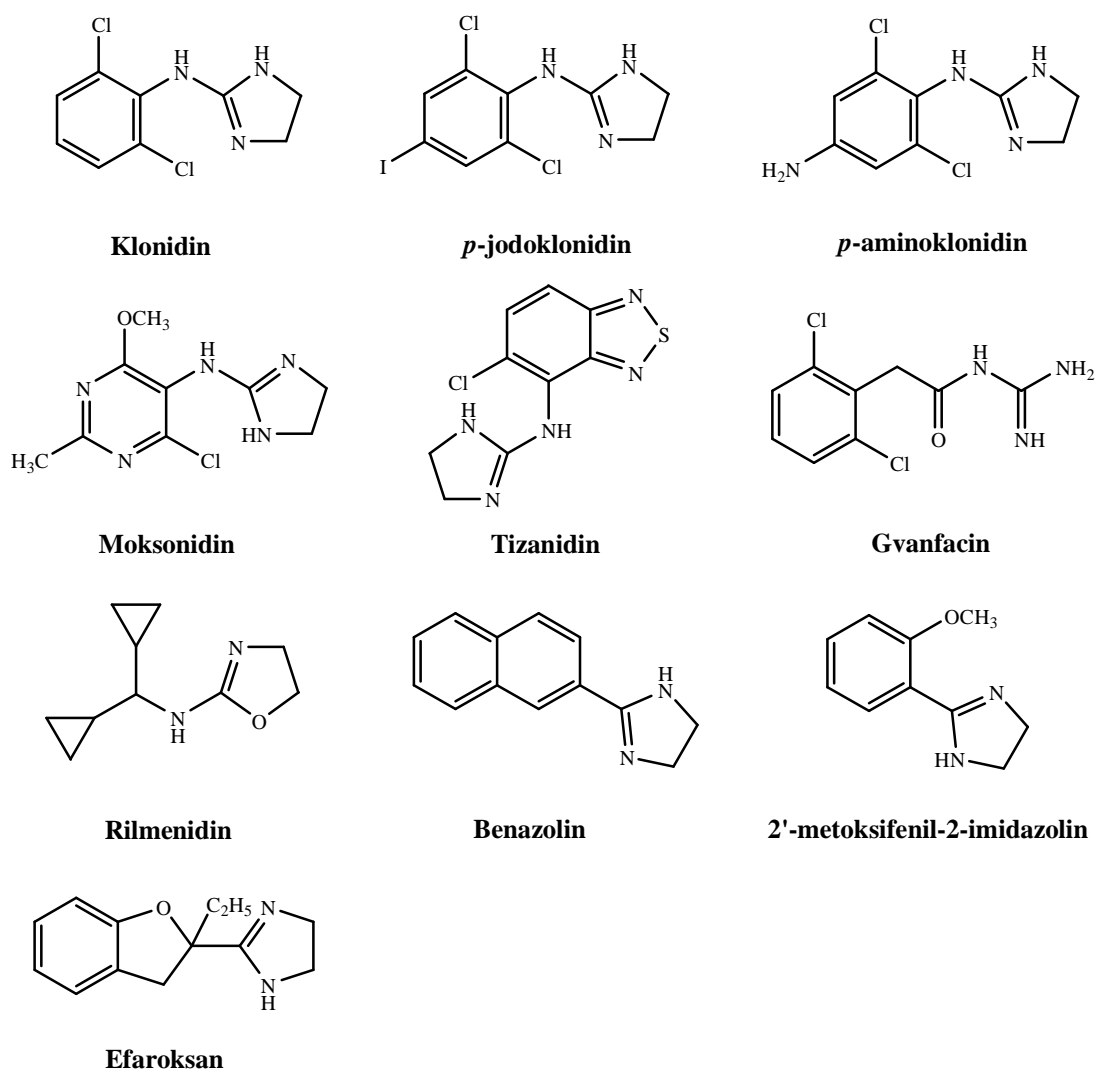


Slika 2. Endogeni ligandi imidazolinskih receptora.

Druga grupa CDS su **harman**²⁶ i **harmalan**²⁷ (Slika 2.). Pripadaju grupi β-karbolinskih alkaloida koji nastaju kondenzacijom indolamina, kao što je triptamin i karboksilnih kiselina kratkog lanca ili aldehida. Izolovani su iz humanog tkiva kao proizvodi sekundarnog metabolizma i takođe su identifikovani kao endogeni ligandi I₁-IR i I₂-IR koji pokazuju centralni hipotenzivni efekat sličan efektu klonidina.^{26,28}

1.3.2. Ligandi I₁-imidazolinskih receptora

Klasa I₁-imidazolinskih receptora je definisana kao receptori koji pokazuju najveći afinitet ka 2-aminoimidazolinima ([³H]-klonidin), umereni afinitet ka imidazolinima ([³H]-idazoksan) i slab afinitet ka gvanidinima (npr. amilorid).¹⁸ Aktivacija I₁-IR je povezana sa nekoliko funkcija u organizmu kao što su: kardiovaskularna funkcija, regulacija očnog pritiska, regulacija renalne ekskrecije natrijuma i kontrola oslobađanja katecholamina (adrenalina, noradrenalina) iz hromafinih ćelija (neuroendokrine ćelije nadbubrežne žlezde).²⁹ Hemijske strukture najznačajnijih liganada I₁-IR su prikazane na Slici 3.



Slika 3. Ligandi I₁-imidazolinskih receptora.

Derivat 2-aminoimidazolina, **klonidin** je prvo jedinjenje za koje je ustanovljeno da ostvaruje svoje antihipertenzivno dejstvo i aktivacijom I₁-IR. U odnosu na različite podtipove receptora, klonidin pokazuje veći afinitet ka I₁-IR i α₂-AR nego ka I₂-IR (Tabela 1.).³⁰

Tabela 1. Afiniteti vezivanja liganada za imidazolinске i α₂-adrenergičke receptore^{18,30-32,35,36,49,51,53,57}

Jedinjenje	pK _i (I ₁ -IR)	pK _i (I ₂ -IR)	pK _i (α ₂ -AR)	pK _i (α _{2A} -AR)	pK _i (α _{2B} -AR)	pK _i (α _{2C} -AR)
Agmatin	7,48	<5	-	<5	<5	<5
Klonidin	7,26	6,02	-	7,21	7,16	6,87
<i>p</i> -aminoklonidin	8,35	<5	-	8,10	7,53	7,67
<i>p</i> -jodoklonidin	8,32	<5	-	8,65	8,13	9,10
Moksonidin	8,38	<5	7,11	5,40	<5	<5
Rilmenidin	7,23	5,96	6,90	5,80	5,76	5,33
Tizanidin	7,55	-	-	7,25	6,75	6,92
Gvanfacin	7,72	-	-	7,81	8,10	8,28
Benazolin	8,89	9,07	4,80	5,45	-	-
Efaroksan	7,28	<5	-	7,87	7,42	5,74
RX801080	-	7,32	7,31	-	-	-
Idazoksan	5,90	7,22	-	8,01	7,43	7,70
2-BFI	7,18	8,47	5,40	5,28	5,41	4,40
BU224	7,38	8,43	<5	5,39	5,79	5,49
BU239	-	9,39	<5	-	-	-
Cirazolin	7,00	7,90		6,714	6,18	6,52
Gvanabenz	7,46	7,17	8,17	8,70	8,54	8,95
Brimonidin	-	7,47	-	6,67	6,02	5,71
RS45041	-	9,37	-	<5	<5	<5
WAP8	-	8,30	6,26	-	-	-
Harmin	6,20	8,00	<5	-	-	-
BU99006	5,60	8,60	5,61	-	-	-
KU14R	-	<5	-	6,32	6,05	4,88

Uvođenjem atoma joda u *para*-položaj dihlorfenil grupe klonidina dobijen je ***p*-jodoklonidin** koji ima veći afinitet i selektivnost za I₁-IR u odnosu na I₂-IR, ali je istovremeno data strukturalna promena povećala i aktivnost na α₂-AR.³¹ Uvođenjem amino grupe u *para*-položaj klonidina dobijen je ***p*-aminoklonidin** koji se klinički koristi kao α₂-agonista u terapiji glaukoma.^{20,32} Zamenom benzenovog prstena klonidina pirimidinskim prstenom, jednog hlora supstituenta metoksi grupom i uvođenjem metil grupe u *p*-položaj aromatičnog prstena nastao je **moksonidin**. Ovim strukturnim modifikacijama dobijen je derivat sa snažnim afinitetom ka I₁-IR i visokom selektivnošću ka I₁-IR u odnosu na I₂-IR i α₂-AR.^{30,31}

Tizanidin je analog klonidina koji se u terapiji primenjuje kao miorelaksans sa centralnim dejstvom. Smatra se da je za miorelaksantno i analgetičko dejstvo tizanidina odgovorna aktivacija α_{2C}-AR.²⁰ **Gvanfacin** je otvoreni analog klonidina nastao kao rezultat studija odnosa strukture i dejstva centralnih α₂-agonista u kojima je pokazano da imidazolinski prsten nije neophodan za aktivnost ove klase jedinjenja, ali je obavezno prisustvo benzenovog prstena sa najmanje jednim atomom hlora ili metil grupom u *orto* položaju.²⁰

Derivat 2-aminooksazolina, **rilménidin** je bio prvi I₁-IR selektivni antihipertenziv koji je uveden u terapiju. Rilménidin ostvaruje antihipertenzivno dejstvo centralno, smanjenjem aktivnosti simpatikusa i na nivou bubrega inhibicijom Na⁺/H⁺ antiporta.³³ Međutim, iako rilménidin pokazuje selektivnost za I₁-IR on poseduje afinitet i za I₂-IR (pK_i=5,96) i α₂-AR (pK_i=6,90) (Tabela 1.).³⁰ Ova činjenica i jednostavna struktura ovog derivata diciklopropilaminooksazolina poslužilo je kao osnova za dobijanje novih I₁-IR selektivnijih jedinjenja. Serija aminopirrolinskih analoga rilménidina je sintetisana i ispitana na I₁-IR, I₂-IR i α₂-AR.³⁴ Izosternom zamenom oksazolinskog prstena suspsituisanim pirolinom nije došlo do značajnog povećanja afiniteta ka I₁-IR, ali je znatno smanjen afinitet za α₂-AR čime je povećana selektivnost u odnosu na rilménidin.

Derivat 2-arilimidazolina **benazolin** prvobitno je opisan kao ligand sa afinitetom ka I₂-IR,³⁵ međutim ustanovljeno je da se benazolin vezuje visokim afinitetom i za I₁-imidazolinske receptor kao i da pokazuje veoma dobru selektivnost ka imidazolinskim receptorima u odnosu na α₁-AR i α₂-AR.³⁶ Polazeći od strukture benazolina izvršena je sinteza i ispitivanje različitih 2-arilimidazolina. Nekoliko ispitivanih jedinjenja, a

naročito 2'-metoksifenil-2-imidazolin pokazalo je ne samo visok afinitet za I₁-IR ($pK_i=8,53$) nego i odličnu selektivnost u odnosu na I₂-IR i α_2 -AR.³⁶ Na osnovu rezultata ove studije zaključeno je da I₁-IR imaju visok afinitet vezivanja 2-fenil-imidazolina sa metil ili metoksi grupom u 2' ili 3' položaju.

Nakon racionalnog dizajniranja 2-imidazolina idazoksana nekoliko strukturnih modifikacija je izvršeno u cilju povećanja selektivnosti i afiniteta za I₁-receptore. Kao rezultat ovih promena dobijen je (\pm)-**efaroksan** kod koga je dioksanski prsten zamenjen etilsupstituisanim dihidrofuranom.³⁷ Efaroksan je mešoviti α_2 -antagonista/I₁-IR ligand ($pK_i(I_1-IR)=7,28$ na humanim trombocitima).³¹ Deluje kao parcijalni agonista I₁-IR, vezivanjem za I₁-IR vrši aktivaciju samo jednog signalnog puta. Za razliku od efaroksana, nesupstituisani hidrobenzofuran-2-imidazolinski analog, **RX801080** (Slika 4.) pokazao je visok afinitet ka I₂-IR i α_2 -adrenergičkim receptorima.³⁸

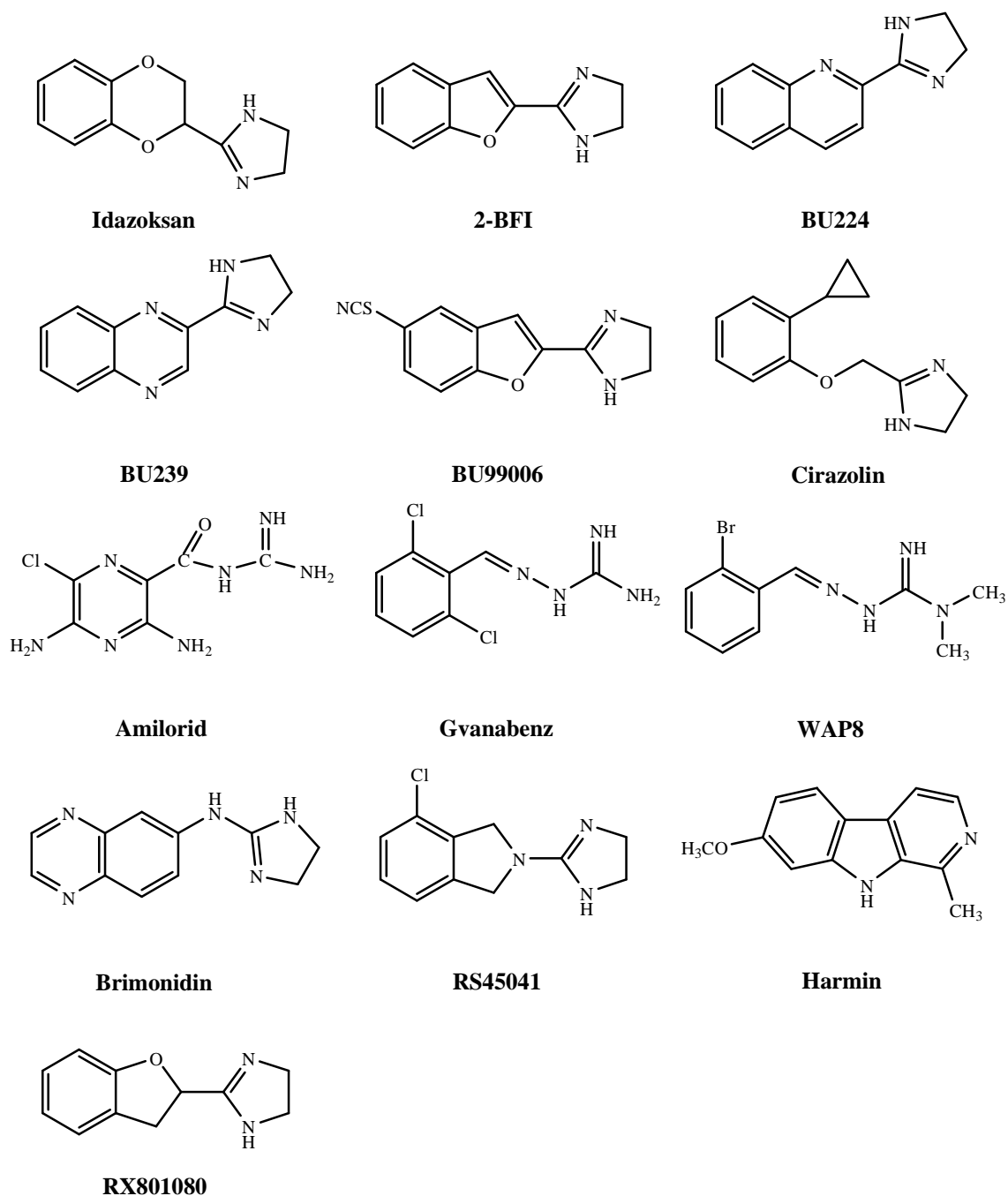
Nova grupa I₁-IR liganada, 2-aminoimidazolina, nastala je povezivanjem strukture agmatina i imidazolinskog prstena. Inkorporiranjem gvanidinske strukture u imidazolinski prsten dovelo je do značajnog pojačanja afiniteta ka I₁-IR.³⁹

1.3.3. Ligandi I₂-imidazolinskih receptora

I₂-imidazolinski receptori (I₂-IR) su definisani kao receptori sa izraženim afinitetom ka gvanidinima i imidazolinima (npr. idazoksan) i ujedno veoma malim afinitetom ka 2-aminoimidazolinima.¹⁸ Ovi receptori su uključeni u patofiziologiju psihičkih poremećaja, bola, Parkinsonove i *Alzheimer*-ove bolesti.^{18,19,40,41} I₂-IR predstavljaju alosterno aktivno mesto koje je povezano sa katalitičkim aktivnim centrom monoamino-oksidade (MAO).⁴² Agonisti ove klase imidazolinskih receptora dovode do porasta koncentracije monoamina u mozgu.⁴³

Imajući u vidu da trodimenzionalna struktura I₂-IR proteina još uvek nije određena, bolje razumevanje farmakoloških efekata aktivacije I₂-IR zasniva se na pronalaženju jedinjenja selektivnih za I₂-imidazolinske receptore u odnosu na I₁-IR i α_2 -AR. I₂-IR su najviše zastupljeni u glija ćelijama⁴⁴ trombocitima, jetri i adipocitima. Do sada sintetisani i izučavani ligandi I₂-IR pripadaju derivatima imidazolina, koji su trenutno najselektivniji I₂-IR ligandi, 2-aminoimidazolina, gvanidina i karbolina (Slika

4.). Derivat 2-imidazolina **idazoksan**, prototip liganada I₂-IR, je imidazolinski antagonist α₂-adrenergičkih receptora sa nezatnom selektivnošću za I₂-IR u odnosu na α₂-AR (I₂/α₂=4,5).⁴⁵



Slika 4. Ligandi I₂-imidazolinskih receptora.

Nekoliko analoga idazoksana, benzodioxani, benzodioxolani i benzofurani testirani su na imidazolinske i α_2 -adrenergičke receptore što je dovelo do otkrića veoma aktivnog liganda **2-BFI** selektivnog za centralne I₂-IR u odnosu α_2 -AR.^{37,38,46} Pošto su I₂-IR uključeni u patofiziologiju psihičkih poremećaja, **2-BFI** je poslužio kao polazno jedinjenje za sintezu novih imidazolinskih derivata koji deluju kao parcijalni ili puni agonisti na dopaminske D₂-receptore.⁴⁷ Veoma visok afinitet ka I₂-IR pokazuju i derivati benazolina kod kojih je izvršena izosterna zamena naftalenskog prstena hinolinom (**BU224**)⁴⁸ i pteridinom (**BU239**).³⁰ Ova jedinjenja predstavljaju veoma korisne ligande za ispitivanje funkcije I₂-vezujućeg mesta. 5-izotiocijano-2-BFI (**BU99006**) je ireverzibilni I₂-IR ligand koji je pokazao jak i selektivan afinitet na I₂-receptore u nervnim ćelijama pacova.⁴⁹

Cirazolin, 2-fenoksimetil derivat imidazolina je veoma aktivan α_1 -AR agonista i α_2 -AR antagonista, kao i ligand I₂-IR sa izraženom I₂-IR/ α_1 -AR selektivnošću (I₂/ α_1 =25).^{50,51} Strukturnim promenama ovog jedinjenja nastali su ligandi sa povećanim afinitetom za I₂-IR i znatno manjim afinitetom za α_1 -AR i α_2 -AR.

N-supstituisani gvanidini i aminogvanidini sa aromatičnim ili heteroaromatičnim jezgrom kao što su **amilorid** i **gvanabenz** predstavljaju značajna jedinjenja koja su upotrebljena za karakterizaciju imidazolinskih receptora. Amilorid je diuretik koji šteti kalijum i može se smatrati otvorenim analogom diuretika triamterena.²⁰ Amilorid i njegovi analozi pokazuju različit afinitet prema I_{2A}-IR i I_{2B}-IR podtipovima receptora dok imidazolinski lekovi, kao na primer idazoksan i 2-BFI, imaju sličan afinitet vezivanja za oba podtipa I₂-receptora.⁵² U ispitivanjima koja su urađena na cerebralnom korteksu zeca amilorid i analozi amilorida pokazali su veći afinitet prema I_{2A}-IR u odnosu na I_{2B}-IR podtip u cerebralnom korteksu pacova.⁵² Za razliku od gvanabenza koji pokazuje deset puta veću selektivnost za α_2 -AR u odnosu na I₂-IR, serija N,N-dimetilgvanidina pokazala je značajnu selektivnost za I₂-IR u odnosu na α_2 -AR. To je ukazalo da su N-metil supstituenti značajni za postizanje I₂-selektivnosti. Najveći afinitet i selektivnost za I₂-receptore pokazao je **WAP8**.⁵³

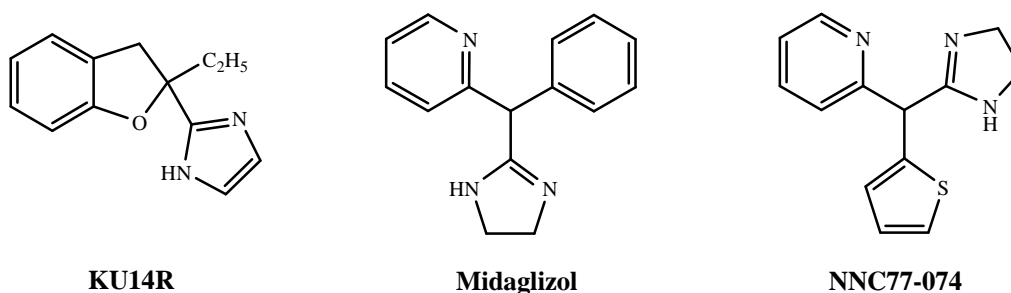
Klasični 2-aminoimidazolini (klonidin, *p*-aminoklonidin) i njima srodni lekovi pokazuju afinitet ka I₁-IR. Najznačajniji derivati 2-aminoimidazolina sa izraženim afinitetom ka I₂-IR su **brimonidin** i **RS45041**. Brimonidin je α_2 -agonista koji se koristi kao i *p*-aminoklonidin u terapiji glaukoma. Ima visok afinitet vezivanja za I₂-IR i

različitu selektivnost u odnosu na α_2 -AR podtipove receptora.^{30,54} **RS45041** je 2-aminoimidazolin sa amino grupom koja ulazi u sastav izoindolinskog jezgra i izuzetno je selektivan ligand I_2 -imidazolinskih receptora. Moguće objašnjenje za neočekivanu selektivnost **RS45041** liganda može biti konformaciona rigidnost uslovljena prisustvom izoindolinskog prstena.^{55,56}

Endogeni ligandi, derivati β -karbolina (harman), otvorili su novo polje u istraživanju jedinjenja koja intereaguju sa imidazolinskim receptorima. Iz familije harmana, **harmin** pokazuje visok afinitet za I_2 -IR ($pK_i=8$) i dobru selektivnost prema I_1 -IR i α_2 -AR ($pK_i I_1=6,20$; $pK_i \alpha_2<5$).⁵⁷

1.3.4. Ligandi I_3 -imidazolinskih receptora

Klasa I_3 -imidazolinskih receptora je uključena u proces indukcije sekrecije insulina iz β -ćelija pankreasa.^{12,13} Detaljnija farmakološka ispitivanja su ustanovila da je aktivni centar I_3 -IR smešten unutar ATP-senzitivnog kalijumovog kanala (K_{ATP}).^{13,58} Trodimenzionalna struktura I_3 -IR proteina još uvek nije određena zbog nedostatka specifičnog radioliganda. Pored toga, zbog malog broja do sada otkrivenih I_3 -IR liganada nije bilo moguće definisati glavne strukturne zahteve za selektivne I_3 -IR ligande. Efaroksan je definisan kao relativno selektivan I_3 -IR agonista, dok je njegov imidazolinski analog KU14R I_3 -IR antagonist.⁵⁹ Strukture značajnijih I_3 -IR liganada su prikazane na Slici 5.



Slika 5. Ligandi I_3 -imidazolinskih receptora.

1.4. ANALITIČKE METODE U ANALIZI LIGANADA IMIDAZOLINSKIH I ALFA ADRENERGIČKIH RECEPTORA

Sinteza i ispitivanje novih jedinjenja, imidazolinskih/gvanidinskih analoga, sa potencijalnom aktivnošću na I_1/I_2 -imidazolinske i α -adrenergičke receptore zahteva i razvoj i primenu odgovarajućih analitičkih metoda za njihovu efikasno razdvajanje, ispitivanje retencionog ponašanja i fizičko-hemijska merenja (određivanje parametara lipofilnosti i kiselinsko-baznih konstanti jonizacije). Zahtevi koji se postavljaju u savremenoj analitičkoj hemiji podrazumevaju da je odabrana metoda jednostavna, brza, tačna, dovoljno osetljiva, ekonomična i da omogućuje rad sa minimalnim količinama uzoraka. Različite analitičke metode kao što su tečna hromatografija pod visokim pritiskom (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC), spektrofotometrija i kapilarna elektroforeza (*Capillary Electrophoresis*, CE) su primenjene u ispitivanju pojedinačnih liganada imidazolinskih receptora.⁶⁰⁻⁶⁸

Imajući u vidu da se osnovni principi razdvajanja analiziranih jedinjenja u kapilarnoj elektroforezi razlikuju u odnosu na hromatografske metode, kombinacijom različitih separacionih metoda moguće je odrediti važne fizičko-hemijske parametre ispitivanih jedinjenja i izvršiti njihovu sveobuhvatnu analizu.

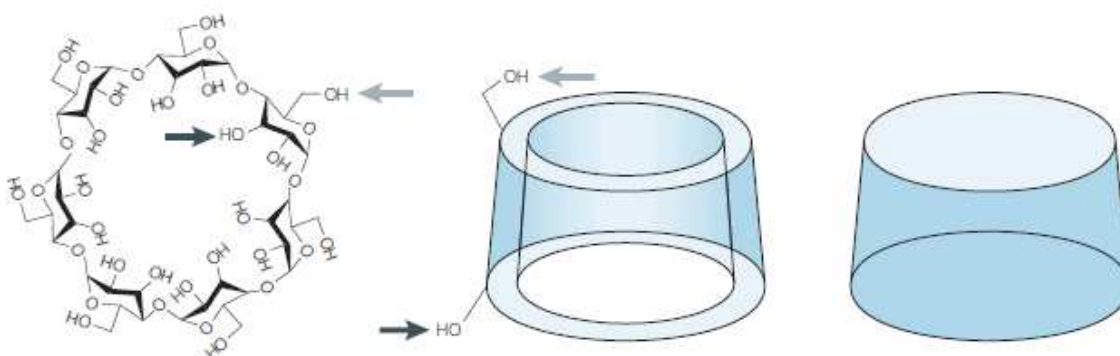
1.4.1. Primena kapilarne elektroforeze u analizi farmaceutski aktivnih supstanci

Kapilarna elektroforeza je separaciona metoda u kojoj se elektroforetsko razdvajanje zasniva na različitoj pokretljivosti jona pod dejstvom električnog polja. Primena kapilarne elektroforeze u farmaceutskoj analizi postala je veoma važna u toku proteklih godina. Prednost ove analitičke metode u razdvajanju brojnih farmaceutskih i biohemijskih smeša dokumentovana je mnogobrojnim podacima iz literature.⁶⁹⁻⁷² Smanjena potrošnja reagenasa, minimalne količine uzoraka potrebnih za analizu, mogućnost direktne detekcije na niskim talasnim dužinama (190-200 nm), analita koji

zahtevaju prethodnu derivatizaciju za HPLC analizu, samo su neke od prednosti ove metode koje su omogućile efikasnu analizu malih organskih i neorganskih jona kao što su aminokiseline, metalni joni, jednostavne organske kiseline i neorganski joni (hloridi i nitrati).⁷² Mogućnost korišćenja različitih puferskih aditiva, ciklodekstrina i površinski aktivnih supstanci, koji imaju sposobnost da modifikuju fizičko-hemijsku prirodu samog separacionog sistema čine ovu metodu jednostavnom i efikasnom u analizi strukturno srodnih jedinjenja⁷³⁻⁷⁵ i enantiomera.⁷⁶⁻⁸⁰ Širok opseg pH vrednosti (1,19-12,00)⁷² koji se može primeniti u CE analizi, u poređenju sa HPLC analizom gde se stabilnost stacionarne faze često dovodi u pitanje, daju prednost ovoj metodi u određivanju pK_a vrednosti kiselih i baznih supstanci.

1.4.1.1. Uloga ciklodekstrina u separacionim metodama

Ciklodekstrini (CD) predstavljaju ciklične oligosaharide izgrađene od 6 (α), 7 (β) i 8 (γ), (1 \rightarrow 4)-povezanih α -D glukoznih jedinica. Najčešće korišćeni ciklodekstrini u separacionim analitičkim metodama su α -, β - i γ -ciklodekstrin. Centralni deo strukture ovih molekula čini šupljina hidrofobnog karaktera, dok su hidroksilne grupe orjentisane spolja dajući hidrofilni karakter spoljašnjem delu molekule (Slika 6.).⁸¹



Slika 6. Šematski prikaz β -ciklodekstrina.⁸¹

Zahvaljujući svom jedinstvenom obliku i fizičko-hemijskim osobinama, ciklodekstrini mogu selektivno da intereaguju sa različitim organskim, neorganskim i biomolekulima sa kojima preko hidrofobnih, *van der Waals*-ovih interakcija i

vodoničnih veza formiraju inkluzione komplekse. Na ovoj osobini ciklodekstrina zasniva se njihova primena u razdvajanju strukturno bliskih jedinjenja i enantiomera⁷³⁻⁸⁰ kao i u povećanju rastvorljivosti, stabilnosti i bioraspoloživosti lekova.^{82,83} Osim toga, CD inkluzioni kompleksi se smatraju dobrim modelima koji imitiraju interakcije leka i bioloških supstrata.⁸⁴

Usled brojnih primena koje su našli, značajni naponi su uloženi u izučavanju hemije ciklodekstrina. Brojne eksperimentalne metode kao što su spektrofotometrija u ultraljubičastoj oblasti (UV), infra crvena spektroskopija (IC), kalorimetrija i nuklearna magnetna rezonanca (NMR) su primenjene u cilju izučavanja ciklodekstrin inkluzionih kompleksa.^{85,86} Vrlo korisnim su se pokazale i različite metode teorijske hemije: molekulska-mehaničke,⁸⁷ molekulska-dinamičke,⁸⁸ a u skorije vreme i kvantno-mehaničke⁸⁹ kojima se može doći do značajnih informacija o prirodi samih interakcija ligand-ciklodekstrin kompleksa, što je u brojnim slučajevima i potvrđeno paralelnom NMR analizom.^{87,88,90} Semi-empirijske metode (*Austin Model 1*, AM1, *Parametrized Model 3*, PM3 i *Parameterization Method 6*, PM6) su korišćene za izračunavanje termodinamičkih parametara kompleksiranja,⁹¹ za identifikaciju tipova interakcija između ciklodekstrina i liganda,⁹² za ispitivanje afiniteta enantiomera za šupljine različitih ciklodekstrina,⁹³ kao i za korelaciju kompleksiranja analita sa ciklodekstrinom i njegovu pokretljivost u elektroforetskom sistemu.⁹⁴

1.4.1.2. Određivanje kiselinsko-baznih konstanti jonizacije metodom kapilarne elektroforeze

Konstanta jonizacije, pK_a , je fundamentalna osobina slabih kiselina i baza. Za jedinjenja koja u strukturi imaju jednu jonizujuću grupu pK_a vrednost se definiše kao pH pri kojoj je 50% jedinjenja jonizovano. Poznavanjem pK_a vrednosti datog jedinjenja moguće je izračunati stepen jonizacije pri bilo kojoj pH vrednosti rastvora. To je važna osobina slabih kiselina i baza jer se neutralne i jonizovane forme leka razlikuju po svojim fizičko-hemijskim osobinama. Jonizovani oblik leka je bolje rastvorljiv u vodi dok je neutralan oblik leka lipofilniji i lakše prolazi kroz ćelijske membrane. Stepenn jonizacije je jedna od nekoliko važnih osobina koje se koriste za procenu resorpcije, distribucije, metabolizma i ekskrecije jedinjenja u biološkim sistemima. Jonizacija ima

važnu ulogu u dejstvu leka i utiče na njegovu raspodelu i na procese vezivanja leka za receptorsko mesto. Zato je poznavanje pK_a vrednosti zajedno sa parametrima lipofilnosti, $\log P$ (logaritam particionog koeficijenta oktanol-voda) i $\log D$ (logaritam distribucionog koeficijenta) vrednostima, jedan od osnovnih zahteva u farmaceutsko-medicinskoj hemiji koji se postavlja za novosintetisana jedinjenja, potencijalne lekove. Pored toga, poznavanje stepena jonizacije u zavisnosti od pH vrednosti je veoma važno u odabiru optimalnih uslova u analizi lekova. Na osnovu pK_a vrednosti moguće je predvideti efektivno naelektrisanje, efektivnu elektroforetsku pokretljivost kao i migracioni redosled analita u kapilarnoj zonskoj elektroforezi (*Capillary Zone Electrophoresis*, CZE) koja je u brojnim slučajevima metoda izbora za određivanje pK_a vrednosti.⁹⁵

Potenciometrijska titracija je standardna metoda za merenje pK_a i može se primeniti na jedinjenja visokog stepena čistoće, rastvorljiva u vodi i dostupna u znatnoj količini. Da bi se detektovale promene u obliku titracione krive neophodne su koncentracije od najmanje 5×10^{-4} M.

Spektrofotometrijska titracija se obično smatra dobrom alternativom potenciometrijskoj titraciji za merenje pK_a vrednosti jedinjenja rastvorljivih u vodi i visokog stepena čistoće (ili koja sadrže nečistoće koje ne interferiraju u spektroskopskim merenjima). Osnovna prednost je veća osetljivost ($>10^{-6}$ M) za jedinjenja sa pogodnim molarnim apsorpcionim koeficijentima. U tom slučaju jedinjenja moraju imati hromofore u blizini jonizujućih grupa tako da neutralne i jonizovane forme pokazuju značajno različite spektralne osobine za njihovu identifikaciju u smeši. Spektrofotometrijske metode imaju ograničenu primenu pošto neka jedinjenja ne mogu da ispune ove zahteve. pK_a vrednost odgovara pH vrednosti na kojoj je postignuta najveća promena u apsorbanciji između jonizovanog i neutralnog oblika jedinjenja.

Određivanje pK_a vrednosti metodom kapilarne elektroforeze zasniva se na merenju efektivne elektroforetske pokretljivosti jonizujućih jedinjenja u seriji rastvora elektrolita konstantne jonske jačine i različitih pH vrednosti. Značajne prednosti kapilarne elektroforeze za pK_a merenja su:

- Instrumenti sa visokim stepenom automatizacije
- CE je separaciona metoda i ne zahteva uzorke visokog stepena čistoće
- Omogućen je rad sa uzorcima slabe rastvorljivosti u vodi (limiti detekcije u μM opsegu)
- Potrošnja uzorka je svedena na minimum
- Poznavanje koncentracije rastvora nije neophodno jer se meri samo elektroforetska pokretljivost jedinjenja.

Kapilarna zonska elektroforeza je uspešno primenjena za precizno određivanje kiselinsko-baznih konstanti jonizacije različitih tipova jedinjenja kao što su različiti tipovi lekova,⁹⁶⁻⁹⁹ aminokiseline,¹⁰⁰ derivati imidazola,¹⁰¹ 2-amino-2-oksazolini,¹⁰² analozi gvanidinopurinskih nukleotida¹⁰³ itd. U najvećem broju slučajeva pK_a vrednosti ovih jedinjenja su određene u vodenim rastvorima, ali postoje i primeri za određivanje pK_a u smeši voda-organski rastvarač^{104,105} kao i u nevodnim rastvaračima^{106,107} uz odgovarajuću kalibraciju.

Najčešće korišćeni vid detekcije za pK_a merenja je direktna UV-apsorpcija,^{98,99} međutim konduktometrijska,¹⁰⁰ amperometrijska,¹⁰⁸ i indirektna UV-detekcija se takođe primenjuju.¹⁰⁹

U dostupnoj literaturi nema podataka o primeni CZE za određivanje kiselinskih konstanti I-IR/ α_2 -AR liganada (klonidina, moksonidina, tizanidina, harmana, harmina, rilmenidina, idazoksana, gvanfacina i efaroksana). Gradijentna reverzno-fazna tečna hromatografija pod visokim pritiskom (RP-HPLC) je primenjena za određivanje kiselinskih konstanti derivata imidazolina (klonidina, moksonidina, efaroksana i idazoksana) i β -karbolina (harman).¹¹⁰ Kiselinske konstante harmina¹¹¹ i klonidina,¹¹² kao i diuretika triamterena¹¹³ određene su i UV spektrofotometrijskom metodom. U *Merck*-ovom indeksu¹¹⁴ može se naći podatak o eksperimentalno određenoj pK_a rilmenidina, dok za tizanidin i gvanfacin nema podataka o eksperimentalnim pK_a vrednostima.

1.4.2. Primena reverzno-fazne tečne hromatografije u određivanju lipofilnosti

Lipofilnost jedinjenja izražena logaritmom particionog koeficijenta oktanol-voda logP ili distribucionog koeficijenta logD, ako su prisutne jonizovane forme jedinjenja, predstavlja jedan od najvažnijih parametara u ADME (*Absorption, Distribution, Metabolism, and Elimination*) karakteristikama leka kao i u određivanju njegovog farmakodinamičkog i toksikološkog profila.

Zametna i dugotrajna određivanja logP/logD tradicionalnim *shake-flesk* metodom, kao i ograničena interlaboratorijska reproduktivnost ovih vrednosti sa jedne strane i uočena linearna zavisnost između logP/logD i hromatografskih retencionih parametara sa druge strane dovela je do zamene prvog metoda dostupnim hromatografskim podacima.^{115,116} Od svog uvođenja reverzno-fazna tečna hromatografija pod visokim pritiskom, koja se može sagledati kao sistem u kojem dolazi do raspodele analita između polarne vodene mobilne faze i nepolarne stacionarne faze, je prepoznata kao pogodna metoda za određivanje lipofilnosti.¹¹⁷

Da bi se dobila visoka korelacija između logP i hromatografskih retencionih podataka proces preraspodele u RP-HPLC sistemu trebalo bi što je moguće bliže da imitira procese koji se dešavaju u sistemu oktanol-voda, što je često veoma teško ostvariti. Postoje podaci da u slučaju ugljovodoničnih-silika stacionarnih faza, suprotno oktanolu, molekul rastvorene supstance vertikalno penetrira u vezani ugljovodonični sloj.¹¹⁸ Pored toga, retencija na takvoj stacionarnoj fazi je pod uticajem gustine vezanih alkil lanaca na površini. Prvi pristupi u određivanju lipofilnosti zasnivali su se na oblaganju stacionarne faze oktanolom, a kao eluent je korišćena voda ili pufer zasićeni oktanolom.^{119,120} Glavni tehnički problem koji se javio u toku pripreme ovakvih kolona bila je nestabilnost samog oblaganja stacionarne faze.

Danas se za proučavanje hidrofobnosti, oktadecilsilika (ODS) stacionarne faze koriste kao kolone prvog izbora. Uočeno je međutim, da se retencioni podaci dobijeni na pojedinačnim kolonama potpuno istog tipa reverzno-faznog punjenja uz primenu iste mobilne faze razlikuju. Razlike u retenciji uglavnom nastaju usled specifičnih osobina date serije stacionarne faze. Te osobine su površina silika matriksa, distribucija veličine pore, prisustvo metalnih nečistoća, tip i količina slobodnih silanolnih grupa, sadržaj

ugljenika, površina modifikovane faze i dr.¹²¹ Zbog toga se različiti parametri lipofilnosti (hidrofobnosti) mogu očekivati ne samo pri korišćenju različitih ODS kolona već i primenom različitih serija istog proizvoda. *Kaliszan* i saradnici su primenom QSRR (*Quantitative Structure Retention Relationships*) analizirali 18 komercijalno dostupnih RP-HPLC kolona.¹²² U literaturi se mogu naći kritički osvrti o prednostima i nedostacima različitih stacionarnih faza korišćenih za određivanje lipofilnosti jedinjenja.¹¹⁷

Najčešće korišćeni retencioni parametar u HPLC, retencioni faktor K , definisan je jednačinom:

$$K = \frac{t_r - t_0}{t_0} \quad (1)$$

gde je t_r retenciono vreme analita, a t_0 retenciono vreme mobilne faze (supstance koja se ne zadržava na koloni). Logaritmovana forma retencionog faktora $\log K$ se koristi kao indeks lipofilnosti.

Iako postoje primeri jako visoke korelacije između $\log K$ i $\log P$ vrednosti dobijenih *shake-flesh* metodom, razlike između ova dva sistema su evidentne. Prisustvo organskog rastvarača u mobilnoj fazi komplikuje proces hromatografskih razdvajanja. Pri određenoj koncentraciji odabranog organskog rastvarača jedan analit može pokazati veću retenciju, odnosno veću lipofilnost u odnosu na drugi analit, dok se obrnuta situacija može desiti pri drugim koncentracijama organskog rastvarača u mobilnoj fazi. Zbog toga, u zavisnosti od sastava mobilne faze mogu se dobiti različite vrednosti za lipofilnost nekog jedinjenja ukoliko se ona izražava $\log K$ vrednostima.¹¹⁷

Od kada su *Boyce* i *Milborrow* izvršili ekstrapolaciju TLC retencionih parametara dobijenih pri različitom odnosu organskog rastvarača i vode u mobilnoj fazi na mobilnu fazu koji čini samo voda, postala je uobičajena praksa da se kao mera lipofilnosti koriste ekstrapolirani podaci umesto podataka dobijenih pri jednom odabranom sastavu mobilne faze (izokratski podatak $\log K$).^{116,123-125} Ekstrapolacija se zasniva na linearnoj *Soczewiński-Snyder* zavisnosti:^{126,127}

$$\log K = \log K_w + S \phi \quad (2)$$

gde K_w odgovara vrednosti K kada mobilnu fazu čini samo voda (pufer), S je konstanta za dati analit i dati HPLC sistem, a ϕ je volumenska frakcija organskog rastvarača u mobilnoj fazi. Na osnovu ove jednačine $\log K = \log K_w$ kada mobilna faza ne sadrži organski rastvarač. Pravolinijska zavisnost javlja se samo pri ograničenom opsegu sastava mobilne faze koji varira u zavisnosti od analita i korišćenog hromatografskog sistema. Zapravo odsecci u *Soczewiński-Snyder* jednačini se obično razlikuju od $\log K_w$ vrednosti određenih eksperimentalno (kada je to moguće) i zavise od organskog rastvarača koji je korišćen. Ovo zapažanje je dovelo neke autore do zaključka da ekstrapolacija retencionih parametara na vodu (pufer) kao mobilnu fazu i $\log K_w$ parametar nemaju fizičko značenje.^{128,129} Međutim $\log K_w$ parametar nije bez značenja i može se posmatrati kao način standardizacije retencionih podataka.¹³⁰

Zavisnost vrednosti $\log P/\log D$ i RP-HPLC retencionih parametara daje mogućnost ne samo procene hidrofobnosti analita već i predviđanje njegove reverzno-fazne hromatografske retencije.^{116,123-125} Osnovna forma ove zavisnosti može se prikazati jednačinom:

$$\log K_w = k_1 + k_2 \log P/\log D \quad (3)$$

gde su k_1 i k_2 koeficijenti regresione jednačine.

Određivanje lipofilnosti serije od 26 imidazolinskih liganada izvršeno je gradijentnom RP-HPLC metodom na XBridge™ C-18 koloni.¹¹⁰ Eksperimentalno određene $\log K_w$ vrednosti primenom RP-HPLC metode pokazale su umerenu korelaciju sa teorijskim (izračunatim) $\log P$ vrednostima i znatno višu korelaciju sa eksperimentalno određenim $\log P$ vrednostima. Pokazano je da se predloženi metod može primeniti za preliminarnu evaluaciju lipofilnosti lekova kandidata, a njegova prednost se ogleda u mogućnosti analize jedinjenja kada su prisutna zajedno u smeši.

1.5. PRIMENA TEORIJSKIH METODA U ISPITIVANJU BIOLOŠKE AKTIVNOSTI I RETENCIONIH OSOBINA LIGANADA IMIDAZOLINSKIH I ALFA ADRENERGIČKIH RECEPTORA

Brz razvoj kombinatorijske hemije i *high-throughput screening* (HTS) metoda olakšao je sintezu velikog broja jedinjenja odgovarajuće hemijske strukture, ali ne uvek i željene osobine. Obično se na osnovu hemijske strukture jedinjenja jasno mogu definisati reakcioni putevi u sintezi, dok je mogućnost predviđanja osobina specifičnih proizvoda reakcije još uvek stvar naučne pretpostavke.

Hemijska reaktivnost u najvećoj meri zavisi od strukture samog jedinjenja. Adekvatno predviđanje različitih osobina, kao što su tačka ključanja, hromatografska retencija ili biološka aktivnost na osnovu hemijske strukture, može se izvršiti samo u okviru serije homologih ili bliskih kongeneričkih jedinjenja ekstrapolacijom ili interpolacijom izmerene osobine reprezentativnih jedinjenja u seriji. Da bi se predvidela odgovarajuća fizičko-hemijska ili biološka osobina potrebno je uspostaviti kvantitativnu zavisnost između hemijske strukture i željene osobine.

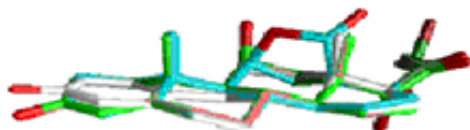
Kvantitativni odnosi strukture i aktivnosti (*Quantitative Structure Activity Relationships*, QSAR) predstavljaju oblast kompjuterskog istraživanja koja razvojem matematičkih modela uspostavlja matematičke korelacije između parametara hemijske strukture i biološke aktivnosti serije jedinjenja.

Kvantitativni odnosi strukture i osobina (*Quantitative Structure Property Relationships*, QSPR) predstavljaju oblast kompjuterskog istraživanja koja razvojem matematičkih modela uspostavlja matematičke korelacije između parametara hemijske strukture i odgovarajuće osobine jedinjenja. Ispitivana osobina može biti retencija u hromatografskom sistemu kada govorimo o kvantitativnim odnosima strukture i retencije (*Quantitative Structure Retention Relationships*, QSRR), pokretljivost u elektroforetskom sistemu (*Quantitative Structure Mobility Relationships*, QSMR), tačka ključanja itd.

QSAR/QSPR modeli se mogu predstaviti u formi prikazanoj na Slici 7. gde je P_i biološka aktivnost (ili osobina od interesa) molekule, D_1, D_2, \dots, D_n , izračunate (ili po

nekad i eksperimentalno određene) strukturne osobine (molekulski deskriptori) ispitivanih jedinjenja i C, C_1, \dots, C_n koeficijenti regresione jednačine.

Da bi se hemijska struktura molekule dovela u korelaciju sa aktivnošću/retencijom neophodno je izračunati različite strukturne osobine (molekulske deskriptore) ispitivanih jedinjenja. Primenom kompjuterske hemije moguće je izračunati veliki broj molekulskih deskriptora (elektronsku energiju, entalpiju, toplotu formiranja, dipolni moment, polarizaciju, elektronegativnost, particioni koeficijent oktanol/voda, molarnu refraktivnost itd.) koji su veoma važni pokazatelji osobina ispitivanih jedinjenja.¹³¹



$$P_i = C + C_1 * D_1 + C_2 * D_2 + \dots + C_n * D_n$$

QSAR: Aktivnost = f (strukture)

QSRR/QSMR: Retencija/pokretljivost = f (strukture)

Slika 7. Zavisnost biološke aktivnosti i retencije/pokretljivosti od hemijske strukture jedinjenja.

1.5.1. Vrste teorijskih metoda u molekulskom modeliranju

Kompjuterska hemija obuhvata različite matematičke metode (Tabela 2.) koje se mogu svrstati u dve velike kategorije:^{131,132}

Molekulsko-mehaničke: primenjuju zakone klasične fizike na molekulsko jezgro bez eksplicitnog razmatranja elektrona.

Kvantno-mehaničke: primenjuju zakone kvantne fizike, opisuju molekul sa eksplicitnim razmatranjem elektronske strukture i zasnivaju se na *Schrödinger*-ovoj

jednačini. *Ab initio*, semi-empirijske i *density functional theory* (DFT) metode pripadaju kvantnoj hemiji.¹³³

Izbor odgovarajućeg metoda zavisi od brojnih faktora koji uključuju:

- Prirodu molekule
- Vrstu informacije koju želimo da dobijemo
- Raspoloživost primenljivih eksperimentalno određenih parametara, koji su potrebni za pojedine metode
- Računarske kapacitete

Tabela 2. Vrste kompjuterskih metoda¹³²

Metod	Prednosti	Nedostaci	Primena
Molekulsko-mehanički (MM2) -Zasniva se na principima klasične fizike -Zahteva empirijske podatke	-Kompjuterski najmanje zahtevan-brz i koristan za ograničene kompjuterske kapacitete -Može se primeniti na velike molekule kao što su enzimi	-Primenjiv na ograničen broj molekula -Ne računa elektronske osobine -Zahteva eksperimentalne podatke ili podatke iz <i>ab initio</i> proračuna	-Veliki sistemi (hiljade atoma) -Sistemi ili procesi u kojima ne dolazi do raskidanja ili formiranja veza
Semi-empirijski (Mopac) -Zasniva se na principima kvantne fizike -Koristi eksperimentalno određene empirijske parametre -Koristi aproksimacije	-Kompjuterski manje zahtevan od <i>ab initio</i> metoda -Može se koristiti za računanje prelaznih i pobuđenih stanja	-Zahteva eksperimentalne podatke ili podatke iz <i>ab initio</i> proračuna -Manje rigorozan od <i>ab initio</i> metoda	-Sistemi srednje veličine -Sistemi koji uključuju elektronske prelaze
Ab initio/DFT (Gaussian) -Zasnivaju se na principima kvantne fizike -Matematički rigorozni, ne koriste empirijske parametre	-Korisni za razne sisteme Ne zavise od eksperimentalnih podataka -Mogu se koristiti za računanje prelaznih i pobuđenih stanja	-Kompjuterski zahtevni	-Mali sistemi (desetine atoma) -Molekuli ili sistemi bez dostupnih eksperimentalnih podataka -Sistemi koji zahteveju veliku tačnost

Veličina molekule može biti ograničavajući faktor za određeni metod. *Ab initio* i DFT su ograničeni na desetine atoma, semi-empirijski na stotine i molekulsko mehanički na hiljade. Za razliku od *ab initio* metoda, molekulsko mehaničke i semi-empirijske metode zahtevaju određene empirijske podatke za izračunavanje odabranih fizičko-hemijskih parametara.

1.5.1.1. Molekulsko-mehaničke metode

Molekulsko-mehaničke metode su jednostavne, brze i sposobne da obrađuju veoma velike sisteme kao što su na primer enzimi. Često se primenjuju za dobijanje preciznih struktura i energija molekula. Glavni nedostatak molekulsko-mehaničkih metoda je što vrše izračunavanje parametara za osnovno stanje sistema i nisu u mogućnosti da adekvatno predstavljaju geometriju modela prilikom formiranja i raskidanja veza. Zasnivaju na osnovnim principima vibracione spektroskopije i ideji da veze imaju svoje prirodne dužine i uglove tako da molekul teži da postigne geometriju pri kojoj će te vrednosti u najvećoj meri biti postignute. Najčešće korišćeni programi zasnovani na ovim metodama su MM₂ i MM₃.¹³¹

1.5.1.2. Semi-empirijske metode

Semi-empirijski proračuni su u osnovi kvantno-mehanički i za razliku od molekulsko-mehaničkih, ove metode koriste matematičke formulacije talasnih funkcija (*Schrödinger*-ova jednačina sa aproksimacijama) koje opisuju vodonikov tip orbitala (*Slater*-tip orbitale (STO) i *Gaussian*-tip orbitale (GTO)). Semi-empirijske metode vrše linearnu kombinaciju orbitala do trenutka pronalaženja sistema sa najnižom energijom. Semi-empirijski proračuni se razlikuju u aproksimacijama koje prave, a koje se odnose na repulziju između elektrona u različitim orbitalama. Najraniji metodi su se zasnivali na proširenoj *Huckel*-ovoj teoriji i CNDO (*Complete Neglect of Differential Overlap*) i nisu bile pouzdane za računanje energije. Unapređene metode kao što su MINDO-3, MNDO, AM1 i PM3 ulaze u sastav MOPAC programa koji se koristi za izračunavanje brojnih parametara: atomskog naelektrisanja, dipolnog momenta, jonizacionog potencijala, kao i za optimizaciju geometrije i računanje vibracionih frekvenci.¹³¹

1.5.1.3. *Ab initio* metode

Ab initio kvantno-mehaničke metode koriste u osnovi *Schrödinger*-ovu jednačinu bez aproksimacija. Ove metode su najkorisnije u slučajevima kada nema dostupnih eksperimentalnih podataka. Glavni nedostatak *ab initio* proračuna je da zahtevaju dosta kompjuterske memorije tako da se ne mogu koristiti rutinski za sisteme sa više od 50 teških atoma. *Ab initio* metode uključuju veliki broj linearnih kombinacija orbitala do trenutka pronalaženja sistema sa minimalnom energijom. U toku te procedure za set orbitala se vrši proračun elektron-elektron repulzione energije koja se zatim koristi za računanje novog seta orbitala i dobijanje nove vrednosti elektron-elektron repulzione energije. Proces se ponavlja do trenutka postizanja najstabilnije konformacije ispitivanog molekula odnosno do pronalaženja sistema sa najnižom potencijalnom energijom. Tačnost samih proračuna zavisi od broja orbitala koje koristi izabrani bazni set. Više upotrebljenih orbitala daje tačnije ali i sporije proračune. Standardni *ab initio* programi daju dobre rezultate kod izračunavanja energije, distribucije naelektrisanja, vibracionih frekvenci i pronalaženja najstabilnije konformacije molekula u osnovnom stanju. Najčešće korišćeni *ab initio* programi su *Gaussian* i *Hondo*. Najjednostavniji oblik *ab initio* proračuna je pomoću *Hartree-Fock* (HF) metode.¹³¹

1.5.1.4. *Density functional theory* (DFT) metode

Density functional theory (DFT) je snažno uticala na razvoj kvantne hemije u toku proteklih 20 godina. Zasnovana na poznatim *Hohenberg* and *Kohn* teoremama DFT je obezbedila dobru osnovu za razvoj kompjuterskih strategija za dobijanje informacije o energiji, strukturi i osobinama molekula na mnogo brži i računarski manje zahtevan način u odnosu na tradicionalnu *ab initio* talasnu funkciju.¹³⁴ DFT je zasnovana na principu da je ukupna energija elektronskog sistema jedinstvena funkcija elektronske gustine, a ne talasne funkcije kao kod *ab initio* i semi-empirijskih metoda. Uvođenje DFT metoda u *Gaussian* programski paket promovisalo je ovaj metod kao kompjutersku alternativu tehnikama talasne funkcije kao što su *Hartree-Fock*, *Møller-Plesset* i dr. Pitanje koje se često postavlja je da li DFT može da se posmatra kao

specijalan oblik *ab initio* metoda. Protiv ove tvrdnje je činjenica da tačna matematička forma DFT jednačine nije poznata za razliku od konvencionalne *ab initio* teorije gde je tačna matematička forma *Schrödinger*-ove jednačine poznata. U konvencionalnoj *ab initio* teoriji talasna funkcija može biti unapređena uzimanjem većeg baznog seta i viših korelacionih nivoa, što nas sve više približava egzatnom rešenju *Schrödinger*-ove jednačine, ali u DFT do sada nije bilo tako jednostavnog načina da se unapredi jednačina pa je potrebno poređenje rezultata sa eksperimentom i sa višim nivoima *ab initio* proračuna. Može se reći da je u tom smislu trenutna DFT semi-empirijska ali ograničen broj empirijskih parametara (uglavnom od 0 do 10) i mogućnost da se jednog dana pronađe egzaktna jednačina čine je u duhu *ab initio* metode. Pored toga DFT metod koji koristi jednačine bez empirijskih parametara je matematički kao *ab initio* i talasnofunkcijske metode.¹³³

1.5.2. Kvantitativni odnosi strukture i aktivnosti (QSAR) liganada imidazolinskih i α_2 -adrenergičkih receptora

Farmakološki efekti selektivnih I_1 -liganada pored centralnog hipotenzivnog dejstva uključuju i antiaritmičko dejstvo, pojačanu renalnu cirkulaciju, diurezu i natriurezu zajedno sa inhibicijom reapsorpcije natrijuma i ekskrecije kalijuma, zatim inhibiciju aktivnosti renalnog simpatikusa^{5,16,18,29,135} i dr. Svi ovi farmakološki efekti ukazuju da se razvojem novih selektivnijih I_1 -IR liganada mogu dobiti veoma efikasni antihipertenzivni lekovi. Pored toga, visokoselektivni I_1 -IR ligandi su veoma važni za ispitivanje strukturnih, funkcionalnih i farmakoloških osobina I_1 -imidazolinskih receptora.

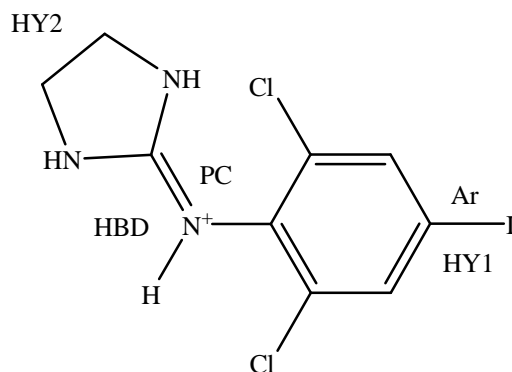
Primena kompjuterskih metoda u racionalnom dizajniranju lekova polazi od razumevanja osnovnih fizioloških, patofizioloških i biohemijskih aspekata bolesti ili ciljnog mesta dejstva u biološkom sistemu. Ukoliko je poznata kristalna struktura određenog receptora onda se može primeniti **direktan pristup** ili dizajniranje liganada koje se zasniva na poznatoj 3D strukturi receptorskog mesta (*Structure-Based Drug Design*, SBDD). Drugi pristup predstavlja **indirektno dizajniranje lekova** i zasniva se na strukturnim karakteristikama samih liganada (*Ligand-Based Drug Design*, LBDD).

Do sada još uvek nije utvrđena trodimenzionalna struktura I₁-IR proteina, ali je kloniran *Imidazoline Antisera-Selected* (IRAS) gen koji je najverovatnije odgovoran za sintezu I₁-IR proteina.¹³⁶ Prenos IRAS cDNA u PC 12 i ovarijalne ćelije kineskog hrčka (*Chinese Hamster Ovary*, CHO) doveo je do ekspresije I₁-IR proteina.^{136,137} Humani IRAS protein, nazvan *nischarin*, uspešno je identifikovan i kloniran.^{136,138-140} Ustanovljeno je da je ekspresija *nischarin*-a u ćeliji od ključnog značaja za očuvanje aktivnosti I₁-IR i pokretanje odgovarajućih signalnih puteva kao što su aktivacija fosfatidilholin-zavisne fosfolipaze C (*phosphatidylcholine-sensitive phospholipase C* (PC-PLC)) i fosforilacija *Extracellular Signal Regulated Kinase* (ERK) enzima.¹⁴⁰⁻¹⁴³ Zato se pretpostavlja da je *nischarin* zapravo I₁-IR, ili funkcionalna jedinica I₁-IR ili membranski medijator uključen u aktivaciju I₁-IR signalnih puteva.¹⁴⁰⁻¹⁴³

Pošto trodimenzionalna struktura I₁-IR proteina nije poznata, preciznije *docking* studije (*in silico* simuliranje vezivanja liganada za receptorsko mesto) na I₁-IR su u velikoj meri otežane. Zbog toga su teorijske metode racionalnog dizajna novih I₁-IR liganada zasnovane na strukturnim karakteristikama liganada (LBDD), kao što su 2D-QSAR, 3D-QSAR analiza i razvoj 3D-strukture farmakofora I₁-IR liganada, jedan od mogućih pristupa u dizajniranju novih farmakološki aktivnih jedinjenja. Veća I₁-IR/ α_2 -AR receptorska selektivnost značajno smanjuje neželjene efekte koji nastaju stimulacijom α_2 -adrenergičkih receptora. QSAR studija I₁-IR liganada u kombinaciji sa QSAR studijom I₁-IR/ α_2 -IR selektivnosti može biti veoma korisna u proceni aktivnosti novih antihipertenziva sa centralnim dejstvom i definisanju najznačajnijih fizičko-hemijskih parametara I₁-IR liganada odgovornih za postizanje povećanog afiniteta ka I₁-IR, kao i za postizanje I₁-IR/ α_2 -AR selektivnosti. Na ovaj način je moguće smanjiti broj sintetisanih i ispitivanih jedinjenja niske biološke aktivnosti.

Dosadašnje 2D-QSAR studije I₁-IR liganada ukazale su da elektrostatički i sterni deskriptori ovih jedinjenja imaju najjači uticaj na njihov afinitet ka I₁-IR i I₂-imidazolinskim receptorima. Pored toga, 3D-QSAR (CoMFA, GRID i GOLPE) studije su pokazale da kombinacija sternih i elektrostatičkih polja kao najznačajnijih MIF (*Molecular Interaction Field*) deskriptora ima najveći uticaj na I₁-IR afinitet vezivanja.¹⁴⁴ Na osnovu ovih studija formiran je i model farmakofore I₁-IR liganada (Slika 8.) koji se sastoji iz 2 hidrofobna regiona (HY1 i HY2), dve grupe donora

vodonične veze (*Hydrogen Bond Donor Groups*, HBD), aromatičnog prstena (Ar) i pozitivno naelektrisanog dela strukture (*Positively Charged moiety*, PC).



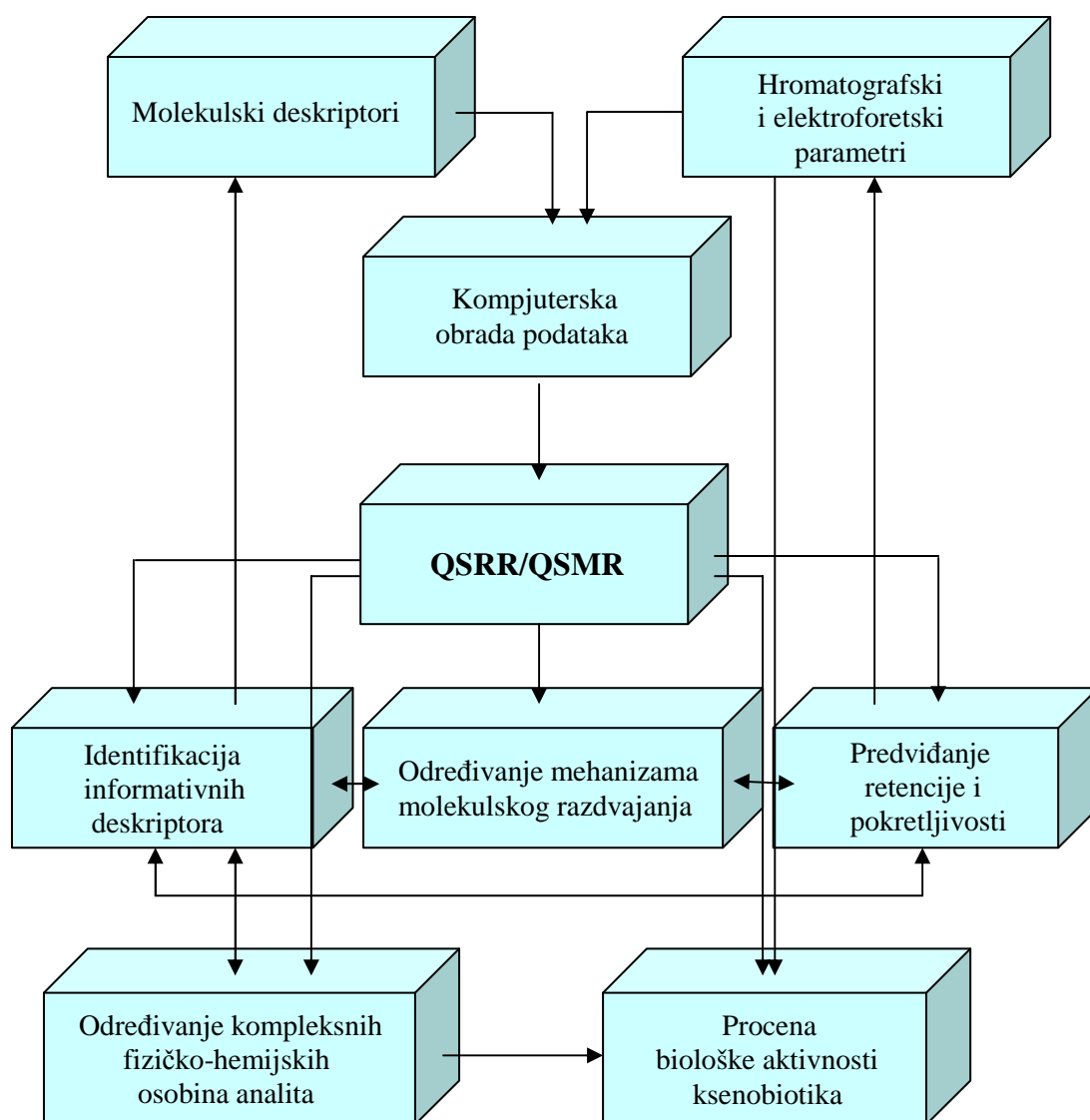
Slika 8. Šematski prikaz farmakofore I₁-IR liganada na primeru *p*-jodoklonidina.

1.5.3. Kvantitativni odnosi strukture i retencije/pokretljivosti (QSRR/QSMR) liganada imidazolinskih i α -adrenergičkih receptora

Reverzno-fazna tečna hromatografija i kapilarna elektroforeza predstavljaju najčešće korišćene separacione metode u analizi farmaceutski aktivnih supstanci. Veliki broj dostupnih stacionarnih faza u HPLC analizi, kao i različitih puferskih aditiva (ciklodekstrina i površinski aktivnih supstanci) koji se mogu koristiti u CE analizi često otežava odabir polaznih uslova za razvoj odgovarajuće analitičke metode. Da bi se jednim delom skratilo vreme potrebno za pronalaženje optimalnih eksperimentalnih uslova pristupilo se proučavanju matematičkih modela na osnovu kojih se jednostavnim računanjem molekulskih deskriptora odgovarajućeg jedinjenja može predvideti njegova hromatografska retencija ili pokretljivost u kapilarnoj elektroforezi. Ukoliko postoji mogućnost da se relativno tačno predvidi retencija analita i/ili separacione smeše onda bi teorijski pristup jednim delom mogao da zameni dugotrajne eksperimente. Među različitim metodama koje se mogu primeniti za predviđanje retencije/pokretljivosti, kvantitativni odnosi strukture i retencije/pokretljivosti (QSRR/QSMR) predstavljaju najčešće korišćeni pristup.¹⁴⁵⁻¹⁵²

Prve QSRR studije nastale su kao rezultat primene metodologije korišćene u studijama kvantitativnog odnosa strukture i biološke aktivnosti, takozvanog *Hansch-ovog* pristupa, na analizu hromatografskih podataka.¹⁵⁰

Da bi se sprovela QSRR/QSMR analiza neophodan je set kvantitativno uporedivih retencionih/elektroforetskih parametara za dovoljno veliku seriju jedinjenja i set njihovih strukturnih deskriptora. Metodologija i ciljevi QSRR/QSMR studija,¹⁴⁵⁻¹⁵⁰ su prikazani na Slici 9.



Slika 9. Metodologija i ciljevi QSRR/QSMR studija.¹⁵⁰

Upotrebom kompjuterskih statističkih hemometrijskih metoda, retencioni parametri mogu biti predstavljeni u funkciji različitih deskriptora ispitivanih jedinjenja. QSRR i QSMR modeli mogu biti primenjeni za:

- identifikaciju najznačajnijih strukturnih deskriptora
- predviđanje retencije/pokretljivosti novog analita i identifikaciju nepoznatih analita
- razumevanje molekulskih mehanizama razdvajanja u datom separacionom sistemu
- kvantitativno poređenje separacionih osobina pojedinačnih tipova hromatografskih kolona
- procenu fizičko-hemijskih osobina analita kao što su lipofilnost i konstante jonizacije
- procenu biološke aktivnosti

Nekoliko osnovnih tipova QSRR i QSMR analize se može primeniti. Najstariji tip QSRR-a uspostavlja korelaciju između retencionih parametara ($\log K/\log K_w$) i logaritma particionog koeficijenta n-oktanol-voda ($\log P$).^{110,116,153} Drugi tip QSRR-a se zasniva na solvatohromnom metodu poređenja i tzv. *linear solvation energy relationships* (LSERs)^{154,155} i treći tip QSRR-a uspostavlja zavisnost između hromatografske retencije i strukturnih deskriptora dobijenih računarskom hemijom.¹⁵⁰⁻¹⁵²

U QSMR analizi elektroforetski parametri kao što su migraciono vreme (t_m),^{149,156} relativno migraciono vreme (RMT)¹⁵⁷ i efektivna pokretljivost analita (μ_{eff})¹⁵⁸ su korišćeni zajedno sa izračunatim molekulskim deskriptorima za formiranje linearnih i nelinearnih regresionih modela kojima se može predvideti elektroforetsko ponašanje različitih grupa lekova,¹⁴⁹ amonijaka i alifatičnih amina u prisustvu ciklodekstrina,¹⁵⁶ aminokiselina¹⁵⁷ i sulfonamida.¹⁵⁸

Farmakološka klasifikacija 83 različita leka, među kojima su i ligandi imidazolinskih i α_2 -adrenergičkih receptora, izvršena je na osnovu njihovog retencionog ponašanja na 6 različitih stacionarnih faza u HPLC sistemu,^{159,160} a retencioni parametri dobijeni u RP-TLC sistemu za 11 liganada imidazolinskih i α -adrenergičkih receptora uspešno su primenjeni u QSAR/QSPR analizi.¹⁶¹

1.6. FORMIRANJE MODELA, PROCENA KVALITETA I VALIDACIJA QSAR/QSPR MODELA

Sam proces formiranja QSAR/QSPR modela može se u osnovi podeliti u 3 stupnja. Prvi stupanj je odabir molekuskog seta podataka za QSAR/QSPR studiju i izračunavanje molekulskih deskriptora. Drugi stupanj se zasniva na primeni različitih statističkih metoda u formiranju odgovarajućih modela. Multilinearna regresija (*Multiple Linear Regression*, MLR)^{162,163} metoda parcijalnih najmanjih kvadrata (*Partial Least Squares regression*, PLS),^{149,162,163} veštačke neuronske mreže (*Artificial Neural Network*, ANN)^{146,164} i klasifikaciona i regresiona stabla (*classification and regression trees*)^{147,165} su najčešće primenjivane statističke metode. U svim pristupima deskriptori predstavljaju nezavisnu promenljivu (X), a biološka aktivnost, hromatografska retencija ili pokretljivost u kapilarnoj elektroforezi predstavljaju zavisnu promenljivu (Y). Treći stupanj i najvažniji deo u formiranju modela je validacija modela, odnosno procena da li se formirani model može koristiti za pouzdano predviđanje biološke aktivnosti ili osobine (retencije, pokretljivosti) novih jedinjenja.

1.6.1. Odabir molekuskog seta podataka i izračunavanje molekulskih deskriptora

Broj jedinjenja koji se koristi u QSAR/QSPR studiji ne bi trebalo da bude suviše mali, a iz praktičnih razloga ni suviše veliki. Gornju granicu najčešće određuju softveri i vreme dostupno za formiranje modela odabranom metodologijom. Da bi se formirali modeli koji se mogu koristiti za pouzdano predviđanje biološke aktivnosti ili osobine, odabrani set jedinjenja je potrebno podeliti na *training* i *test set*.¹⁶⁶ Jedinjenja koja ulaze u sastav *training* seta koriste se za formiranje regresionih modela, dok su jedinjenja iz *test seta* važna za validaciju formiranih modela i procenu njihove sposobnosti predviđanja. Maksimalan broj jedinjenja u *training setu* ne bi trebalo da prelazi 2000 jer tada dolazi do neefikasnosti u samoj obradi podataka. U slučaju velikog broja jedinjenja

može se primeniti nekoliko različitih pristupa kao što su 1) izdvajanje različitih podsetova jedinjenja 2) klasterovanje podataka i formiranje nezavisnih modela za svaki klaster itd. Teško je dati egzaktan minimum jedinjenja koji se može koristiti za dobijanje pouzdane regresione jednačine, ali uvek treba imati u vidu da mali trening set može dati slučajnu korelaciju i *overfitting* (nepovoljan odnos broja parametara i broja analiziranih jedinjenja usled čega je dobijeni model previše prilagođen trening setu) što za rezultat može imati dobijanje nepouzdanih regresionih jednačina.¹⁶⁶

1.6.1.1. Molekulski deskriptori

Molekulski deskriptori se mogu definisati kao krajnji rezultat matematičke procedure kojom se informacija o strukturi molekule prevodi u korisnu numeričku vrednost koja simbolično predstavlja određenu karakteristiku molekule (*teorijski deskriptori*). Deskriptori takođe mogu biti i rezultat standardnog eksperimenta kada se klasifikuju kao *eksperimentalni deskriptori*. „Korisna“ numerička vrednost u ovom kontekstu podrazumeva da dobijena vrednost može značajno doprineti boljem razumevanju molekulskih osobina i/ili da može biti korišćena u modelu za predviđanje osobina drugih molekula.¹⁶⁷

Broj strukturnih deskriptora koji se može izračunati za neko jedinjenje je praktično neograničen. Samo pomoću Dragon softvera koji se često koristi u ove svrhe, moguće je izračunati preko 4000 molekulskih deskriptora.

Postoji nekoliko načina na osnovu kojih se molekulski deskriptori mogu klasifikovati u grupe. Jedna od najjednostavnijih podela je na osnovu prirode deskriptora, na teorijske ili eksperimentalne deskriptore. Dalja klasifikacija teorijskih molekulskih deskriptora se vrši na osnovu dimenzionalnosti molekulskog predstavljanja. U zavisnosti od načina prikazivanja molekule, teorijske deskriptore možemo podeliti na nulte-(0D), jedno-(1D), dvo-(2D), tro-(3D) i četvoro-(4D) dimenzionalne.

0D-deskriptori se dobijaju iz molekulske formule i nezavisni su od molekulske strukture. To su najjednostavniji deskriptori koji pokazuju hemijski sastav jedinjenja bez informacija o geometriji molekule. Primer ovih deskriptora su broj i tip atoma, molekulska masa itd. 1D-deskriptori predstavljaju molekul u vidu liste molekulskih

fragmenata. Primer ovih deskriptora su broj finkcionalnih grupa (amino grupa, estara, broj atoma donora H-veze itd). 2D-deskriptori su topološki deskriptori i daju informacije o povezanosti atoma u molekuli uzimajući u obzir i tip vezivanja i interakciju između atoma (Zagreb indeks, Balaban indeks itd.). 3D-deskriptori se računaju iz geometrijske ili trodimenzionalne strukture molekule (3D MoRSE deskriptori, GETAWAY deskriptori i dr.), dok se 4D-deskriptori dobijaju iz stereoelektronskog prikazivanja molekule ili prikazivanja u vidu rešetke.¹⁶⁷

Klasifikacija deskriptora se može izvršiti i na fizičko-hemijske, kvantno-hemijske, teorijske (topološki, geometrijski) itd.

Sa hemijske tačke gledišta značajni su samo oni matematički deskriptori čije se značenje može jasno dovesti u vezu sa retencijom, biološkom aktivnošću, farmakokinetičkim parametrima ili nekom drugom ispitivanom osobinom. Pokazano je da brojni neempirijski strukturni deskriptori znatno doprinose kvalitetu formiranih modela. Sa druge strane, može se uvesti na hiljade novih deskriptora bez unapređenja njihovog statističkog kvaliteta i fizičkog značenja. Pitanje koje se tada postavlja je da li dobro predviđanje, koje potvrđuje kvalitet date regresione jednačine, ima važnost u slučaju kada se značenje primenjenih deskriptora ne može jasno interpretirati u funkciji ispitivane osobine? Odnosno, da li je bolje formirati QSAR/QSPR model sa deskriptorima koji se jednostavno mogu interpretirati, čak i ako sposobnost predviđanja takvog modela može biti čak i lošija u odnosu na prethodni slučaj? Odgovor na ovo pitanje se može dobiti samo ukoliko modeli formirani sa deskriptorima čije je značenje nejasno imaju znatno veću moć predviđanja u odnosu na modele čiji deskriptori se mogu jednostavno interpretirati. Pošto kvalitet QSAR/QSPR modela zavisi uglavnom od odabira najinformativnijih deskriptora ispitivanih jedinjenja iz ogromnog seta često međusobno korelisanih deskriptora, pogodan metod za odabir deskriptora je ključ za dobijanje odgovarajućih modela.

1.6.2. Statističke metode za formiranje QSAR/QSPR modela

1.6.2.1. Multilinearna regresija

Multilinearna regresiona analiza predstavlja jednu od najčešće korišćenih metoda u formiranju QSAR/QSPR regresionih modela. U MLR-u, regresiona analiza se sprovodi sa ciljem da se dobiju statistički značajni modeli u kojima se zavisno promenljiva Y predstavlja kao funkcija limitiranog broja molekulskih deskriptora.

QSAR/QSPR modeli mogu biti formirani od *a priori* izabranog malog seta deskriptora poznatih fizičko-hemijskih osobina ili polazeći od velikog seta potencijalno korisnih deskriptora kada se MLR analiza ne može primeniti jer u najvećem broju slučajeva broj dostupnih deskriptora značajno premašuje broj ispitivanih objekata. U takvim situacijama pre formiranja regresionih modela potrebno je izvršiti selekciju najinformativnijeg seta deskriptora. U te svrhe može se primeniti postupna MLR (*stepwise MLR*) analiza, gde se selekcija deskriptora unapred (*forward*) ponavlja sa njihovom eliminacijom unazad (*backward*).^{162,163} Jedan od nedostataka ovog metoda je da se postupna MLR procedura zasniva na podešavanju podataka (*fitting*) pa dobijeni model može biti previše prilagođen ispitivanom trening setu (*overffited*). Da bi se to izbeglo primenjuje se ukrštena validacija.

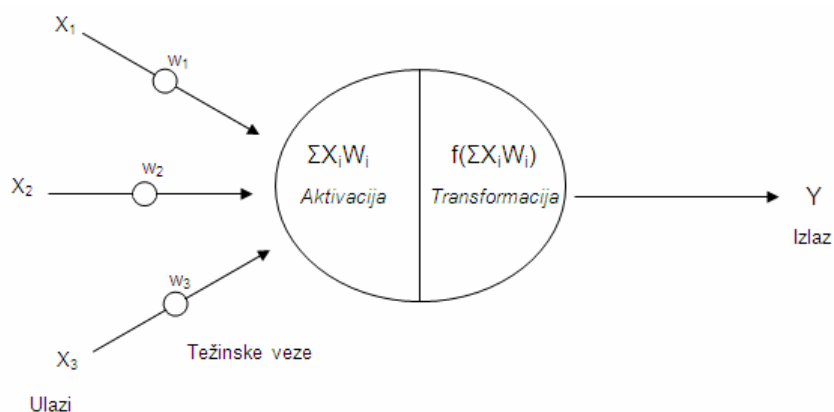
1.6.2.2. Metoda parcijalnih najmanjih kvadrata

Metoda parcijalnih najmanjih kvadrata (*Partial Least Squares regression, PLS*) predstavlja generalizaciju multilinearne regresije. PLS pristup uveo je *Herman Wold* 1975. godine za modelovanje komplikovanih setova podataka, organizovanih u matrice (blokove), na koje se nije mogla primeniti uobičajena regresiona analiza. Najveći značaj PLS regresije, za razliku od MLR analize, ogleda se u mogućnosti analize podataka koji su nepotpuni, sa visokom interkorelacijom, sa velikim brojem promenljivih X, a daje mogućnost i istovremenog modelovanje nekoliko zavisnih promenljivih Y. Sam metod se zasniva na uspostavljanju linearne zavisnosti između zavisne promenljive Y i niza latentnih (eksplanatornih, predviđajućih) promenljivih, takozvanih PLS faktora koji predstavljaju linearnu kombinaciju originalnih

promenljivih (X) i povećavaju kovarijansu između X (matrice molekulskih deskriptora) i Y (retencionog vremena, biološke aktivnosti). PLS se često interpretira i kao projekcija na latentne strukture (*Projection to Latent structures*).^{168,169}

1.6.2.3. Veštačke neuronske mreže

Veštačke neuronske mreže (*Artificial Neural Network, ANN*) su kompjuterski programi dizajnirani da po ugledu na biološke neuronske sisteme imitiraju način na koji čovečji mozak obrađuje informacije.¹⁷⁰ Osnovna gradivna komponenta veštačkih neuronskih mreža je neuron (Slika 10.)¹⁷⁰. Svaki veštački neuron ima svoj težinski ulaz (*weighted input*), prenosnu funkciju (*transfer function*) i izlaz (*output*). Ponašanje neuronske mreže je uslovljeno: prenosnom funkcijom njenih neurona, pravilima učenja i samom arhitekturom (brojem neurona, slojeva itd.). Dolazeći signali koji se nazivaju ulazi (*inputs*) pomnoženi težinskim vezama (*connection weights*) se prvo saberu, a zatim prolaze kroz prenosnu funkciju stvarajući izlaz (*output*) za taj neuron. Aktivaciona funkcija je težinski zbir neuronskih ulaza, a najčešće korišćena prenosna funkcija je sigmoidalna funkcija. Prenosna funkcija daje nelinearni karakter mreži.

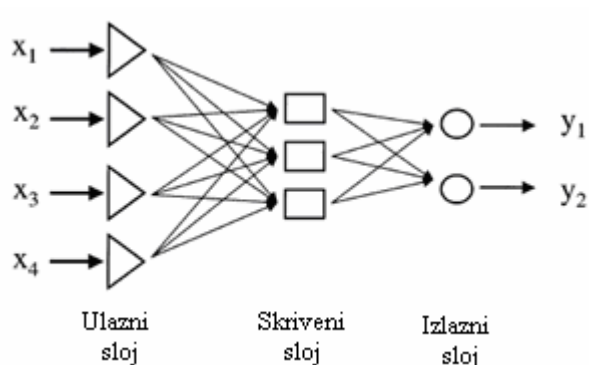


Slika 10. Model veštačkog neurona.¹⁷⁰

Postoje različiti tipovi uređenja (arhitekture) neuronskih mreža, a jedan od najčešće korišćenih su višeslojni perceptroni (*Multilayer Perceptrons, MLP*). Ovaj tip veštačke

mreže se sastoji od ulaznog sloja, jednog ili više skrivenih slojeva i izlaznog sloja (Slika 11).

Svaki sloj ima nekoliko jedinica koje odgovaraju neuronima. Neuroni susednih slojeva su potpuno povezani vezama koje odgovaraju sinapsama. Jačina veza između neurona naziva se težina. Kako se signal prenosi kroz mrežu jednosmerno od ulaza preko skrivenog sloja do izlaza, MLP pripada višeslojnim nerekurentnim mrežama (*Multi Layer Feedforward Networks*) (Slika 11.).



Slika 11. Višeslojna nerekurentna mreža.¹⁷⁰

Neuronske mreže uče na primerima. Suština procesa učenja je da on dovodi do korigovanja sinaptičkih težina. Kada ulazni podaci koji se dovode mreži više ne dovode do promene ovih koeficijenata, smatra se da je mreža obučena za rešavanje nekog problema. Postoje različiti algoritmi učenja, a višeslojni perceptroni se primenjuju za rešavanje kompleksnih problema zahvaljujući najčešće *back propagation (BP)* algoritmu.¹⁷¹

1.6.3. Validacija modela

Validacija modela je jedan od najkritičnijih koraka QSAR/QSPR analize koji omogućuje poređenje formiranih modela i izbor optimalnog modela sa najvećim prognostičkim potencijalom. Najčešće se primenjuje ukrštena validacija (*Leave-One-Out Cross Validation*, LOO-CV) u kojoj se validacioni regresioni faktor (*Leave-One-Out Cross Validated*, Q^2) koristi kao kriterijum robusnosti i predviđajuće sposobnosti modela. Često se smatra da je visoka vrednost Q^2 (na primer $Q^2 > 0,5$)¹⁷² dovoljan pokazatelj dobre moći predviđanja datog modela. Međutim, iako niske vrednosti Q^2 ukazuju na loše predviđanja modela, visoke vrednosti Q^2 se danas ne smatraju dovoljnim kriterijumom u proceni kvaliteta formiranog modela.^{166,173} Sposobnost formiranog modela da predvidi vrednost zavisne promenljive Y trebalo bi da bude potvrđena primenom još jedne validacione procedure, eksterne validacije, koja podrazumeva proveru sposobnosti datog modela da predvidi ispitivanu osobinu za jedinjenja koja nisu korišćena u formiranju modela i koja čine tzv. test set ili eksterni set.

Prema *Tropshi* i saradnicima^{166,173} test set treba da ima najmanje 5 jedinjenja čije aktivnosti/osobine i struktura moraju da budu u opsegu aktivnosti/osobina i strukture jedinjenja u trening setu. Ovaj zahtev je neophodan za dobijanje pouzdane statistike za poređenje između eksperimentalnih i predviđenih vrednosti ovih jedinjenja. Pored visoke Q^2 vrednosti pouzdan model treba da bude okarakterisan i visokim koeficijentom korelacije R (ili R^2) između predviđene i eksperimentalne aktivnosti/osobine jedinjenja iz test seta. Pri formiranju QSAR/QSPR modela sledeće parametre za jedinjenja u test setu treba uzeti u obzir:

- (i) koeficijent korelacije R između predviđene i eksperimentalne vrednosti
- (ii) najmanje jedan (a bolje oba) koeficijent determinacije za regresionu pravu koja prolazi kroz centar koordinacionog sistema R_0^2 (eksperimentalna (Y-osa) vs. predviđena (X-osa) vrednost) ili $R_0'^2$ (predviđena (Y-osa) vs. eksperimentalna (X-osa) vrednost)
- (iii) najmanje jedan nagib regresionih kriva (k i k') koje prolaze kroz centar koordinacionog sistema (odsečak jednak nuli).

2. CILJ RADA

Ciljevi ove doktorske disertacije su:

- QSAR analiza i primena multilinearne regresije u postavljanju matematičke zavisnosti za definisanje kvantitativnog odnosa hemijske strukture imidazolinskih i α_2 -adrenergičkih liganada i njihovog afiniteta za I₁-imidazolinske receptore, α_2 -adrenergičke receptore, kao i njihove I₁-IR/ α_2 -AR selektivnosti.
- Optimizacija eksperimentalnih uslova za razdvajanje smeše imidazolinskih i α_2 -adrenergičkih liganada (klonidin, moksonidin, rilmenidin, harman, harmin, amilorid, tizanidin, idazoksan, agmatin, gvanfacin, klopamid, efaroksan, *p*-aminoklonidin, gvanabenz, triamteren i indapamid) metodom kapilarne elektroforeze.
 - Ispitivanje uticaja koncentracije i pH vrednosti pufera, temperature, napona i različitih koncentracija α -, β - i γ -ciklodekstrina na elektroforetsku pokretljivost i rezoluciju.
 - Teorijsko ispitivanje i optimizacija procesa kompleksiranja liganada imidazolinskih i α_2 -adrenergičkih receptora sa α -, β - i γ -ciklodekstrinom.
 - Primena linearnih (MLR i PLS) i nelinearnih (ANN) statističkih metoda u formiranju QSMR modela koji definišu pokretljivost ispitivanih jedinjenja u prisustvu različitih ciklodekstrina, α -, β - i γ -ciklodekstrina.
 - Formiranje *multi-target* QSMR modela koji definiše matematičku zavisnost deskriptora liganada (X) i pokretljivosti u kapilarnoj elektroforezi u prisustvu α -CD (Y1), β -CD (Y2) i γ -CD (Y3).
- Ispitivanje retencije/pokretljivosti 29 liganada imidazolinskih i/ili α -adrenergičkih receptora (klonidin, moksonidin, rilmenidin, brimonidin, harman, harmin, amilorid, tizanidin, idazoksan, gvanfacin, klopamid, efaroksan, triamteren, indapamid, fenilefrin, efedrin, pseudoefedrin, doksazosin, tamsulosin, karvedilol, klopamin, olanzapin, maprotilin, mianserin, ksilometazolin, nafazolin, oksimetazolin,

tetrahidrozolin, tramazolin) primenom reverzno-fazne tečne hromatografije pod visokim pritiskom i kapilarne elektroforeze.

- Eksperimentalno određivanje efektivne elektroforetske pokretljivosti metodom kapilarne elektroforeze pri kiseljoj, baznoj i neutralnoj pH vrednosti elektrolita i retencionih faktora RP-HPLC metodom korišćenjem C18 kolone pri kiseljoj, baznoj i neutralnoj pH vrednosti mobilne faze.
 - Primena linearnih statističkih metoda (postupne MLR i PLS) u formiranju odgovarajućih QSRR/QSMR modela koji definišu retenciju/pokretljivost ispitivane grupe imidazolinskih i/ili alfa adrenergičkih liganada pri različitim pH vrednostima u CE i RP-HPLC sistemu i upoređivanje mehanizama odgovornih za retenciono ponašanje u različitim analitičkim sistemima.
 - Korelacija eksperimentalno određenih retencionih parametara u kiseljoj, neutralnoj i baznoj sredini primenom RP-HPLC metode sa $\log P$ i $\log D$ vrednostima izračunatih primenom različitih teorijskih metoda.
 - Klasterovanje liganada imidazolinskih i alfa adrenergičkih receptora na osnovu eksperimentalno određenih $\log K_w$ vrednosti u kiseljoj, neutralnoj i baznoj sredini; efektivne pokretljivosti, μ_{eff} u kiseljoj, baznoj i neutralnoj sredini i na osnovu deskriptora izdvojenih u najznačajnijim QSRR/QSMR modelima.
- Određivanje kiselinsko-baznih konstanti jonizacije klonidina, moksonidina, tizanidina, gvanfacina, rilmenidina, idazoksana, efaroksana, harmana, harmina i triamterena metodom kapilarne elektroforeze.

3. EKSPERIMENTALNI DEO

3.1. QSAR STUDIJE IMIDAZOLINSKIH I α_2 -ADRENERGIČKIH LIGANADA

3.1.1. Biološki podaci

QSAR studije su sprovedene na dve grupe eksperimentalnih podataka koji su preuzeti iz literature.^{31,32}

Prvu grupu eksperimentalnih rezultata su činili afiniteti vezivanja (konstante inhibicije vezivanja radioliganda, K_i) 12 ispitivanih jedinjenja za I₁-imidazolinske, α_{2A} -, α_{2B} - i α_{2C} -adrenergičke receptore koji su određeni u prisustvu I₁-IR radioliganda [¹²⁵I] *p*-jodoklonidina ([¹²⁵I]PIC).³¹

Afiniteti vezivanja za I₁-imidazolinske receptore su određeni na ćelijskim membranama humanih trombocita u prisustvu 10 μ M noradrenalina čiji je nizak afinitet ka I₁-imidazolinskim receptorima ($K_i \approx 1$ mM) i visok afinitet ka α_2 -AR omogućio selektivno maskiranje α_2 -adrenergičkih receptora. Negativan logaritam K_i vrednosti, pK_i (I₁-IR) ($pK_i = -\log K_i$) izračunat je za sva ispitivana jedinjenja i korišćen kao zavisno promenljiva u QSAR analizi.

Afiniteti vezivanja za humane α_{2A} -, α_{2B} - i α_{2C} -adrenergičke receptore izmereni su na ovarijalnim ćelijama kineskog hrčka (*Chinese hamster ovary*, CHO) u kojima su ovi receptori eksprimirani. Za QSAR analizu izračunata je srednja vrednost afiniteta vezivanja i izražena kao $pK_i(\alpha_2\text{-AR})$.

Selektivnost vezivanja za I₁-IR u odnosu na α_2 -AR je izračunata iz razlike afiniteta vezivanja: I₁-IR/ α_2 -AR-selektivnost = $pK_i(\text{I}_1\text{-R}) - pK_i(\alpha_2\text{-AR})$.

Drugu grupu eksperimentalnih rezultata su činili afiniteti vezivanja 11 ispitivanih jedinjenja za I₁-imidazolinske receptore određeni na PC12 ćelijama u prisustvu visokoselektivnog I₁-IR liganda, radiojodiniranog 2-(2-hloro-4-jodofenilamino)-5-metil-pirolina ([¹²⁵I] LNP911).³² Negativan logaritam K_i vrednosti, $pK_i(\text{I}_1\text{-IR})$ ($pK_i = -\log K_i$) izračunat je za sva ispitivana jedinjenja i korišćen kao zavisno promenljiva u QSAR analizi.

3.1.2. Optimizacija konformacije ispitivanih jedinjenja i izračunavanje molekulskih deskriptora

Hemijske strukture ispitivanih jedinjenja konstruisane su u ChemDrawUltra programu.¹⁷⁴ Za sva ispitivana jedinjenja izračunate su pK_a vrednosti i odabrani dominantni molekulski/katjonski oblici pri fiziološkom pH 7,4 pomoću MarvinSketch programa.¹⁷⁵ Kristalna struktura klonidin-hidrohlorida poslužila je kao osnova za odabir odgovarajućeg metoda za geometrijsku optimizaciju ispitivanih jedinjenja.¹⁷⁶ Ranije izvedene B3LYP (*Becke 3-parameter, Lee, Yang and Parr*)^{177,178} konformacione analize [B3LYP/6-31+G(d,p)] su pokazale, u skladu sa eksperimentalnim podacima, da klonidin i moksonidin egzistiraju kao stabilniji imino tautomeri dok kod rilmenidina amino tautomer pokazuje nešto veću stabilnost.^{179,180} Kompletna geometrijska optimizacija odabranih dominantnih tautomernih i izomernih oblika pri fiziološkom pH 7,4 izvršena je primenom B3LYP/3-21G(d,p) metoda u okviru *Density Functional Theory* (DFT) pomoću Gaussian 98 programa.¹⁸¹

Izračunavanje molekulskih deskriptora tako optimizovanih struktura u Gaussian 98 programu¹⁸¹ izvršeno je korišćenjem B3LYP hibridne funkcije sa 6-31G(d,p) baznim setom u vodenom rastvoru (*Polarizable Continuum Model*, PCM).¹⁸² Pored toga, ChemProp¹³² i MarvinSketch¹⁷⁵ programi su korišćeni za izračunavanje particionog koeficijenta oktanol-voda (logP), kiselinsko-baznih konstanti jonizacije (pK_a), distribucionog koeficijenta (logD), izoelektrične tačke, ukupnog naelektrisanja, molarne refraktivnosti (MR), *Connolly* površine dostupne rastvaraču (*Connolly Solvent Accessible Surface Area*, SAS), *Connolly* molekulske površine (*Connolly Molecular Surface Area*, MS) i polarnog dela površine molekule (*Polar Surface Area*, PSA).

Od 42 izračunata fizičko-hemijska, topološka i elektronska deskriptora za multilinearu regresionu analizu odabrani su samo molekulski parametri koji su pokazali visok stepen korelacije sa eksperimentalno određenim afinitetima ka imidazolinskim I₁-IR ($pK_i(I_1-IR)$) i α_2 -adrenergičkim receptorima ($pK_i(\alpha_2-AR)$), kao i visoku korelaciju sa I₁-IR/ α_2 -AR selektivnošću ($r \geq 0,55$). Odabrani deskriptori nisu pokazali značajnu interkorelaciju.

3.1.3. Optimizacija aktivnog domena IRAS-a

Aminokiselinska sekvenca aktivnog domena IRAS-a (NCBI locus: AAC33104)¹⁴³ dobijena je iz baze podataka Nacionalnog centra za biotehnologiju (*National Center for Biotechnology Information Database*) (www.ncbi.nlm.nih.gov) *In silico* simuliranje vezivanja liganada za receptorsko mesto (fleksibilan ligand *docking*) izvedeno je u Argus Lab 4.0.1. programu.¹⁸³ Program je validiran sa *docking* tačnošću od ~3 Å za vrednost RMSD (*root mean square deviation*) između predviđene i eksperimentalne kristalografske strukture.¹⁷⁶ *Docking* proračuni započeti su geometrijskom optimizacijom aktivnog domena IRAS-a, rutenijum-vezujućeg regiona (aminokiseline 629-691)¹³⁶ primenom UFF (*Universal Force Field*)¹⁸⁴ metoda implementiranog u ArgusLab 4.0.1 program.¹⁸³ LNP911 kao jedinjenje sa najvećim afinitetom i selektivnošću za I₁-IR (K_i : 1,400 nM) odabrano je za traženje i selekciju aminokiselina u aktivnom domenu receptora koje su odgovorne za interakciju sa ligandom. Utvrđeno je da aminokiseline Asp, Glu, Tyr i Ala učestvuju u formiranju intermolekulskih veza sa ligandom.

3.2. SEPARACIONE METODE U ANALIZI LIGANADA IMIDAZOLINSKIH I ALFA ADRENERGIČKIH RECEPTORA

3.2.1. Oprema, hemikalije i računarski programi

3.2.1.1. Oprema

- Sistem za kapilarnu elektroforezu SpectraPhoresis 500 (Spectra Physics Analytical, SAD)
UV detektor
program ChromQuest software version 4.0 (Thermo Finnigan, SAD)
- HPLC uređaj HP 1100 (Hewlett-Packard, Beaverton, OR, SAD)
binarna pumpa
20 µl manuelni injektor Rheodyne
1100A UV detektor
program ChemStation
- pH metar Radiometer model PHM 240 pH/ION-meter (Radiometer, Kopenhagen, Danska)
- Analitička vaga AdventurerTM-Pro (Ohaus Corporation, Pine Brook, SAD)
- Ultrazvučno kupatilo UCI-75 (R. ESPINAR, S.L., Barcelona, Španija)
- Kolona: XTerra[®] RP18, 4,6 x 100 mm, 3,5 µm (Waters, Irska)
- Kapilare: 31 cm x 50 µm id, efektivna dužina 23,5 cm; 31,5 cm x 50 µm id, efektivna dužina 24,0 cm (Polymicro Technologies, SAD)
- TKA sistem za prečišćavanje vode (Niederelbert, Nemačka)

3.2.1.2. Hemikalije

- **Standardi ispitivanih supstanci:** agmatin-sulfat, klonidin-hidrohlid, *p*-aminoklonidin-hidrohlid, gvanabenz, moksonidin-hidrohlid, gvanfacin-hidrohlid, brimonidin-tartarat, efaroksan-hidrohlid, idazoksan-hidrohlid, rilmenidin-hemifumarat, harman, harmin-hidrohlid, tizanidin-hidrohlid, triamteren, klopamid, indapamid, nafazolin-hidrohlid, ksilometazolin-hidrohlid, tetrahidrozolin-hidrohlid, oksimetazolin-hidrohlid, efedrin-hidrohlid, pseudoefedrin-hidrohlid, maprotilin-hidrohlid, tamsulosin-hidrohlid, mianserin-hidrohlid, karvedilol, klozapin i olanzapin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD); tramazolin-hidrohlid, doksazosin-mezilat (Zdravlje, Leskovac, Srbija); amilorid-hidrohlid (Galenika, Beograd, Srbija); fenilefrin-hidrohlid (Ivančić i sinovi, Beograd, Srbija)
- α -, β - i γ -ciklodekstrin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- Mravlja kiselina (Merck, Darmstadt, Nemačka)
- 85 % ortofosforna kiselina ((Merck, Darmstadt, Nemačka)
- Natrijum hidroksid (Merck, Darmstadt, Nemačka)
- Natrijum-dihidrogenfosfat, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Merck, Darmstadt, Nemačka)
- Dinatrijum-hidrogenfosfat, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Merck, Darmstadt, Nemačka)
- Amonijum acetat (Merck, Darmstadt, Nemačka)
- Metanol Chromasolv HPLC čistoće (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemačka)
- Borna kiselina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- Glacijalna sirćetna kiselina (J. T. Baker, Deventer, Holandija)
- Amonijum hidroksid (Carlo Erba, Milano, Italija)

3.2.1.3. Računarski programi

- Microsoft Office Excel, Microsoft Corporation, SAD, 2003
- ChemDrawUltra 7.0.0, CambridgeSoft Corporation, MA, SAD, 2002.
- Chem3DUltra 7.0.0, CambridgeSoft, MA, SAD, 2002.
- *Gaussian 98* (Revision A.7), Gaussian, Inc., Pittsburgh, PA, SAD 1998.

- SIMCA P+ program, Version 12.0, Umetrics AB, Umea, Švedska 2008.
- MarvinSketch, ChemAxon, Budimpešta, Mađarska 2008.
- Dragon 6.0 program, Talete srl, DRAGON (Software for Molecular Descriptor Calculation), Version 6.0 – 2010.
- STATISTICA Neural Networks 4.0, StatSoft, Inc., SAD 1998.
- OriginPro 8 SRO, MA, SAD, 2007.

3.2.2. QSMR studija liganada imidazolinskih i α_2 -adrenergičkih receptora u prisustvu α -, β - i γ -ciklodekstrina

3.2.2.1. Priprema rastvora

Osnovni rastvori agmatina, amilorida, klonidina, moksonidina, tizanidina, harmina, efaroksana, gvanfacina, gvanabenza, idazoksana (1 mg/mL): u odmerni sud od 10 mL prenese se 10 mg ispitivane supstance, rastvori na ultrazvučnom kupatilu u 0,1 % rastvoru mravlje kiseline i dopuni 0,1 % rastvorom mravlje kiseline do crte.

Osnovni rastvori rilmenidina, triamterena, klopamida, indapamida, p-aminoklonidina, harmana: u odmerne sudove od 25 mL prenese se 5 mg rilmenidin hemifumarata, 5 mg triamterena, 12,5 mg klopamida, 12,5 mg indapamida, 12,5 mg p-aminoklonidina, 25 mg harmana, doda 10 mL 0,1 % rastvora mravlje kiseline, nekoliko kapi koncentrovane mravlje kiseline i meša na ultrazvučnom kupatilu do rastvaranja. Odmerni sudovi se dopune 0,1 % rastvorom mravlje kiseline do crte.

Radni rastvor smeše 15 jedinjenja: u odmerni sud od 25 mL prenesu se odgovarajuće zapremine osnovnih rastvora ispitivanih supstanci tako da krajnje koncentracije u rastvoru budu 0,45 mM za agmatin, 0,14 mM za klonidin, p-aminoklonidin, idazoksan i efaroksan, 0,20 mM za moksonidin i rilmenidin, 0,25 mM za amilorid, gvanabenz, harman i harmin, 0,1 mM za triamteren, klopamid i indapamid, 0,05 mM gvanfacin.

Radni rastvor smeše 11 jedinjenja: u odmerni sud od 25 mL prenesu se odgovarajuće zapremine osnovnih rastvora ispitivanih supstanci tako da krajnje koncentracije u rastvoru budu: 0,07 mM za klonidin, moksonidin i tizanidin; 0,12 mM za agmatin; 0,05 mM za gvanfacin i 0,1 mM za amilorid, harman harmin, rilmenidin, klopamid i idazoksan. Odmerni sud se dopuni vodom do crte.

Rastvori elektrolita (pufera)

Rastvor fosfatnog pufera pH 1,5: pomeša se 509 μL 85% ortofosforne kiseline i 560 μL 2,5 M rastvora NaOH sa 200 mL vode, podesi pH vrednost rastvora 85% ortofosfornom kiselinom na pH 1,5 i razblaži vodom do 250 mL.

Rastvor fosfatnog pufera pH 2,0: pomeša se 509 μL 85% ortofosforne kiseline sa 200 mL vode, pH vrednost rastvora podesi 2,5 M rastvorom NaOH na pH 2,0 i razblaži vodom do 250 mL.

Rastvor α -ciklodekstrina u puferu pH 2,0 (12 mM): u odmerni sud od 10 mL prenese se masa koja odgovara 0,1167 g α -ciklodekstrina, doda 5 mL rastvora fosfatnog pufera pH 2,0, rastvori na ultrazvučnom kupatilu i dopuni puferom do crte.

Rastvor β -ciklodekstrina u puferu pH 2,0 (15 mM): u odmerni sud od 10 mL prenese se masa koja odgovara 0,17025 g β -ciklodekstrina, doda 5 mL fosfatnog pufera pH 2,0 i rastvori na ultrazvučnom kupatilu uz blago zagrevanje. Rastvor se ohladi i dopuni puferom do crte.

Rastvor β -ciklodekstrina u puferu pH 1,5 (15 mM): u odmerni sud od 10 mL prenese se masa koja odgovara 0,17025 g β -ciklodekstrina, doda 5 mL fosfatnog pufera pH 1,5 i rastvori na ultrazvučnom kupatilu uz blago zagrevanje. Rastvor se ohladi i dopuni puferom do crte.

Rastvor γ -ciklodekstrina u puferu pH 2,0 (6 mM): u odmerni sud od 10 mL prenese se masa koja odgovara 0,0778 g γ -ciklodekstrina, doda 5 mL rastvora fosfatnog pufera pH 2,0, rastvori na ultrazvučnom kupatilu i dopuni puferom do crte.

3.2.2.2. Elektroforetski uslovi

Razdvajanje ispitivanih jedinjenja u smeši postignuto je korišćenjem neobloženih kapilara dužine 31 cm (za smešu 15 jedinjenja) i 31,5 cm (za smešu 11 jedinjenja), efektivnih dužina 23,5 (za smešu 15 jedinjenja) i 24 cm (za smešu 11 jedinjenja), unutrašnjeg prečnika 50 μm , uz primenu napona od +9 kV i pri temperaturi od 25 °C. Uzorci su injektovani u kapilaru elektrodinamičkim putem (10 kV, 1s) u triplikatu i praćeni na talasnoj dužini od 200 nm. Pre započinjanja elektroforetskog razdvajanja kapilara je ispirana 0,1 M HCl (15 min), vodom (10 min) i radnim elektrolitom (15 min).

U cilju stabilizacije elektroosmotskog toka i unutrašnje površine kapilare, kroz kapilaru je pre injektovanja ispitivane smeše jedinjenja propuštan radni elektrolit pri visokom naponu u toku 20 minuta. Između dva injektovanja kapilara je ispirana 2 minuta radnim rastvorom elektrolita (rastvorom α -, β - ili γ -ciklodekstrina u odgovarajućem puferu).

3.2.2.3. Odabir dominantnih tautomernih oblika

Hemijske strukture ispitivanih jedinjenja konstruisane su u ChemDrawUltra programu.¹⁷⁴ Za sva ispitivana jedinjenja izračunate su pK_a vrednosti i odabrani dominantni molekulski/katjonski oblici pri eksperimentalnim uslovima, pH 1,5 i pH 2,0 pomoću MarvinSketch programa.¹⁷⁵ Ciklični gvanidini i amidini (moksonidin, klonidin, tizanidin i rilmenidin) mogu biti prisutni u dva glavna tautomerna oblika, amino i imino. Sa ciljem da se dobiju precizniji rezultati odabir dominantnih tautomernih oblika je izvršen tako što su katjoni njihovih amino i imino tautomera optimizovani primenom B3LYP/6-31G(d,p) nivoa *Density Functional Theory* (DFT). U ranijim ispitivanjima odabrani metod je uspešno primenjen za optimizaciju srodnih gvanidina i amidina.¹⁸⁵ Moksonidin-amin katjon je odabran kao dominantni tautomerni oblik na osnovu niže vrednosti SCF energije (*Self Consistent Field Energy*). Za katjone amino i imino tautomera klonidina, tizanidina i rilmenidina dobijene vrednosti SCF energije su bile ekvivalentne pa su dominantni tautomerni oblici, imino oblici klonidina, tizanidina i

rilmenidina odabrani na osnovu eksperimentalno dobijenih rezultata ^1H i ^{13}C NMR spektroskopske analize.¹⁸⁶

3.2.2.4. Optimizacija ligand-ciklodekstrin kompleksa

Polazne koordinate ciklodekstrina su preuzete iz proteinske baze podataka [pdb 3ck7- α -CD, 1gvi- β -CD, 2zyk- γ -CD] (protein data bank: <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>). Geometrija α -, β -, γ -ciklodekstrina i odabranih molekulskih/katjonskih oblika ispitivanih jedinjenja i odgovarajućih tautomera je optimizovana primenom semi-empirijskog PM3 metoda u Gaussian 98 programu.¹⁸¹ Prethodna ispitivanja su pokazala da je odabrani metod pogodan za modeliranje velikih molekulskih sistema, kao što su ciklodekstrin inkluzioni kompleksi.^{91,92}

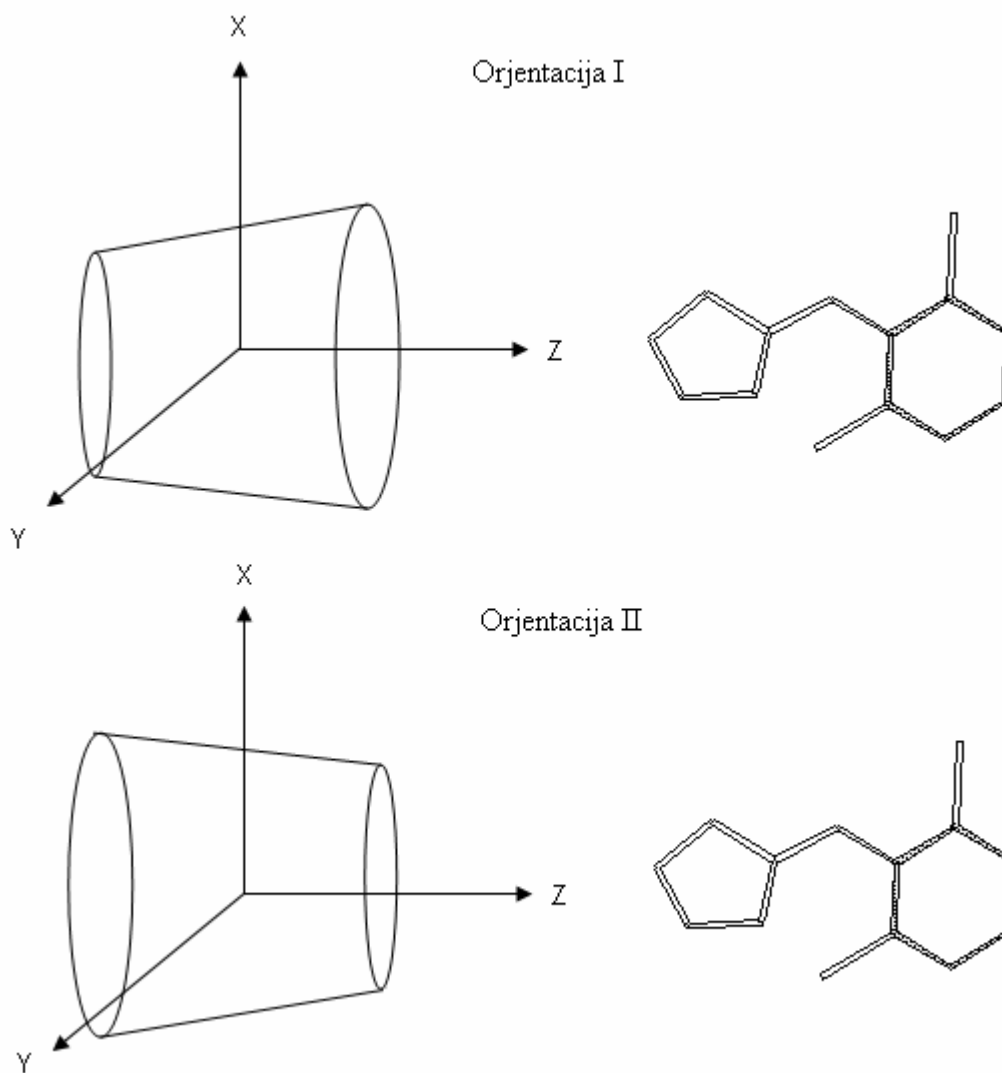
U cilju simuliranja inkluzionog procesa, glikozidni atomi kiseonika optimizovanog ciklodekstrina su postavljeni u XY ravan i njihov centar je definisan kao centar koordinacionog sistema. Ciklodekstrin je zadržan u ovoj poziciji dok je ligand uveden u CD šupljinu duž Z-ose u rastojanju od 3 do -3 Å od koordinacionog centra i sa intervalima od 1Å. Za svaki interval geometrija dobijenog kompleksa je potpuno optimizovana PM3 metodom sve dok analizom harmonijskih frekvenci nije potvrđeno da je dobijena polazna tačka stvarni minimum (sve svojstvene (*eigen*) vrednosti *Hessian*-ove matrice su bile pozitivne).

Inkluzioni proces svakog liganda, uključujući oba tautomerna oblika moksonidina, klonidina, tizanidina i rilmenidina, je ispitivan u dve moguće orijentacije: **Orijentaciji I** gde je ligand uveden u ciklodekstrin kroz širu stranu šupljine koja sadrži sekundarne alkoholne grupe i **Orijentaciji II** gde je ligand uveden kroz užu stranu šupljine koja sadrži primarne alkoholne grupe (Slika 12.). Najstabilniji kompleksi (sa najnižom SCF energijom) svakog liganda i odgovarajućeg ciklodekstrina su dalje korišćeni za proračun molekulskih deskriptora i energije kompleksiranja:

$$\Delta E = E_{\text{kompleks}} - E_{\text{ligand}} - E_{\text{CD}} \quad (4)$$

gde E_{kompleks} , E_{ligand} , and E_{CD} predstavljaju redom ukupnu energiju kompleksa, liganda i odgovarajućeg ciklodekstrina.⁹¹ Ista procedura je primenjena za sve inkluzione komplekse sa α -, β - i γ -ciklodekstrinom.

Termodinamički parametri kompleksiranja, promena entalpije (ΔH°), entropija (ΔS°) i *Gibbs*-ova slobodna energija (ΔG°) izračunati su PM3 metodom u Gaussian programu za pritisak od 1 atm i pri temperaturi od 289,15 K.



Slika 12. Orjentacije liganda i ciklodekstrina prilikom formiranja kompleksa.

3.2.2.5. Molekulski deskriptori

Gaussian 98 (B3LYP/6-31G+(d,p)/3-21G(d)/STO-3G(d,p)/STO-3G(d) i HF/3-21G(d)/STO-3G(d) bazni set),¹⁸¹ MarvinSketch¹⁷⁵ i Chem3D Ultra 7.0.0¹³² programi su korišćeni za izračunavanje konstitucionih, fizičko-hemijskih, termodinamičkih i elektronskih osobina analiziranih jedinjenja (odabranih dominantnih katjonskih/molekulskih i tautomernih oblika) i njihovih kompleksa. Grupi izračunatih deskriptora dodati su i kvantno-hemijski deskriptori kao što su hemijski potencijal (μ), elektronegativnost (χ), *hardness* (η), *global softness* (S) i indeks elektrofilnosti (ω) koji se veoma često koriste u interpretaciji različitih aspekata hemijskog vezivanja i reakcionih mehanizama. Hemijski potencijal, elektronegativnost, *hardness* (otpornost na transfer elektrona) i *softness* (hemijska reaktivnost, sposobnost delokalizacije naelektrisanja)¹⁸⁷⁻¹⁸⁹ se prema *Koopman*-ovoj teoremi definišu kao:

$$\mu = \frac{(E_{LUMO} + E_{HOMO})}{2} \quad (5)$$

$$\chi = -\mu \quad (6)$$

$$\eta = \frac{(E_{LUMO} - E_{HOMO})}{2} \quad (7)$$

$$S = \frac{1}{2\eta} = \frac{1}{(E_{LUMO} - E_{HOMO})} \quad (8)$$

Hemijski potencijal ukazuje na tendenciju elektrona da se odvoji, *hardness* se može opisati kao otpornost na transfer elektrona, *softness* je koristan za jednostavno predviđanje hemijske reaktivnosti.^{134,190-192} Indeks elektrofilnosti je predložen kao mera smanjenja energije do koje dolazi usled maksimalnog protoka elektrona između donora i akceptora ($\omega = \chi^2/2\eta$).¹⁹³

Svi izračunati deskriptori su predstavljeni u Tabeli 3. Pojedini deskriptori su računati i za ligande i za ligand-CD komplekse, dok su drugi računati samo za ligande ili komplekse. Ukupno je izračunato 47 deskriptora liganada i po 13 deskriptora kompleksa za svaki CD (α -, β - i γ -CD). Odabir najbolje grupe deskriptora vršen je nezavisno za svaki CE sistem koji sadrži α -, β - ili γ -CD tako što su izračunati

deskriptori korelisani sa RMT (relativnim migracionim vremenom, $RMT = t_{\text{analit}}(\text{min})/t_{\text{agmatin}}(\text{min})$) ispitivanih jedinjenja u prisustvu α -, β - ili γ -CD odvojeno. Deskriptori sa konstantnim vrednostima su eliminisani. Među deskriptorima koji su pokazali visoku interkorelaciju ($r > 0,99$) zadržan je deskriptor koji je imao veću korelaciju sa Y, dok je drugi eliminisan iz grupe.¹⁶² Na kraju, ukupan broj deskriptora liganada i odgovarajućih kompleksa koji je korišćen u QSMR analizi bio je 53 za α -CD, 52 za β -CD i 52 za γ -CD.

U slučaju *multi-target* QSMR (mQSMR) analize razmatrani su samo deskriptori liganada. Među kolinearnim deskriptorima (sa interkorelacijom $r > 0,99$) zadržan je deskriptor koji je imao veću korelaciju sa većinom zavisnih promenljivih, RMT u prisustvu α -CD (Y1), β -CD (Y2) i γ -CD (Y3), dok je drugi eliminisan iz grupe podataka. Na kraju, ukupno 40 deskriptora liganada je korišćeno u mQSMR analizi.

Tabela 3. Izračunati deskriptori korišćeni u QSMR analizi i njihove skraćenice

Programi	Deskriptori
Chem3D	Energija savijanja (Eb), Naelektrisanje-dipol energija (Ecd), Dipol-dipol energija (Ed), Energija istezanja (Es), Energija istezanja-savijanja (Esb), Torziona energija (Et), Ukupna Energija (E), <i>van der Waals</i> -ova 1,4 energija (E14), ne <i>van der Waals</i> -ova 1,4 energija (Ev), Particioni koeficijent (oktanol/voda)(ClogP), Molarna refraktivnost (MR), Balaban indeks (Bindx), Broj klastera (ClsC), Prečnik (Diam), Površina dostupna rastvaraču (SAS), Molekulska površina (MS), Zapremina molekula (SEV), Egzaktna masa (Mass), Molekulski topološki indeks (Tindx), <i>Ovality</i> , Glavni moment inercije-X (PMIX), Glavni moment inercije-Y (PMIY), Glavni moment inercije-Z (PMIZ), Zbir stepeni (Sdeg), Zbir valencionih stepeni (SVDe), Ukupna povezanost (TCon), Ukupna valencionna povezanost (TVCon), <i>Wiener</i> indeks (WIndx), Karakteristika oblika (ShpA), Koeficijent oblika (ShpC).
MarvinSketch	logP nejonskih vrsta, Distribucionni koeficijent (logD), Površina polarnog dela molekule (PSA), Površina dostupna rastvaraču (SASA), <i>van der Waals</i> -ova površina, Donor vodonične veze (HBD), Akceptor vodonične veze (HBA), Refraktivnost, Naelektrisanje.
Gaussian	Dipol, Energija najviše popunjene molekulske orbitale (HOMO), Energija najniže nepopunjene molekulske orbitale (LUMO), Hemijski potencijal (μ), Elektronegativnost (χ), Otpornost na transfer elektrona (η), Sposobnost delokalizacije naelektrisanja (S), Indeks elektrofilnosti (ω), Energija kompleksiranja (ΔE), <i>Gibbs</i> -ova energija (ΔG), Entalpija (ΔH), Entropija (ΔS).
MOPAC	Toplota formiranja (Hf)

3.2.3. QSRR i QSMR studija liganada imidazolinskih i alfa adrenergičkih receptora

3.2.3.1. Priprema rastvora pufera za CE i HPLC analizu

Priprema rastvora pufera pH 4,4: u odmerni sud od 500 mL prenese se i rastvori u vodi 0,5 g NaOH, doda 1,8 mL glacijalne sirćetne kiseline i dopuni vodom do crte. Jonska jačina dobijenog rastvora iznosi 25 mmol/L.

Priprema rastvora pufera pH 7,4: U odmerni sud od 500 mL prenese se i rastvori u vodi 0,68466 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, doda 3,77 mL rastvora 1M NaOH i dopuni vodom do crte. Jonska jačina dobijenog rastvora iznosi 25 mmol/L.

Priprema boratnog pufera pH 9,1: U odmerni sud od 500 ml prenese se i rastvori u vodi 1,6014 g H_3BO_3 doda 12,65 mL 1M NaOH i dopuni vodom do crte. Jonska jačina dobijenog rastvora iznosi 25 mmol/L.

Priprema amonijum acetatnog pufera pH 9,1: U odmerni sud od 500 mL prenese se i rastvori u vodi 0,9635 g amonijum acetata, podese pH vrednost amonijakom na pH 9,1 i dopuni vodom do crte. Jonska jačina dobijenog rastvora iznosi 25 mmol/L.

3.2.3.2. Priprema rastvora za HPLC analizu

Priprema osnovnih rastvora

Osnovni rastvori efaroksana, amilorida, tizanidina, idazoksana, klonidina, nafazolina, ksilometazolina, tramazolina, tetrahidrozolina, oksimetazolina, efedrina, pseudoefedrina, fenilefrina, maprotilina, tamsulosina, harmana, harmina, klopamida, indapamida, moksonidina, rilmenidina, mianserina, doksazosina, karvedilola, klozapina, olanzapina, gvanfacina, triamterena, brimonidina (1 mg/mL): U odmerni sud od 10 mL prenese se 10 mg ispitivane supstance rastvori na ultravučnom kupatilu u 7 mL metanola i dopuni metanolom do crte.

Priprema radnih rastvora

Radni rastvori efaroksana, amilorida, tizanidina, idazoksana, klonidina, nafazolina, ksilometazolina, tramazolina, tetrahidrozolina, oksimetazolina, efedrina, pseudoefedrina, fenilefrina, maprotilina, tamsulosina, harmana, harmina, klopamida, indapamida, moksonidina, rilmenidina, mianserina, doksazosina, karvedilola, klozapina, olanzapina, gvanfacina, triamterena, brimonidina (0,1 mg/mL): u odmerni sud od 10 mL prenese se 1 mL osnovnog rastvora i dopuni metanolom do crte.

Radni rastvor rilmenidina (0,7 mg/mL): u odmerni sud od 10 mL odmeri se 7 mg rilmenidin hemifumarata, rastvori na ultrazvučnom kupatilu u 7 mL metanola i dopuni metanolom do crte.

3.2.3.3. Priprema rastvora za kapilarnu elektroforezu

Priprema osnovnih rastvora

Osnovni rastvori efaroksana, amilorida, tizanidina, idazoksana, klonidina, nafazolina, ksilometazolina, tramazolina, tetrahidrozolina, oksimetazolina, efedrina, pseudoefedrina, fenilefrina, maprotilina i tamsulosina u vodi ($c=1$ mg/mL): odmeri se 10 mg ispitivane supstance, prenese u odmerni sud od 10 mL, rastvori u vodi i dopuni vodom do crte.

Osnovni rastvor gvanfacina u vodi ($c=0,5$ mg/mL): odmeri se 5 mg gvanfacina, prenese u odmerni sud od 10 mL, rastvori u vodi i dopuni vodom do crte.

Osnovni rastvor brimonidina u 0,1 % rastvoru mravlje kiseline ($c=1$ mg/mL): odmeri se 10 mg brimonidina, prenese u odmerni sud od 10 mL, rastvori u 0,1 % rastvoru mravlje kiseline i dopuni istim rastvaračem do crte.

Osnovni rastvori harmana, harmina, klopamida, indapamida, moksonidina, rilmenidina, mianserina, doksazosina, karvedilola, klozapina i olanzapina u metanolu ($c=3$ mg/mL): u odmerni sud od 5 mL prenese se 15 mg ispitivane supstance, rastvori u metanolu i dopuni metanolom do crte.

Osnovni rastvor triamterena u metanolu (c=0,29 mg/mL): u odmerni sud od 25 mL prenese se 7,25 mg triamterena, rastvori u metanolu i dopuni metanolom do crte.

Priprema radnih rastvora

Radni rastvori efaroksana, amilorida, tizanidina, idazoksana, klonidina, nafazolina, ksilometazolina, tramazolina, tetrahidrozolina, oksimetazolina, efedrina, pseudoefedrina, fenilefrina, maprotilina i tamsulosina (30 µg/mL): u odmerni sud od 5 ml prenese se 150 µL osnovnog rastvora u vodi (c=1 mg/mL), doda 100 µL acetona i dopuni vodom do crte.

Radni rastvor gvanfacina (15 µg/mL): u odmerni sud od 5 mL prenese se 150 µL osnovnog rastvora gvanfacina u vodi (0,5 mg/mL), doda 100 µL acetona i dopuni vodom do crte.

Radni rastvori efedrina i pseudoefedrina (45 µg/mL): u odmerni sud od 5 mL prenese se 225 µL osnovnog rastvora efedrina i pseudoefedrina u vodi (c=1 mg/mL), doda 100 µL acetona i dopuni vodom do crte.

Radni rastvori harmana, harmina, klopamida, indapamida, moksonidina, rilmenidina, mianserina, doksazosina, karvedilola, klozapina, olanzapina (30 µg/mL): u odmerni sud od 10 mL prenese se 100 µL osnovnog rastvora u metanolu doda 200 µL acetona i dopuni vodom do crte.

Radni rastvor rilmenidina (60 µg/mL): u odmerni sud od 10 mL prenese se 200 µL osnovnog rastvora rilmenidina u metanolu, doda 200 µL acetona i dopuni vodom do crte.

Radni rastvor triamterena (5,8 µg/mL): u odmerni sud od 10 mL prenese se 200 µL osnovnog rastvora triamterena u metanolu, doda 200 µL acetona i dopuni vodom do crte.

Pre injektovanja svi rastvori su profiltrirani kroz membranske filtere 0,22 μm .

3.2.3.4. Određivanje $\log K_w$ vrednosti reverzno-faznom tečnom hromatografijom pod visokim pritiskom

Za određivanje $\log K_w$ vrednosti primenjena je reverzno-fazna tečna hromatografija pod visokim pritiskom (RP-HPLC). Sva jedinjenja su injektovana u zaprimini od 20 μL i analizirana pri izokratskim uslovima na XTerra[®] RP18, 4.6 x 100 mm, 3.5 μm koloni, pri protoku od 0,8 mL/min, na sobnoj temperaturi i korišćenjem UV detekcije u oblasti talasnih dužina od 200-280 nm.

U zavisnosti od lipofilnosti ispitivanih jedinjenja i pH vrednosti pufera (pH 4,4; 7,4 ili 9,1) najmanje 6 mobilnih faza metanol/pufer sa udelom metanola od 75-2 % je primenjeno za određivanje retencionog vremena i izračunavanje retencionog faktora K prema sledećoj formuli:

$$K = (t_r - t_0) / t_0 \quad (1)$$

gde je t_r retenciono vreme analita, a t_0 *dead volume* (retenciono vreme mobilne faze) određeno injektovanjem vodenog rastvora KNO_3 kao markera koji se ne zadržava na koloni.

Na osnovu linearne zavisnosti logaritma retencionog faktora, $\log K$ i volumenske frakcije organskog rastvarača u mobilnoj fazi ϕ koju je dao *Snyder*:

$$\log K = \log K_w + S\phi \quad (2)$$

izračunata je vrednost $\log K_w$ koja u datoj jednačini predstavlja odsečak, dok konstanta S odgovara nagibu linearne krive.

Zbog velike razlike u lipofilnosti između ispitivanih jedinjenja, nije bilo moguće pratiti retenciju svih jedinjenja u istom opsegu mobilnih faza. Najlipofilnija jedinjenja kao što su doksazosin, karvedilol, klozapin, maprotilin praćena su sa većim udelom metanola u mobilnoj fazi dok su hidrofilna jedinjenja kao što su fenilefrin, efedrin,

pseudoefedrin, brimonidin i moksonidin praćena sa znatno manjim udelom organskog rastvaraća.

Za svako ispitivano jedinjenje određene su $\log K_w$ vrednosti za tri različita sistema metanol/pufer pH 4,4; metanol/pufer pH 7,4 i metanol/pufer pH 9,1 koje redom odgovaraju $\log K_{w4,4}$, $\log K_{w7,4}$ i $\log K_{w9,1}$ vrednostima.

3.2.3.5. Određivanje efektivne elektroforetske pokretljivosti metodom kapilarne elektroforeze

Efektivna elektroforetska pokretljivost jedinjenja za tri različite pH vrednosti elektrolita određena je korišćenjem neobložene kapilare dužine 31,5 cm (efektivna dužina 24 cm) i unutrašnjeg dijametra 50 μm . Pre upotrebe kapilara je kondicionirana 15 minuta 0,1 M NaOH, 10 minuta vodom i 10 minuta radnim elektrolitom (rastvor pufera pH 4,4; 7,4 ili 9,1). U cilju stabilizacije elektroosmotskog toka (*ElectroOsmotic Flow*, EOF) i unutrašnje površine kapilare, pre injektovanja uzoraka kroz kapilaru je propušten radni elektrolit pod visokim naponom u toku 20 minuta. Svi uzorci su zatim injektovani hidrodinamičkim putem u triplikatu, pri naponu od 11 kV i temperaturi od 25°C, i praćeni na talasnoj dužini od 200 nm. Između dva injektovanja kapilara je ispirana rastvorom radnog elektrolita 1 minut. Kao marker elektroosmotskog toka korišćen je 2% v/v aceton.

Efektivna elektroforetska pokretljivost, μ_{eff} analita pri datoj pH vrednosti elektrolita izračunata je na osnovu eksperimentalno dobijenih podataka prema sledećoj formuli:

$$\mu_{eff} = l_t l_{eff} / U (1/t_m - 1/t_{eof}) \quad (9)$$

Gde je l_t ukupna dužina kapilare, l_{eff} , efektivna dužina kapilare, U primenjeni napon, t_m migraciono vreme analita, t_{eof} migraciono vreme elektroneutralnog EOF markera.

Efektivna elektroforetska pokretljivost svakog jedinjenja određena je pri tri različite pH vrednosti elektrolita: pH 4,4; pH 7,4 i pH 9,1 što odgovara redom $\mu_{eff 4,4}$, $\mu_{eff 7,4}$ i $\mu_{eff 9,1}$ vrednostima.

3.2.3.6. Optimizacija konformacije ispitivanih jedinjenja i izračunavanje molekulskih deskriptora

Hemijske strukture ispitivanih jedinjenja konstruisane su u ChemDrawUltra programu.¹⁷⁴ U cilju odabira dominantnih tautomernih oblika moksonidina, klonidina, rilmenidina, tizanidina, brimonidina i tramazolina, neutralni amino i imino tautomeri ovih jedinjenja su optimizovani primenom B3LYP/6-31G(d,p) nivoa *Density Functional Theory* (DFT). Kao dominantni tautomeri oblici, na osnovu niže SCF energije, izdvojeni su amino tautomer rilmenidina i imino tautomeri ostalih jedinjenja.

Za sva ispitivana jedinjenja (uključujući dominantne tautomerne oblike) izračunate su pK_a vrednosti i odabrani dominantni molekulski/katjonski oblici pri tri različite pH vrednosti (pH 4,4; pH 7,4 i pH 9,1) pomoću MarvinSketch programa.¹⁷⁵ Kompletna geometrijska optimizacija odabranih dominantnih tautomernih i molekulskih/katjonskih oblika pri datim pH vrednostima izvršena je primenom B3LYP/3-21G(d,p)^{gas} nivoa *Density Functional Theory* (DFT) u Gaussian 98 programu.¹⁸¹

Za sve optimizovane strukture primenom Gaussian 98 (B3LYP/3-21G(d,p), MarvinSketch, Chem3D Ultra 7.0.0 i Dragon 6.0 programa¹⁹⁴ izračunato je 2400 molekulskih deskriptora podeljenih u 20 klasa. Odabir najboljeg seta deskriptora vršen je nezavisno za svaki HPLC ($\log K_{w4,4}$; $\log K_{w7,4}$ i $\log K_{w9,1}$) i CE ($\mu_{\text{eff } 4,4}$; $\mu_{\text{eff } 7,4}$ i $\mu_{\text{eff } 9,1}$) sistem. Deskriptori sa konstantnim vrednostima su eliminisani. Među deskriptorima koji su pokazali visoku interkorelaciju ($r > 0,99$) zadržan je deskriptor koji je imao veću korelaciju sa Y, dok je drugi eliminisan iz seta.

3.2.4. Određivanje kiselinno-baznih konstanti jonizacije metodom kapilarne elektroforeze

3.2.4.1. Priprema rastvora analiziranih supstanci

Priprema osnovnih rastvora

Osnovni rastvori efaroksana, tizanidina, idazoksana i klonidina u vodi (c=1 mg/mL): odmeri se 10 mg ispitivane supstance, prenese u odmerni sud od 10 mL, rastvori u vodi i dopuni vodom do crte.

Osnovni rastvor gvanfacina u vodi (c=0,5 mg/mL): odmeri se 5 mg ispitivane supstance, prenese u odmerni sud od 10 mL, rastvori u vodi i dopuni vodom do crte.

Osnovni rastvori harmana, harmina, moksonidina i rilmenidina u metanolu (c=3 mg/mL): u odmerni sud od 5 mL prenese se 15 mg ispitivane supstance, rastvori u metanolu i dopuni metanolom do crte.

Osnovni rastvor triamterena u metanolu (c=0,29 mg/mL): u odmerni sud od 25 mL prenese se 7,25 mg ispitivane supstance, rastvori u metanolu i dopuni metanolom do crte.

Priprema radnih rastvora

Radni rastvori efaroksana, tizanidina, idazoksana i klonidina (30 µg/mL): u odmerni sud od 5 mL prenese se 150 µL osnovnog rastvora u vodi (c=1 mg/mL), doda 100 µL acetona i dopuni vodom do crte.

Radni rastvor gvanfacina (15 µg/mL): u odmerni sud od 5 mL prenese se 150 µL osnovnog rastvora gvanfacina u vodi (0,5 mg/mL), doda 100 µL acetona i dopuni vodom do crte.

Radni rastvori harmana, harmina i moksonidina (30 µg/mL): U odmerni sud od 10 mL prenese se 100 µL osnovnog rastvora u metanolu, doda 200 µL acetona i dopuni vodom do crte.

Radni rastvor rilmenidina (60 µg/mL): u odmerni sud od 10 mL prenese se 200 µL osnovnog rastvora rilmenidina u metanolu, doda 200 µL acetona i dopuni vodom do crte.

Radni rastvor triamterena (5,8 µg/mL): u odmerni sud od 10 mL prenese se 200 µL osnovnog rastvora triamterena u metanolu, doda 200 µL acetona i dopuni vodom do crte.

3.2.4.2. Priprema rastvora pufera

Priprema rastvora pufera pH vrednosti u opsegu 4,0-11,0 i konstantne jonske jačine ($I=25$ mmol/L) je prikazana u Tabeli 4. Za pripremu odgovarajućih pufera korišćene su sledeće pK_a vrednosti: sirćetna kiselina 4,76; fosforna kiselina 7,20 i 12,33; borna kiselina 9,23. Vrednost pH je merena na 25°C i bez dodatnog podešavanja. Svi rastvori su pripremani neposredno pre upotrebe i filtrirani kroz 0,45 µm membranske filtere.

3.2.4.2.1. Priprema acetatnog pufera (CH_3COOH/CH_3COONa)

Acetatni pufer je korišćen za merenje efektivne elektroforetske pokretljivosti u rasponu teorijskih pH od 4,10 do 5,70. U rastvoru acetatnog pufera pH vrednost se može izračunati prema sledećoj jednačini:

$$pH = pK_a + \log \frac{C_b}{C_k} \quad \left(\frac{C_b}{C_k} = 10^{pH - pK_a} \right) \quad (10)$$

U kojoj je $C_b = C_{CH_3COONa}$, a $C_k = C_{CH_3COOH}$

Jonska jačina datog pufera je jednaka:

$$I = \frac{1}{2} \sum_i c_i z_i^2 = \frac{1}{2} (C_{\text{CH}_3\text{COO}^-} + C_{\text{Na}^+}) = \frac{1}{2} (C_b + C_b) \quad (11)$$

i zajedno sa jednačinom 10 predstavlja sistem od 2 jednačine sa 2 nepoznate u kojima je $I=C_b$.

Tabela 4. Sastav pufera odgovarajuće pH vrednosti i konstantne jonske jačine ($I=25$ mmol/L)

Priprema pufera	Teorijska pH	Izmerena pH	Struja [μA]
CH ₃ COOH 124,50 mM; NaOH 25 mM	4,10	4,08	16-17
CH ₃ COOH 74,90 mM; NaOH 25 mM	4,40	4,37	16-17
CH ₃ COOH 50,00 mM; NaOH 25 mM	4,70	4,67	16-17
CH ₃ COOH 35,00 mM; NaOH 25 mM	5,10	5,07	16-17
CH ₃ COOH 30,00 mM; NaOH 25 mM	5,40	5,37	16-17
CH ₃ COOH 27,50 mM; NaOH 25 mM	5,70	5,63	16-17
NaH ₂ PO ₄ 20,43 mM; NaOH 2,28 mM	6,30	6,03	15-16
NaH ₂ PO ₄ 16,89 mM; NaOH 4,06 mM	6,70	6,42	14-15
NaH ₂ PO ₄ 14,09 mM; NaOH 5,45 mM	7,00	6,72	14-15
NaH ₂ PO ₄ 11,82 mM; NaOH 6,59 mM	7,30	6,97	13-14
NaH ₂ PO ₄ 9,76 mM; NaOH 7,62 mM	7,75	7,33	13-14
NaH ₂ PO ₄ 8,81 mM; NaOH 8,09 mM	8,25	7,60	13-14
H ₃ BO ₃ 214,60 mM; NaOH 25 mM	8,35	7,91	14-15
H ₃ BO ₃ 159,30 mM; NaOH 25 mM	8,50	8,24	14-15
H ₃ BO ₃ 109,70 mM; NaOH 25 mM	8,70	8,56	14-15
H ₃ BO ₃ 92,30 mM; NaOH 25 mM	8,80	8,73	14-15
H ₃ BO ₃ 62,80 mM; NaOH 25 mM	9,05	8,92	14-15
H ₃ BO ₃ 51,80 mM; NaOH 25 mM	9,20	9,13	15-16
H ₃ BO ₃ 40,10 mM; NaOH 25 mM	9,45	9,33	15-16
H ₃ BO ₃ 35,70 mM; NaOH 25 mM	9,60	9,49	15-16
H ₃ BO ₃ 30,30 mM; NaOH 25 mM	9,90	9,84	15-16
H ₃ BO ₃ 27,70 mM; NaOH 25 mM	10,20	10,09	15-16
H ₃ BO ₃ 25,80 mM; NaOH 25 mM	10,70	10,48	15-16
Na ₂ HPO ₄ 7,20 mM; NaOH 1,13 mM	11,60	10,68	12-13
Na ₂ HPO ₄ 6,56 mM; NaOH 1,78 mM	11,90	10,98	13-14

Za zadato pH i jonsku jačinu pufera ($I=25$ mmol/L), izračunavanje C_k i C_b je izvršeno u Excelu prema sledećim jednačinama:

$$\boxed{C_b = I} \quad (12)$$

$$\boxed{C_k = \frac{I}{10^{\text{pH}-\text{p}K_a}}} \quad (13)$$

Puferi odgovarajuće pH vrednosti su pripremljeni mešanjem izračunatih koncentracija CH_3COOH i NaOH (Tabela 4.), pri čemu je početna koncentracija CH_3COOH iznosila: $C^{\circ}_{\text{CH}_3\text{COOH}} = C_b + C_k$, gde je $C_b = C_{\text{NaOH}}$.

3.2.4.2.2. Priprema fosfatnog pufera ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$)

Fosfatni pufer je korišćen za merenje efektivne elektroforetske pokretljivosti u rasponu teorijskih pH od 6,30 do 8,25. U rastvoru fosfatnog pufera pH vrednost se može izračunati prema jednačini 10 u kojoj je $C_b = C_{\text{Na}_2\text{HPO}_4}$, a $C_k = C_{\text{NaH}_2\text{PO}_4}$.

Jonska jačina datog pufera je jednaka:

$$I = \frac{1}{2} \sum_i c_i z_i^2 = \frac{1}{2} \left(\overbrace{C_{\text{Na}^+} + C_{\text{H}_2\text{PO}_4^-}}^{C_{\text{NaH}_2\text{PO}_4}} + \overbrace{2C_{\text{Na}^+} + 2^2 c_{\text{HPO}_4^{2-}}}^{C_{\text{Na}_2\text{HPO}_4}} \right) \quad (14)$$

$$I = \frac{1}{2} (C_k + C_k + 2C_b + 4C_b) \quad (15)$$

Jednačine 10 i 15 predstavljaju sistem od 2 jednačine sa 2 nepoznate u kojima je

$$I = C_k + 3C_b \quad \text{i} \quad \frac{C_b}{C_k} = 10^{\text{pH}-\text{p}K_a}. \quad \text{Iz datih jednačina se mogu izračunati}$$

C_b i jonska jačina rastvora I ($C_b = C_k 10^{\text{pH}-\text{p}K_a}$; $I = C_k + 3C_k 10^{\text{pH}-\text{p}K_a}$).

Za zadato pH i jonsku jačinu ($I=25$ mmol/L) koncentracije kiseline i baze izračunate su u Excelu prema sledećim jednačinama:

$$C_k = \frac{I}{1 + 3 \cdot 10^{\text{pH} - \text{p}K_a}} \quad (16)$$

$$C_b = \frac{I 10^{\text{pH} - \text{p}K_a}}{1 + 3 \cdot 10^{\text{pH} - \text{p}K_a}} \quad (17)$$

Puferi su pripremljeni mešanjem odgovarajućih koncentracija NaH_2PO_4 i NaOH (Tabela 4.), pri čemu je početna koncentracija NaH_2PO_4 iznosila: $C^{\circ}_{\text{NaH}_2\text{PO}_4} = C_b + C_k$,
gde je $C_b = C_{\text{NaOH}}$.

3.2.4.2.3. Priprema boratnog pufera ($\text{H}_3\text{BO}_3/\text{NaH}_2\text{BO}_3$)

Boratni pufer je korišćen za merenje efektivne elektroforetske pokretljivosti u rasponu teorijskih pH od 8,35 do 10,70. U rastvoru boratnog pufera pH vrednost se može izračunati prema sledećoj jednačini 10 u kojoj je $C_b = C_{\text{NaH}_2\text{BO}_3}$, a $C_k = C_{\text{H}_3\text{BO}_3}$.

Jonska jačina datog pufera je jednaka:

$$I = \frac{1}{2} \sum_i c_i z_i^2 = \frac{1}{2} (C_{\text{Na}^+} + C_{\text{H}_2\text{BO}_3^-}) = \frac{1}{2} (C_b + C_k) \quad (18)$$

i zajedno sa jednačinom 10 predstavlja sistem od 2 jednačine sa 2 nepoznate u kojoj je $I = C_b$.

Za zadato pH i jonsku jačinu pufera ($I=25$ mmol/L), izračunavanje C_k i C_b je izvršeno u Excelu prema jednačinama 12 i 13.

Puferi su pripremljeni mešanjem odgovarajućih koncentracija H_3BO_3 i NaOH (Tabela 4.), pri čemu je početna koncentracija H_3BO_3 iznosila: $C^{\circ}_{\text{H}_3\text{BO}_3} = C_b + C_k$, gde je $C_b = C_{\text{NaOH}}$.

3.2.4.2.4. Priprema fosfatnog pufera ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{Na}_3\text{PO}_4$)

Fosfatni pufer je korišćen za merenje efektivne elektroforetske pokretljivosti u rasponu teorijskih pH od 11,60 do 11,90. U rastvoru fosfatnog pufera pH vrednost se može izračunati prema jednačini 10 u kojoj je $C_b = C_{\text{Na}_3\text{PO}_4}$, a $C_k = C_{\text{Na}_2\text{HPO}_4}$.

Jonska jačina datog pufera je jednaka:

$$I = \frac{1}{2} \sum_i c_i z_i^2 = \frac{1}{2} \left(\overbrace{3C_{\text{Na}^+} + 3^2 C_{\text{PO}_4^{3-}}}^{C_{\text{Na}_3\text{PO}_4}} + \overbrace{2C_{\text{Na}^+} + 2^2 c_{\text{HPO}_4^{2-}}}^{C_{\text{Na}_2\text{HPO}_4}} \right) \quad (19)$$

$$I = \frac{1}{2} (3C_b + 9C_b + 2C_k + 4C_k) = \frac{1}{2} (12C_b + 6C_k) \quad (20)$$

i zajedno sa jednačinom 10 predstavlja sistem od 2 jednačine sa 2 nepoznate u kojima je:

$$I = 6C_b + 3C_k \quad (20)$$

$$\frac{C_b}{C_k} = 10^{\text{pH} - \text{p}K_a} \quad (10)$$

Iz datih jednačina se mogu izračunati C_b i jonska jačina rastvora I ($C_b = C_k 10^{\text{pH} - \text{p}K_a}$; $I = 6C_k 10^{\text{pH} - \text{p}K_a} + 3C_k$).

Za zadato pH i jonsku jačinu pufera ($I=25$ mmol/L), izračunavanje C_k i C_b je izvršeno u Excelu prema sledećim jednačinama:

$$C_k = \frac{I}{3 + 6 \cdot 10^{\text{pH} - \text{p}K_a}} \quad (21)$$

$$C_b = \frac{I 10^{\text{pH} - \text{p}K_a}}{3 + 6 \cdot 10^{\text{pH} - \text{p}K_a}} \quad (22)$$

Puferi su pripremljeni mešanjem odgovarajućih koncentracija Na_2HPO_4 i NaOH (Tabela 4.), pri čemu je početna koncentracija Na_2HPO_4 iznosila: $C^{\circ}_{\text{Na}_2\text{HPO}_4} = C_b + C_k$,
 gde je $C_b = C_{\text{NaOH}}$.

3.2.4.3. Određivanje efektivne elektroforetske pokretljivosti

Efektivna elektroforetska pokretljivost jedinjenja u opsegu pH vrednosti od 4,0-11,0 određena je korišćenjem neobložene kapilare dužine 31,5 cm (efektivna dužina 24 cm) i unutrašnjeg dijametra 50 μm . Pre upotrebe kapilara je kondicionirana 15 minuta 0,1 M NaOH , 10 minuta vodom i 10 minuta radnim elektrolitom. U cilju stabilizacije elektroosmotskog toka (EOF) i unutrašnje površine kapilare, pri svakoj pH vrednosti pre injektovanja uzoraka, kroz kapilaru je propušten radni elektrolit pod visokim naponom u toku 20 minuta. Svi uzorci su zatim injektovani hidrodinamičkim putem u triplikatu, pri naponu od 11 kV i temperaturi od 25°C, i praćeni na talasnoj dužini od 200 nm. Između dva injektovanja kapilara je ispirana rastvorom radnog elektrolita 1 minut. Prilikom promene radnog elektrolita odgovarajuće pH vrednosti kapilara je ispirana 0,1 M NaOH 5 min, a zatim ponovo kondicionirana pre injektovanja uzoraka. Kao marker elektroosmotskog toka korišćen je 2% v/v aceton.

Efektivna elektroforetska pokretljivost analita μ_{eff} pri datoj pH vrednosti elektrolita izračunata je na osnovu eksperimentalno dobijenih podataka prema sledećoj formuli:

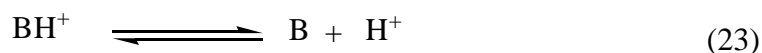
$$\mu_{\text{eff}} = \frac{l_t l_{\text{eff}}}{U} \left(\frac{1}{t_m} - \frac{1}{t_{\text{eof}}} \right) \quad (9)$$

gde je l_t ukupna dužina kapilare, l_{eff} efektivna dužina kapilare, U primenjeni napon, t_m migraciono vreme analita, t_{eof} migraciono vreme elektroneutralnog EOF markera.

3.2.4.4. Teorija kiselinsko-bazne ravnoteže

Ispitivani ligandi α_2 -adrenergičkih i/ili imidazolinskih receptora i diuretik triamteren su organske baze koje su u kiseljoj, neutralnoj i slabo baznoj sredini prisutne u formi katjona usled protonavanja atoma azota imidazolinskog prstena (idazoksan, efaroksan), gvanidinske grupe (gvanfacin), cikličnog gvanidina: 2-amino-2-imidazolina (klonidin, moksonidin, tizanidin) i 2-amino-pirimidina (triamteren), oksazolinskog prstena (rilmenidin) ili azota piridina β -karbolina (harman, harmin).

Termodinamička konstanta jonizacije monoprotonskih baza se može definisati kao:



$$K_a^T = \frac{a_B a_{\text{H}^+}}{a_{\text{BH}^+}} = \frac{c_B \gamma_B a_{\text{H}^+}}{c_{\text{BH}^+} \gamma_{\text{BH}^+}} \quad (24)$$

gde je a_{H^+} aktivitet vodonikovih jona, a_B i a_{BH^+} aktiviteti neutralne i protonovane forme leka. Aktiviteti B i BH^+ se mogu izraziti kao proizvodi odgovarajućih molarnih koncentracija c_B i c_{BH^+} i odgovarajućih koeficijenata aktiviteta γ_B i γ_{BH^+} .

Koeficijent aktiviteta naelektrisanih vrsta se može izračunati na osnovu *Debye-Huckel*-ove teorije prema jednačini:

$$\log \gamma_{\text{BH}^+} = -\frac{0,5085z^2\sqrt{I}}{1+3,281a\sqrt{I}} \quad (25)$$

gde su z i a naelektrisanje, odnosno efektivni dijametar hidratisanog jona. Prosečna vrednost $a=0,5$ nm je korišćena za računanje koeficijenata aktiviteta, pošto su tačne vrednosti dijametara hidratisanih jona uglavnom nepoznate. I je jonska jačina rastvora (mol/dm^3) i računa se prema jednačini:

$$I = \frac{1}{2} \sum_i c_i z_i^2 \quad (11)$$

gde je c_i molarna koncentracija i z_i naelektrisanje i -tog jona u rastvoru. Pošto je pH vrednost elektrolita povezana sa aktivitetom vodonikovih jona a_{H^+} , a eksperimentalno određene efektivne pokretljivosti sa molarnom koncentracijom jonskih vrsta, uvedena je tzv. „mešovita“ konstanta jonizacije, K_a koja predstavlja:

$$K_a = \frac{a_{H^+} c_B}{c_{BH^+}} \quad (26)$$

Uzimajući u obzir da je koeficijent aktiviteta elektroneutralnih oblika baze jednak jedinici, zavisnost termodinamičke i mešovite konstante jonizacije se može prikazati kao:

$$K_a^T = \frac{K_a}{\gamma_{BH^+}} \quad (27)$$

odnosno logaritmovanjem i uzimanjem u obzir da je $pK_a^T = -\log K_a^T$

$$pK_a^T = pK_a + \log \gamma_{BH^+} \quad (28)$$

Efektivna pokretljivost monoprotanske baze, μ_{eff} je jednaka:

$$\mu_{\text{eff}} = \frac{\mu_{BH^+} c_{BH^+}}{c_{BH^+} + c_B} \quad (29)$$

gde je μ_{BH^+} stvarna jonska pokretljivost protonovanog oblika baze, BH^+ . Korišćenjem jednačina (26) i (29) dobijena je zavisnost efektivne elektroforetske pokretljivosti, μ_{eff} baze B, od pH vrednosti elektrolita:

$$\mu_{\text{eff}} = \frac{\mu_{\text{BH}^+}}{1 + 10^{\text{pH} - \text{p}K_{\text{a}}}} \quad (30)$$

Stvarna jonska pokretljivost μ_{BH^+} i mešovita konstanta jonizacije $\text{p}K_{\text{a}}$ su vrednosti koje zavise od jonske jačine i temperature. Ukoliko se kapilarna zonska elektroforeza izvodi u uslovima konstantne jonske jačine i temperature ovi parametri se mogu smatrati konstantnim vrednostima, a efektivna elektroforetska pokretljivost, μ_{eff} , predstavljena u jednačini (30), je u tom slučaju samo u funkciji pH vrednosti. Na osnovu jednačine (30), merenjem efektivne elektroforetske pokretljivosti analita pri različitim pH vrednostima, moguće je odrediti konstantu jonizacije i stvarnu jonsku pokretljivost iz nelinearne regresione krive u Origin programu. Na osnovu jednačine (28) iz $\text{p}K_{\text{a}}$ se može izračunati termodinamička konstanta jonizacije $\text{p}K_{\text{a}}^{\text{T}}$ koja odgovara rastvoru elektrolita čija je jonska jačina jednaka nuli ($I=0$).

3.3. STATISTIČKE ANALIZE KORIŠĆENE U QSAR/QSRR/QSMR STUDIJAMA I VALIDACIJA MODELA

3.3.1. Statističke analize

U formiranju regresionih modela i odabiru najznačajnijih deskriptora korišćene su linearne i nelinearne statističke metode.

Linearna statistička analiza izvršena je primenom multilinearne regresione analize (*MultiLinear Regression*, MLR), postupne multilinearne regresione analize (*stepwise* MLR) i analize parcijalnih najmanjih kvadrata (*Partial Least Squares*, PLS).

Nelinearna statistička analiza izvršena je primenom veštačkih neuronskih mreža (*Artificial Neural Network* ANN).

3.3.1.1. Multilinearna regresiona analiza (MLR)

Multilinearna regresiona analiza urađena je u Microsoft-Excel programu, *Microsoft-Excel 2000/Regression Data Analysis and Multi-precision Floating point Computation for Excel (XNUMBERS.XLA-Ver.4.7-2006)*.¹⁹⁵

3.3.1.2. Postupna Multilinearna regresiona analiza (postupna MLR)

Postupna MLR analiza je urađena u STATISTICA programu.¹⁹⁶ Odabir najznačajnijih deskriptora je izvršen primenom postupne (*stepwise*) procedure u kojoj se selekcija deskriptora unapred (*forward*) smenjuje sa njihovom eliminacijom unazad (*backward*). U postupnoj MLR analizi odabir deskriptora je vršen korak po korak polazeći od početne matrice podataka X (matrica deskriptora) i uzimajući u obzir njihovu korelaciju sa Y (retenciono vreme, biološka aktivnost itd). Prvo se izdvoji promenljiva koja ima najveću korelaciju sa Y, formira se odgovarajući jednoparametarski regresioni model i testira značajnost dobijenog regresionog koeficijenta primenom *F*-testa. Ako je koeficijent značajan, deskriptor se uključuje u model. Ovaj korak uvođenja novih promenljivih u model naziva se selekcija unapred.

Nakon uključivanja svake promenljive u model primenom *F*-testa ispituje se značajnost promenljivih koje su već u modelu. Ukoliko se pokaže da neka od promenljivih u modelu ne doprinosi više značajno regresionoj jednačini, takva promenljiva se eliminiše iz modela i ovaj korak se naziva eliminacija unazad. Ceo proces se ponavlja sve do trenutka kada dalje uvođenje ili eliminacija deskriptora ne dovodi do poboljšanja kvaliteta regresionog modela. Kriterijumi za uvođenje novog deskriptora ili isključivanje deskriptora vrše se na osnovu zadatih vrednosti *F* parametra za uključivanje (*F to enter*) i isključivanje (*F to remove*) deskriptora. Ovaj metod se zasniva na podešavanju rezultata (*data fitting*) i dobijeni modeli mogu biti previše prilagođeni ispitivanom (*training*) setu (*overfitted*). Da bi se to izbeglo optimalan broj deskriptora u svakom modelu i pouzdanost predviđanja formiranih modela procenjuje se LOO-CV postupkom i na osnovu parametara: validacioni regresioni faktor (Q^2), srednja kvadratna greška procene (*Root Mean Square Error of Estimation*, RMSEE), srednja kvadratna greška predviđanja (*Root Mean Square Error of Prediction*, RMSEP).

3.3.1.3. Metoda parcijalnih najmanjih kvadrata (PLS)

Formiranje modela primenom PLS metode je izvršeno u SIMCA P+ 12.0 programu.¹⁹⁷ U toku PLS analize najznačajniji deskriptori su birani na osnovu VIP parametra (*Variable Importance in the Projection*). Nezavisno promenljive *X* sa VIP vrednostima većim od 1 imaju najveći uticaj na formirani model, *X* varijable sa $1,0 > VIP > 0,5$ pokazuju umeren uticaj, dok *X*-varijable sa VIP vrednostima manjim od 0,5 nisu relevantne za model.¹⁶⁹ Od izračunatih molekulskih deskriptora samo oni sa VIP vrednostima većim od 0,5 su razmatrani u formiranju modela i najrelevantniji deskriptori, sa visokim VIP vrednostima, odabrani za PLS modelovanje. Odabir najznačajnijih deskriptora za PLS-QSMR modele izvršen je na osnovu parametara Q^2 , RMSEE i RMSEP vrednosti.

3.3.1.4. Veštačke neuronske mreže (ANN)

Višeslojni perceptron (*Multilayer Perceptrons*, MLP) koji predstavlja najčešće korišćenu višeslojnu nerekurentnu mrežu (*Multilayer Feedforward Networks*) uz *back propagation* (BP) algoritam je korišćen za formiranje nelinearnih modela u STATISTICA programu modul *Neural Network*.¹⁹⁶ Odabir najznačajnijih deskriptora koji su korišćeni kao inputi u ANN-u izvršen je primenom postupne MLR analize u STATISTICA programu.

Za svaku grupu eksperimentalnih podataka formirana je troslojna mreža sa sigmoidalnom transfer funkcijom. Prvi sloj je ulazni sloj čiji je broj čvorova jednak broju odabranih deskriptora. Drugi sloj je skriveni sloj čiji se optimalan broj čvorova određuje u toku procesa treniranja. Treći sloj je izlazni sloj sastavljen od jednog čvora, RMT (relativnog migracionog vremena) ispitivanih jedinjenja. Svi podaci su podeljeni u trening, verifikacioni i test set. Trening set je korišćen za treniranje mreže, verifikacioni za praćenje performansi mreže i procesa treniranja, a test set za nezavisnu procenu kvaliteta kreirane mreže.

Primenom postupne MLR metodologije odabrani su setovi sa različitim brojem značajnih deskriptora za ANN trening. Optimalan broj čvorova u skrivenom sloju određen je u toku optimizacije svake pojedinačne mreže. *Overfitting* ANN modela izbegnut je primenom 2 paralelne procedure. Prvo, u toku treniranja mreže na grafiku je praćena greška (*Root Mean Square Error*, RMSE) za trening i verifikacioni set. U trenutku kada RMSE verifikacionog seta počne da raste, a trening seta nastavlja da opada trening je zaustavljen da bi se izbeglo pretreniranje mreže. Drugo, formirani ANN modeli sa različitim brojem odabranih parametara su analizirani i optimalan je biran poređenjem Q^2 , r (eksperimentalna vs. predviđena vrednost), RMSEE i RMSEP vrednosti.

3.3.2. Procena pouzdanosti predviđanja i validacija modela

Procena kvaliteta i prognostičkog kapaciteta formiranih modela, kao i poređenje modela i odabir optimalnih izvršen je na osnovu vrednosti parametara kao što su: koeficijent korelacije (r), koeficijent determinacije (R^2), standardizovan kvadrat koeficijenta determinacije (R^2_{adj}), F odnos i p vrednost, validacioni regresioni faktor (Q^2), srednja kvadratna greška procene (RMSEE), srednja kvadratna greška predviđanja (RMSEP). Više vrednosti r , R^2 , R^2_{adj} , F , p i Q^2 i niže vrednosti RMSEE i RMSEP parametara moraju biti zadovoljene u cilju dobijanja pouzdanih modela.

$$R^2 = \frac{SSR}{SSTo} \quad (31)$$

$$R^2_{adj} = 1 - \frac{MSE}{MS(Total)} \quad (32)$$

R^2 i R^2_{adj} parametri pokazuju koliko odstupa regresiona funkcija od zadatih vrednosti y_i .

Varijacija, *ukupna suma kvadrata*:
$$SSTo = \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2 \quad (33)$$

Varijacija, *suma kvadrata greške*:
$$SSE = \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2 \quad (34)$$

Varijacija, *regresiona suma kvadrata*:
$$SSR = \sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - \bar{y})^2 \quad (35)$$

gde je
$$\bar{y} = \sum_{i=1}^n \frac{y_i}{n} \quad (36)$$

U prikazanim formulama n predstavlja broj podataka koji formiraju regresionu jednačinu, y_i je zadata vrednost i \hat{y}_i vrednost izračunata datim regresionim modelom.

Varijanse MSR (regresiona), MSE (rezidualna) i MS (total) predstavljaju količnik odgovarajućih varijacija i stepeni slobode ispitivanog modela, kao na primer $MS=SS/df$.

F parametar se izračunava kao odnos dve varijanse $F=MSR/MSE$, dok je p -vrednost izračunata kao nivo važnosti F parametra. Sve hipoteze su testirane sa $\alpha=0,05$.

Ukrštena validacija (LOO-CV) i validacioni regresioni faktor (Q^2), su korišćeni kao kriterijum robusnosti i predviđajuće sposobnosti formiranih modela. Sam postupak se zasniva na isključivanju jednog para podataka (x_i, y_i) iz trening seta, a zatim formiranju nove regresione funkcije korišćenjem preostalih $n-1$ podataka. Dobijeni regresioni model sa $n-1$ podataka se zatim koristi za predviđanje vrednosti y isključenog jedinjenja. Odstupanje isključenog (x_i, y_i) podatka se računa prema formuli $e_{(i)}=y_i - \hat{y}_i$. Proces se ponavlja za svih $i=1, 2, \dots, n$ parova podataka računajući pritom vrednosti odstupanja $e_{(1)}, \dots, e_{(n)}$ od odgovarajućih regresionih funkcija. Na osnovu predviđene rezidualne sume kvadrata (*Predicted REsidual Sum of Squares*, PRESS) i SSTo izračunata je vrednost Q^2 :

$$PRESS = \sum_{i=1}^n e_{(i)}^2 \quad (37)$$

$$Q^2 = 1 - \frac{PRESS}{SSTo} \quad (38)$$

Regresioni modeli sa $Q^2 \geq 0,5$ se smatraju dovoljno pouzdanim za predviđanje i izračunavanje zavisno promenljivih.

Sposobnost modela da izvrši predviđanje jedinjenja u trening setu procenjena je na osnovu vrednosti RMSEE:

$$RMSEE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n}} \quad (39)$$

gde je n broj uzoraka u trening setu, a y_i i \hat{y}_i predstavljaju redom eksperimentalne i predviđene vrednosti jedinjenja u trening setu.

Sposobnost modela da izvrši predviđanje jedinjenja u test setu procenjena je na osnovu vrednosti RMSEP:

$$RMSEP = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n}} \quad (40)$$

gde je n broj uzoraka u test setu, a y_i i \hat{y}_i predstavljaju redom eksperimentalne i predviđene vrednosti jedinjenja u test setu.

Kao dodatni kriterijumi za eksternu validaciju primenjena su i *Tropsha* i *Golbraikh*^{166,173} pravila:

- (i) koeficijent korelacije R između predviđene i eksperimentalne vrednosti u test setu bi trebalo da bude približno 1
- (ii) najmanje jedan (a bolje oba) koeficijent determinacije za regresionu pravu koja prolazi kroz centar koordinacionog sistema R_0^2 (eksperimentalna (Y-osa) vs. predviđena (X-osa) vrednost) ili R'_0^2 (predviđena (Y-osa) vs. eksperimentalna (X-osa) vrednost) bi trebalo da bude blizak vrednosti R^2 za jedinjenja u test setu
- (iii) najmanje jedan nagib regresionih kriva (k i k') koje prolaze kroz centar koordinacionog sistema (odsečak jednak nuli) za test set bi trebalo da bude približno 1.

QSAR/QSPR modeli se smatraju pouzdanim ako su zadovoljeni sledeći uslovi:

(i) $Q^2 > 0,5$; (ii) $R^2 > 0,6$, (iii) R_0^2 ili $R_0'^2$ bliski R^2 tako da $[(R^2 - R_0^2)/R^2] < 0,1$ ili $[(R^2 - R_0'^2)/R^2] < 0,1$ odnosno (iv) $0,85 \leq k \leq 1,15$ ili $0,85 \leq k' \leq 1,15$

Gde je:

$$R = \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})(\hat{y}_i - \bar{\hat{y}})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2 \sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - \bar{\hat{y}})^2}} \quad (41)$$

$$R_0^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - k\hat{y}_i)^2}{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2} \quad (42)$$

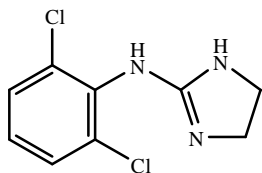
$$k = \frac{\sum_{i=1}^n y_i \hat{y}_i}{\sum_{i=1}^n \hat{y}_i^2} \quad (43)$$

$$R_0'^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - k'y_i)^2}{\sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - \bar{\hat{y}})^2} \quad (44)$$

$$k' = \frac{\sum_{i=1}^n y_i \hat{y}_i}{\sum_{i=1}^n y_i^2} \quad (45)$$

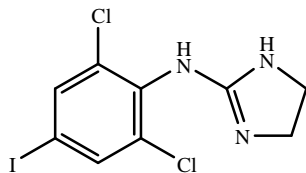
U datim jednačinama y_i predstavlja eksperimentalnu vrednost jedinjenja u test setu, \hat{y}_i predviđenu vrednost jedinjenja u test setu; $\bar{\hat{y}}$ prosečnu predviđenu vrednost jedinjenja u test setu i \bar{y} prosečnu eksperimentalnu vrednost jedinjenja u test setu.

3.4. HEMIJSKE STRUKTURE ISPITIVANIH JEDINJENJA



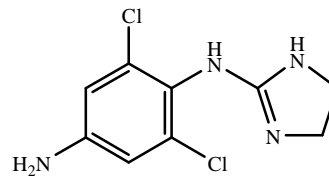
Klonidin

2-(2,6-dihloroanilino)-
2-imidazolin



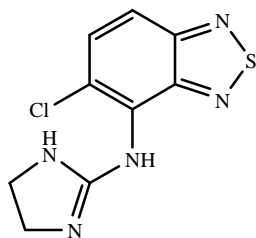
p-jodoklonidin

2-(4-jodo-2,6-dihloroanilino)-
2-imidazolin



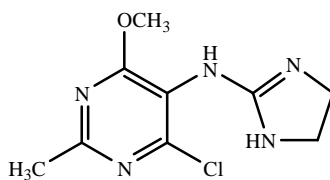
p-aminoklonidin

2-(4-amino-2,6-dihloroanilino)-
2-imidazolin



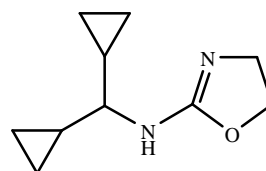
Tizanidin

5-hloro- N-(4,5-dihidro-1H-
imidazol-2-il)-2,1,3-
benzotiadiazol-4-amin



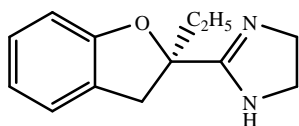
Moksonidin

4-hloro-N-(4,5-dihidro-1H-
imidazol-2-il)-6-metoksi-2-
metil-5-pirimidinamin



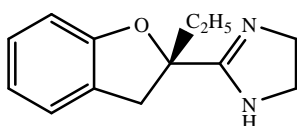
Rilmenidin

N-(diciklopropilmetil)-4,5-
dihidro-2-oksazolamin



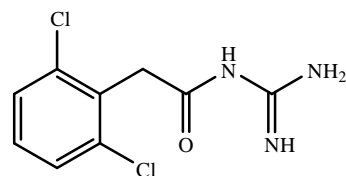
R-efaroksan

(R)-2-etil-2-(imidazolin-2-il)-
2,3-dihidrobenzofuran



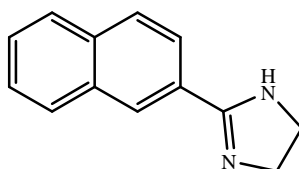
S-efaroksan

(S)-2-etil-2-(imidazolin-2-il)-
2,3-dihidrobenzofuran



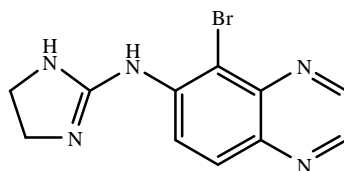
Gvanfacin

N-amidino-2-(2,6-dihlorofenil)
acetamid



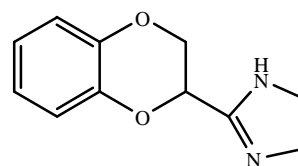
Benazolin

2-(naftalen-2-il)-
4,5-dihidro-1H-imidazol



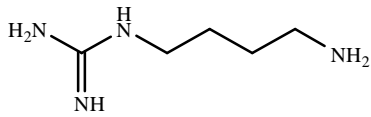
Brimonidin

5-bromo-N-(4,5-dihidro-1H-
imidazol-2-il)-6-hinoksalinamin



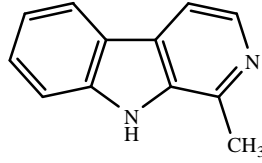
Idazoksan

2-(2,3-dihidro-1,4-benzodioxin-
2-il)-4,5-dihidro-1H-imidazol



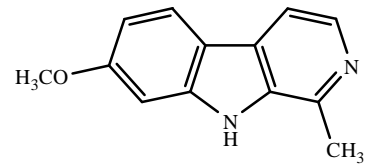
Agmatin

4-(aminobutil)gvanidin



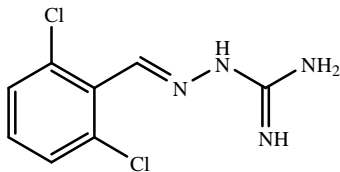
Harman

1-metil-9H-pirido[3,4-b] indol



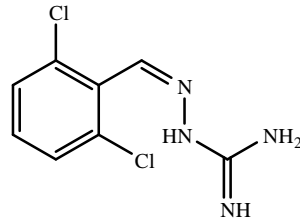
Harmin

7-metoksi-1-metil-9H-pirido[3,4-b] indol



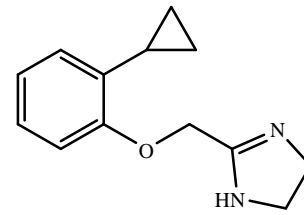
Gvanabenz-1

(E) [(2,6-dihlorobenziliden) amino]gvanidin



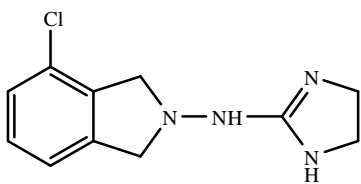
Gvanabenz-2

(Z) [(2,6-dihlorobenziliden) amino]gvanidin



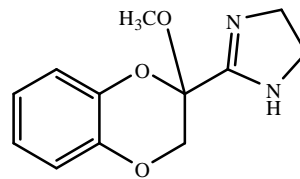
Cirazolin

2-(2-ciklopropilfenoksimetil)-4,5-dihidro-1H-imidazol



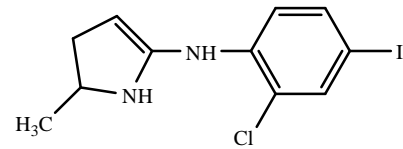
BDF-6143

4-hloro-N-(4,5-dihidro-1H-imidazol-2-il)-2,3-dihidro-1H-izoindol-2-amin



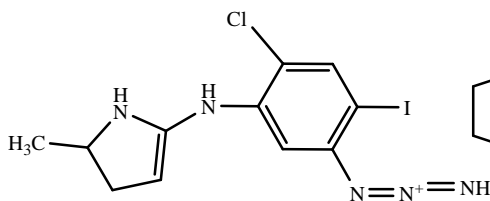
RX821002

2-(2-metoksi-3H-1,4-benzodioxin-2-il)-4,5-dihidro-1H-imidazol



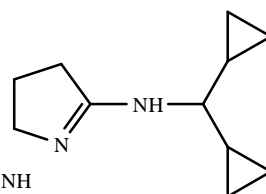
LNP911

N-(2-hloro-4-jodofenil)-5-metil-4,5-dihidro-1H-pirol-2-amin



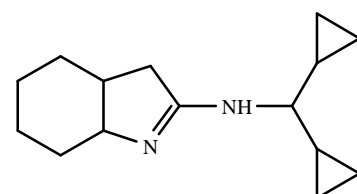
LNP906

1-{4-hloro-2-jodo-5-[(5-metil-4,5-dihidro-1H-pirol-2-il) amino] fenil} triaza-1,2-dien-2-ium



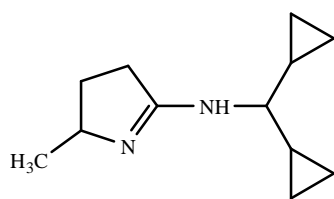
T1

N-(diciklopropilmetil)-4,5-dihidro-3H-pirol-2-amin



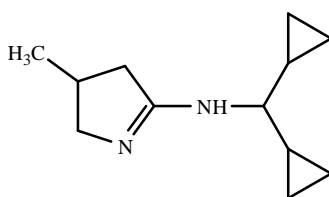
T2

N-(diciklopropilmetil)-3a,4,5,6,7,7a-heksahidro-3H-indol-2-amin



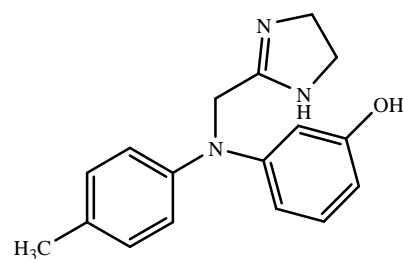
T3

N-(diciklopropilmetil)-5-metil-4,5-dihidro-3H-pirol-2-amin



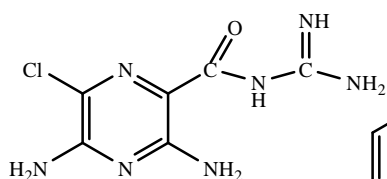
T4

N-(diciklopropilmetil)-4-metil-4,5-dihidro-3H-pirol-2-amin



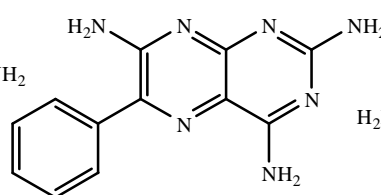
Fentolamin

3-[[4,5-dihidro-1H-imidazol-2-il)metil](4-metilfenil)amino]fenol



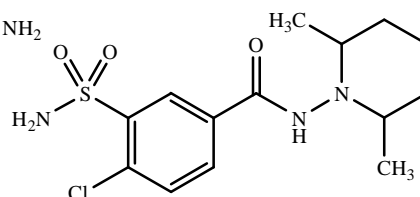
Amilorid

N-amidino-3,5-diamino-6-hloropirazinkarboksamid



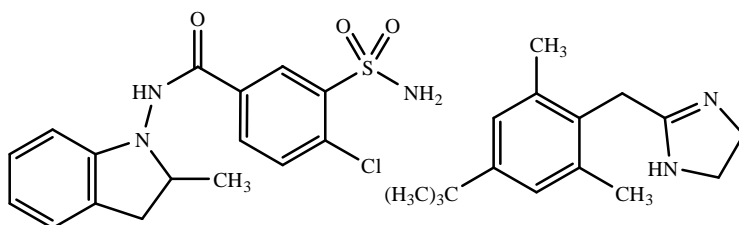
Triamteren

6-fenil-2,4,7-pteridintriamin



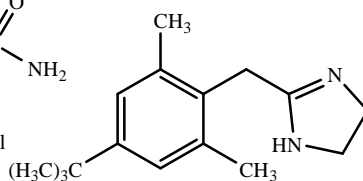
Klopamid

(cis)-3-(aminosulfonyl)-4-hloro-N-(2,6-dimetil-1-piperidinil)benzamid



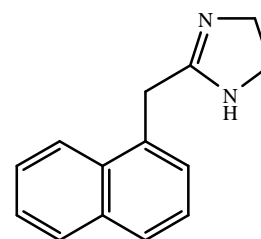
Indapamid

4-hloro-N-(2-metil-1-indolinil)-3-sulfamoilbenzamid



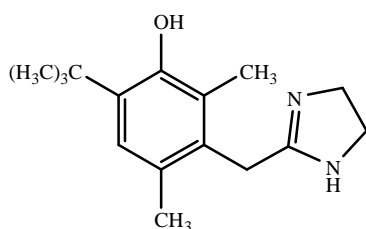
Ksilometazolin

2-(4-terc-butil-2,6-dimetilbenzil)-2-imidazolin



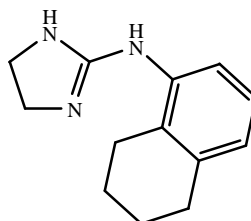
Nafazolin

2-(1-naftilmetil)imidazolin



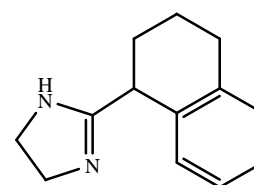
Oksimetazolin

2-(4-terc-butil-2,6-dimetil-3-hidroksibenzil)-2-imidazolin



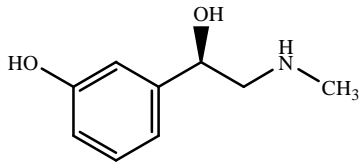
Tramazolin

2-[(5,6,7,8-tetrahidro-1-naftil)amino]-2-imidazolin



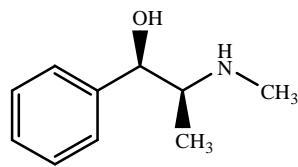
Tetrahidrozolin

2-(1,2,3,4-tetrahidro-1-naftil)-2-imidazolin



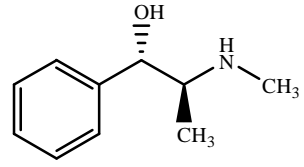
Fenilefrin

(R)-3-hidroksi-alfa-[(metilamino)metil]benzenmetanol



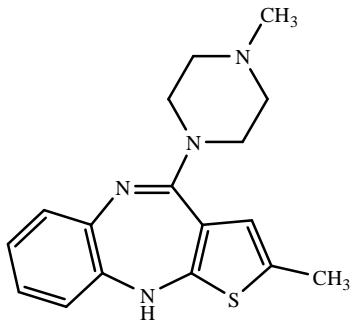
Efedrin

(1R,2S)-2-metilamino-1-fenilpropan-1-ol



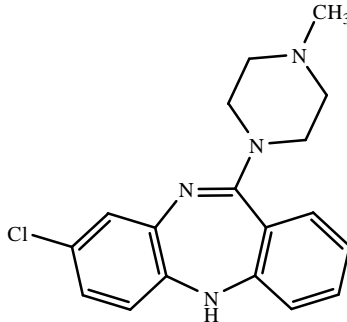
Pseudoefedrin

(1S,2S)-2-(metilamino)-1-fenilpropan-1-ol



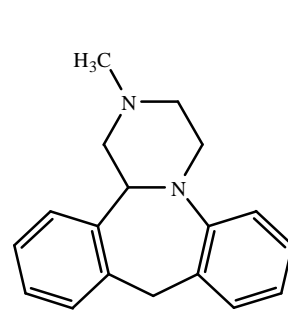
Olanzapin

2-metil-4-(4-metil-1-piperazinil)-10H-tieno[2,3-b][1,5]benzodiazepin



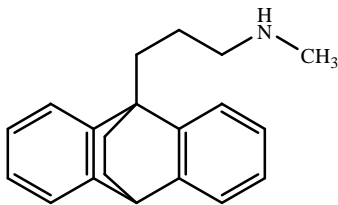
Klozapin

8-hloro-11-(4-metil-1-piperazinil)-5H-dibenzo[b,e][1,4]diazepin



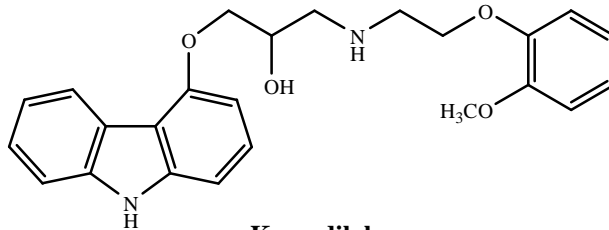
Mianserin

(±)-2-metil-1,2,3,4,10,14b-heksahidrodibenzo[c,f]pirazino[1,2-a]azepin



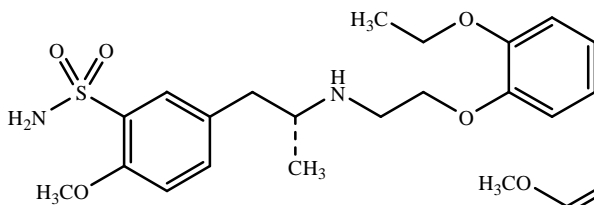
Maprotilin

N-metil-9,10-etanoantracen-9(10H)-propanamin



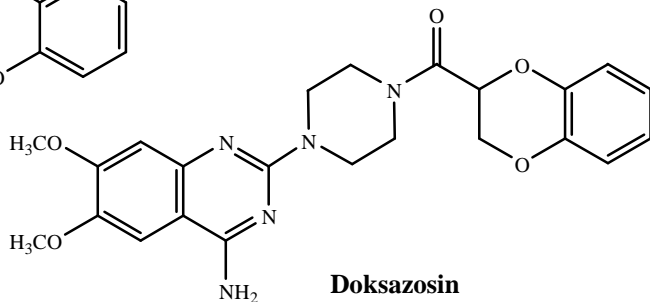
Karvedilol

1-(9H-karbazol-4-il-oksi)-3-[[2-(2-metoksifenoksi)etil]amino]-2-propanol



Tamsulosin

(R)-5-[2-[[2-(2-etoksifenoksi)etil]amino]propil]-2-metoksibenzen sulfonamid



Doksazosin

1-(4-amino-6,7-dimetoksi-2-hizanolinil)-4-[(2,3-dihidro-1,4-benzodioxin-2-il)karbonil]piperazin

4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1. QSAR STUDIJE IMIDAZOLINSKIH I α_2 -ADRENERGIČKIH LIGANADA

Istovremeno prisustvo I_1 -imidazolinskih i α_2 -adrenergičkih receptora u brojnim tkivima i ćelijskim linijama otežava određivanje selektivnog afiniteta vezivanja različitih liganada za I_1 -imidazolinsko mesto. Nedostatak visokoselektivnih liganada bio je i glavni problem u karakterizaciji imidazolinskih receptora. S obzirom da su dobijene vrednosti afiniteta istih liganada za I_1 -imidazolinske receptore bile veoma različite u zavisnosti od korišćenog radioliganda ($[^{125}\text{I}]$ PIC i $[^{125}\text{I}]$ LNP911) i ćelijskih linija (PC 12 i humani trombociti)^{31,32,36} zaključeno je da nije moguće direktno porediti rezultate različitih *in vitro* ispitivanja. Zato su QSAR istraživanja sprovedena nezavisno na 2 grupe eksperimentalnih podataka dobijenih u prisustvu različitih radioliganada i na različitim ćelijskim linijama.

Prva QSAR analiza imala je za cilj definisanje najznačajnijih molekulskih deskriptora kojima se sa izvesnom preciznošću mogu predvideti: afiniteti liganada ka I_1 -imidazolinskim receptorima, α_2 -adrenergičkim receptorima, kao i selektivnost za I_1 -IR u odnosu na α_2 -AR. Ispitivanja su sprovedena na 12 imidazolinskih/oksazolinskih/gvanidinskih analoga čije su konstante inhibicije (K_i) vezivanja $[^{125}\text{I}]$ *p*-jodoklonidina za humane α_{2A} -, α_{2B} - i α_{2C} -adrenergičke receptore određene na ovarijalnim ćelijama kineskog hrčka, a za I_1 -imidazolinske receptore na humanim trombocitima.

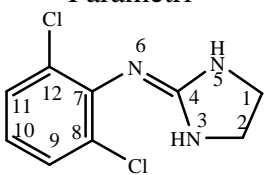
Druga QSAR analiza sprovedena je sa 11 jedinjenja čiji su afiniteti za I_1 -IR određeni na PC12 ćelijama u prisustvu visokoselektivnog radioliganda $[^{125}\text{I}]$ LNP911 i imala je za cilj definisanje najznačajnijih molekulskih deskriptora kojima se sa izvesnom preciznošću mogu predvideti afiniteti liganada za I_1 -imidazolinske receptore.

Odabrani setovi jedinjenja pokazali su dobar raspon i distribuciju $pK_i(I_1\text{-IR})$ vrednosti (od 5,901 do 8,319 i od 5,067 do 8,854) što je bio važan preduslov za formiranje odgovarajućih QSAR modela. Pored toga, sve $pK_i(I_1\text{-IR})$ vrednosti korišćene za formiranje regresionih modela su bile iznad 5 ($pK_i(I_1\text{-IR}) > 5$), odnosno manje od 10 μM što se smatra graničnom vrednošću za aktivnost na odgovarajuće receptore.³⁰ Prethodno određena kristalna struktura klonidin-hidrohlorida pokazala je da je imidazolinski deo molekule protonovan i da su dva atoma azota imidazolinskog prstena

hemijski ekvivalentna.¹⁷⁶ Eksperimentalno dobijeni geometrijski parametri klonidin-hidrohlorida¹⁷⁶ i parametri izračunati pomoću dva DFT metoda¹⁸⁵ su prikazani u Tabeli 5.

Dobijene vrednosti geometrijskih parametara izračunate B3LYP/6-31+G(d,p)^{voda} PCM¹⁸⁵ i B3LYP/3-21G(d,p) metodom nisu pokazale značajnu razliku od eksperimentalno dobijenih vrednosti, kristalografske strukture (Tabela 5.), zbog čega je B3LYP/3-21G(d,p) metod odabran za geometrijsku optimizaciju svih ispitivanih jedinjenja u QSAR studijama. Dodatnom analizom harmonijskih frekvenci je potvrđeno da je dobijena konformacija stvarni minimum pošto su sve svojstvene (*eigen*) vrednosti *Hessian*-ove matrice bile pozitivne.

Tabela 5. Eksperimentalno dobijene i izračunate vrednosti geometrijskih parametara klonidin-hidrohlorida

 Parametri	Klonidin-hidrohlolid			
	Difrakcija X-zraka ¹⁷⁶	B3LYP/6-31+G(d,p) ¹⁸⁵	BP86/TZ2P-CPCM ¹⁸⁵	B3LYP/3-21G(d,p)
$d[\text{C}(1)\text{-N}(5)]$	1,447	1,478	1,478	1,497
$d[\text{C}(1)\text{-C}(2)]$	1,532	1,546	1,550	1,572
$d[\text{N}(5)\text{-C}(4)]$	1,321	1,373	1,387	1,340
$d[\text{C}(4)\text{-N}(3)]$	1,322	1,307	1,294	1,343
$d[\text{N}(3)\text{-C}(2)]$	1,450	1,469	1,472	1,500
$d[\text{C}(4)\text{-N}(6)]$	1,327	1,355	1,377	1,343
$d[\text{N}(6)\text{-C}(7)]$	1,418	1,423	1,411	1,437
$\theta[\text{C}(1)\text{-N}(5)\text{-C}(4)]$	111,4	107,7	106,5	111,6
$\theta[\text{N}(5)\text{-C}(4)\text{-N}(3)]$	111,7	113,3	115,7	111,3
$\theta[\text{N}(5)\text{-C}(1)\text{-C}(2)]$	102,6	101,8	101,7	101,9
$\theta[\text{C}(4)\text{-N}(3)\text{-C}(2)]$	110,6	109,6	107,8	111,4
$\theta[\text{C}(1)\text{-C}(2)\text{-N}(3)]$	103,5	103,9	104,9	101,9
$\theta[\text{N}(5)\text{-C}(4)\text{-N}(6)]$	123,1	120,2	117,2	124,1
$\theta[\text{C}(4)\text{-N}(6)\text{-C}(7)]$	123,0	123,9	124,4	122,3
$\Phi[\text{C}(1)\text{-N}(5)\text{-C}(4)\text{-N}(3)]$	1,0	-11,2	-11,7	-4,9
$\Phi[\text{N}(5)\text{-C}(4)\text{-N}(3)\text{-C}(2)]$	-0,5	-2,8	0,2	-4,3
$\Phi[\text{N}(5)\text{-C}(1)\text{-C}(2)\text{-N}(3)]$	0,7	-19,9	-16,6	-12,4
$\Phi[\text{C}(1)\text{-N}(5)\text{-C}(4)\text{-N}(6)]$	-177,3	168,8	169,4	175,2
$\Phi[\text{C}(4)\text{-N}(6)\text{-C}(7)\text{-C}(8)]$	-76,4	-106,6	-118,5	-94,9

4.1.1. QSAR studija liganada imidazolinskih i α_2 -adrenergičkih receptora čiji su afiniteti za I₁-receptore određeni na humanim trombocitima u prisustvu radioliganda [¹²⁵I] *p*-jodoklonidina

U prvoj QSAR studiji, od 42 deskriptora koja su razmatrana u formiranju QSAR modela nekoliko deskriptora kao što su prosečno parcijalno atomsko naelektrisanje na azotima ($N_{\text{pros. naelek.}}$), logaritam distribucionog koeficijenta oktanol-voda pri pH 7,4 ($\log D_{7,4}$), logaritam particionog koeficijenta oktanol-voda ($\log P$), HOMO energija i molarna refraktivnost (MR), pokazalo je dobru korelaciju sa afinitetom za I₁-IR receptore ($pK_i(\text{I}_1\text{-IR})$) i dalo statistički značajne modele.

Primenom multilinearne regresione analize dobijena je matematička zavisnost sa tri nezavisno promenljive ($\log D_{7,4}$; prosečno parcijalno atomsko naelektrisanje na azotima, $N_{\text{pros. naelek.}}$ (B3LYP/6-31G(d,p)^{voda} sa Mulliken-ovom populacionom analizom) i molarna refraktivnost liganda, MR) kojom je definisan afinitet liganada za I₁-imidazolinske receptore:

$$pK_i(\text{I}_1\text{-IR}) = 3,5338 + 0,3527 \log D_{7,4} - 2,6113 N_{\text{pros. naelek.}} + 0,3015 MR \quad (46)$$

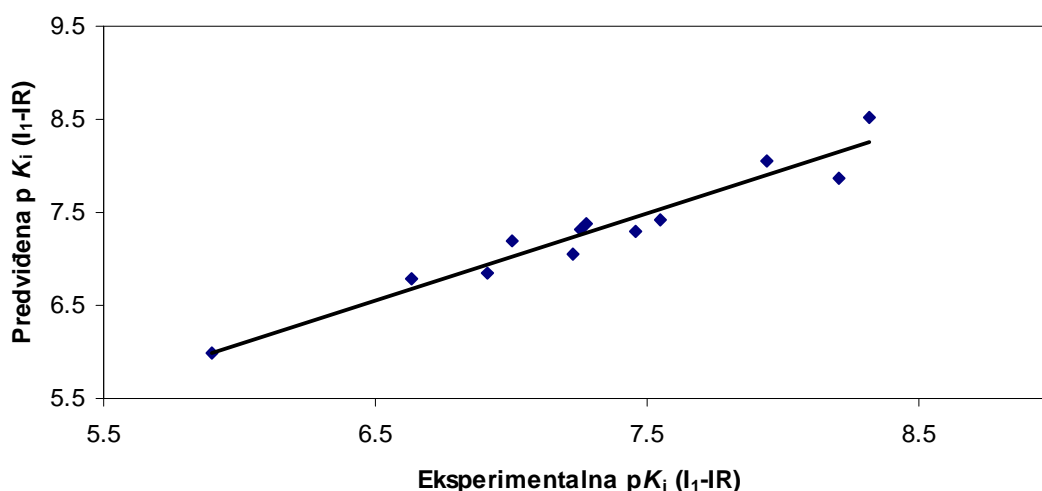
Dobijeni statistički parametar R^2 (0,935) i R^2_{adj} (0,911), kao i rezultati ukrštene validacije ($Q^2 = 0,803 > 0,5$) ukazuju na visoku prognostičku sposobnost predloženog QSAR modela¹⁹⁸ (Tabela 6.).

Sposobnost formiranog modela da predvidi aktivnost ispitana je i eksternom validacijom, predviđanjem aktivnosti test seta koji su činili moksonidin i gvanfacin čiji su afiniteti za imidazolinski receptor ($pK_i(\text{I}_1\text{-IR})$) određeni na humanim trombocitima u prisustvu [¹²⁵I] PIC.³² Proračun molekulskih parametara sproveden je istom teorijskom procedurom kao za ispitivani set jedinjenja, a zatim je primenom predložene regresione jednačine $pK_i(\text{I}_1\text{-IR}) = f(\log D_{7,4}, N_{\text{pros. naelek.}}, \text{MR})$ izračunat afinitet vezivanja za I₁-IR. Dobijena vrednost RMSEP za dva test jedinjenja (RMSEP: 0,877) koja je niža od RMSEE QSAR modela (RMSEE: 0,957) ukazuje da formirani QSAR model predstavlja pouzdan model kojim se može vršiti predviđanje afiniteta novih liganada za imidazolinske receptore.

Tabela 6. Linearna zavisnost između eksperimentalno određenog afiniteta liganada za humane I₁-IR³¹ i izračunatih molekulskih parametara: logD_{7,4}, prosečno parcijalno atomsko naelektrisanje na azotima (N_{pros. naelek.} izračunato B3LYP/6-31G(d,p)^{voda} metodom sa Mulliken-ovom populacionom analizom) i molarna refraktivnost liganda (MR)

Jedinjenje	pK _i (I ₁ -IR) ³¹	logD _{7,4}	N _{pros.naelek.} B3LYP/6- 31G(d,p) ^{voda}	MR [cm ³ /mo]	K _i (I ₁ -R) [nM±SEM] ³¹
<i>p</i> -jodoklonidin	8,319	3,46	-0,6207	7,1205	4,8 ± 1,2
Oksimetazolin	8,208	1,52	-0,5463	7,8620	6,2 ± 1,2
Fentolamin	7,943	1,55	-0,5464	8,4232	11,4 ± 3,8
Tizanidin	7,548	2,16	-0,4572	6,3976	28,3 ± 8,5
Gvanabenz	7,460	1,29	-0,5553	6,1750	34,7 ± 44,8
Efaroksan	7,281	1,81	-0,4989	6,2935	52,4 ± 30,4
Klonidin	7,260	1,07	-0,6311	5,8141	55,0 ± 10,0
Rilmenidin	7,228	1,63	-0,5388	5,0763	59,2 ± 5,8
Cirazolin	7,004	1,53	-0,4674	6,3335	99,0 ± 31,0
Nafazolin	6,915	0,27	-0,4699	6,6144	121,6 ± 80,5
BDF, 6143	6,635	-1,02	-0,6368	6,4416	232,0 ± 126,0
Idazoksan	5,901	0,90	-0,1830	5,4794	1255,0 ± 745,0
<i>r</i> , korelacija		0,653	-0,620	0,666	
Regresiona jednačina	pK_i(I₁-IR) = 3,5338 + 0,3527 logD_{7,4} - 2,6113 N_{pros. naelek.} + 0,3015 MR				
R ²					0,935
R ² _{adj}					0,911
RMSE					0,957
Q ² >0,5					0,803
F-odnos					38,313
<i>p</i> -vrednost					0,00004
Eksterna validacija regresionog modela					
Jedinjenje	pK _i (I ₁ -IR)	logD _{7,4}	N _{pros.naelek.} B3LYP/ 6-31G(d,p) ^{voda}	MR [cm ³ /mo]	Predviđena pK _i (I ₁ -IR)
Moksonidin	8,377 ³¹	1,05	-0,6250	5,9812	7,339
Gvanfacin	7,721 ³¹	1,50	-0,4452	6,0272	7,042
RMSEP					0,877
LNP906	8,220 ¹⁹⁹	1,93	-0,6601	8,1167	8,385

Na Slici 13. je prikazana korelacija između eksperimentalno dobijenih i predviđenih pK_i vrednosti ispitivanog seta jedinjenja.



Slika 13. Korelacija između teorijski predviđene i eksperimentalne $pK_i(I_1-IR)$ vrednosti jedinjenja u trening setu.

Pored toga, pregledom literature je nađeno da serija sintetisanih pirolinskih analoga^{32,34,199} pokazuje visok stepen I_1-IR/α_2-AR selektivnosti i nanomolarni afinitet za I_1 -receptore. Eksperimentalno dobijena vrednost afiniteta vezivanja jednog pirolinskog analoga LNP906 ($K_i = 6,03 \pm 0,69$ nM, $pK_i = 8,220$)¹⁹⁹ koja je merena na PC12 ćelijskim membranama istiskivanjem specifičnog vezivanja [¹²⁵I] PIC, takođe je bila vrlo bliska pK_i vrednosti koja je predviđena formiranim QSAR modelom ($K_i = 4,12$ nM, $pK_i = 8,385$).

Na osnovu formirane regresione QSAR jednačine može se zaključiti da povećanje vrednosti distribucionog koeficijenta ($\log D$ pri pH 7,4) i molarne refraktivnosti zajedno sa smanjenjem prosečnog naelektrisanja na atomima azota u heterocikličnom prstenu liganada dovodi do većeg afiniteta vezivanja za aktivno mesto I_1 receptora.

Jedinjenja koja imaju jonizujuće grupe prisutna su u rastvoru kao smeša različitih jonskih formi, a jonizacija ovih grupa zavisi od pH vrednosti rastvora. Za razliku od $\log P$ koji je mera hidrofobnosti samo jedne forme leka (nejonizovane), distribicioni koeficijent D je mera lipofilnosti pri bilo kojoj pH vrednosti. Distribicioni koeficijent predstavlja odnos koncentracije nejonizovane forme leka u oktanolu i zbira koncentracija jonizovane i nejonizovane forme leka u vodi. Pozitivna korelacija $\log D_{7,4}$

sa afinitetom vezivanja ukazuje da lipofilniji ligandi, sa višim vrednostima $\log D_{7,4}$, imaju jači afinitet vezivanja za I_1 -imidazolinski receptor.

Molarna refraktivnost (MR) predstavlja stvarnu zapreminu molekule i povezana je sa *London* disperzivnim silama koje su prisutne u lek-receptor interakcijama.²⁰⁰

Tabela 7. Regresione jednačine koje povezuju HOMO energiju (B3LYP/6-31G(d,p)^{voda}) i logaritam particionog koeficijenta oktanol/voda ($\log P$) sa eksperimentalno određenim afinitetima liganada za humane α_2 -AR i I_1 -IR/ α_2 -AR-selektivnošću³¹

Jedinjenje	Selektivnost, $pK_i(I_1\text{-IR})-pK_i(\alpha_2\text{-AR})$	$pK_i(\alpha_2\text{-AR})$	HOMO[hartree], B3LYP/6-31G(d,p) ^{voda}	$\log P$
<i>p</i> -jodoklonidin	-0,1413	8,4601	-0,35355	2,743
Oksimetazolin	1,1837	7,0240	-0,23255	4,609
Fentolamin	0,6992	7,2439	-0,20977	3,809
Tizanidin	0,6197	6,9285	-0,25371	2,093
Gvanabenz	-1,2540	8,7137	-0,26222	2,381
Efaroksan	0,0996	7,1811	-0,23968	2,842
Klonidin	-0,5229	7,7825	-0,26388	1,578
Rilmenidin	-0,2875	7,5152	-0,27744	1,421
Cirazolin	0,5891	6,4153	-0,23719	2,542
Nafazolin	0,0827	6,8324	-0,22583	3,826
BDF, 6143	-1,8981	8,5326	-0,25299	1,360
Idazoksan	-1,1493	7,0506	-0,24228	0,856
Selektivnost, korelacija (<i>r</i>)			0,248	0,724
$pK_i(\alpha_2\text{-AR})$, korelacija (<i>r</i>)			-0,595	-0,297
Regresiona jednačina	$I_1\text{-IR}/\alpha_2\text{-AR}\text{-selektivnost} = -1,6192 + 0,5805 \log P$			
Regresiona jednačina	$pK_i(\alpha_2\text{-AR}) = 4,3731 - 12,1931 \text{ HOMO}$			

Selektivni afiniteti vezivanja za α_{2A} -, α_{2B} - i α_{2C} -receptore³¹ su iskorišćeni za dobijanje prosečne $pK_i(\alpha_2\text{-AR})$ vrednosti i formiranje regresionog modela kojim se može predvideti afinitet liganada za α_2 -adrenergičke receptore. Od izračunatih molekularskih parametara najznačajniju korelaciju sa zavisno promenljivom Y ($pK_i(\alpha_2\text{-$

AR)) imala je HOMO energija liganda (Tabela 7.)¹⁹⁸ pa se dobijeni jednoparametarski linearni model:

$$pK_i(\alpha_2\text{-AR}) = 4,3731 - 12,1931 \text{ HOMO} \quad (47)$$

može koristiti za brzu procenu afiniteta liganada za α_2 -adrenergičke receptore.

Lipofilnost jedinjenja izražena kao $\log P$ pokazala je dobru korelaciju sa I_1/α_2 -selektivnošću ($pK_i(I_1\text{-R}) - pK_i(\alpha_2\text{-AR})$) ($r: 0,724$), a dobijena regresiona jednačina:

$$I_1\text{-IR}/\alpha_2\text{-AR-selektivnost} = -1,6192 + 0,5805 \log P \quad (48)$$

se može koristiti za brzu procenu selektivnosti novih liganada (Tabela 7.)¹⁹⁸

Regresione jednačine formirane QSAR analizom mogu se koristiti za predviđanje afiniteta liganada za I_1 -imidazolinske receptore, α_2 -adrenergičke receptore, kao i za predviđanje I_1/α_2 -selektivnosti. Imajući u vidu da selektivna aktivacija I_1 -receptora može značajno smanjiti neželjene efekte nastale kao posledica stimulacije α_2 -AR, predloženi QSAR model $pK_i(I_1\text{-IR}) = f(\log D_{pH7,4}, N_{\text{pros. naelek.}}, MR)$ u kombinaciji sa QSAR modelom za predviđanje selektivnosti liganada $pK_i(I_1\text{-R}) - pK_i(\alpha_2\text{-AR}) = f(\log P)$ može biti izuzetno koristan u racionalnom dizajniranju novih, selektivnih I_1 -IR liganada sa povećanim afinitetom vezivanja za I_1 -imidazolinske receptore.

4.1.2. QSAR studija liganada imidazolinskih i α_2 -adrenergičkih receptora čiji su afiniteti za I₁-receptore određeni na PC12 ćelijama u prisustvu radioliganda [¹²⁵I] LNP911

QSAR modeli formirani sa drugim setom eksperimentalnih rezultata, afinitetom liganada za I₁-receptore merenim na PC12 ćelijama, potvrdili su značaj naelektrisanja na atomu azota heterociklusa i lipofilnosti za povećan afinitet liganada ka I₁-receptorima.

Od ukupnog broja deskriptora koji su razmatrani u formiranju QSAR modela tri deskriptora: parcijalno atomsko naelektrisanje na azotu u heterocikličnom prstenu $(N-2_{naelek.})$ (niža vrednost naelektrisanja azota u heterociklusu), $1/\log D_{7,4}$ i dipolni moment liganda, pokazala su dobru korelaciju sa afinitetom liganada ka I₁-IR ($pK_i(I_1-IR)$) i dala statistički značajne modele.²⁰¹

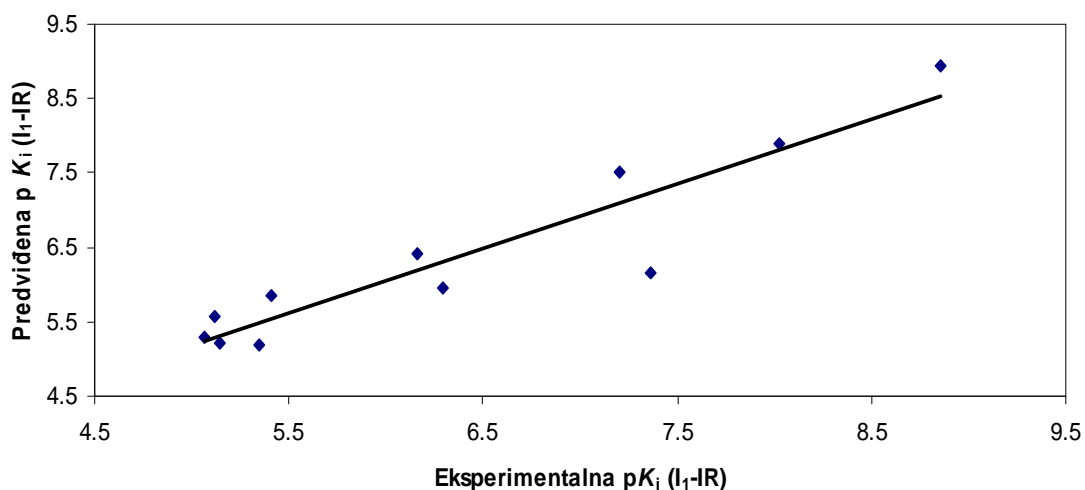
Prvi QSAR model (QSAR model-1, $pK_i(I_1-IR) = f(N-2_{naelek.}, 1/\log D_{7,4})$) formiran je sa dve promenljive, parcijalnim atomskim naelektrisanjem na atomu azota u heterocikličnom prstenu $(N-2_{naelek.})$ [B3LYP/6-31G(d,p)^{voda} sa *Mulliken*-ovom populacionom analizom) i $1/\log D_{7,4}$. Dobijeni statistički parametri $R^2=0,874$, $R^2_{adj}=0,843$, RMSEE=0,446, F=27,742, p=0,00025 i rezultati ukrštene validacije $Q^2=0,821$, ukazuju na visoku prognostičku sposobnost formiranog modela.

Drugi QSAR model (QSAR model-2, $pK_i(I_1-IR) = f(N-2_{naelek.}; 1/\log D_{pH7,4}, Dipol)$) formiran je sa tri promenljive, parcijalnim atomskim naelektrisanjem na atomu azota u heterocikličnom prstenu $(N-2_{naelek.})$ [B3LYP/6-31G(d,p)^{voda} sa *Mulliken*-ovom populacionom analizom), $1/\log D_{7,4}$ i dipolnim momentom [B3LYP/6-31G(d,p)^{voda}] liganda i sa vrednostima regresionih ($R^2=0,874$, $R^2_{adj}=0,820$, RMSEE=0,446, F=16,196, p=0,00157) i validacionih parametara: $Q^2=0,802$.

Suviše veliki broj deskriptora u odnosu na broj podataka (n=11) je glavni nedostatak drugog modela. Takođe, bolji regresioni i validacioni parametri QSAR modela-1 ($R^2_{adj}=0,843$, $Q^2=0,821$) u odnosu na QSAR model-2 ($R^2_{adj}=0,820$, $Q^2=0,802$) ukazuju na njegov veći prognostički značaj usled čega se QSAR model-1:

$$pK_i(I_1-IR) = -5,715 - 21,491 N-2_{naelek.} - 0,468 1/\log D_{7,4} \quad (49)$$

može izdvojiti kao bolji model za predviđanje afiniteta za I₁-imidazolinske receptore. Korelacija između predviđene i eksperimentalne pK_i(I₁-IR) vrednosti jedinjenja u trening setu prikazana je na Slici 14.



Slika 14. Korelacija između predviđene i eksperimentalne pK_i(I₁-IR) vrednosti jedinjenja u trening setu.

Značajno poboljšanje regresionih parametara u višeparametarskom modelu $pK_i(I_1-IR) = f(N-2_{naelek.}; 1/\log D_{7,4})$ u poređenju sa odgovarajućim monoparametarskim modelima (Tabela 8.)²⁰¹ ukazuje na važan uticaj oba odabrana deskriptora na finalnu pK_i vrednost.

Eksternom validacijom sprovedenom na 4 test jedinjenja (T1-T4), čiji su I₁-IR afiniteti liganada mereni na plazma membranama ćelija izolovanim iz adrenalne medule u prisustvu [³H] klonidina,³⁴ potvrđen je dobar prognostički potencijal predloženog QSAR modela-1. RMSEP za 4 test molekula (0,426) bila je niža u odnosu na RMSEE ispitivanog seta jedinjenja (0,446). Prognostički potencijal ispitan je i na LNP906 ligandu čija aktivnost je određena na PC12 ćelijskim membranama pomoću [¹²⁵I]-PIC.¹⁹⁹ Izračunato N-2_{naelek.} LNP906 liganda (N-2: -0,73848) bilo je znatno niže od N-2_{naelek.} liganada u trening setu (između -0,52 i -0,69) te je i predviđena pK_i(I₁-IR) vrednost (9,913) bila značajno veća od eksperimentalne vrednosti (8,002).¹⁹⁹

Tabela 8. Regresiona jednačina koja povezuje parcijalno atomsko naelektrisanje na azotu u heterocikličnom prstenu ($(N-2_{naelek.}) [B3LYP/6-31G(d,p)]^{voda}$ sa *Mulliken*-ovom populacionom analizom) i logaritam distribucionog koeficijenta pri pH 7,4 ($1/\log D_{7,4}$) sa eksperimentalno određenim afinitetima liganada za $(I_1-IR)^{32}$

Jedinjenje	$K_i(I_1-IR)$ [mol/dm ³]	$pK_i(I_1-IR)$	$N-2_{naelek.}$	$1/\log D_{7,4}$	Dipol ^a
Efaroksan	$8,567 \times 10^{-6}$	5,067	-0,5237	0,5525	5,451
Idazoksan	$7,655 \times 10^{-6}$	5,116	-0,5491	1,1111	7,643
Moksonidin	$7,215 \times 10^{-6}$	5,142	-0,5839	3,4483	11,207
<i>p</i> -aminoklonidin	$4,492 \times 10^{-6}$	5,348	-0,5885	3,7037	4,734
Benazolin	$3,903 \times 10^{-6}$	5,409	-0,5717	1,5385	10,855
Klonidin	$6,930 \times 10^{-7}$	6,159	-0,5851	0,9346	6,587
RX821002	$5,070 \times 10^{-7}$	6,295	-0,5548	0,5376	6,300
BDF-6143	$6,230 \times 10^{-8}$	7,206	-0,5936	-0,9804	12,073
Rilmenidin	$4,390 \times 10^{-8}$	7,358	-0,5662	0,6135	9,428
<i>p</i> -jodoklonidin	$9,500 \times 10^{-9}$	8,022	-0,6432	0,4762	17,732
LNP911	$1,400 \times 10^{-9}$	8,854	-0,6875	0,2639	10,497
korelacija $pK_i(I_1-IR)$, r			-0,801	-0,582	0,567
korelacija, $K_i(I_1-IR)$, r			0,571	0,524	-0,385
R^2					0,874
R^2_{adj}					0,843
RMSEE					0,446
$Q^2 > 0,5$					0,821
<i>F</i> -odnos					27,742
<i>p</i> -vrednost					0,000252

Eksterna validacija

$$pK_i(I_1-IR) = -5,715 - 21,491 N-2_{naelek.} - 0,468 1/\log D_{7,4}$$

Jedinjenje	Predviđena $pK_i(I_1-IR)$	$pK_i(I_1-IR)$	$N-2_{naelek.}$	$1/\log D_{7,4}$	
T1	6,0135	$6,29^{34}$	-0,52284	-1,053	
T2	4,1982	$4,00^{34}$	-0,53915	3,571	
T3	6,5267	$5,80^{34}$	-0,52695	-1,961	
T4	6,4751	$6,19^{34}$	-0,52615	-1,887	
RMSEP					0,426
Jedinjenje	Predviđena $pK_i(I_1-IR)$	$pK_i(I_1-IR)$	$N-2_{naelek.}$	$1/\log D_{7,4}$	
LNP906	9,9127	$8,220^{199}$	-0,73848	0,518	

^a Dipolni moment je računat primenom B3LYP/6-31G(d,p)^{voda} seta.

Na osnovu regresione jednačine (49) može se zaključiti da su povećanje liposolubilnosti ($\log D_{7,4}$) liganda i smanjenje $N-2_{\text{naelek.}}$ u heterocikličnom prstenu važni za predviđanje afiniteta liganada za I_1 -imidazolinski receptor.

Pošto je imidazolinski deo strukture protonovan, a oba atoma azota imidazolinskog prstena hemijski ekvivalentna¹⁷⁶ dolazi se do zaključka da niže negativno parcijalno atomsko naelektrisanje oba azota u prstenu ima važan uticaj na selektivnost vezivanja liganada za I_1 -IR. Kao najznačajnije strukturne karakteristike ispitivanih jedinjenja važne za I_1 -IR aktivnost mogu se izdvojiti $N=C-N$ grupa i hidrofobni deo molekule. Formirani QSAR modeli ograničeni su na ligande sa $\log D_{7,4}$ vrednostima u rasponu od -1,02 do 0,27 i nižim parcijalnim atomskim naelektrisanjem na atomima azota heterociklusa (između -0,52 i -0,69). Pošto su novodizajnirana jedinjenja najčešće derivati već ispitanih I_1 -IR liganada njihove $\log D$ i N -naelektrisanje vrednosti su vrlo često u domenu postavljenih QSAR modela.

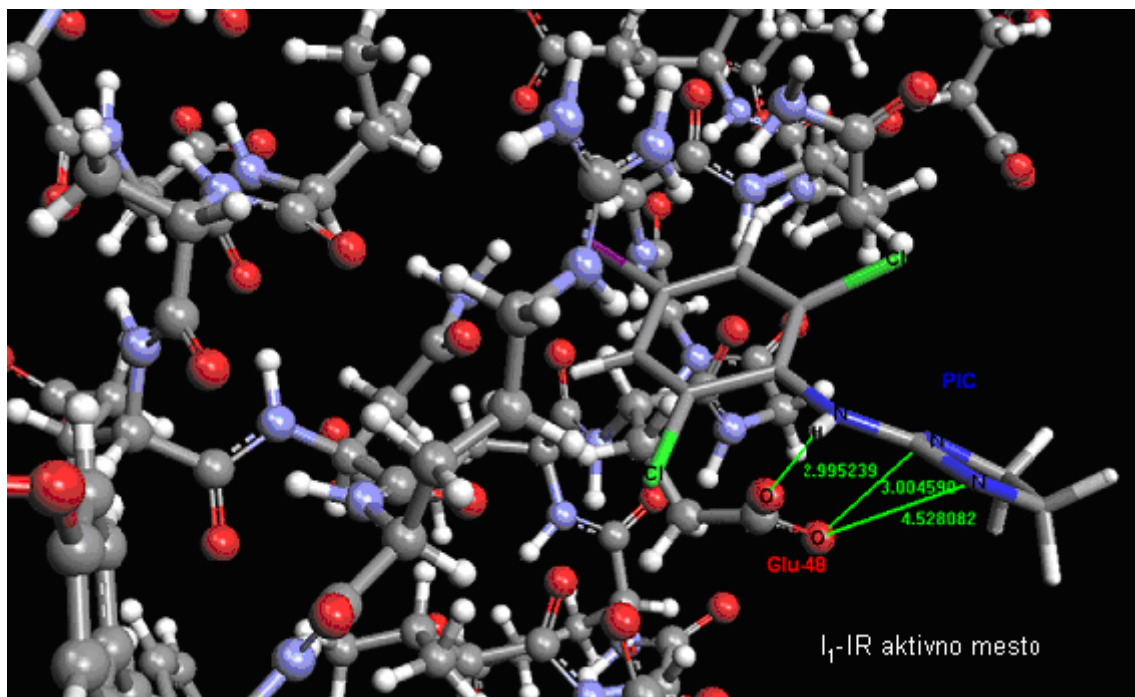
U poređenju sa statističkim parametrima 2D-QSAR modela dostupnog u literaturi ($R^2=0.781$, $Q^2=0.656$)¹⁴⁴, 2D-QSAR modeli predloženi u disertaciji se na osnovu viših regresionih i validacionih parametara (QSAR-model 1: $R^2= 0.935$ i $Q^2= 0.803$; QSAR-model 2: $R^2= 0.874$ i $Q^2= 0.821$) mogu smatrati pouzdanijim modelima u predviđanju biološke aktivnosti i uz postojeće 3D-QSAR modele¹⁴⁴ mogu se koristiti za predviđanje aktivnosti novih jedinjenja potencijalnih I_1 -IR liganada.

4.1.3. Virtuelni Docking

Sobzirom da trodimenzionalna struktura I₁-IR proteina još uvek nije određena onemogućeno je izvođenje preciznijih *docking* studija interakcije ligand-receptor, kao i razvoj novih I₁-IR liganada baziran na strukturi ciljnog mesta dejstva leka (*Structure Based Drug Design*, SBDD). Međutim, uspešno je kloniran *Imidazoline Receptor Antisera-Selected* (IRAS) gen koji je najverovatnije odgovoran za sintezu I₁-IR proteina.¹³⁶ Na osnovu poznate aminokiselinske sekvence aktivnog domena IRAS-a koji vezuje rutenijum crvenu boju i koji je odgovoran za vezivanje imidazolinskih liganada,¹³⁶ ispitano je učešće oba atoma azota heterocikličnog prstena u vezivanju za aktivno mesto IRAS proteina.

Fleksibilan ligand *docking* izveden je u Argus Lab 4.0.1. programu.¹⁸³ Ranije validacije ovog programa pokazale su da postoji veoma mala razlika u tačnosti između ArgusLab i GOLD (*Genetic optimization for Ligand Docking*) programa.^{202, 203} *Docking* proračuni započeti su geometrijskom optimizacijom aktivnog domena IRAS-a, rutenijum-vezujućeg regiona (aminokiseline 629-691)¹³⁶ primenom UFF¹⁸⁴ metoda implementiranog u ArgusLab 4.0.1 programu. LNP911 kao jedinjenje sa najvećim afinitetom i selektivnošću za I₁-IR (K_i : 1,400 nM)³² odabrano je za traženje i selekciju aminokiselina u aktivnom domenu proteina koje su odgovorne za interakciju sa ligandom. Utvrđeno je da aminokiseline Asp, Glu, Tyr i Ala učestvuju u formiranju intermolekulskih veza sa ligandom.

Nakon odabira I₁-IR aktivnog mesta, dominantni oblici svih ispitivanih jedinjenja na pH 7,4 podvrgnuti su *docking* proračunima. Atomi azota u heterocikličnim prstenovima liganada kod svih ispitivanih jedinjenja bili su uključeni u formiranje intermolekulskih veza sa aminokiselinama u aktivnom domenu I₁-IR (Slika 15.).



Slika 15. Vezivanje *p*-jodoklonidina u aktivnom domenu I₁-IR. Ligand i ostaci aminokiselina koji učestvuju u interakcijama su predstavljeni u vidu štapića i loptica. Plavom bojom su prikazani atomi azota, a crvenom kiseonika.

Kao i rezultati QSAR studija i *docking* studija I₁-IR liganada potvrđuju važan uticaj N-atoma heterocikličnog prstena na selektivnu I₁-IR aktivaciju. Pored toga, aromatični deo u strukturi liganada stupao je u hidrofobne interakcije sa aminokiselinama aktivnog mesta što je u skladu sa dobijenom pozitivnom korelacijom između $\log D_{7,4}$ i $pK_i(I_1-IR)$ vrednosti.

4.2. QSMR STUDIJA LIGANADA IMIDAZOLINSKIH I α_2 -ADRENERGIČKIH RECEPTORA U PRISUSTVU α -, β - I γ -CIKLODEKSTRINA

4.2.1. Preliminarna QSMR studija

Uvođenje i ispitivanje novih jedinjenja sa potencijalnom I₁/I₂-IR aktivnošću zahteva i razvoj odgovorajućih analitičkih metoda za njihovo efikasno razdvajanje.

Cilj ovog rada je bio da se postavi jednostavna, brza i efikasna analitička metoda koja će omogućiti razdvajanje strukturno srodnih jedinjenja u smeši. Kapilarna elektroforeza je odabrana zbog svojih brojnih prednosti u separaciji različitih farmaceutskih i biohemijjskih smeša: smanjene potrošnje reagenasa, minimalnih količina uzoraka potrebnih za analizu, mogućnosti korišćenja različitih puferskih aditiva i dr.

Ispitivanje je započeto sa 15 jedinjenja sa afinitetom za imidazolinske i/ili α_2 -adrenergičke receptore (agmatin, *p*-aminoklonidin, klonidin, moksonidin, rilmenidin, harman, harmin, gvanabenz, idazoksan, gvanfacin, efaroksan, amilorid, klopamid, indapamid i triamteren). Detaljne farmakološke studije sprovedene na agonistima imidazolinskih receptora, kao što su klonidin, moksonidin i rilmenidin, ukazale su na njihovu stimulaciju diureze, natriureze, kaliureze i cGMP ekskreciju.^{29, 204} Pored toga, poznato je da je diuretik amilorid agonista I₂-IR⁵² zbog čega su u analizu pored amilorida uključeni i diuretici klopamid, indapamid i triamteren kao mogući potencijalni ligandi imidazolinskih receptora.

4.2.1.1. Optimizacija eksperimentalnih uslova

Hemijski, većina ispitivanih jedinjenja su derivati amidina, imidazolina ili gvanidina i poseduju bazne karakteristike. Polazeći od zavisnosti da je elektroforetska pokretljivost srazmerna odnosu naelektrisanja i mase, za sva ispitivana jedinjenja je na osnovu teorijskih pK_a vrednosti i molekulske mase izračunata pokretljivost pri različitim pH vrednostima elektrolita. Dobijeni teorijski proračuni su ukazali na veoma blisku

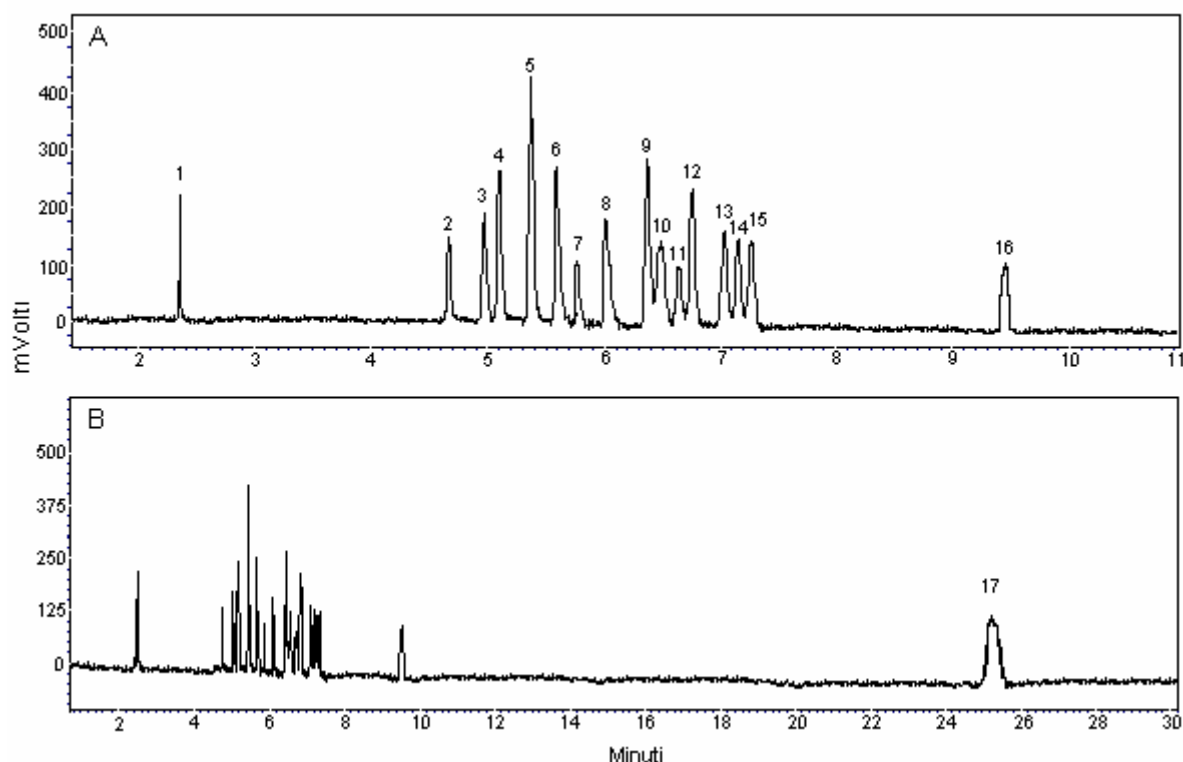
pokretljivost analiziranih jedinjenja kao i da se najveće razlike u pokretljivosti uočavaju na pH 2,8 što je ujedno i bila polazna pH vrednost u daljim ispitivanjima.

Razdvajanja su započeta na neobloženoj kapilari dužine 36,5 cm i unutrašnjeg prečnika 50 μm , na sobnoj temperaturi (25°C) sa 25 mM fosfatnim puferom pH 2,8 i pri jačini napona od 15 kV. Pri datim eksperimentalnim uslovima nije postignuto razdvajanje jedinjenja u smeši. Smanjenje napona na 10 kV dovelo je do povećanja migracionih vremena analita, dok je povećanje napona na 20 kV skratilo migraciona vremena ali bez značajnijeg poboljšanja u rezoluciji. Uticaj pH vrednosti kao najkritičnijeg parametra od kojeg zavisi stepen jonizacije pa samim tim i pokretljivost u smeši ispitan je pravljenjem serije fosfatnih pufera pH vrednosti 2,5; 2,0 i 1,5.

Snižavanje pH vrednosti elektrolita imalo je za rezultat bolju rezoluciju između ispitivanih jedinjenja pri čemu su najbolji rezultati postignuti pri pH vrednosti 1,5 i pri naponu od 10 kV čime je izbegnuto prekomerno *Joule*-ovo zagrevanje. Pri datim eksperimentalnim uslovima prisustvo elektroosmotskog toka je u velikoj meri redukovano tako da se mehanizam razdvajanja zasniva uglavnom na relativnom odnosu naelektrisanja i mase ispitivanih jedinjenja. Od 15 ispitivanih jedinjenja u smeši samo je indapamid pri datoj pH vrednosti prisutan dominantno (90%) (MarvinSketch)¹⁷⁵ u neutralnom obliku što je uticalo na njegovo znatno duže migraciono vreme u odnosu na ostala jedinjenja koja su u rastvoru bila prisutna u formi katjona. Da bi se postiglo donekle prihvatljivo vreme razdvajanja analiziranih jedinjenja, ispitan je i uticaj kraće kapilare (dužina 31 cm, unutrašnji prečnik 50 μm). Na datoj kapilari migraciono vreme indapamida je neznatno skraćeno, ali je rezolucija primenom napona od 9 kV zadržana. U daljoj optimizaciji korišćeni su sledeći uslovi: kapilara 31 cm x 50 μm , fosfatni pufer pH 1,5, napon + 9kV, elektrodinamičko injektovanje i temperatura 25°C. Sva ispitivanja su rađena pri talasnoj dužini od 200 nm usled slabe apsorpcije agmatina i rilmenidina.

Uprkos optimizaciji eksperimentalnih uslova razdvajanje nekoliko grupa ispitivanih jedinjenja u smeši nije postignuto. Tek nakon dodatka različitih koncentracija β -CD (5, 10 i 15 mM) u ispitivani elektrolit pH 1,5 došlo je do značajne modifikacije u elektroforetskoj pokretljivosti i povećanja rezolucije ispitivanih jedinjenja u smeši. Najbolje razdvajanje postignuto je u ranu od 25 min dodatkom 15 mM β -CD u fosfatni pufer pH 1,5 (Slika 16.) Dalje povećanje koncentracije ciklodekstrina bilo je ograničeno njegovom limitiranom rastvorljivošću u datom puferu.

Pri datim eksperimentalnim uslovima (15 mM β -CD) ispitan je i uticaj temperature na ponašanje jedinjenja u smeši. Povećanje temperature elektrolita iznad 25°C imalo je negativan uticaj na razdvajanje jedinjenja, dok sniženje temperature nije značajno uticala na pokretljivost jedinjenja usled čega je temperatura elektrolita podešena na 25°C. Nešto bolja rezolucija se može postići i upotrebom duže kapilare ali sa posledičnim povećanjem migracionih vremena ispitivanih jedinjenja.



Slika 16. Elektroferogrami smeše analiziranih jedinjenja. Eksperimentalni uslovi: kapilara 31 cm x 50 μ m, fosfatni pufer pH 1,5 koji sadrži 15 mM β -CD, napon +9kV, elektrodinamičko injektovanje (+ 10kV, 1s), temperatura 25°C, talasna dužina 200 nm: (A) zumirani pikovi 1-16; (B) svih 17 pikova. Migracioni redosled: agmatin (1), *p*-aminoklonidin (2), amilorid (3), klonidin (4), moksonidin (5), harman (6), rilmenidin (7), harmin (8), gvanabenz-1 (9), idazoksan (10), gvanabenz-2 (11), gvanfacin (12), triamteren (13), S-efaroksan (14), R-efaroksan (15), klopamid (16) i indapamid (17).

Datom analitičkom metodom postignuto je razdvajanje 15 ispitivanih gvanidinskih/imidazolinskih jedinjenja u smeši. Migracioni redosled ispitivanih jedinjenja je bio sledeći: agmatin, *p*-aminoklonidin, amilorid, klonidin, moksonidin, harman, rilmenidin, harmin, gvanabenz-1, idazoksan, gvanabenz-2, gvanfacin,

triamteren, S-efaroksan, R-efaroksan, klopamid i indapamid (Slika 16.). Neutralno naelektrisanje indapamida je razlog njegovog znatno dužeg migracionog vremena u poređenju sa ostalih 14 jedinjenja čije je razdvajanje postignuto za samo 10 min. Pri datim separacionim uslovima uspešno su razdvojeni i enantiomeri efaroksana pri čemu je β -CD pored svoje uloge u razdvajanju strukturno srodnih jedinjenja pokazao i ulogu hiralnog selektora.

4.2.1.2. Molekulsko modeliranje i primena MLR u QSMR analizi

Sposobnost ciklodekstrina da intereaguju sa različitim organskim i neorganskim jedinjenjima gradeći inkluzione komplekse našla je primenu i u separacionim metodama za razdvajanje strukturno srodnih jedinjenja. Metode teorijske hemije uspešno su korišćene za korelaciju elektroforetskih rezultata sa procesom kompleksiranja liganada i različitih ciklodekstrina.⁹⁴ Sa ciljem da se objasni elektroforetsko ponašanje ispitivanih gvanidinskih/imidazolinskih analoga u prisustvu β -CD i uspostavi matematička zavisnost kojom se može predvideti elektroforetska pokretljivost srodnih jedinjenja sprovedena je QSMR analiza primenom linearne regresije.

Eksperimentalno dobijeni podaci, migraciona vremena [$t(\text{min})$ i $\log(t)$] ispitivanih jedinjenja u smeši pri optimalnim eksperimentalnim uslovima, korišćeni su za dalju QSMR analizu. Preliminarna analiza podataka pokazala je dobru distribuciju $\log(t)$ vrednosti (od 0,387 do 1,401) što je bio jedan od preduslova za dobijanje značajnog regresionog modela.

Za sva ispitivana jedinjenja izračunate su pK_a vrednosti i odabrani dominantni molekularni/jonski oblici pri eksperimentalnom pH 1,5 korišćenjem MarvinSketch programa.¹⁷⁵ Amino i imino tautomeri klonidina, *p*-aminoklonidina, moksonidina i rilmenidina su korišćeni za formiranje QSMR modela. Geometrija ispitivanih jedinjenja i odgovarajućih kompleksa sa β -CD je optimizovana primenom MOPAC/PM3 metoda. Teorijski proračuni za optimizovane strukture izvršeni su u Gaussian 98 programu¹⁸¹ korišćenjem B3LYP/6-31+G(d,p) baznog seta za ligande^{177,178} i HF/3-21G(d) za ligand- β -CD komplekse. Za sve ligand- β -CD komplekse izračunata je energija kompleksiranja ΔE [HF/3-21G(d)] i entalpija ΔH [HF/3-21G(d), PM3]. Particioni koeficijent oktanol/voda ($\log P$), pK_a , distribicioni koeficijent $\log D$,

naelektrisanje, izoelektrična tačka, *Connolly* površina dostupna rastvaraču (*Connolly Solvent Accessible Surface Area*, SAS), *Connolly* molekulska površina (*Connolly Molecular Surface Area*, MS) su izračunati u MarvinSketch¹⁷⁵ i ChemPro¹³² programima. Koeficijenti korelacije su određeni za sve molekulske parametre i deskriptori sa najvišim koeficijentima korelacije su odabrani za multiparametarsku linearnu analizu.

Regresiona analiza je sprovedena sa ciljem da se ispita korelacija između elektroforetskog migracionog vremena [$t(\text{min})$ i $\log(t)$] i izračunatih deskriptora optimizovanih liganada i odgovarajućih β -CD kompleksa. Molekulski parametri koji su pokazali najveći stepen korelacije sa promenljivom Y ($\log(t)$) kao što su HOMO (*Highest Occupied Molecular Orbital*) energija [B3LYP/6-31+G(d,p) i HF/3-21G(d)], ukupno naelektrisanje jedinjenja pri pH 1,5, SAS i MS su odabrani za dalju MLR analizu. Obe površine (SAS i MS) su računane korišćenjem *Connolly* programa.²⁰⁵

Ukupno naelektrisanje jedinjenja pri pH 1,5 je bilo u dobroj korelaciji sa $\log(t)$ (r : -0,895). Relativno visoka korelacija postojala je i između $\log(t)$ i HOMO (ligand- β -CD) energije kompleksa (r : 0,810) i SAS (ligand- β -CD) površine kompleksa (r : 0,608).

Pošto se u osnovi mehanizma separacije jonskih vrsta u kapilarnoj elektroforezi nalazi pokretljivost jedinjenja na osnovu odnosa naelektrisanja i mase relativno visoka korelacija između $\log(t)$ i ukupnog naelektrisanja (r : -0,895), kao i između $\log(t)$ i SAS površine ligand- β -CD kompleksa (r : 0,608) su bile očekivane.

U molekularnoj teoriji orbitala kao što su DFT i HF teorija, jonizaciona energija jedinjenja je povezana sa HOMO energijom. Dobra pozitivna korelacija HOMO energije kompleksa (ligand- β -CD) sa $\log(t)$ vrednostima ukazuje da kompleksi sa nižom HOMO energijom imaju manju reaktivnost sa pozitivnim jonima elektrolita koji se formiraju uz zid kapilare i migriraju brže, dok kompleksi sa većom HOMO (ligand- β -CD) energijom stupaju u jače interakcije sa dvostrukim difuznim slojem i migriraju sporije.

Kombinacijom najznačajnijih deskriptora sa vrednostima $\log(t)$ formirano je nekoliko multiparametarskih linearnih modela:²⁰⁶

$$\log(t) = f[\text{SAS (ligand-}\beta\text{-CD), HOMO (ligand-}\beta\text{-CD), naelektrisanje (ligand)}] \quad (50)$$

$$\log(t) = f[\text{SAS (ligand-}\beta\text{-CD)}, \text{HOMO (ligand)}, \text{naelektrisanje (ligand)}] \quad (51)$$

$$\log(t) = f[\text{SAS (ligand)}, \text{HOMO (ligand-}\beta\text{-CD)}, \text{naelektrisanje (ligand)}] \quad (52)$$

$$\log(t) = f[\text{MS (ligand)}, \text{HOMO (ligand-}\beta\text{-CD)}, \text{naelektrisanje (ligand)}] \quad (53)$$

Bolji regresioni i validacioni parametri QSMR modela-50: $Q^2 = 0,778$, $R^2_{adj} = 0,894$ u odnosu na QSMR model-51: $Q^2 = 0,710$, $R^2_{adj} = 0,849$; QSMR model-52: $Q^2 = 0,632$, $R^2_{adj} = 0,852$ i QSMR model-53: $Q^2 = 0,614$, $R^2_{adj} = 0,851$ ukazuju na njegov najveći prognostički značaj.

QSMR model-50 koji kombinuje molekulske parametre liganda (naelektrisanje) i molekulske parametre ligand- β -CD kompleksa (HOMO i SAS) pokazao je najveću sposobnost predviđanja. Zato se predložena linearna jednačina:

$$\log(t) = 0,12304 + 0,00141 \text{ SAS (ligand-}\beta\text{-CD)} + 1,65736 \text{ HOMO (ligand-}\beta\text{-CD)} \\ - 0,14372 \text{ ukupno naelektrisanje (ligand)} \quad (54)$$

može smatrati optimalnim regresionim modelom za predviđanje elektroforetske pokretljivosti novih derivata gvanidina i imidazolina (Tabela 9.).²⁰⁶

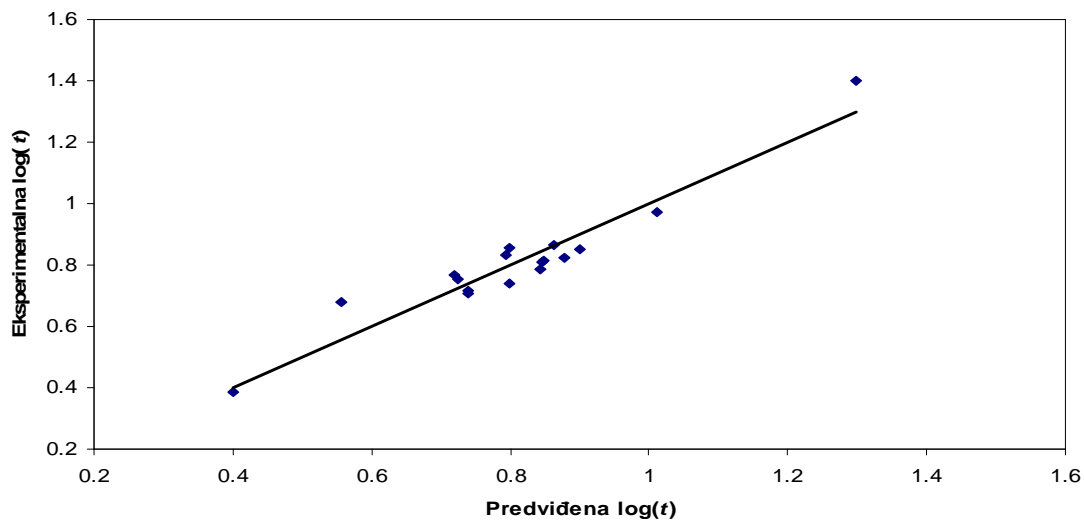
Tabela 9. Linearna zavisnost između eksperimentalno određenih vrednosti migracionog vremena ($\log(t)$) i izračunatih molekulskih parametara: SAS (ligand- β -CD), HOMO (ligand- β -CD) i ukupno naelektrisanje (ligand)

Jedinjenje	t[<i>min</i>]	log(<i>t</i>)	SAS (ligand- β -CD) [Å ²]	HOMO (ligand- β -CD) HF/3-21(d) [hartrees]	Ukupno naelektrisanje (ligand) pri pH 1,5
Agmatin	2,440	0,387	1011,090	-0,52242	2,01
<i>p</i> -aminoklonidin	4,790	0,680	1107,695	-0,53120	1,78
Amilorid	5,078	0,706	1070,720	-0,41974	1,43
Klonidin	5,206	0,717	1035,575	-0,42715	1,00
Moksonidin	5,464	0,738	1113,365	-0,45794	1,00
Harman	5,674	0,754	945,442	-0,35556	1,04
Rilmenidin	5,869	0,769	1055,585	-0,45695	1,00
Harmin	6,083	0,784	1041,400	-0,36614	1,03
Gvanabenz 1	6,433	0,808	1109,080	-0,42574	1,00
Idazoksan	6,549	0,816	1091,000	-0,40959	1,00
Gvanabenz 2	6,685	0,825	1121,490	-0,41599	1,01
Gvanfacin	6,807	0,833	1060,350	-0,41536	1,00
Triamteren	7,076	0,850	1130,710	-0,40994	1,01
S-Efaroksan	7,186	0,856	1062,840	-0,41487	1,00
R-Efaroksan	7,297	0,863	1097,060	-0,40522	1,00
Klopamid	9,379	0,972	1130,670	-0,39550	0,41
Indapamid	25,156	1,401	1169,720	-0,27986	0,13
koef. korelacije, <i>r</i>			0,608	0,810	-0,895
log(<i>t</i>) = 0,12304 + 0,00142 SAS (ligand-β-CD) + 1,657359 HOMO (ligand-β-CD) - 0,14372 naelektrisanje (ligand)					
<i>R</i> ²					0,914
<i>R</i> _{adj} ²					0,894
RMSEE					0,056
Q ² >0,5					0,778
<i>F</i> -odnos					45,897
<i>p</i> -vrednost					3,54E-07

Na Slici 17. je prikazana korelacija između eksperimentalnih i predviđenih $\log(t)$ vrednosti.

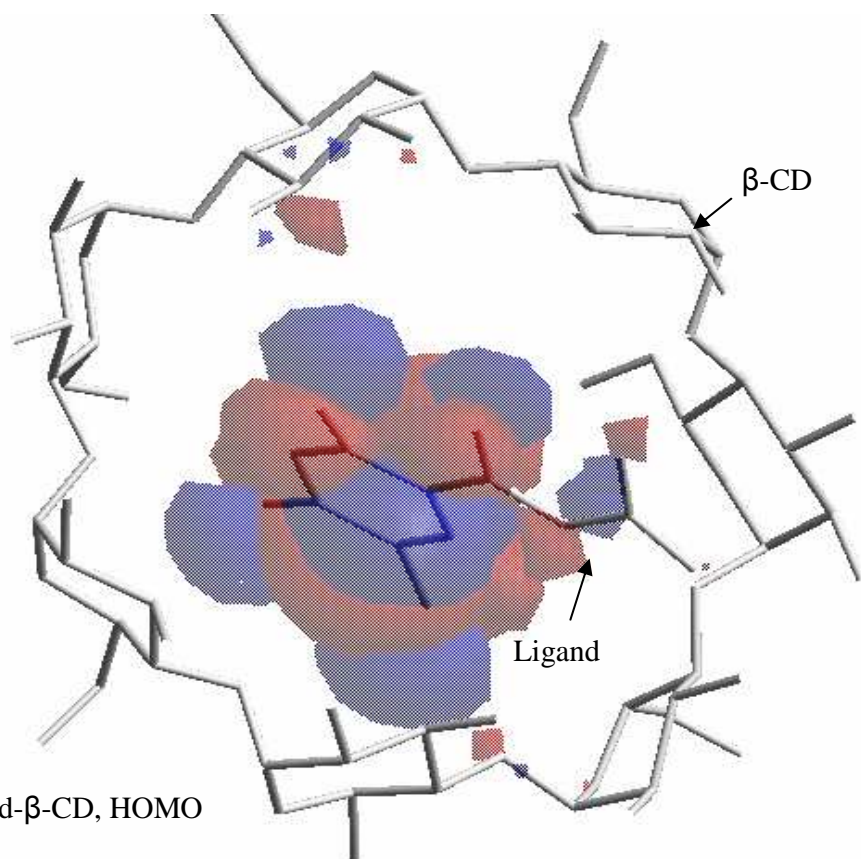
Značajno poboljšanje u regresionim parametrima dobijenim za multiparametarski model $\log(t) = f[\text{SAS (ligand-}\beta\text{-CD), HOMO (ligand-}\beta\text{-CD), naelektrisanje (ligand)}]$ u odnosu na odgovarajuće jednoparametarske modele (Tabela 9.) ukazuje na važan uticaj svih

odabranih deskriptora SAS (ligand- β CD), HOMO (ligand- β -CD), naelektrisanje (ligand) na krajnje $\log(t)$ vrednosti.

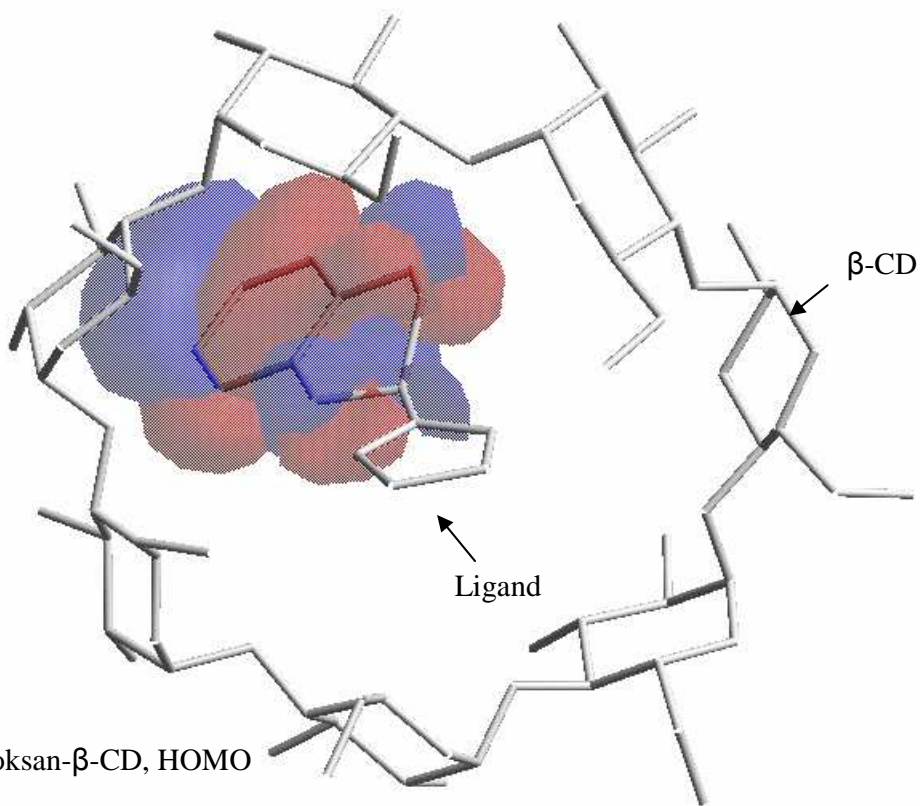


Slika 17. Korelacija između eksperimentalnih i predviđenih $\log(t)$ vrednosti.

Relativno visoka korelacija između HOMO (ligand- β -CD) i $\log(t)$ ($r:0,810$) i dominantna HOMO lokacija na ligandu u okviru ligand- β -CD kompleksa ukazuje da je ligand iz kompleksa uglavnom uključen u fizičko-hemijske interakcije sa unutrašnjim zidom kapilare i elektrolitom u toku elektroforetskog razdvajanja (Slika 18.).



a) Amilorid- β -CD, HOMO



b) Idazoksan- β -CD, HOMO

Slika 18: HOMO konformacije: a) Amilorid- β -CD i b) Idazoksan- β -CD kompleksi.

4.2.2. QSMR studija liganada imidazolinskih i α_2 -adrenergičkih receptora u kapilarnoj elektroforezi u prisustvu α -, β - i γ -ciklodekstrina

Značaj kapilarne elektroforeze u ispitivanju i razdvajanju farmaceutskih smeša potvrđen je rezultatima prethodnog istraživanja u kojem je na brz i jednostavan način izvršeno razdvajanje 15 liganada imidazolinskih receptora. Naročito je važno istaći ulogu koju je imao β -ciklodekstrin u modifikaciji elektroforetskog ponašanja ispitivanih jedinjenja čime je omogućena analiza i razdvajanje strukturno veoma sličnih liganada bliske elektroforetske pokretljivosti.

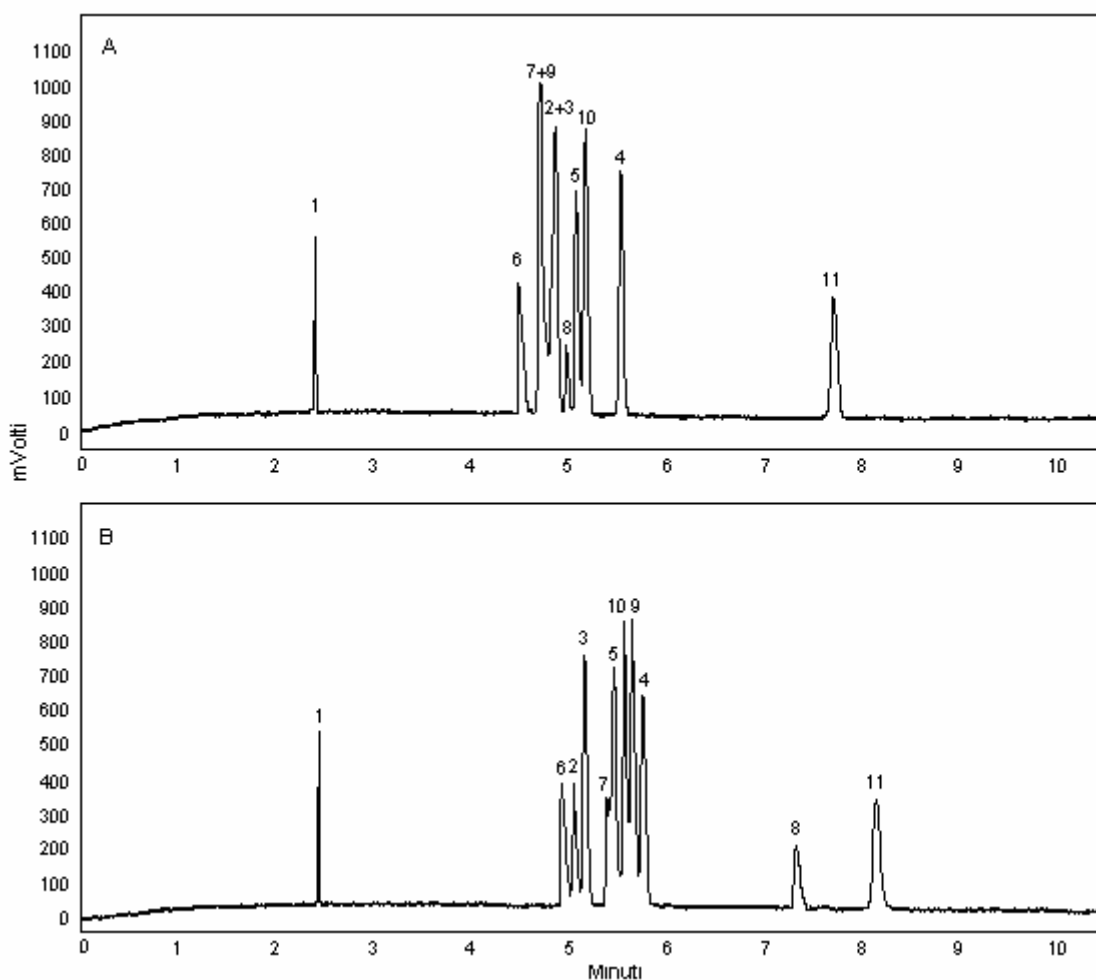
Rezultati sprovedene QSMR analize i uspostavljena matematička zavisnost između migracionog vremena i molekulskih parametara ispitivanih liganada i ligand- β -CD kompleksa ($\log(t) = f[\text{SAS (ligand-}\beta\text{-CD), HOMO (ligand-}\beta\text{-CD), naelektrisanje (ligand)}]$) pokazali su da se na brz i jednostavan način teorijskim proračunima odgovarajućih deskriptora može predvideti elektroforetsko ponašanje novih, strukturno srodnih liganada imidazolinskih receptora. To je istovremeno i jedan od načina da se izbegnu brojni i dugotrajni eksperimenti u pronalaženju optimalnih separacionih uslova za analizu srodnih jedinjenja u smeši.

Polazeći od činjenice da kompleksiranje ciklodekstrina sa ligandom zavisi ne samo od karakteristika liganda nego i od vrste i strukture samog ciklodekstrina, efekat različitih ciklodekstrinskih aditiva na elektroforetsku pokretljivost nije uvek jednostavno predvideti. Zato je prethodno izvedena studija proširena sa još dva često korišćena ciklodekstrina kao što su α - i γ -ciklodekstrin. Pored toga, primenjene su i dodatne, linearne i nelinearne statističke metode, i izvršeno je njihovo poređenje u pouzdanosti predviđanja elektroforetske pokretljivosti novih imidazolinskih liganada pri različitim elektroforetskim uslovima i u prisustvu tri najčešće korišćena ciklodekstrina, α -CD, β -CD i γ -CD.

U cilju realnog poređenja različitih statističkih pristupa i načina odabira najznačajnijih molekulskih parametara, kao i u cilju postavljanja strožijih kriterijuma u validaciji, ispitivanja elektroforetske pokretljivosti su nastavljena sa 11 jedinjenja, dok su 4 liganda izdvojena za eksternu validaciju.

4.2.2.1. Optimizacija eksperimentalnih uslova i molekulsko modeliranje

Optimizacija eksperimentalnih uslova započeta je sa 11 jedinjenja (agmatin, amilorid, klonidin, tizanidin, moksonidin, harman, rilmenidin, harmin, idazoksan, gvanfacin i klopamid). Na osnovu teorijskih proračuna pK_a vrednosti i rezultata prethodne CE studije kisela sredina je inicijalno izabrana za razdvajanje 11 jedinjenja u smeši. Koncentracija i pH vrednost pufera, temperatura i napon su menjani u malim procentima sa ciljem da se postigne zadovoljavajuća rezolucija.



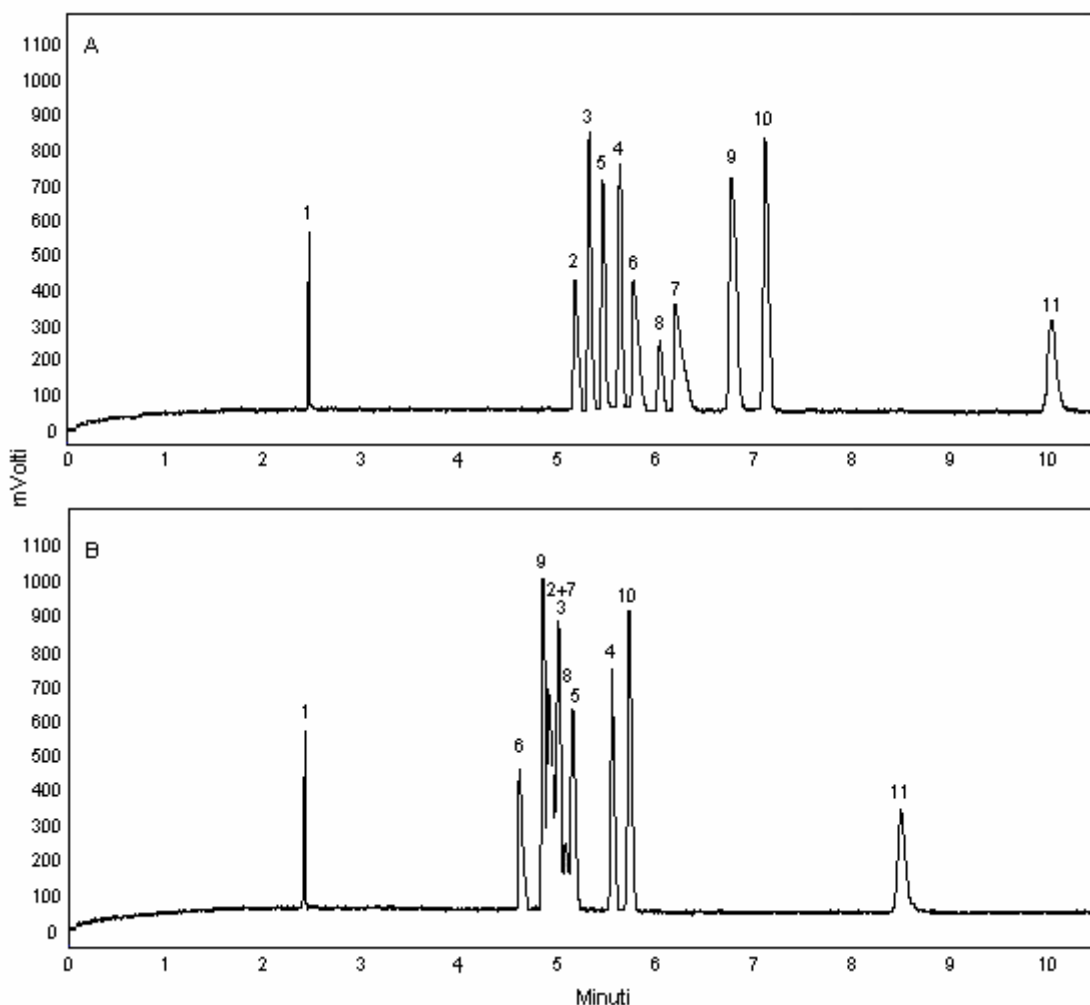
Slika 19. Elektroferogrami ispitivane smeše jedinjenja u prisustvu različitih elektrolita: (A) 30 mM fosfatni pufer pH 2,0 bez CD; (B) 30 mM fosfatni pufer pH 2,0 koji sadrži 12 mM α -CD; Migracioni redosled: 1-agmatin, 2-amilorid, 3-klonidin, 4-moksonidin, 5-tizanidin, 6-harman, 7-harmin, 8-rilmenidin, 9-idazoksan, 10-gvanfacin, 11-klopamid.

Uprkos optimizaciji eksperimentalnih uslova nije postignuto razdvajanje nekoliko grupa jedinjenja (harmin i idazoksan, amilorid i klonidin), ali su eksperimentalni uslovi 30 mM fosfatni pufer pH 2,0, napon od +9 kV i temperatura 25°C odabrani za dalja ispitivanja (Slika 19A.).

Sa ciljem da se postigne razdvajanje kritičnih pikova, ispitan je uticaj 3 različita ciklodekstrina, α -, β - i γ -CD.²⁰⁷ Različite koncentracije α -, β - i γ -CD su nezavisno rastvorene u 30 mM fosfatnom puferu pH 2,0 i pri navedenim eksperimentalnim uslovima (+9 kV i 25°C) ispitan je njihov uticaj na separaciono i migraciono ponašanje ispitivane smeše jedinjenja. Najbolja rezolucija između ispitivanih jedinjenja postignuta je u prisustvu 12 mM α -CD (Slika 19B.), 15 mM β -CD (Slika 20A.), i 6 mM γ -CD (Slika 20B.).

Dodatak α -CD (12 mM) u ispitivani elektrolit doveo je do nešto boljeg, ali ne i potpunog, razdvajanja harmina i idazoksana, kao i amilorida i klonidina. Promena u migracionom ponašanju naročito je bila evidentna kod rilmenidina čije se migraciono vreme produžilo sa 4,9 na 7,3 minuta.

Dodatak γ -CD je imao najmanji uticaj na migraciono ponašanje ispitivanih jedinjenja pri čemu su najveće promene u migracionom ponašanju uočene u prisustvu 6 mM γ -CD i to između pikova gvanfacina i moksonidina. Optimalni elektroforetski uslovi uz potpuno razdvajanje 11 jedinjenja u smeši za samo 10 minuta postignuti su u prisustvu 15 mM β -CD rastvorenog u 30 mM fosfatnom puferu pH 2,0, pri naponu od +9 kV, temperaturi 25°C i uz elektrodinamičko injektovanje (10 kV, 1s).



Slika 20. Elektroferogrami ispitivane smeše jedinjenja u prisustvu različitih elektrolita: (A) 30 mM fosfatni pufer pH 2,0 koji sadrži 15 mM β -CD; (B) 30 mM fosfatni pufer pH 2,0 koji sadrži 6 mM γ -CD. Migracioni redosled: 1-agmatin, 2-amilorid, 3-klonidin, 4-moksonidin, 5-tizanidin, 6-harman, 7-harmin, 8-rilmenidin, 9-idazoksan, 10-gvanfacin, 11-klopamid.

Analiza jedinjenja korišćenih u eksternoj validaciji (nafazolin, efaroksan i triamteren) izvršena je njihovim pojedinačnim ispitivanjem u smeši sa agmatinom pri eksperimentalnim uslovima u kojima je postignuto najbolje razdvajanje ispitivane smeše jedinjenja (u prisustvu 12 mM α -CD, 15 mM β -CD i 6 mM γ -CD).

Na početku teorijske studije koja je imala za cilj da se dobije više informacija o interakcijama između ispitivanih jedinjenja i različitih ciklodekstrina u datim CE sistemima, kompleksiranje liganada sa α -, β - i γ -ciklodekstrinom je ispitano semiempirijskim PM3 metodom u Gaussian 98 programu.¹⁸¹ Ranije sprovedene teorijske studije koje su poredile dva semi-empirijska metoda, AM1 i PM3, ukazale su na

prednost PM3 metoda u teorijskim ispitivanjima ciklodekstrina.⁹² To je potvrđeno i rezultatima koji su dobijeni optimizacijom α -i β -ciklodekstrina AM1 i PM3 metodama, gde je PM3 metodom dobijena geometrija CD bila sličnija kristalnoj strukturi, dok je AM1 metodom geometrija molekule bila iskrivljena usled neracionalno formiranih vodoničnih veza.⁹²

Negativne vrednosti energije kompleksiranja dobijene za α -, β - i γ -CD komplekse ukazuju na tendenciju ispitivanih jedinjenja ka kompleksiranju (Tabela 10.).²⁰⁷ Rezultati dobijeni za harman- β -CD i harmin- β -CD komplekse bili su u skladu sa eksperimentalnim podacima dobijenim ¹³C-NMR, ¹H-NMR, IC i UV-VIS spektralnom analizom.⁸⁵ U Tabeli 10. su prikazani termodinamički parametri: promena entalpije (ΔH°), entropija (ΔS°) i *Gibbs*-ova slobodna energija (ΔG°) izračunati za komplekse svih ispitivanih jedinjenja sa α -, β - i γ -CD. Za najveći broj jedinjenja dobijeni rezultati pokazuju da je afinitet liganada prema šupljinama ciklodekstrina entalpijski ($\Delta H^\circ < 0$) i energetski ($\Delta G^\circ < 0$) favorizovan proces, dok entropija sistema koja je manja od nule ($\Delta S^\circ < 0$) ukazuje na nefavorizovan proces. Iz negativnih vrednosti ΔH° i ΔS° se može zaključiti da su *van der Waals*-ove interakcije i vodonične veze značajnije od hidrofobnih interakcija u toku kompleksiranja I-IR/ α_2 -AR liganada i ciklodekstrina.^{91,208}

Tabela 10. Energije kompleksiranja i termodinamičke osobine izračunate za najstabilnije komplekse liganada sa α -, β - i γ -ciklodekstrinom

Jedinjenja	α -ciklodekstrin				β -ciklodekstrin				γ -ciklodekstrin			
	ΔE [Kcal/mol]	ΔH° [Kcal/mol]	ΔG° [Kcal/mol]	ΔS° [cal/molK]	ΔE [Kcal/mol]	ΔH° [Kcal/mol]	ΔG° [Kcal/mol]	ΔS° [cal/molK]	ΔE [Kcal/mol]	ΔH° [Kcal/mol]	ΔG° [Kcal/mol]	ΔS° [cal/molK]
Agmatin	-71,699	-68,201	-43,870	-81,605	-47,440	-41,727	-19,116	-75,840	-65,255	-59,101	-36,861	-74,594
Amilorid	-17,326	-16,584	-2,856	-46,046	-16,284	-13,244	5,347	-62,355	-28,972	-10,278	2,796	-43,849
Klonidin	-26,393	-25,565	-7,498	-60,598	-17,991	-18,218	2,225	-68,564	-25,169	-24,522	-8,905	-52,381
Moksonidin	-27,598	-26,864	-5,027	-73,243	-20,306	-16,730	1,674	-61,728	-26,669	-23,790	-5,053	-62,841
Tizanidin	-27,290	-27,575	-11,754	-53,065	-19,265	-17,388	-2,408	-50,243	-20,902	-19,297	-0,485	-63,094
Harman	-33,471	-31,349	-8,325	-77,223	-26,393	-24,344	-3,653	-69,398	-33,484	-31,994	-11,653	-68,221
Harmin	-26,355	-23,169	-2,837	-68,194	-25,640	-23,941	-6,004	-60,162	-33,609	-32,122	-11,259	-69,976
Rilmenidin	-31,162	-27,449	-2,573	-83,432	-27,328	-25,649	-5,904	-66,224	-32,442	-28,309	-9,490	-63,119
Idazoksan	-28,815	-27,629	-8,987	-62,526	-24,768	-22,467	-5,836	-55,780	-30,572	-28,563	-14,376	-47,585
Gvanfacin	-29,142	-25,665	-8,515	-57,519	-19,396	-18,293	-1,597	-55,999	-26,581	-24,258	-7,882	-54,926
Klopamid	-16,968	-13,426	12,107	-85,637	-17,721	-15,481	4,234	-66,127	-19,547	-17,555	-0,108	-58,518
Nafazolin	-27,328	-22,450	-0,373	-74,047	-26,029	-23,099	-1,388	-72,820	-33,929	-29,835	-6,525	-78,180
Triamteren	-21,699	-17,651	4,939	-75,768	-16,334	-13,163	6,457	-65,805	-21,756	-19,555	0,994	-68,922
S-efaroksan ^{a)}	-23,827	-22,039	-1,160	-70,031	-25,370	-22,610	-0,780	-73,220	-28,389	-25,237	-9,453	-52,941
R-efaroksan ^{a)}	-24,937	-21,455	2,959	-81,885	-20,739	-21,402	0,313	-72,834				

^{a)} Enantioseparacija efaroksana nije postignuta u prisustvu optimalne koncentracije γ -CD (6 mM)

4.2.2.2. Postupna MLR, PLS i ANN-QSMR studija

Kvantitativna regresiona analiza je izvršena sa ciljem da se uspostavi korelacija između relativnih migracionih vremena ispitivanih gvanidinskih/imidazolinskih derivata dobijenih pri odgovarajućim CE uslovima i optimalnim koncentracijama ciklodekstrina (Slika 19. i 20.) i izračunatih molekulskih parametara optimizovanih liganada i odgovarajućih α -CD, β -CD i γ -CD kompleksa. Za formiranje regresionih modela korišćene su linearne (postupna MLR i PLS) i nelinearne (ANN) statističke metode.

Da bi se omogućilo adekvatno poređenje različitih statističkih metoda za formiranje regresionih modela u svim slučajevima je korišćen isti trening set od 11 jedinjenja (agmatin, amilorid, klonidin, tizanidin, moksonidin, harman, rilmenidin, harmin, idazoksan, gvanfacin, klopamid) i test set od 4 jedinjenja (nafazolin, triamteren, S-efaroksan i R-efaroksan). Treba napomenuti da su enantiomeri efaroksana uspešno razdvojeni u prisustvu 12 mM α -CD i 15 mM β -CD, dok sa optimalnom koncentracijom γ -CD razdvajanje nije postignuto, te je i test set u slučaju γ -CD činilo 3 jedinjenja (nafazolin, triamteren i efaroksan). Za procenu kvaliteta formiranih jednačina i odabir statistički najznačajnijih modela korišćeni su sledeći statistički parametri: R^2 , F odnos, p vrednost, RMSEE, RMSEP i validacioni regresioni faktor Q^2 .¹⁶⁹

Primenom postupne MLR metode najznačajniji linearni regresioni modeli formirani su sa 2 deskriptora u slučaju α -CD (QSMR(α -CD)), 3 deskriptora za β -CD (QSMR(β -CD)) i 2 deskriptora za γ -CD (QSMR(γ -CD)). Dobijeni statistički rezultati i formirane jednačine su prikazani u Tabeli 11.

PLS analizom od izračunatih molekulskih deskriptora samo oni sa VIP vrednostima većim od 0,5 su razmatrani u formiranju modela i najrelevantniji deskriptori, sa visokim VIP vrednostima odabrani za PLS modelovanje. Statistički najznačajniji modeli dobijeni PLS analizom su prikazani u Tabeli 11.²⁰⁷

Tabela 11. Statistički parametri za MLR, PLS i ANN modele

Modeli	Regresiona jednačina/odabrani deskriptori	RMSEE	RMSEP	Q ²	r	R ²	F	p
Pojedinačni α-CD modeli								
Postupna MLR	RMT=5,05903 - 12,25830 χ (ligand- α -CD) [B3LYP/3-21G(d)] - 5,79760 Tcon (ligand)	0,181	0,312	0,765	0,945	0,893	33,285	0,00013
PLS ^{a)}	RMT= $f(\chi$ (ligand- α -CD) [B3LYP/3-21G(d)]; Δ G (ligand- α -CD) [PM3])	0,193	0,239	0,869	0,937	0,879	26,428	0,00030
ANN	RMT= $f(\chi$ (ligand- α -CD) [B3LYP/3-21G(d)], Tcon-ligand, HOMO-ligand [B3LYP/6-31+G(d,p)], logD-ligand, ω -ligand [HF/3-21G(d)], PMIZ-ligand, E-ligand, Eb-ligand)	0,317	0,170	0,456	0,866			
Pojedinačni β-CD modeli								
Postupna MLR	RMT=3,62080 - 0,00699 Hf(ligand) + 0,00783 Ed(ligand) - 0,01054 Et(ligand)	0,184	0,519	0,855	0,965	0,931	31,250	0,00020
PLS ^{a)}	RMT= $f(\chi$ (ligand- β -CD) [HF/3-21G(d)]; ShpA (ligand))	0,193	0,242	0,911	0,961	0,924	41,186	6,14E-05
ANN	RMT= f (Hf-ligand [PM3], Ed-ligand, Et-ligand, PSA-pH2-ligand, PMIX-ligand, Esb-ligand, ClsC-ligand, Δ E (ligand- β -CD)[HF/3-21G(d)])	0,257	0,262	0,427	0,959			
Pojedinačni γ-CD modeli								
Postupna MLR ^{a)}	RMT=3,78027 - 7,13550 χ (ligand) [B3LYP/3-21G(d)] + 0,00053 PMIX (ligand)	0,081	0,288	0,966	0,989	0,978	181,318	2,17E-07
PLS	RMT = $f(\chi$ -ligand[B3LYP/3-21G(d)]; Mass-ligand)	0,110	0,179	0,958	0,980	0,961	90,138	3,26E-06
ANN	RMT= $f(\chi$ (ligand) [B3LYP/3-21G(d)], PMIX-ligand, Δ E (ligand- γ -CD) [HF/STO-3G(d)], E1.4-ligand, SASA-ligand, E-ligand, Eb-ligand, ClogP-ligand, Bindx-ligand)	0,210	0,124	0,316	0,936			

^{a)} Optimalni modeli za različite CE sisteme koji sadrže α -, β - ili γ -CD. Nazivi odabranih deskriptora i njihove skraćenice nalaze se u Tabeli 3. (eksperimentalni deo).

Višeslojni perceptron (MLP) uz *back propagation* (BP) algoritam je odabran za nelinearno QSMR modeliranje. Prvi korak u konstrukciji veštačkih neuronskih mreža je odabir odgovarajućih deskriptora. Genetički algoritam,²⁰⁹ analiza osnovnih komponenti (*Principal Component Analysis*, PCA)²¹⁰ i postupna MLR su uspešno korišćeni u tu svrhu.^{211,212} U ovom radu je za odabir deskriptora primenjena postupna MLR metoda.

Svi podaci su podeljeni u trening (11 jedinjenja), verifikacioni (nafazolin, R-efaroksan) i test set (triamteren, S-efaroksan) za α -CD i β -CD. U slučaju γ -CD enantioseparacija efaroksana nije postignuta tako da je korišćen isti trening (11 jedinjenja) i nešto izmenjen verifikacioni (nafazolin i triamteren) i test set (efaroksan). Primenom postupne MLR metodologije odabrani su setovi od 3, 5 i 9 značajnih deskriptora za ANN trening. Broj odabranih deskriptora imao je najveći uticaj na Q^2 vrednost. Povećan broj ulaznih varijabli dao je i mrežu boljih performansi (regresioni odnos je bio manji) i Q^2 vrednost veća. Devet odabranih deskriptora dalo je najbolje statističke rezultate prikazane u Tabeli 11. Odabrana topologija (arhitektura) mreža, brzina učenja i *momentum*, broj epoha, kao i regresioni odnos i RMSE za verifikacioni set koji su pored Q^2 , r , RMSEE i RMSEP korišćeni za odabir najbolje mreže su prikazani u Tabeli 12.

Dobijeni statistički parametri (RMSEP računat iz verifikacionog i test seta: 0,170 za ANN-QSMR(α -CD), 0,262 za ANN-QSMR(β -CD) i 0,124 za ANN-QSMR(γ -CD)) za odabrane ANN-QSMR modele ukazuju na dobru sposobnost predviđanja podataka koji nisu korišćeni za treniranje mreže, a koji imaju RMT bliska srednjim eksperimentalnim vrednostima. Iznenađujuće je da formirani modeli nisu prošli LOO-CV validaciju usled veoma lošeg predviđanja migracionog vremena agmatina, koji ima najveću pokretljivost i klopamida koji ima najmanju pokretljivost u smeši. Nedovoljna tačnost formiranih ANN modela u predviđanju RMT prvog i poslednjeg jedinjenja u smeši može se izdvojiti kao glavni nedostatak odabranih ANN-QSMR modela. Greška u predviđanju RMT ostalih jedinjenja u smeši u toku ukrštene validacije bila je za sve formirane ANN-QSMR(α -CD), ANN-QSMR(β -CD), ANN-QSMR(γ -CD) modele u granicama prihvatljivosti, slično kao kod linearnih modela. Značajan raskorak između niskih vrednosti RMSEE i RMSEP na jednoj strani i nedovoljno visoke vrednosti Q^2 na drugoj strani ukazuje da je LOO-CV validacija ključni verifikacioni korak u toku ANN modeliranja.

Tabela 12. Topologija statistički najznačajnijih mreža za ANN-QSMR(α -CD), ANN-QSMR(β -CD) i ANN-QSMR(γ -CD) modele

Modeli	Br. čvorova u ulaznom sloju	Br. čvorova u skrivenom sloju	Br. čvorova u izlaznom sloju	Broj epoha	Brzina učenja	<i>Momentum</i>	Regresioni odnos	RMSE verifikacionog seta	Q^2
ANN-QSMR(α -CD)	9	12	1	109	0,1	0,3	0,78430	0,200	0,456
ANN-QSMR(β -CD)	9	12	1	282	0,1	0,3	0,35191	0,104	0,427
ANN-QSMR(γ -CD)	9	12	1	369	0,1	0,3	0,51199	0,121	0,316

Linearne statističke metode (postupna MLR i PLS) pokazale su superiornost u odnosu na nelinearnu (ANN). Formirani linearni modeli imali su bolje statističke parametre u odnosu na ANN modele. Nešto niža vrednost RMSEP (PLS: 0,239; postupna MLR: 0,312) i viša Q^2 vrednost (PLS: 0,869; postupna MLR: 0,765) u PLS analizi ukazuju da PLS-QSMR(α -CD) model može biti izdvojen kao optimalan model za predviđanje RMT u prisustvu α -CD. Znatno niža RMSEP (PLS: 0,242; postupna MLR: 0,519) i viša Q^2 vrednost (PLS: 0,911; postupna MLR: 0,855) dobijena u PLS-QSMR(β -CD) modelu pokazuje da ovaj model ima bolju sposobnost predviđanja RMT ispitivanih jedinjenja u prisustvu β -CD u odnosu na MLR model. Kada je reč o γ -CD-QSMR studiji, iako je RMSEP bila nešto niža u PLS analizi (PLS: 0,179; postupna MLR: 0,288), MLR-QSMR(γ -CD) model je odabran kao pouzdaniji usled boljih statističkih vrednosti RMSEE, r (korelacija između eksperimentalnih i predviđenih vrednosti), Q^2 , R^2 , F i p . (Tabela 11.). Eksperimentalno dobijene i odabranim modelima predviđene RMT vrednosti su prikazane u Tabeli 13.²⁰⁷

Tabela 13. Eksperimentalne i predviđene RMT vrednosti za optimalne QSMR modele (PLS-QSMR(α -CD), PLS-QSMR(β -CD) i postupna MLR-QSMR(γ -CD))

Jedinjenja	12 mM α -CD		15 mM β -CD		6mM γ -CD	
	Eksp.	Predvid.	Eksp.	Predvid.	Eksp.	Predvid.
Trening set						
Agmatin	1,0000 (2,44 min)	1,0159	1,0000 (2,45 min)	1,1059	1,0000 (2,41 min)	0,9976
Amilorid	2,0588	2,2417	2,1045	2,3576	2,0249	2,1728
Klonidin	2,1047	2,3251	2,1617	2,3238	2,0673	2,1507
Moksonidin	2,3456	2,3372	2,2909	2,4727	2,2924	2,2949
Tizanidin	2,2246	2,0297	2,2195	2,2251	2,1287	2,1849
Harman	2,0082	2,1660	2,3452	2,3258	1,9026	1,8965
Harmin	2,1950	2,3632	2,5186	2,5416	2,0249	2,0205
Rilmenidin	2,9798	2,5110	2,4538	2,2458	2,0981	1,9821
Idazoksan	2,3000	2,2168	2,7501	2,6036	2,0053	2,0204
Gvanfacin	2,2688	2,2132	2,8909	2,4431	2,3648	2,2031
Klopidamid	3,3127	3,3784	4,0827	4,1731	3,5049	3,4903
RMSEE		0,193		0,193		0,081
Test set						
Nafazolin	2,1573	2,5541	2,4587	2,8045	2,1260	2,2094
S-efaroksan	2,6082	2,3590	2,9635	2,7765	2,2587	2,2044
R-efaroksan	2,6664	2,5987	3,0221	2,8155	2,2587	2,2044
Triamteren	2,4726	2,4104	2,9266	2,7353	2,5707	2,0812
RMSEP		0,239		0,242		0,288

Na osnovu statističkih parametara prikazanih za sve formirane modele (Tabela 11.), kao optimalni modeli koji se pouzdano mogu koristiti za predviđanje elektroforetske pokretljivosti novih jedinjenja, derivata gvanidina/imidazolina, u prisustvu jednog od ciklodekstrina (α -, β - ili γ -CD) su izdvojeni:

PLS-QSMR(α -CD) model:

$$\mathbf{RMT} = f(\chi \text{ (ligand-}\alpha\text{-CD) [B3LYP-3-21G(d)]; } \Delta G \text{ (ligand-}\alpha\text{-CD) [PM3]}) \quad (55)$$

$$Q^2 = 0,869; \text{RMSEE} = 0,193; \text{RMSEP} = 0,239; r = 0,937; F = 26,428; p = 0,00030$$

PLS-QSMR(β -CD) model:

$$\mathbf{RMT} = f(\chi(\text{ligand-}\beta\text{-CD}) [\mathbf{HF-3-21G(d)}]; \mathbf{ShpA}(\text{ligand})) \quad (56)$$

$$Q^2 = 0,911; \text{RMSEE} = 0,193; \text{RMSEP} = 0,242; r = 0,961; F = 41,186; p = 6,14E-05$$

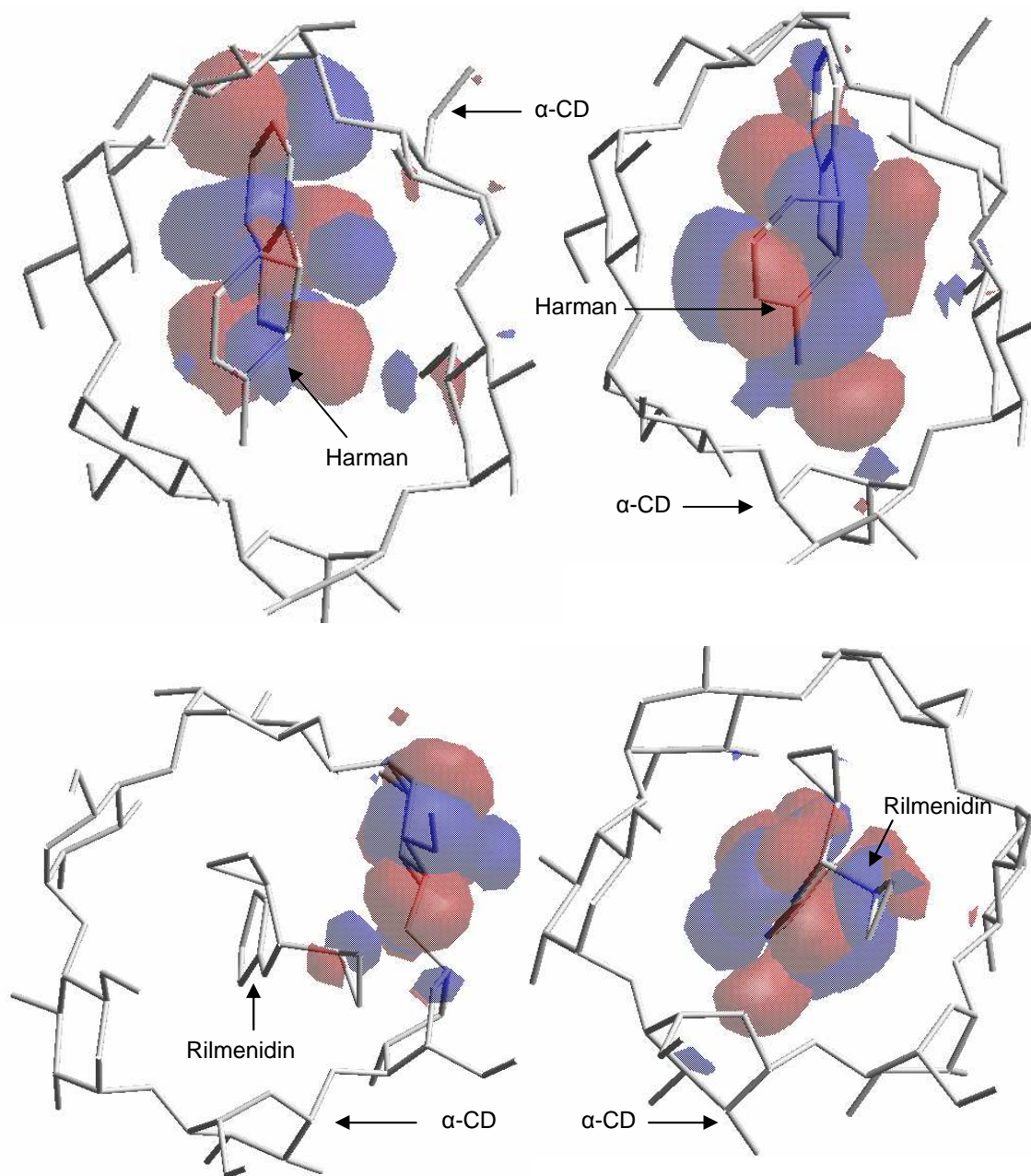
Postupna MLR-QSMR(γ -CD) model:

$$\mathbf{RMT} = 3,78027 - 7,13550 \chi(\text{ligand}) [\mathbf{B3LYP-3-21G(d)}] + 0,00053 \mathbf{PMIX}(\text{ligand}) \quad (57)$$

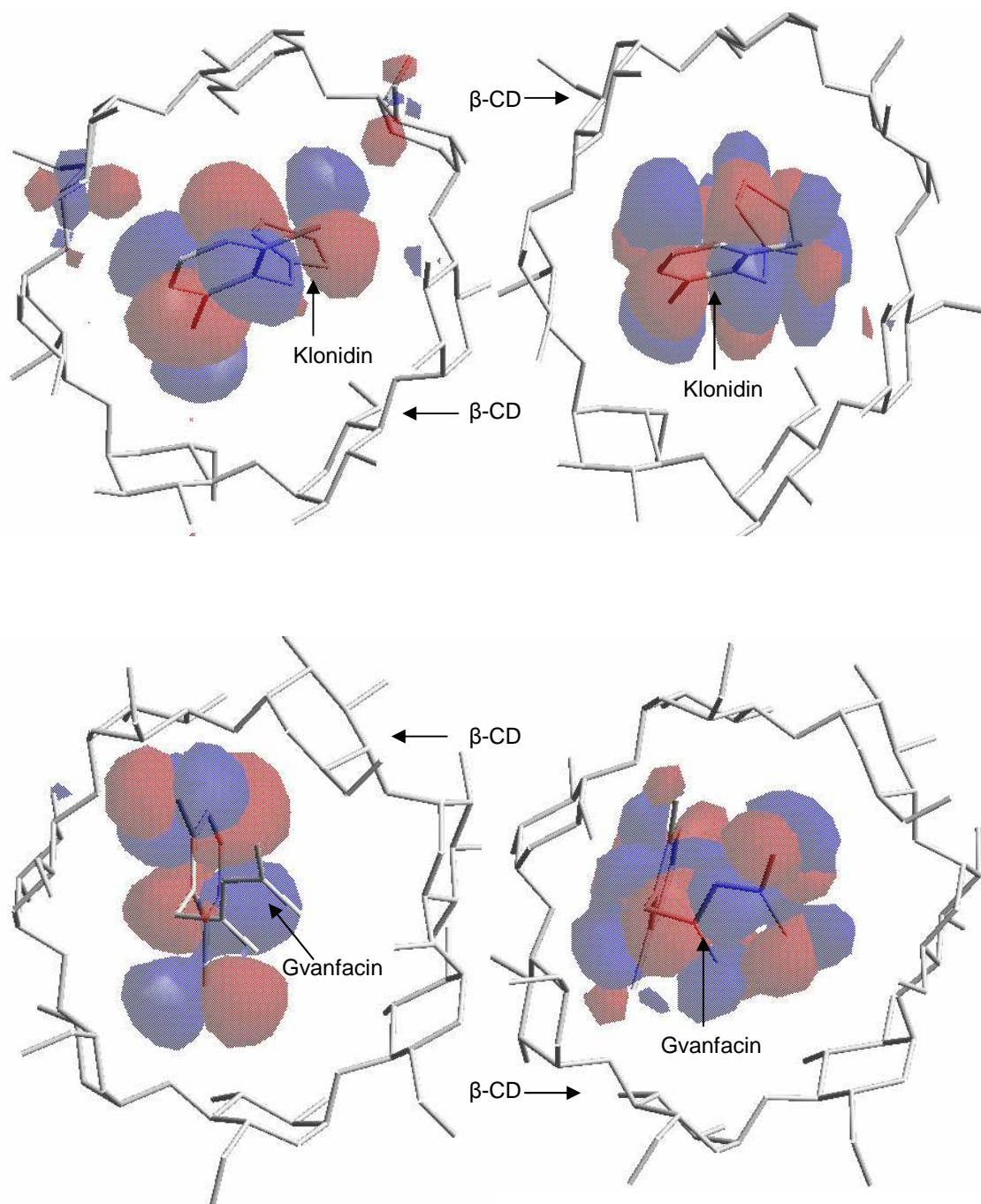
$$Q^2 = 0,966; \text{RMSEE} = 0,081; \text{RMSEP} = 0,288; r = 0,989; F = 181,318; p = 2,17E-07$$

Vrednosti molekulskih deskriptora za odabrane modele nalaze se u **Prilogu A** (Tabele 28., 29. i 30.).

Elektronegativnost kompleksa (χ (ligand- α -CD), χ (ligand- β -CD)), koja pripada elektronskoj klasi deskriptora, izdvojena je kao važan deskriptor u predviđanju migracionog ponašanja i u prisustvu α -CD i u prisustvu β -CD. *Pauling* je uveo koncept elektronegativnosti kao sposobnost atoma u molekuli da privlače elektrone.²¹³ Visoka negativna korelacija elektronegativnosti kompleksa (χ (ligand- α -CD) i χ (ligand- β -CD)) sa relativnim migracionim vremenom u skladu je sa teorijom razdvajanja jonskih vrsta u kapilarnoj elektroforezi na osnovu relativnog odnosa mase i naelektrisanja. Elektronegativniji kompleks migriraće brže prema negativno naelektrisanjoj elektrodi usled tendencije da prihvati elektron. Na Slici 21. su prikazane HOMO i LUMO orbitale harman- α -CD and rilmenidin- α -CD kompleksa. LUMO je uvek locirana na ligandu, dok je HOMO na ligandu ili α -ciklodekstrinu. Na Slici 22. su prikazane HOMO i LUMO klonidin- β -CD i gvanfacin- β -CD kompleksa. I HOMO i LUMO su pozicionirani na ligandu.



Slika 21. HOMO (levo) i LUMO (desno) konformacije harman- α -CD i rilmenidin- α -CD kompleksa.



Slika 22. HOMO (levo) i LUMO (desno) konformacije klonidin-β-CD i gvanfacin-β-CD kompleksa.

Visoka pozitivna korelacija između *Gibbs*-ove enerije kompleksa (ΔG (ligand- α -CD)) i RMT ukazuje da kompleksi liganda i α -CD sa višim vrednostima ΔG imaju duže migraciono vreme. *Gibbs*-ova slobodna energija je termodinamički parametar važan za bolje razumevanje procesa kompleksiranja liganda i ciklodekstrina. Termodinamička korist domaćin-gost interakcije ogleda se u smanjenju ukupne *Gibbs*-ove energije do koje dolazi kao rezultat interakcije liganda i ciklodekstrina. Negativne vrednosti ovog parametra dobijene za ligand- α -CD komplekse ukazuju da se proces kompleksiranja odvija spontano na 25°C.

Pozitivna korelacija karakteristike oblika (*Shape attribute*, ShpA) sa RMT u jednačini koja definiše pokretljivost u prisustvu β -CD pokazuje da jedinjenja koja imaju voluminoznije grupe u svojoj strukturi imaju duže migraciono vreme usled većeg afiniteta ka hidrofobnom džepu β -CD. ShpA pripada klasi sternih deskriptora i ukazuje na značaj topologije samog jedinjenja u reakciji vezivanja sa ciljnim mestom, u ovom slučaju β -ciklodekstrinom.

Negativna korelacija između elektronegativnosti liganda (χ (ligand)) i RMT u modelu koji definiše pokretljivost u prisustvu γ -CD ukazuje da će elektronegativniji ligandi manje intereagovati sa hidrofobnim džepom γ -CD i migrirati brže prema katodi.

Pozitivna korelacija između glavnog momenta inercije X (*Principal Moment of Inertia* X, PMIX) i RMT (γ -CD) pokazuje da će jedinjenja sa višim vrednostima PMIX imati duže migraciono vreme. PMIX pripada klasi sternih deskriptora i predstavlja moment inercije kada je X osa *Cartesian*-ovog koordinacionog sistema glavna osa u ispitivanom molekulu.

4.2.2.3. *Multi-target* QSMR studija

Multi-target QSMR studija (mQSMR) je sprovedena sa ciljem da se dobije generalizovana jednačina na osnovu koje se može izvršiti predviđanje migracionog ponašanja srodnih imidazolinskih/gvanidinskih derivata u prisustvu α -CD, β -CD ili γ -CD.²⁰⁷ Za formiranje odgovarajućih modela korišćeni su samo molekularni parametri liganda sa najvećim uticajem na RMT. mQSMR modeli koji definišu zavisnost između nezavisne promenljive X (deskriptori liganda) i tri zavisne promenljive Y (relativno migraciono vreme u prisustvu 12 mM α -CD (Y1), 15 mM β -CD (Y2) i 6 mM γ -CD

(Y3)) formirani su primenom PLS i ANN statističkih metoda. Postupna MLR metoda se ne može primeniti za formiranje regresione jednačine sa više od jedne zavisne promenljive Y zbog čega ova metoda nije korišćena u mQSMR analizi. Ista procedura i trening algoritmi korišćeni u formiranju pojedinačnih QSMR modela primenjeni su i u mQSMR analizi.

Primenom PLS metoda najbolji statistički rezultati, kumulativno $Q^2 = 0,863$ (izračunato za α -, β - i γ -ciklodekstrin) i $R^2 = 0,890$, dobijeni su u PLS-mQSMR (α -CD, β -CD, γ -CD) modelu sa 2 deskriptora:

$$\mathbf{RMT} = f(\omega\text{-ligand [HF/STO-3G(d)]; SEV-ligand)} \quad (58)$$

Indeks elektrofilnosti (*Electrophilicity index*, ω) [HF/STO-3G(d)] i *Connolly* zapremina molekula (*Connolly Solvent-Excluded Volume*, SEV) su odabrani kao molekulski parametri liganda sa najvećim uticajem na sve tri zavisne promenljive Y (RMT dobijeno pri optimalnim koncentracijama α -CD (Y1), β -CD (Y2) i γ -CD (Y3)). Ostali statistički parametri su prikazani u Tabeli 14.

Vrednosti molekulskih deskriptora za odabrani PLS-mQSMR (α -CD, β -CD, γ -CD) model nalaze se u Prilogu A (Tabela 31.).

Tabela 14. Statistički parametri i topologija mreže za mQSMR modele

mQSMR modeli	RMSEE	RMSEP	r	Q ² kumulativna	R ² kumulativna	F	p
PLS-mQSMR(α -CD, β -CD, γ -CD) model				0,863	0,890		
α -CD	0,247	0,209	0,895			11,292	0,00468 1
β -CD	0,229	0,308	0,944			29,056	2,14E-04
γ -CD	0,081	0,275	0,989			134,014	7,06E-07
ANN-mQSMR(α -CD, β -CD, γ -CD) model				0,278			
α -CD	0,213	0,133	0,946				
β -CD	0,166	0,355	0,979				
γ -CD	0,084	0,307	0,995				

Model	Br. čvorova u ulaznom sloju	Br. čvorova u skrivenom sloju	Br. čvorova u izlaznom sloju	Broj epoha	Brzina učenja	<i>Momentum</i>	Regres. odnos	RMSE verifik. seta
ANN-mQSRR(α -CD, β -CD, γ -CD)	9	11	3	149	0,6	0,3	0,15908	0,129

Za formiranje ANN modela deskriptori su odabrani primenom postupne MLR metode. Od 40 deskriptora liganada izdvojeni su samo deskriptori sa najvećim uticajem na svaki ciklodekstrin pojedinačno i upotrebljeni kao ulazne promenljive u veštačkim neuronskim mrežama sa tri izlazne promenljive. Krajnja topologija veštačkih neuronskih mreža i odabrani eksperimentalni uslovi su prikazani u Tabeli 14. Devet deskriptora liganada koji su korišćeni za formiranje ANN-mQSMR(α -CD, β -CD, γ -CD) modela i poređani prema opadajućoj senzitivnosti su: toplota formiranja (*Heat of Formation*, Hf), molekulska površina (*Connolly Molecular Area*, MS), torziona energija (*Torsion Energy*, Et), elektronegativnost (χ) [B3LYP/6-31+G(d,p)], dipol-dipol energija (Ed), molekulska zapremina (*Connolly Solvent-Excluded Volume*, SEV), polarni deo molekule pri pH 2,0 (*Polar Surface Area pH2*, PSA), glavni moment inercije X (*Principal Moment of Inertia-X*, PMIX) i dijametar (Diam).

Raskorak između niskih vrednosti RMSEE (0,213, 0,166 i 0,084 za α -, β - i γ -CD) i RMSEP ((0,133, 0,355 i 0,307 za α -, β - i γ -CD) i nedovoljno visoke vrednosti Q^2 (0,278) potvrdio je kao i u slučaju pojedinačnih modela da je LOO validacija neizostavni korak u proceni kvaliteta formiranih ANN modela.

Na osnovu statističkih rezultata PLS-mQSMR(α -CD, β -CD, γ -CD) model je odabran kao optimalan *multi-target* model koji je dalje upoređen sa pojedinačnim PLS-QSMR(α -CD), PLS-QSMR(β -CD) i postupna MLR-QSMR(γ -CD) modelima. Vrednosti RMSEP za PLS-mQSMR(α -CD, β -CD, γ -CD) model (0,209, 0,308 i 0,275 za α -CD, β -CD i γ -CD model) bile su nešto bolje za CE sisteme sa α - i γ -ciklodekstrinom u poređenju sa pojedinačnim odabranim QSMR modelima (0,239, 0,242 i 0,288 za α -CD, β -CD i γ -CD model) (Tabela 11.).

Dobijena kumulativna (zbirna) Q^2 vrednost (0,863) za PLS-mQSMR(α -CD, β -CD, γ -CD) model bila je nešto niža od Q^2 vrednosti (0,869, 0,91 i 0,966 za α -CD, β -CD, γ -CD model) odabranih pojedinačnih modela.

Visoka sposobnost predviđanja odabranog PLS-mQSMR(α -CD, β -CD, γ -CD) modela ukazuje da se jednostavnim izračunavanjem 2 deskriptora liganda, *Electrophilicity index* (ω) [HF/STO-3G(d)] i *Connolly Solvent-Excluded Volume* (SEV), može postići brzo predviđanje elektroforetskog ponašanja (RMT (α -CD), RMT (β -CD), RMT (γ -CD)) srodnih gvanidinskih/imidazolinskih derivata pri elektroforetskim uslovima u kojima se za separaciju koristi po jedan od tri ispitivana ciklodekstrina, α -,

β - ili γ -ciklodekstrin. Kada se ovim brzim preliminarnim teorijskim predviđanjem odabere ciklodekstrin kojim se može postići najbolje razdvajanje ispitivane smeše jedinjenja, primenom formiranih specifičnih QSMR (α -CD, β -CD ili γ -CD) modela moguće je preciznije predvideti migraciono vreme analita u prisustvu odabranog ciklodekstrina (α -CD, β -CD ili γ -CD).

4.3. QSRR i QSMR STUDIJE LIGANADA IMIDAZOLINSKIH I ALFA ADRENERGIČKIH RECEPTORA

Retencija i pokretljivost u reverzno-faznoj tečnoj hromatografiji i kapilarnoj elektroforezi u velikoj meri zavise od stepena jonizacije ispitivanih jedinjenja odnosno od pH vrednosti mobilne faze i elektrolita pri datim eksperimentalnim uslovima. Sa porastom stepena jonizacije baznih jedinjenja raste i njihova pokretljivost pod dejstvom električnog polja u kapilarnoj elektroforezi. Sa druge strane retencioni faktor za nedisosovane forme kiseline ili baze može biti 10-20 puta veći nego za odgovarajuće disosovane forme leka pri datom sastavu mobilne faze (voda-organski rastvarač) u RP-HPLC sistemu.

Uticaj stepena jonizacije (kisele, bazne i neutralne sredine), na retenciono ponašanje i pokretljivost u RP-HPLC i CE sistemima ispitana je za 29 jedinjenja sa dejstvom na α -adrenergičke i/ili imidazolinske receptore. Za rad u kiseljoj sredini odabrana je pH vrednost 4,4 pri kojoj je većina ispitivanih jedinjenja ostvarila najveći stepen jonizacije, $\text{pH} = \text{p}K_a - 2$ (na osnovu podataka o $\text{p}K_a$ MarvinSketch¹⁷⁵ i eksperimentalno određenih $\text{p}K_a$ vrednosti). Za rad u neutralnoj sredini korišćen je $\text{pH} = 7,4$ i za rad u baznoj sredini $\text{pH} = 9,1$. Vrednost $\text{pH} 9,1$ odabrana je kao kompromis pri kojem se 9 jedinjenja kreće zajedno sa markerom elektroosmotskog toka i ima efektivnu pokretljivost jednaku nuli, oko 1/3 jedinjenja ostvaruje intermedijernu pokretljivost (pH u blizini $\text{p}K_a$ vrednosti) i preostala jedinjenja sa $\text{p}K_a$ vrednostima iznad 10 su i dalje u najvećem procentu jonizovana.

Sa ciljem da se uporede mehanizmi retencije dve analitičke metode, reverzno-fazne tečne hromatografije i kapilarne elektroforeze pri tri različite pH vrednosti (4,4; 7,4 i 9,1), eksperimentalno su određeni: retencioni faktor koji odgovara 0% organskog rastvarača ($\log K_w$) primenom RP-HPLC metode i efektivna pokretljivost (μ_{eff}) u prisustvu acetona kao elektroosmotskog markera primenom CE metode.

Sva ispitivanja su izvršena pri istim pH vrednostima i jonskoj jačini pufera ($I = 25 \text{ mM}$). Acetatni pufer je korišćen za kiselu sredinu ($\text{pH} 4,4$), fosfatni za neutralnu ($\text{pH} 7,4$), dok je za rad pri $\text{pH} 9,1$ odabran boratni pufer u CE i amonijum acetatni pufer u RP-HPLC.

Na osnovu eksperimentalno dobijenih podataka ($\log K_w$ i μ_{eff}) i velikog broja izračunatih deskriptora uspostavljene su kvantitativne zavisnosti između strukture i retencije/pokretljivosti za ispitivani set jedinjenja primenom linearnih statističkih metoda, postupne MLR i PLS metode. Definisani su regresioni modeli na osnovu kojih se sa visokim stepenom pouzdanosti može predvideti retencija/pokretljivost srodnih baznih jedinjenja i izdvojiti najznačajniji molekularni parametri koji utiču na ponašanje ispitivanih jedinjenja u HPLC i CE sistemima.

Pored toga izvršena je korelacija dobijenih $\log K_w$ u kiseljoj, neutralnoj i baznoj sredini ($\log K_{w4,4}$, $\log K_{w7,4}$ i $\log K_{w9,1}$) sa parametrima lipofilnosti $\log D_{4,4}$, $\log D_{7,4}$ i $\log D_{9,1}$ izračunatim u MarvinSketch.¹⁷⁵

4.3.1. Određivanje $\log K_w$ HPLC metodom

Retencija u HPLC sistemu je praćena određivanjem $\log K_w$ vrednosti kao realnijeg parametra za ispitivanje retencionog ponašanja i hidrofobnosti (lipofilnosti) u odnosu na izokrasku vrednost $\log K$. $\log K_w$ predstavlja ekstrapolirani retencioni faktor koji odgovara čistoj vodi (puferu) kao mobilnoj fazi i istovremeno je važan pokazatelj hidrofobnosti (lipofilnosti) ispitivanog jedinjenja jer su njegove vrednosti u brojnim slučajevima istog reda veličine kao i oktanol-voda $\log P/\log D$ vrednosti.^{116,123-125}

Pošto su ispitivanja na većini C18 kolona ograničena na opseg pH vrednosti od 2,5 do 7,5 za stacionarnu fazu je odabrana XTerra[®] RP18, 4,6 x 100 mm, 3,5 μm , kolona koja daje mogućnost rada u širokom opsegu pH, do pH 12,0.²¹⁴ Tehnologija izrade same kolone dovela je do povećane pH stabilnosti i smanjene interakcije sa slobodnim silanolnim grupama (formiranje vodoničnih veza i elektrostatičke sile) koje mogu dovesti do značajnog povećanja retencije naročito u slučaju pozitivno naelektrisanih baznih jedinjenja.

Najčešće korišćene mobilne faze u RP-HPLC su smeše vode ili pufera sa organskim rastvaračem, obično metanolom, acetonitrilom ili tetrahidrofuranom. U određivanju $\log K_w$ vrednosti (proceni lipofilnosti) pokazalo se da je metanol najpogodniji organski rastvarač za RP-HPLC jer ne dovodi do narušavanja sposobnosti vode da formira vodonične veze. Pored toga u toku uspostavljanja ravnoteže metanol se

vezuje za stacionarnu fazu formirajući monosloj koji ima sposobnost građenja vodoničnih veza slično n-oktanolu.¹²⁵ Zato je za rad odabran metanol.

Takođe, treba uzeti u obzir da su organski rastvarači sposobni da utiču na pK_a vrednost jonizovanih jedinjenja, kao i na kiselost površinskih silanolnih grupa i pH vrednost mobilne faze. Po pravilu pK_a baznih jedinjenja opada sa povećanjem koncentracije organskog rastvarača. Ovi efekti su svedeni na minimum u proceduri ekstrapolacije što je bio još jedan od razloga za upotrebu $\log K_w$ vrednosti umesto izokratske $\log K$ u slučaju baznih jedinjenja.

Dobijene $\log K_w$ vrednosti (odsecci) i nagibi (S) pri tri različite pH su prikazani u Tabeli 15. U kiseloj sredini (pH 4,4) raspon dobijenih vrednosti se kreće od 0,09 (fenilefrin) do 3,75 (karvedilol). Pri datim uslovima samo dva jedinjenja (klopamid i indapamid) se nalaze u neutralnom (molekulskom) obliku dok su sva ostala jedinjenja u najvećem broju slučajeva potpuno (preko 99%) jonizovana. To je istovremeno i razlog nižih $\log K_w$ vrednosti (jonizovana forma leka je manje lipofilna) datih jedinjenja u poređenju sa pH 7,4 i pH 9,1 pri kojima su jedinjenja prisutna u manjem procentu u jonizovanom obliku ili su nejonizovana (pH 9,1). Sa povećanjem pH povećava se i lipofilnost ispitivanih jedinjenja pa samim tim i $\log K_w$.

Tabela 15. Dobijene vrednosti odsečka ($\log K_w$) i nagiba (S) pri pH 4,4; 7,4 i 9,1

Jedinjenje	pH 4,4		pH 7,4		pH 9,1	
	$\log K_w$	S	$\log K_w$	S	$\log K_w$	S
Amilorid	1,11 ± 0,04	-3,31 ± 0,09	1,05 ± 0,04	-3,23 ± 0,12	0,98 ± 0,04	-2,74 ± 0,11
Brimonidin	0,99 ± 0,03	-4,78 ± 0,21	1,08 ± 0,03	-3,20 ± 0,12	1,26 ± 0,07	-3,23 ± 0,19
Karvedilol	3,75 ± 0,04	-5,84 ± 0,07	4,15 ± 0,08	-5,44 ± 0,13	4,21 ± 0,10	-5,56 ± 0,18
Klonidin	0,82 ± 0,02	-2,74 ± 0,05	0,98 ± 0,01	-1,82 ± 0,02	1,47 ± 0,01	-2,71 ± 0,03
Klopamid	2,00 ± 0,02	-3,61 ± 0,04	1,99 ± 0,03	-3,59 ± 0,08	1,87 ± 0,01	-3,34 ± 0,02
Klozapin	2,94 ± 0,03	-4,69 ± 0,06	3,85 ± 0,05	-4,88 ± 0,08	3,95 ± 0,08	-5,04 ± 0,15
Doksazosin	3,42 ± 0,07	-5,56 ± 0,14	3,67 ± 0,11	-5,05 ± 0,19	3,60 ± 0,11	-4,95 ± 0,20
Efaroksan	1,31 ± 0,02	-3,20 ± 0,04	1,33 ± 0,03	-3,10 ± 0,14	1,85 ± 0,01	-3,38 ± 0,03
Efedrin	0,56 ± 0,02	-2,41 ± 0,08	0,57 ± 0,02	-2,49 ± 0,09	1,01 ± 0,02	-2,52 ± 0,05
Gvanfacin	1,73 ± 0,01	-3,47 ± 0,03	1,92 ± 0,12	-3,21 ± 0,03	2,00 ± 0,00	-3,35 ± 0,01
Harman	1,72 ± 0,06	-3,74 ± 0,18	2,76 ± 0,05	-3,70 ± 0,09	2,78 ± 0,06	-3,75 ± 0,11
Harmin	2,15 ± 0,04	-4,28 ± 0,11	2,88 ± 0,05	-3,85 ± 0,09	2,95 ± 0,07	-3,97 ± 0,12
Idazoksan	0,82 ± 0,01	-2,66 ± 0,03	0,85 ± 0,02	-1,58 ± 0,04	1,53 ± 0,01	-2,80 ± 0,01
Indapamid	2,69 ± 0,02	-4,16 ± 0,06	2,55 ± 0,02	-4,19 ± 0,04	2,35 ± 0,03	-3,78 ± 0,06
Maprotilin	2,90 ± 0,08	-4,31 ± 0,14	2,58 ± 0,12	-3,18 ± 0,20	3,09 ± 0,08	-4,20 ± 0,14
Mianserin	2,48 ± 0,03	-4,24 ± 0,07	3,91 ± 0,05	-4,82 ± 0,08	3,92 ± 0,06	-4,83 ± 0,11
Moksonidin	0,57 ± 0,03	-3,21 ± 0,17	0,63 ± 0,03	-2,36 ± 0,10	0,75 ± 0,04	-2,31 ± 0,10
Nafazolin	1,52 ± 0,01	-3,48 ± 0,04	1,52 ± 0,01	-3,64 ± 0,05	1,76 ± 0,01	-3,50 ± 0,03
Olanzapin	1,64 ± 0,04	-3,37 ± 0,11	3,23 ± 0,07	-4,37 ± 0,12	3,28 ± 0,08	-4,46 ± 0,14
Oksimetaz.	2,33 ± 0,02	-3,89 ± 0,04	2,33 ± 0,04	-3,61 ± 0,10	2,60 ± 0,07	-4,14 ± 0,16
Fenilefrin	0,09 ± 0,02	-2,53 ± 0,14	0,04 ± 0,01	-2,62 ± 0,06	0,39 ± 0,02	-2,00 ± 0,06
Pseudoefed.	0,60 ± 0,03	-2,60 ± 0,10	0,61 ± 0,02	-2,67 ± 0,12	1,10 ± 0,02	-2,72 ± 0,07
Rilmenidin	0,92 ± 0,03	-2,88 ± 0,09	0,90 ± 0,03	-2,35 ± 0,11	1,48 ± 0,02	-2,96 ± 0,06
Tamsulosin	2,22 ± 0,05	-4,73 ± 0,13	2,75 ± 0,04	-4,51 ± 0,10	3,06 ± 0,09	-4,97 ± 0,20
Tetrahidroz.	1,06 ± 0,02	-2,94 ± 0,05	1,08 ± 0,01	-3,24 ± 0,06	1,32 ± 0,03	-2,99 ± 0,07
Tizanidin	0,74 ± 0,02	-2,65 ± 0,06	1,12 ± 0,01	-2,23 ± 0,03	1,34 ± 0,01	-2,63 ± 0,04
Triamteren	1,75 ± 0,05	-3,96 ± 0,14	1,92 ± 0,05	-3,76 ± 0,12	1,93 ± 0,04	-3,75 ± 0,11
Tramazolin	1,55 ± 0,03	-3,43 ± 0,07	1,51 ± 0,01	-3,51 ± 0,06	1,74 ± 0,01	-3,37 ± 0,03
Ksilometaz.	2,61 ± 0,00	-4,22 ± 0,01	2,59 ± 0,02	-4,14 ± 0,04	2,79 ± 0,08	-4,17 ± 0,16

4.3.2. Određivanje efektivne elektroforetske pokretljivosti metodom kapilarne elektroforeze

Razdvajanje jonskih vrsta u kapilarnoj elektroforezi zasniva se na različitoj elektroforetskoj pokretljivosti analita pod dejstvom električnog polja u kapilari ispunjenoj rastvorom pufera.

Prividna pokretljivost jona (*apparent mobility*, μ_{app}) predstavlja zbir pokretljivosti elektroosmotskog toka (*electroosmotic flow mobility*, μ_{eof}) i efektivne pokretljivosti jona (*effective mobility*, μ_{eff}).

$$\mu_{app} = \mu_{eof} + \mu_{eff} \quad (59)$$

Pojava elektroosmoze (elektroendoosmoze) je jedan od fundamentalnih faktora u kapilarnoj zonskoj elektroforezi. U silika kapilarama, silanolne grupe (-SiOH) vezane za unutrašnji zid kapilare jonizuju do negativno naelektrisanih grupa (SiO⁻) pri pH vrednostima pufera (radnog elektrolita) iznad 2,0. Privučeni negativnim naelektrisanjem SiO⁻ grupa, pozitivno naelektrisani joni rastvora pufera formiraju uz zid kapilare dvostruki sloj katjona. Spoljašnji sloj katjona koji je udaljeniji od silanolnih grupa predstavlja pokretni deo dvostrukog sloja i pod dejstvom primenjenog električnog polja putuje prema negativno naelektrisanjoj katodi noseći sa sobom i molekule vode u istom pravcu i stvarajući protok tečnosti poznat pod nazivom elektroosmotski tok (*ElectroOsmotic Flow*, EOF). Pozitivno naelektrisani joni osećaju pozitivan uticaj elektroosmotskog toka jer se kreću prema istoj elektrodi, katodi, za razliku od negativnih jona koji migriraju prema pozitivno naelektrisanjoj anodi. U uslovima kada je μ_{eof} veće od μ_{app} , anjoni koji imaju afinitet prema anodi se zajedno sa elektroosmotskim tokom kreću prema katodi. Zahvaljujući prisustvu EOF i neutralna jedinjenja nošena elektroosmotskim tokom kroz kapilaru putuju prema katodi.²¹⁵

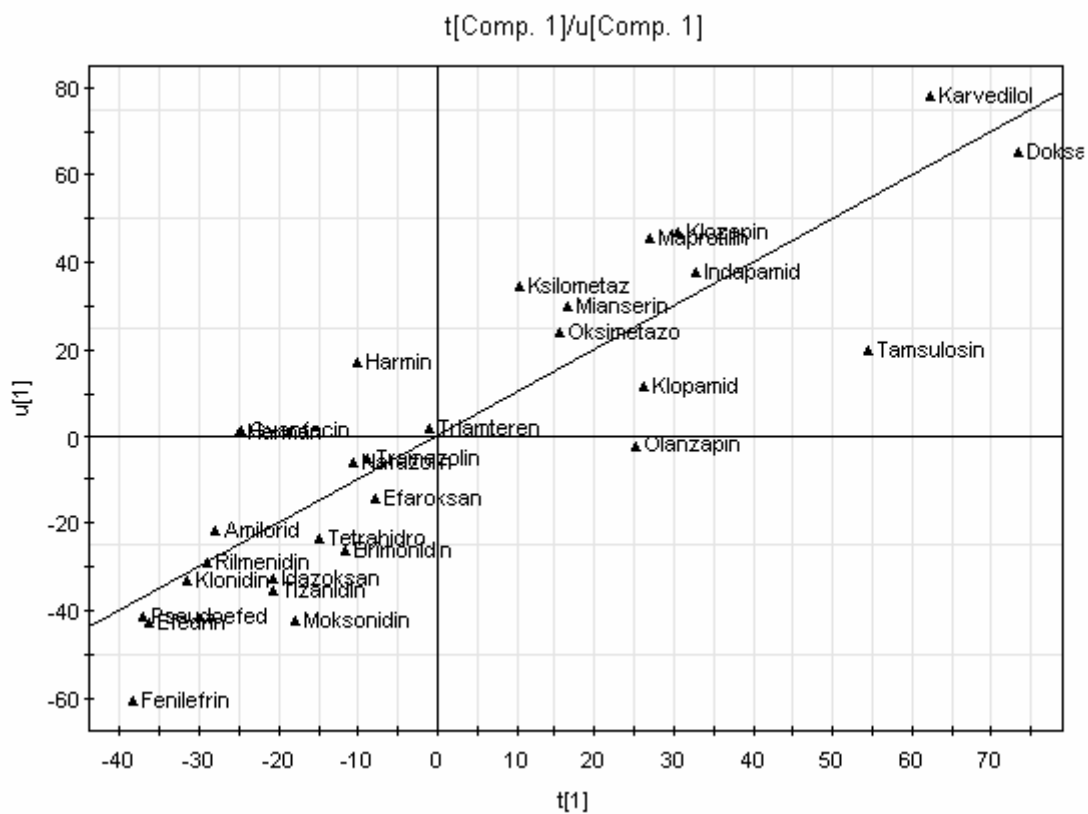
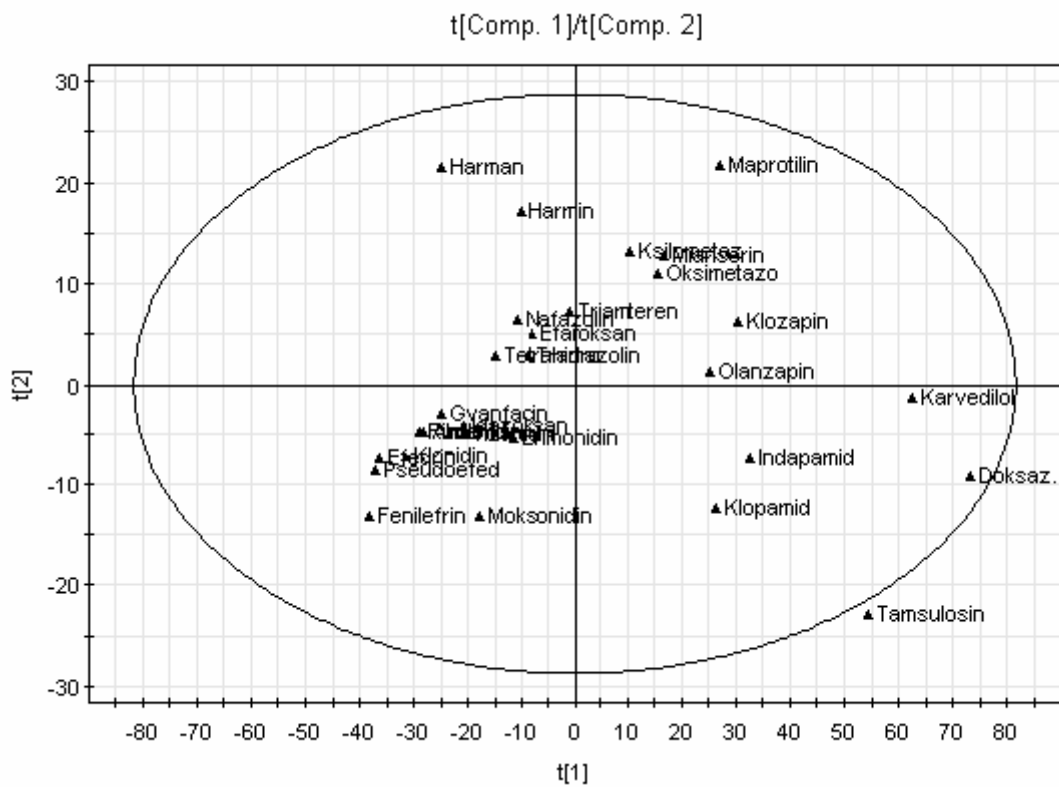
Da bi se odredila efektivna pokretljivost (μ_{eff}) iz prividne pokretljivosti μ_{app} potrebno je meriti elektroosmotski protok. To se može postići primenom neutralnog markera. Neutralni marker predstavlja neutralno jedinjenje koje se kreće samo zahvaljujući elektroosmotskom protoku.

Efektivna elektroforetska pokretljivost 29 ispitivanih jedinjenja određena je u prisustvu 2% v/v acetona kao neutralnog markera. Pri pH 4,4, 27 ispitivanih jedinjenja ostvarilo je svoju maksimalnu efektivnu pokretljivost i u formi katjona imalo veću pokretljivost od neutralnog markera, dok je efektivna pokretljivost klopamida i indapamida kao neutralnih analita koji se kreću zajedno sa markerom elektroosmotskog toka bila jednaka nuli (Tabela 22.). Raspon dobijenih vrednosti kreće se od 0 (indapamid, klopamid) do $28,19 \times 10^{-5} \text{cm}^2 \text{s}^{-1} \text{V}^{-1}$ (harman). Pri fiziološkom pH 7,4 jedinjenja sa pK_a vrednostima oko 7,4 su ostvarila intermedijernu pokretljivost, indapamid i klopamid su migrirali zajedno sa EOF markerom ($\mu_{\text{eff}} = 0$) i jedinjenja sa pK_a vrednostima iznad 10 koja su pri datim uslovima u visokom procentu prisutna u formi katjona su zadržala efektivnu pokretljivost sličnu kao i u kiselj sredini. Dobijeni raspon efektivne pokretljivosti kreće se od 0 do $24,18 \times 10^{-5} \text{cm}^2 \text{s}^{-1} \text{V}^{-1}$ (nafazolin). U baznoj sredini pri pH 9,1 negativno naelektrisani joni klopamida i indapamida migriraju prema katodi sporije od EOF markera i imaju negativne vrednosti efektivne pokretljivosti. Nenaelektrisana jedinjenja putuju zajedno sa markerom i pokretljivost im je jednaka nuli, dok su derivati 2-metilimidazolina sa pK_a vrednostima iznad 10 pri datim uslovima zadržala visok stepen pokretljivosti. ($\mu_{\text{eff}} = 25,05 \times 10^{-5} \text{cm}^2 \text{s}^{-1} \text{V}^{-1}$, tetrahidrozolin).

4.3.3. Primena postupnog MLR i PLS metoda u QSRR/QSMR analizi

Kvantitativna regresiona analiza izvršena je sa ciljem da se uspostavi korelacija između izračunatih molekulskih parametara ispitivanih α -adrenergičkih i imidazolinskih liganada i vrednosti $\log K_w$ u HPLC sistemu i μ_{eff} u CE sistemu pri tri različite pH vrednosti (4,4; 7,4 i 9,1). Za formiranje regresionih modela korišćene su linearne, postupna MLR i PLS, statističke metode.

Za svaku pH vrednost i oba ispitivana sistema, HPLC i CE, prvo su formirani trening i test setovi. Odabir test jedinjenja izvršen je u Simca P 12+ programu¹⁹⁷ korišćenjem *tt* i *tu* grafika.



Slika 23. T_i i t_u grafici.

Tu grafik pokazuje zavisnost između X i Y i koristi se za identifikaciju *outlier-a* (jedinjenja koja po svojim X i Y vrednostima značajno odstupaju od ostalih ispitivanih jedinjenja u grupi), kao i stepena zavisnosti između ispitivanih promenljivih (Slika 23.).

Tt grafik pokazuje kako su X-prostor i odgovarajuće vrednosti raspoređeni jedni u odnosu na druge. Koristi se za identifikaciju *outlier-a* i za grupisanje ispitivanih jedinjenja na osnovu datih, X i Y, podataka (Slika 23.).

Pomoću pomenutih grafika prvo su identifikovani *outlier-i* koji nisu korišćeni u daljem radu. Odabir test jedinjenja je izvršen tako da njihove X i Y vrednosti budu u okviru datih vrednosti u trening setu, kao i da većina hemijskih podgrupa ima po jednog predstavnika u test setu (derivati 2-amino imidazolina, 2-metil imidazolina, feniletilamina itd). Odabrani trening i test setovi imali su najmanje 20 jedinjenja korišćenih za formiranje regresionih modela i najmanje 5 jedinjenja za eksternu validaciju. Ukupno 6 nezavisnih trening i test setova je formirano, po jedan za svaku zavisno promenljivu: $\log K_{w4,4}$, $\log K_{w7,4}$, $\log K_{w9,1}$, $\mu_{\text{eff}4,4}$, $\mu_{\text{eff}7,4}$ i $\mu_{\text{eff}9,1}$. U cilju odabira statistički značajnijeg modela pri svakoj pH vrednosti u HPLC sistemu, isti trening i test set su korišćeni za dobijanje postupnih MLR i PLS regresionih jednačina. Ista procedura je primenjena i za CE analizu podataka. Pored standardnih validacionih i regresionih parametara (Q^2 , R^2 , F-vrednost, p -vrednost, RMSEE i RMSEP) zahvaljujući dovoljno velikim test setovima modeli su testirani i prema kriterijumima za eksternu validaciju koje su predložili *Golbraikh* i *Tropsha*.^{166,173}

4.3.3.1. QSRR analiza

Za formiranje QSRR modela pri pH 4,4 korišćen je trening set od 21 jedinjenja. Tamsulosin je izdvojen kao *outlier* i nije korišćen u daljoj analizi, dok je preostalih 7 jedinjenja činilo test set (Slika 23.).

Postupnom MLR metodom izdvojena su 4 deskriptora sa najvećim uticajem na zavisno promenljivu $\log K_{w4,4}$:

$$\begin{aligned} \log K_{w4,4} (\text{postupna MLR}) = & - 5,24598 + 0,64963 \text{ SM06_EA} - 9,89747 \text{ VE2_B}(s) \\ & - 0,12794 \text{ SpMax8_Bh}(v) + 1,51417 \text{ SpMax5_Bh}(p) \end{aligned} \quad (60)$$

dok je statistički najznačajniji PLS-QSRR model formiran sa 5 deskriptora:

$$\log K_{w4,4}(\text{PLS}) = f(\text{VE2_Dz(p)}; \text{SpMax5_Bh(e)}; \text{SpMax5_Bh(i)}; \text{SM02_EA(ri)}; \text{SM04_EA(ri)}) \quad (61)$$

Bolji validacioni i regresioni parametri (Tabela 16.) dobijeni za PLS-QSRR model ($Q^2 = 0,868$, $\text{RMSEP} = 0,342$, $F = 59,399$, $p = 1,18E-08$) u odnosu na postupni MLR-QSRR model ($Q^2 = 0,764$, $\text{RMSEP} = 0,496$, $F = 23,502$, $p = 1,6E-06$) ukazuju na veći prognostički značaj PLS-QSRR modela koji je odabran kao optimalni model za predviđanje retencionog ponašanja pri pH 4,4.

Tabela 16. Najznačajniji statistički parametri dobijeni za postupne MLR-QSRR i PLS-QSRR modele

pH	Model	Q^2	R^2	F	p	RMSEE	RMSEP
pH 4,4	Postupna MLR	0,764	0,855	23,502	1,57E-06	0,369	0,496
	PLS	0,868	0,880	59,399	1,18E-08	0,336	0,342
pH 7,4	Postupna MLR	0,846	0,907	54,995	5,82E-09	0,365	0,446
	PLS	0,883	0,903	28,978	3,76E-07	0,371	0,378
pH 9,1	Postupna MLR	0,931	0,953	113,538	1,91E-11	0,226	0,353
	PLS	0,915	0,924	96,874	2,32E-10	0,286	0,359

Tabela 17. Parametri eksterne validacije za formirane modele prema *Golbraikhu* i *Tropshi*

pH	Model	R^2	R_0^2	$(R^2 - R_0^2)/R^2$	k	$R_0'^2$	$(R^2 - R_0'^2)/R^2$	k'
pH 4,4	Postupna MLR	0,635	0,618	0,028	0,981	0,578	0,090	0,950
	PLS	0,819	0,817	0,002	1,007	0,800	0,023	0,961
pH 7,4	Postupna MLR	0,829	0,782	0,056	0,943	0,827	0,002	1,015
	PLS	0,854	0,839	0,018	0,962	0,854	0,000	1,006
pH 9,1	Postupna MLR	0,910	0,877	0,036	0,960	0,802	0,118	1,022
	PLS	0,874	0,872	0,002	0,960	0,868	0,007	1,022

Za formiranje QSRR modela pri pH 7,4 upotrebljen je trening set od 21 jedinjenja. Tamsulosin je ponovo identifikovan kao *outlier* i nije korišćen u daljoj analizi, dok je preostalih 7 jedinjenja činilo test set.

Primenom postupne MLR analize najbolji statistički parametri dobijeni su u jednačini sa 3 deskriptora:

$$\log K_{w7,4}(\text{postupna MLR}) = 5,91899 - 22,05690 \text{ VE2_Dt} + 0,00274 \text{ QXXp} \\ + 0,02905 \text{ F02[C-C]} \quad (62)$$

dok je PLS analizom, kao i u kiseljoj sredini, najbolje statističke rezultate dao model sa 5 deskriptora:

$$\log K_{w7,4}(\text{PLS}) = f(\text{Ho_Dt}; \text{SM3_Dt}; \text{VE2_Dt}; \text{H_D/Dt}; \text{LogD 7,4}) \quad (63)$$

Iako postupni MLR-QSRR model ima statistički značajnije vrednost F, p, R², RMSEE (54,995; 5,8E-09; 0,907; 0,365) od PLS-QSRR modela (28,978; 3,76E-07; 0,903; 0,371), bolji validacioni parametri (Q² = 0,883; R²_{test} = 0,854; RMSEP = 0,378) dobijeni za PLS-QSRR model u odnosu na postupni MLR-QSRR model ((Q² = 0,846; R²_{test} = 0,829; RMSEP = 0,446) (Tabele 16. i 17.) izdvojile su ovaj regresioni model kao pouzdaniji za predviđanje retencionog ponašanja srodnih jedinjenja na pH 7,4.

Najznačajniji postupni MLR regresioni model koji definiše retenciono ponašanje ispitivanih jedinjenja u baznoj sredini, na pH 9,1, dobijen je sa 3 deskriptora:

$$\log K_{w9,1}(\text{postupna MLR}) = - 0,53081 + 0,09255 \text{ nBM} + 0,70852 \text{ SpMin6_Bh(p)} \\ + 0,58125 \text{ logD 9,1} \quad (64)$$

Statistički najbolji PLS-QSRR model formiran je sa 5 deskriptora:

$$\log K_{w9,1}(\text{PLS}) = f(\text{VE2_Dt}; \text{H_D/Dt}; \text{F04[C-C]}; \text{ALOGP}; \text{logD 9,1}) \quad (65)$$

Na osnovu boljih validacionih i regresionih parametara postupnog MLR-QSRR modela (Tabele 16. i 17.) u odnosu na PLS-QSRR model, $\log K_{w9,1}$ (postupna MLR) regresiona jednačina može biti izdvojena kao optimalna i pouzdana za predviđanje retencionog ponašanja liganada α -adrenergičkih i imidazolinskih receptora u baznoj sredini.

Svi formirani postupni MLR-QSRR i PLS-QSRR modeli su zadovoljili i kriterijume eksterne validacije (Tabela 17.) koje su predložili *Golbraikh* i *Tropsha*: (i) $Q^2 > 0,5$; (ii) $R^2 > 0,6$, (iii) $[(R^2 - R_0^2)/R^2] < 0,1$ ili $[(R^2 - R_0'^2)/R^2] < 0,1$ odnosno (iv) $0,85 \leq k \leq 1,15$ ili $0,85 \leq k' \leq 1,15$ čime je dodatno potvrđena njihova pouzdanost u predviđanju retencionog ponašanja novih liganada.

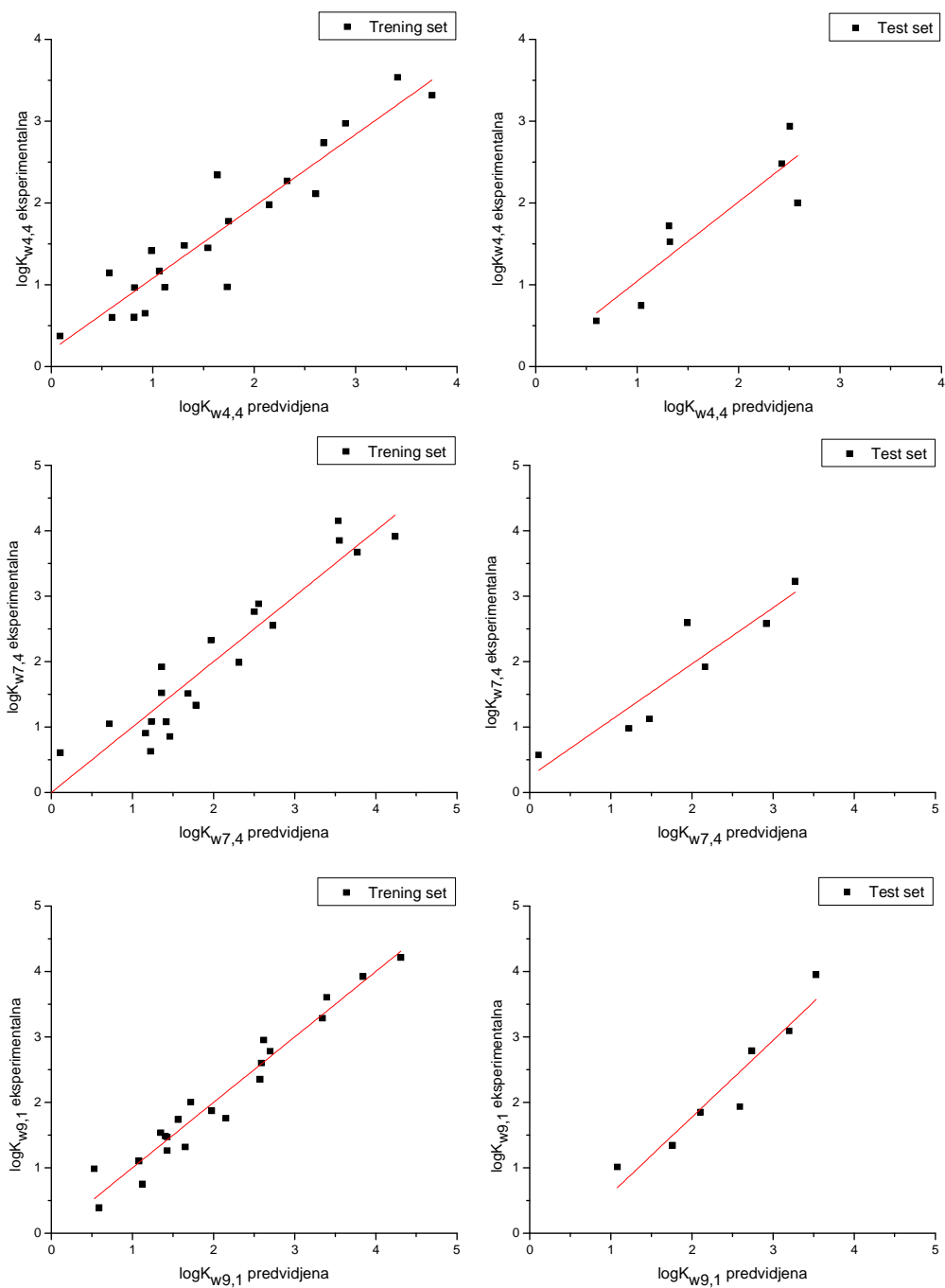
U Tabeli 18. su prikazane eksperimentalno dobijene i vrednosti predviđene statistički značajnijim modelom pri svakoj pH vrednosti. Vrednosti molekulskih deskriptora za odabrane modele nalaze se u Prilogu A (Tabele 32., 33. i 34.).

Tabela 18. Eksperimentalno dobijene i vrednosti $\log K_w$ predviđene statistički značajnijim modelima pri pH 4,4 (PLS-QSRR); pH 7,4 (PLS-QSRR) i pH 9,1 (postupni MLR-QSRR)

Jedinjenje	$\log K_{w4,4}$		$\log K_{w7,4}$		$\log K_{w9,1}$	
	Eksp.	Predviđ.	Eksp.	Predviđ.	Eksp.	Predviđ.
Amilorid	1,118	0,969	1,051	0,715	0,984	0,528
Brimonidin	0,988	1,414	1,078	1,416	1,263	1,429
Karvedilol	3,755	3,317	4,151	3,535	4,214	4,309
Klonidin	0,816	0,604	0,979	1,224 ^t	1,471	1,426
Klopamid	2,001	2,583 ^t	1,987	2,314	1,869	1,976
Klozapin	2,938	2,506 ^t	3,850	3,554	3,950	3,532 ^t
Doksazosin	3,416	3,535	3,673	3,771	3,605	3,396
Efaroksan	1,312	1,479	1,333	1,784	1,848	2,107 ^t
Efedrin	0,560	0,599 ^t	0,570	0,109 ^t	1,010	1,080 ^t
Gvanfacin	1,732	0,972	1,918	1,361	2,002	1,720
Harman	1,719	1,316 ^t	2,760	2,503	2,780	2,697
Harmin	2,149	1,977	2,883	2,557	2,950	2,620
Idazoksan	0,821	0,965	0,854	1,462	1,535	1,350
Indapamid	2,685	2,733	2,552	2,730	2,353	2,576
Maprotilin	2,902	2,971	2,578	2,919 ^t	3,089	3,200 ^t
Mianserin	2,478	2,428 ^t	3,912	4,239	3,921	3,843
Moksonidin	0,572	1,144	0,627	1,222	0,748	1,121
Nafazolin	1,522	1,324 ^t	1,521	1,360	1,757	2,151
Olanzapin	1,640	2,340	3,228	3,274 ^t	3,285	3,345
Oksimetazolin	2,326	2,267	2,327	1,970	2,600	2,590
Fenilefrin	0,086	0,371	0,038	-0,061	0,389	0,588
Pseudoefedrin	0,598	0,599	0,609	0,109	1,102	1,080
Rilmenidin	0,924	0,650	0,904	1,165	1,485	1,404
Tamsulosin	2,220	/	2,752	/	3,065	/
Tetrahidrozolin	1,065	1,168	1,082	1,232	1,317	1,654
Tizanidin	0,745	1,041 ^t	1,123	1,477 ^t	1,342	1,760 ^t
Triamteren	1,749	1,776	1,918	2,165 ^t	1,932	2,591 ^t
Tramazolin	1,547	1,451	1,513	1,685	1,736	1,561
Ksilometazolin	2,610	2,111	2,594	1,944 ^t	2,786	2,739 ^t

^t – jedinjenja u test set; /-outlier

Korelacioni grafici koji pokazuju zavisnost eksperimentalnih i vrednosti predviđenih odabranim modelima za trening i test set su prikazani na Slici 24.



Slika 24. Korelacija izmedu eksperimentalnih i predvidjenih vrednosti $\log K_w$ pri pH 4,4; 7,4 i 9,1 za trening i test set.

Najznačajniji molekularni parametri izdvojeni u optimalnim postupnim MLR i PLS modelima pri tri različite pH vrednosti predstavljani su u Tabeli 19. i pripadaju 0D-, 1D- i 2D-deskriptorima. Da bi se odabrani deskriptori doveli u vezu sa osobinama ispitivanih molekula izvršena je njihova kratka karakterizacija odnosno podela u grupe na: deskriptore koji se zasnivaju na 2D-matricama (*2D-matrix based descriptors*), pokazatelje susedne veze (*Edge adjacency indices*), *Burden-ove* svojstvene vrednosti (*Burden eigenvalues*), konstitucione deskriptore i molekulske osobine.

Tabela 19. Najznačajniji molekularni deskriptori u optimalnim QSRR modelima

pH	Odabrani deskriptori	Klasa deskriptora	Opis
pH 4,4	VE2_Dz(p)	Deskriptori koji se zasnivaju na 2D-matricama	Srednji koeficijent poslednjeg svojstvenog vektora iz <i>Barysz-ove</i> matrice korigovan polarizabilnošću
	SpMax5_Bh(e)	<i>Burden-ove</i> svojstvene vrednosti	Najveća svojstvena vrednost br. 5 <i>Burden-ove</i> matrice korigovana <i>Sanderson-ovom</i> elektronegativnošću
	SpMax5_Bh(i)	<i>Burden-ove</i> svojstvene vrednosti	Najveća svojstvena vrednost br. 5 <i>Burden-ove</i> matrice korigovana jonizacionim potencijalom
	SM02_EA(ri)	<i>Burden-ove</i> svojstvene vrednosti	Spektralni moment reda 2 iz matrice susedne veze korigovan rezonantnim integralom
	SM04_EA(ri)	Pokazatelji susedne veze	Spektralni moment reda 4 iz matrice susedne veze korigovan rezonantnim integralom
pH 7,4	Ho_Dt	Deskriptori koji se zasnivaju na 2D-matricama	<i>Hosoya-tip</i> indeksa iz <i>detour</i> matrice
	SM3_Dt	Deskriptori koji se zasnivaju na 2D-matricama	Spektralni moment reda 3
	VE2_Dt	Deskriptori koji se zasnivaju na 2D-matricama	Srednji koeficijent poslednje svojstvene vrednosti
	H_D/Dt	Deskriptori koji se zasnivaju na 2D-matricama	<i>Harary-tip</i> indeksa iz <i>distance/detour</i> matrice
	LogD _{7,4}	Molekulska osobina	Logaritam distribucionog koeficijenta oktanol-voda pri pH 7,4
pH 9,1	nBM	Konstitucioni deskriptori	Broj višestrukih veza
	SpMin6_Bh(p)	<i>Burden-ove</i> svojstvene vrednosti	Najmanja svojstvena vrednost br. 6 <i>Burden-ove</i> matrice korigovana polarizabilnošću
	logD _{9,1}	Molekulska osobina	Logaritam distribucionog koeficijenta oktanol-voda pri pH 9,1

Deskriptori odabrani PLS metodom pri pH 4,4 pripadaju grupama: deskriptori koji se zasnivaju na 2D-matricama (VE2_Dz(p)), *Burden*-ove svojstvene vrednosti (SpMax5_Bh(e) i SpMax5_Bh(i)) i pokazatelji susedne veze (SM02_EA(ri) i SM04_EA(ri)).

VE2_Dz(p) (*average coefficient of the last eigenvector from Barysz matrix weighted by polarizability*) je srednji koeficijent poslednjeg svojstvenog vektora iz *Barysz*-ove matrice korigovan polarizabilnošću i pripada grupi deskriptora koji se zasnivaju na 2D-matricama. Ova grupa deskriptora su topološki pokazatelji izračunati primenom seta osnovnih algebarskih operatora na različite teorijske matrice. Podeljeni su u nekoliko podgrupa u zavisnosti od matrica iz kojih su izvedeni. *Barysz*-ove matrice uzimaju u obzir prisustvo heteroatoma i višestrukih veza u molekuli.²¹⁶ Računaju se u funkciji različitih atomskih osobina (atomskog broja, atomske mase, atomske *van der Waals* zapremine, *Sanderson*-ove elektronegativnosti, atomske polarizabilnosti, atomskog jonizacionog potencijala i reda veze).

SpMax5_Bh(e) i SpMax5_Bh(i) (*largest eigenvalue n. 5 of Burden matrix weighted by Sanderson electronegativity and ionization potential*) najveća svojstvena vrednost br. 5 *Burden*-ove matrice korigovana *Sanderson*-ovom elektronegativnošću (e) i jonizacionim potencijalom (i)) pripadaju grupi deskriptora *Burden*-ove svojstvene vrednosti.²¹⁷ Ovi deskriptori su prvobitno bili predloženi za traženje hemijske sličnosti/različitosti u velikim bazama podataka. Računaju se iz *Burden*-ovih matrica na osnovu svojstvenih vrednosti za koje se pokazalo da reflektuju odgovarajuće aspekte molekulske strukture i da su tako korisne u traženju sličnosti među jedinjenjima.

SM02_EA(ri) i SM04_EA(ri) (*spectral moments of order 2 and 4 from edge adjacency mat. weighted by resonance integral*) spektralni momenti reda 2 i 4 iz matrice susedne veze korigovani rezonantnim integralom, pripadaju grupi deskriptora pokazatelji susedne veze (*Edge adjacency indices*).²¹⁸⁻²²⁰ To su topološki indeksi izračunati iz matrice susedne veze (EA) molekule. Daju informaciju o povezanosti između ivica molekule uzimajući u obzir hemijske veze između nevodonikovih atomskih parova. Dragon računa EA matrice korišćenjem različitih osobina veze: dipolnog momenta

(dm), konvencionalnog reda veze (bo) i parametara povezanih sa rezonantnim integralom (ri). Spektralni moment predstavlja linearne kombinacije različitih strukturnih fragmenata molekule.²¹⁸⁻²²⁰

Deskriptori odabrani PLS metodom pri pH 7,4 pripadaju grupama: deskriptori koji se zasnivaju na 2D-matricama i koji opisuju molekulske osobine ($\log D_{7,4}$).

Ho_Dt (*Hosoya-like index (log function) from detour matrix*), Hosoya Z broj računa način na koji su nesusedne veze distribuirane kroz molekul. Zavisi od veličine molekule kao i od njegove voluminoznosti.^{167,221,222}

SM3_Dt (*spectral moment of order 3 from detour matrix*) spektralni moment reda 3 iz *detour* matrice.

VE2_Dt (*average coefficient of the last eigenvector from detour matrix*), srednji koeficijent poslednje svojstvene vrednosti iz *detour* matrice.

H_D/Dt (*Harary-like index from distance/detour matrix*) Harary-tip indeksa iz *distance/detour* matrice je parametar osetljiv na sterne efekte²²¹ i izračunat iz *distance/detour* matrica koje se koriste za karakterizaciju cikličnosti molekule.²²¹ Harary indeks raste sa povećanjem molekulske veličine i molekuskog grananja.²²³ Nalazi se u pozitivnoj korelaciji sa $\log K_{w7,4}$.

logD_{7,4} oktanol-voda distribicioni koeficijent izračunat u MarvinSketch programu¹⁷⁵ pripada grupi deskriptora koji opisuju molekulske osobine i mera je lipofilnosti jedinjenja pri datoj pH vrednosti 7,4. Ima pozitivnu korelaciju sa $\log K_w$ vrednostima što ukazuje da lipofilnija jedinjenja na pH 7,4 imaju veći afinitet prema nepolarnoj stacionarnoj fazi.

Deskriptori odabrani postupnim MLR metodom pri pH 9,1 imaju pozitivnu korelaciju sa $\log K_w$ vrednostima i pripadaju grupama: konstiticioni deskriptori, *Burden*-ove svojstvene vrednosti i molekulske osobine ($\log D$).

nBM je broj višestrukih veza u molekuli i pripada konstitucionim deskriptorima. Konstitucionni deskriptori su najjednostavniji i često korišćeni deskriptori koji pokazuju hemijski sastav jedinjenja bez informacija o geometriji molekule ili povezanosti atoma. Broj višestrukih veza računa dvostruke, trostruke i aromatične veze u molekuli.

SpMin6_Bh(p) (*smallest eigenvalue n. 6 of Burden matrix weighted by polarizability*) najmanja svojstvena vrednost br. 6 *Burden*-ove matrice korigovana polarizabilnošću.

logD_{9,1} je oktanol-voda distribucioni koeficijent određen pri pH 9,1 i predstavlja molekulsku osobinu povezanu sa lipofilnošću jedinjenja. Ima visoku pozitivnu korelaciju sa logK_{w9,1} vrednostima što ukazuje da lipofilnija jedinjenja imaju veći afinitet prema nepolarnoj stacionarnoj fazi i veću retenciju u HPLC sistemu.

4.3.3.2. QSMR analiza

QSMR modeli koji definišu pokretljivost ispitivanih jedinjenja u kapilarnoj elektroforezi pri pH 4,4 formirani su sa 20 jedinjenja u trening setu. Tri jedinjenja, klopamid, indapamid i olanzapin, su identifikovana kao *outlier-i*, a 6 jedinjenja je korišćeno u eksternoj validaciji.

Postupni MLR-QSMR model koji je dao statistički najznačajnije rezultate formiran je sa 4 deskriptora:

$$\begin{aligned} \mu_{\text{eff } 4,4} (\text{postupna MLR}) = & 45,51010 - 3,93697 \text{ ATS6s} - 0,12728 \text{ ATSC6m} \\ & + 1,09327 \text{ Mor30i} + 0,03226 \text{ ATSC8m} \end{aligned} \quad (66)$$

PLS analizom, takođe je odabran model sa 4 deskriptora koja su pokazala najveći uticaj na zavisno promenljivu $\mu_{\text{eff } 4,4}$:

$$\mu_{\text{eff } 4,4} (\text{PLS}) = f(\text{Ho_Dz}(\mathbf{e}); \text{ATS6s}; \text{ATS7s}; \text{ATSC6m}) \quad (67)$$

Na osnovu boljih statističkih parametara ($Q^2=0,931$, $F=115,508$, $p=1,28 \text{ E-}10$, $R^2_{\text{test}} = 0,897$ i $\text{RMSEP}=0,984$) PLS-QSMR modela u odnosu na postupni MLR-QSMR model ($Q^2=0,880$, $F=64,338$, $p=2,92 \text{ E-}9$, $R^2_{\text{test}} = 0,876$ i $\text{RMSEP}=1,063$) (Tabele 20. i 21.), PLS-QSMR model se može koristiti kao optimalan i pouzdan model za predviđanje elektroforetske pokretljivosti srodnih jedinjenja pri pH vrednosti elektrolita 4,4.

Tabela 20. Najznačajniji statistički parametri dobijeni za postupne MLR-QSMR i PLS-QSMR modele

pH	Model	Q^2	R^2	F	p	RMSEE	RMSEP
pH 4,4	Postupna MLR	0,880	0,945	64,338	2,92E-09	0,739	1,063
	PLS	0,931	0,939	115,508	1,28E-10	0,776	0,984
pH 7,4	Postupna MLR	0,858	0,932	51,412	1,4E-08	1,569	2,216
	PLS	0,855	0,870	50,098	7,47E-08	2,170	3,244
pH 9,1	Postupna MLR	0,891	0,936	58,736	2,32E-09	2,640	3,794
	PLS	0,882	0,916	29,464	3,35E-07	3,033	4,290

Tabela 21. Parametri eksterne validacije za formirane modele prema *Golbraikhu* i *Tropshi*

pH	Model	R^2	$R_0'^2$	$(R^2-R_0'^2)/R^2$	k	$R_0'^2$	$(R^2-R_0'^2)/R^2$	k'
pH 4,4	Postupna MLR	0,876	0,862	0,016	0,999	0,876	0,000	0,999
	PLS	0,893	0,882	0,013	1,002	0,893	0,000	0,996
pH 7,4	Postupna MLR	0,788	0,771	0,022	1,003	0,781	0,009	0,980
	PLS	0,686	0,563	0,178	0,938	-0,818	2,192	1,030
pH 9,1	Postupna MLR	0,879	0,860	0,022	0,843	0,814	0,075	1,096
	PLS	0,873	0,834	0,045	0,813	0,750	0,141	1,118

QSMR modeli pri pH 7,4 formirani su sa 20 jedinjenja u trening setu, a 5 jedinjenja je zadržano u test setu. Klopamid, indapamid, gvanfacin i triamteren su izdvojeni kao *outlier-i* i nisu korišćeni u daljoj analizi.

Postupnom MLR analizom, statistički najznačajniji model formiran je sa 4 deskriptora:

$$\mu_{\text{eff } 7,4}(\text{postupna MLR}) = 34,68883 - 31,30360 \text{ GGI6} - 158,70600 \text{ R7u} + \\ + 1,21557 \text{ Mor28s} - 10,57450 \text{ HATS2i} \quad (68)$$

PLS analizom izabran je model sa 5 deskriptora koji su pokazali najveći uticaj na elektroforetsku pokretljivost jedinjenja u neutralnoj sredini.

$$\mu_{\text{eff } 7,4}(\text{PLS}) = f(\text{GGI6}; \text{SpMaxA_EA(dm)}; \text{G1}; \text{RDF045e}; \text{Mor32m}) \quad (69)$$

Niže vrednosti RMSEE i RMSEP (postupna MLR: RMSEE=1,569 i RMSEP=2,216; PLS: RMSEE=2,170 i RMSEP=3,244), neznatno bolji parametri Q^2 i F (postupna MLR: $Q^2=0,858$, $F=51,412$; PLS: $Q^2=0,855$ i $F=50,098$) i znatno više vrednosti R^2_{training} , R^2_{test} (postupna MLR: $R^2_{\text{training}}=0,932$ i $R^2_{\text{test}}=0,788$; PLS: $R^2_{\text{training}}=0,870$ i $R^2_{\text{test}}=0,686$) dobijene su za postupni MLR-QSMR model u odnosu na PLS-QSMR model (Tabele 20 i 21). Pored toga, PLS-QSMR model nije zadovoljio ni kriterijume eksterne validacije koje su predložili *Golbraikh* i *Tropsha* (Tabela 21.) [$(R^2 - R_0^2)/R^2 = 0,178 > 0,1$; $R_0^2 = -0,818$; $(R^2 - R_0^2)/R^2 = 2,192 > 0,1$;] što ukazuju da se postupna MLR regresiona jednačina može koristiti kao optimalan i pouzdan model za predviđanje elektroforetske pokretljivosti srodnih jedinjenja pri pH vrednosti elektrolita 7,4.

QSMR modeli pri pH 9,1 formirani su sa 21 jedinjenjem u trening setu. Harman i mianserin su izdvojeni kao *outlier-i* i 6 jedinjenja je odabrano za eksternu validaciju.

Postupnom MLR analizom odabran je model sa 4 deskriptora:

$$\mu_{\text{eff } 9,1}(\text{postupna MLR}) = 60,98426 - 15,11770 \text{ SM1_Dz(Z)} + 1,00148 \text{ SM15_EA(dm)} \\ - 29,9053 \text{ HOMO[B3LYP/3-21G(d,p)]} - 60,3708 \text{ ISH} \quad (70)$$

dok je PLS analizom izdvojeno 5 najznačajnijih molekulskih parametara:

$$\mu_{\text{eff } 9,1}(\text{PLS}) = f(\text{ZM1MulPer}; \text{AAC}; \text{SM1_Dz(Z)}; \text{SM11_EA(dm)}; \text{ISH}) \quad (71)$$

Oba modela formirana pri pH 9,1 su zadovoljila odgovarajuće validacione kriterijume (Tabela 20. i 21.), izuzev vrednosti $(R^2-R'_0{}^2)/R^2$ 0,141 > 0,1 za PLS-QSMR model. Međutim, validacioni i regresioni parametri prikazani u Tabelama 20. i 21. ukazuju da na osnovu viših vrednosti Q^2 , F , R^2_{training} , R^2_{test} ($Q^2=0,891$, $F=58,736$, $R^2_{\text{training}}=0,936$ i $R^2_{\text{test}}=0,879$ za MLR model i $Q^2=0,882$, $F=29,464$, $R^2_{\text{training}}=0,916$ i $R^2_{\text{test}}=0,873$ za PLS model) i niže greške u predviđanju, RMSEE i RMSEP (RMSEE=2,640 i RMSEP=3,794 za MLR model i RMSEE=3,033 i RMSEP=4,290 za PLS model) dobijenih za postupni MLR-QSMR model u poređenju sa PLS-QSMR modelom, predloženi postupni MLR regresioni model: $\mu_{\text{eff } 9,1} = f(\text{SMI_Dz}(\mathbf{Z}); \text{SM15_EA}(dm); \text{HOMO} [\text{B3LYP/3-21G(d,p)}]; \text{ISH})$ može biti korišćen kao pouzdan model za predviđanje efektivne pokretljivosti srodnih jedinjenja pri datoj pH vrednosti elektrolita 9,1.

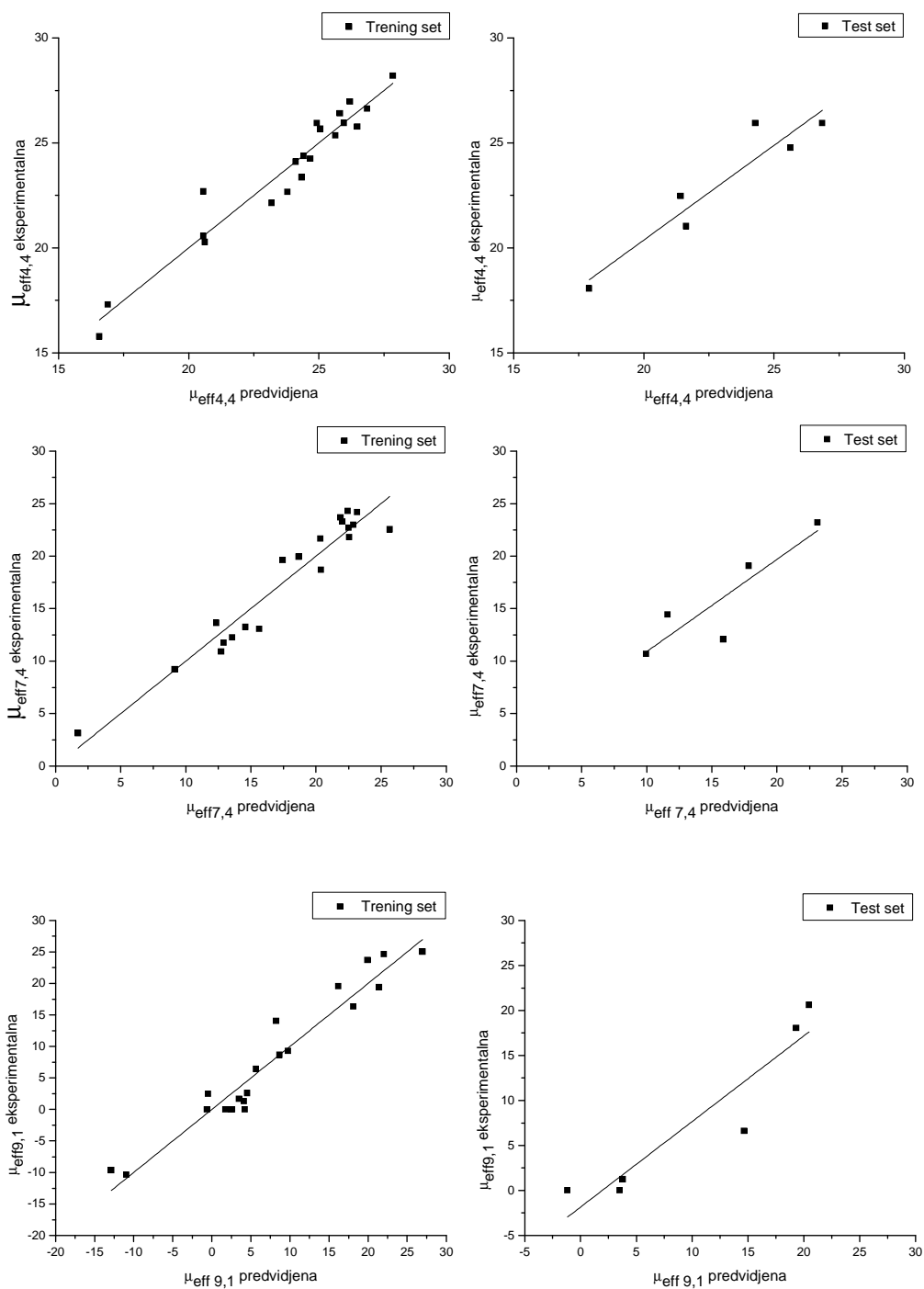
U Tabeli 22. su prikazane eksperimentalne i predviđene vrednosti dobijene optimalnim PLS i postupnim MLR modelima. Vrednosti molekulskih deskriptora za odabrane modele nalaze se u Prilogu A (Tabele 35., 36. i 37.).

Tabela 22. Eksperimentalno dobijene i vrednosti efektivne pokretljivosti predviđene statistički značajnijim modelima pri pH 4,4 (PLS-QSMR); pH 7,4 (postupna MLR-QSMR) i pH 9,1 (postupna MLR-QSMR) [$10^{-5}\text{cm}^2\text{s}^{-1}\text{V}^{-1}$]

Jedinjenje	$\mu_{\text{eff}4,4}$		$\mu_{\text{eff}7,4}$		$\mu_{\text{eff}9,1}$	
	Eksp.	Predvid.	Eksp.	Predvid.	Eksp.	Predvid.
Amilorid	25,939	24,282 ^t	21,786	22,545	6,416	5,675
Brimonidin	23,357	24,339	13,247	14,583	0,000	1,759
Karvedilol	18,061	17,902 ^t	13,057	15,638	1,693	3,499
Klonidin	25,952	25,961	19,607	17,428	2,575	4,516
Kloпамid	0,000	/	0,000	/	-9,640	-12,869
Klozapin	22,697	20,562	9,204	9,153	0,000	4,218
Doksazosin	15,795	16,568	3,137	1,726	0,000	3,509 ^t
Efaroxan	24,099	24,116	22,704	22,510	16,361	18,112
Efedrin	25,942	26,852 ^t	23,199	23,131 ^t	18,047	19,326 ^t
Guanfacin	24,242	24,665	5,083	/	0,000	-0,625
Harmane	28,192	27,836	11,752	12,920	0,000	/
Harmin	26,410	25,810	13,636	12,356	1,305	4,099
Idazoksan	26,969	26,193	23,293	22,009	6,627	14,665 ^t
Indapamid	0,000	/	0,000	/	-10,382	-10,949
Maprotilin	20,559	20,563	18,696	20,376	19,402	21,393
Mianserin	22,471	21,418 ^t	12,234	13,575	0,000	/
Moksonidin	22,669	23,793	10,907	12,728	0,000	2,597
Nafazolin	25,941	24,920	24,180	23,159	24,643	22,011
Olanzapin	33,632	/	10,679	9,952 ^t	1,241	3,777 ^t
Oksimetazolin	20,276	20,620	19,061	17,831 ^t	19,556	16,176
Fenilefrin	25,780	26,472	21,650	20,334	8,661	8,667
Pseudoefedrin	26,633	26,852	23,691	21,871	9,299	9,746
Rilmenidin	25,350	25,636	22,551	25,668	14,065	8,234
Tamsulosin	17,310	16,893	14,444	11,599 ^t	2,472	-0,459
Tetrahidrozolin	25,680	25,055	24,299	22,442	25,047	26,955
Tizanidin	24,770	25,629 ^t	12,077	15,874 ^t	0,000	-1,169 ^t
Triamteren	22,146	23,181	1,140	/	0,000	2,487
Tramazolin	24,393	24,417	22,988	22,865	23,713	19,945
Ksilometazolin	21,032	21,631 ^t	19,943	18,675	20,627	20,474 ^t

t-jedinjenja u test setu; / - outlier

Korelacioni grafici koji pokazuju zavisnost između ekperimentalne i predviđene efektivne pokretljivosti za jedinjenja u trening i test setu pri tri pH vrednosti prikazani su na Slici 25.



Slika 25. Korelacija između eksperimentalnih i predviđenih vrednosti μ_{eff} pri pH 4,4; 7,4 i 9,1 za trening i test setove.

Najznačajniji deskriptori izdvojeni u optimalnim postupnim MLR i PLS modelima pri tri različite pH vrednosti predstavljani su u Tabeli 23. Svi deskriptori koji

konfiguriraju u odabranim jednačinama pripadaju 2D- i 3D-deskriptorima. Da bi se odabrani deskriptori doveli u vezu sa osobinama ispitivanih molekula izvršena je njihova kratka karakterizacija odnosno podela u grupe na: 2D autokorelacione deskriptore (*2D autocorrelation*), deskriptore koji se zasnivaju na 2D-matricama (*2D-matrix based descriptors*), *GETAWAY*, *3D-MoRSE* deskriptore i pokazatelje susedne veze (*Edge adjacency indices*).

Tabela 23. Najznačajniji molekulske deskriptori u optimalnim QSMR modelima

pH	Odabrani deskriptori	Klasa deskriptora	Opis
pH 4,4	Ho_Dz(e)	Deskriptori koji se zasnivaju na 2D-matricama	<i>Hosoya</i> -tip indeksa iz <i>Barysz</i> -ovih matrica korigovan <i>Sanderson</i> -ovom elektronegativnošću
	ATS6s	2D autokorelacioni deskriptori	<i>Brotto-Moreau</i> -ov autokorelacioni deskriptor korigovan I-stanjem
	ATS7s	2D autokorelacioni deskriptori	<i>Brotto-Moreau</i> -ov autokorelacioni deskriptor korigovan I-stanjem
	ATSC6m	2D autokorelacioni deskriptori	Centrirani <i>Brotto-Moreau</i> -ov autokorelacioni deskriptor korigovan masom
pH 7,4	GGI6	2D autokorelacioni deskriptori	Topološki indeks naelektrisanja reda 6
	R7u+	<i>GETAWAY</i> deskriptori	R maksimalna autokorelacija
	Mor28s	<i>3D-MoRSE</i> deskriptori	signal 28/korigovan I-stanjem
	HATS2i	<i>GETAWAY</i> deskriptori	<i>leverage-weighted autocorrelation of lag 2 / weighted by ionization potential</i>
pH 9,1	HOMO [B3LYP/3-21G(d,p)]	Kvantno-hemijski	Energija najviše popunjene molekulske orbitale
	SM1_Dz(Z)	Deskriptori koji se zasnivaju na 2D-matricama	Spektralni moment reda 1 iz <i>Barysz</i> -ove matrice korigovan atomskim brojem
	ISH	<i>GETAWAY</i> deskriptori	Standardizovan informacioni sadržaj
	SM15_EA(dm)	Pokazatelji susedne veze	Spektralni moment reda 15 iz matrice susedne veze korigovan dipolnim momentom

Deskriptori odabrani PLS metodom pri pH 4,4 imaju visoku negativnu korelaciju sa efektivnom pokretljivošću i pripadaju grupi 2D autokorelacionih (ATS6s, ATS7s, ATSC6m) i deskriptora koji se zasnivaju na 2D-matricama (H0_Dz(e)).

2D autokorelacioni deskriptori opisuju kako je posmatrana osobina distribuirana duž topološke molekulske strukture odnosno predstavljaju mere homogenosti molekulske strukture. Tipične atomske osobine na osnovu kojih se računaju ovi deskriptori su: atomska masa (m), *van der Waals*-ova zapremina (v), *Sanderson*-ova elektronegativnost (e), atomska polarizabilnost (p), atomski jonizacioni potencijal (i) i unutrašnja energija (intrinsic state) (s). Najpoznatiji autokorelacioni deskriptori su oni koje su definisali *Broto-Moreau* i zovu se *ATS (Autocorrelation of Topological Structure)*.

ATS6s i ATS7s (*Broto-Moreau autocorrelation of lag 6 (log function) weighted by I-state*) su *Broto-Moreau*-ovi autokorelacioni deskriptori korigovani I-stanjem. To su deskriptori koji predstavljaju interakcije između atoma na topološkoj udaljenosti 6 i 7.

ATSC6m (*Centred Broto-Moreau autocorrelation of lag 6 weighted by mass*) je centrirani *Broto-Moreau*-ov autokorelacioni deskriptor korigovan masom.

H0_Dz(e) (*Hosoya-like index (log function) from Barysz matrix weighted by Sanderson electronegativity*) *Hosoya*-tip indeksa iz *Barysz*-ovih matrica korigovan *Sanderson*-ovom elektronegativnošću. Predstavlja meru veličine molekule i njegovog grananja.²²²

Deskriptori odabrani postupnim MLR metodom pri pH 7,4 pripadaju grupi 2D autokorelacionih (GGI6), *GETAWAY* (R7u+, HATS2i) i *3D-MoRSE* (Mor28s) deskriptora.

GETAWAY (GEometry, Topology, and Atom-Weights Assembly) deskriptori su geometrijski deskriptori koji daju informaciju o položaju supstituenata i fragmenata u prostoru i osetljivi su na molekulske grananje i cikličnost. Takođe, daju informaciju o veličini i obliku molekule kao i o nekim atomskim osobinama. Informacija koju nose ovi deskriptori često se odnosi na deo molekulske strukture pa se u modelima koji imaju visoku moć predviđanja obično javlja više od jednog *GATAWAY* deskriptora.^{224,225}

HATS2i (*leverage-weighted autocorrelation of lag 2 / weighted by ionization potential*) je autokorelacioni deskriptor nastao po analogiji sa *Broto-Moreau*-ovim autokorelacionim deskriptorima za razliku od kojih je izračunat za 3D prostornu geometriju molekule.²²⁴

R7u+ (*R maximal autocorrelation of lag 7 / unweighted*) pripada *R-GATAWAY* autokorelacionim deskriptorima koji uzimaju u obzir lokalne aspekte molekula koji maksimalno doprinose autokorelaciji.²²⁴ Ima negativnu korelaciju sa pokretljivošću.

HATS i R⁺ indeksi se često koriste u QSPR analizama ali se mogu koristiti i za analizu sličnosti i različitosti. Ovi deskriptori daju informaciju o strukturnim fragmentima i pogodni su za opisivanje razlika u kongeneričkim serijama molekula.²²⁴

3D-MoRSE (*3D-Molecule Representation of Structures based on Electron diffraction*) deskriptori kao što je **Mor28s** daju informaciju iz 3D atomskih koordinata korišćenjem iste transformacije kao u studijama elektronske difrakcije.²²⁶

Mor28s (*signal 28 / weighted by I-state*), signal 28 korigovan I-stanjem. Različite atomske osobine mogu biti uzete u obzir prilikom računanja ovog deskriptora (atomska masa (m), *van der Waals*-ova zapremina (v), *Sanderson*-ova elektronegativnost (e), atomska polarizabilnost (p), atomski jonizacioni potencijal (i) i unutrašnja energija (s).

GGI6 (*topological charge index of order 6*) topološki indeks naelektrisanja reda 6 pripada 2D autokorelacionim deskriptorima i koristi se za procenu prenosa naelektrisanja između parova atoma odnosno ukupnog transfera naelektrisanja u molekuli.²²⁷ Ima negativnu korelaciju sa efektivnom pokretljivošću.

Deskriptori odabrani postupnom MLR metodom pri pH 9,1 pripadaju grupama: deskriptori koji se zasnivaju na 2D-matricama (SM1_Dz(Z)), *GETAWAY* (ISH), pokazatelji susedne veze (SM15_EA(dm)) i kvantno-hemijski deskriptori (HOMO).

SM1_Dz(Z) (*spectral moment of order 1 from Barysz matrix weighted by atomic number*) spektralni moment reda 1 iz *Barysz-ovez* matrice korigovan atomskim brojem je deskriptor koji se zasniva na 2D-matricama.

ISH (*standardized information content on the leverage equality*) pripada grupi *GETAWAY* deskriptora i nosi informaciju o molekulskoj kompleksnosti koja je funkcija simetrije. Ukoliko molekul ne pokazuje nijedan element simetrije onda je ISH=1. Sa

druge strane za teorijski perfektno simetričan slučaj $ISH=0$. U slučaju ispitivanih jedinjenja sve vrednosti ISH su iznad 0,82 i u negativnoj su korelaciji sa pokretljivošću, odnosno što je veći stepen simetrije, to je i manja pokretljivost pri datim uslovima elektrolita, $pH=9,1$. Ovaj deskriptor daje i informaciju o molekulskoj entropiji (termodinamičkoj entropiji) tako da može biti koristan u modeliranju fizičko-hemijskih osobina povezanih sa entropijom i simetrijom.²²⁴

SM15_EA(dm) (*spectral moment of order 15 from edge adjacency mat. weighted by dipole moment*) spektralni moment reda 15 iz matrice susedne veze korigovan dipolnim momentom. Spektralni moment predstavlja linearne kombinacije različitih strukturnih fragmenata molekule.

HOMO energija izračunata B3LYP/3-21G(d,p) metodom nalazi se u negativnoj korelaciji sa efektivnom pokretljivošću jedinjenja pri pH 9,1. Jedinjenja koja imaju nižu HOMO energiju imaju veću pokretljivost što ukazuje da manje intereaguju sa pozitivno naelektrisanim katjonima pufera koji formiraju sloj uz zid kapilare.

Na osnovu molekulskih parametara odabranih primenom postupne MLR i PLS statističkih metoda može se zaključiti da se važne informacije o retencionom mehanizmu u RPLC sistemu mogu dobiti na osnovu 0D-, 1D- i 2D-deskriptora za razliku od CE sistema gde su dominirali znatno kompleksniji 2D- i 3D-deskriptori.

Za pojedine odabrane teorijske deskriptore nije bilo jednostavno dovesti u vezu njihovo značenje sa retencijom u hromatografskom sistemu i pokretljivošću u CE sistemu, ali je njihovo prisustvo u odabranim QSRR i QSMR modelima bilo neophodno u cilju dobijanja QSRR/QSMR modela visoke moći predviđanja.

4.3.4. Korelacija $\log K_w$ i $\log D/\log P$

U toku proteklih godina znatno je porastao broj studija koje se bave ispitivanjem lipofilnosti lekova primenom RP-HPLC metode.^{110,116,123-125} Uočeno je da postoji linearna zavisnost između $\log P/\log D$ vrednosti i dobijenih retencionih parametara $\log K$ i $\log K_w$ koja se uopšteno može prikazati jednačinom:

$$\log K_w (\log K) = k_1 + k_2 \log P (\log D) \quad (3)$$

gde su k_1 i k_2 koeficijenti date regresione jednačine.

U prethodno urađenoj QSRR analizi, primenom postupne MLR i PLS statističkih metoda polazeći od 2400 molekulskih deskriptora, formirani QSRR regresioni modeli koji definišu retenciju liganada α -adrenergičkih i imidazolinskih receptora u HPLC sistemu su kao nezavisno promenjivu imali izdvojen jedan od parametara lipofilnosti $\log D_{7,4}$, $\log D_{9,1}$ ili $A\log P$.

Sa ciljem da se ispita mogućnost dobijenih retencionih parametara $\log K_w$, određenih pri različitom stepenu jonizacije ispitivanih jedinjenja (pH 4,4; 7,4 i 9,1), u predviđanju lipofilnosti izvršena je korelacija $\log K_w$ vrednosti ($\log K_{w4,4}$, $\log K_{w7,4}$ i $\log K_{w9,1}$) dobijenih RP-HPLC metodom sa teorijski izračunatim parametrima lipofilnosti u MarvinSketch ($\log D_{4,4}$; $\log D_{7,4}$, $\log D_{9,1}$) i Dragon programu ($A\log P$).

Svih 29 analiziranih jedinjenja su slabe organske baze i njihovo retenciono vreme raste sa povećanjem pH vrednosti. U kiseloj i neutralnoj sredini većina jedinjenja je prisutna u jonizovanom obliku pa je i njihova korelacija izvršena sa $\log D$ (pH zavisnim $\log P$), dok su u baznoj sredini u znatnom broju prisutna u neutralnom obliku gde je korelacija izvršena sa oba parametra lipofilnosti $\log P$ i $\log D$.

U Tabeli 24. su prikazane linearne zavisnosti između $\log K_w$ vrednosti određenih u kiseloj, neutralnoj i baznoj sredini i $\log D$ vrednosti izračunatih u MarvinSketch 4.1.13 programu. Pored toga MarvinSketch 5.5.1.0. program¹⁷⁵ koji daje mogućnost računanja $\log D$ vrednosti primenom različitih metoda (Weighted, VG, KLOP, PHYS) korišćen je za računanje $\log D$ vrednosti pri jonskoj jačini od 25 mM. Vrednosti parametara lipofilnosti koji su pokazali najviši stepen korelacije sa odgovarajućim $\log K_{w4,4}$; $\log K_{w7,4}$ i $\log K_{w9,1}$ vrednostima nalaze se u Prilogu A (Tabela 38.).

Tabela 24. Zavisnost $\log K_w$ i $\log D/\log P$ vrednosti izračunatih različitim metodama

Metod	Jednačine	R	R ²	Stand. greška
MarvinSketch 4.1.13	$\text{Log}K_{w4,4} = 1,671 + 0,408 \times \text{log}D_{4,4}$	0,534	0,285	0,804
Weighted	$\text{Log}K_{w4,4} = 1,860 + 0,420 \times \text{log}D_{4,4}$	0,621	0,386	0,746
VG	$\text{Log}K_{w4,4} = 1,799 + 0,339 \times \text{log}D_{4,4}$	0,531	0,282	0,806
KLOP	$\text{Log}K_{w4,4} = 1,945 + 0,452 \times \text{log}D_{4,4}$	0,662	0,438	0,713
PHYS	$\text{Log}K_{w4,4} = 1,827 + 0,434 \times \text{log}D_{4,4}$	0,643	0,414	0,728
MarvinSketch 4.1.13	$\text{Log}K_{w7,4} = 1,065 + 0,771 \times \text{log}D_{7,4}$	0,795	0,632	0,705
Weighted	$\text{Log}K_{w7,4} = 1,303 + 0,701 \times \text{log}D_{7,4}$	0,827	0,684	0,653
VG	$\text{Log}K_{w7,4} = 1,204 + 0,715 \times \text{log}D_{7,4}$	0,808	0,652	0,686
KLOP	$\text{Log}K_{w7,4} = 1,429 + 0,656 \times \text{log}D_{7,4}$	0,818	0,668	0,669
PHYS	$\text{Log}K_{w7,4} = 1,289 + 0,693 \times \text{log}D_{7,4}$	0,826	0,683	0,655
MarvinSketch 4.1.13	$\text{Log}K_{w9,1} = 0,675 + 0,861 \times \text{log}D_{9,1}$	0,865	0,748	0,531
Weighted	$\text{Log}K_{w9,1} = 0,746 + 0,859 \times \text{log}D_{9,1}$	0,891	0,794	0,480
VG	$\text{Log}K_{w9,1} = 0,663 + 0,864 \times \text{log}D_{9,1}$	0,871	0,758	0,521
KLOP	$\text{Log}K_{w9,1} = 1,003 + 0,752 \times \text{log}D_{9,1}$	0,855	0,730	0,550
PHYS	$\text{Log}K_{w9,1} = 0,673 + 0,887 \times \text{log}D_{9,1}$	0,904	0,817	0,453
Dragon	$\text{Log}K_{w9,1} = 0,995 + 0,665 \times \text{Alog}P$	0,847	0,717	0,563

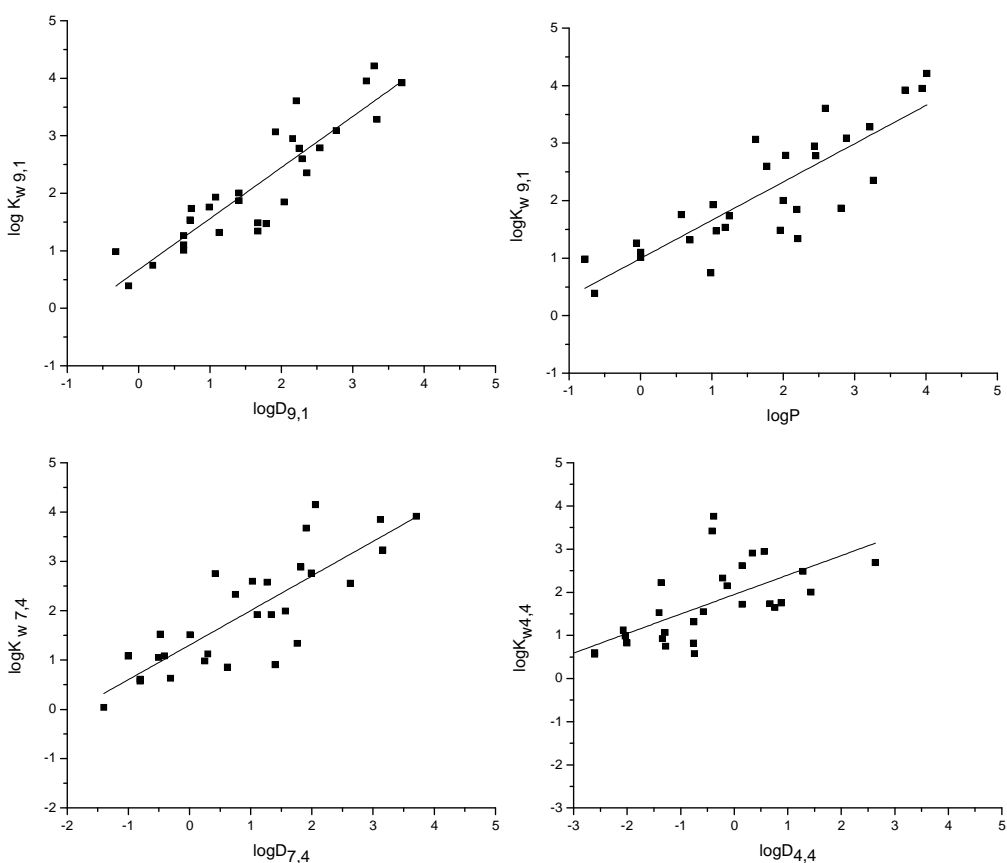
*MarvinSketch 5.5.1.0 je korišćen za računanje $\log D$ vrednosti Weighted, VG, KLOP i PHYS metodom.

Na osnovu dobijenih statističkih podataka ($R=0,904$ i $R^2=0,817$) najveći stepen korelacije ostvaren je između $\log K_{w9,1}$ i $\log D_{9,1}$ izračunatog *PHYS* metodom u MarvinSketch 5.5.1.0 programu (Tabela 24.). Zavisnost $\log K_{w9,1}$ od $\log D_{9,1}$ prikazana je i na Slici 26. Nešto niža korelacija ($R=0,847$ i $R^2=0,717$) je dobijena između $\log K_{w9,1}$ i $\text{Alog}P$ (*Ghose-Crippen*-ov oktanol-voda particioni koeficijent $\log P$) vrednosti izračunatih u Dragon programu (Tabela 24., Slika 26.).

Što se tiče korelacije sa $\log D$ pri fiziološkom pH 7,4 dobijeni statistički parametri ukazuju na umeren stepen korelacije pri čemu je najveća zavisnost ($R=0,827$ i

$R^2 = 0,684$) dobijena sa $\log D_{7,4}$ izračunatim *Weighted* metodom u MarvinSketch 5.5.1.0 programu. Korelacija $\log K_{w,7,4}$ i $\log D_{7,4}$ je prikazana na Slici 26.

Najniži stepen korelacije ostvaren je u kiseljoj sredini (Slika 26.), pri čemu su najbolji statistički parametri (Tabela 24.) dobijeni sa $\log D_{4,4}$ vrednostima računatim *KLOP* metodom ($R=0,662$ i $R^2=0,438$). Pri datim eksperimentalnim uslovima ispitivana jedinjenja su potpuno jonizovana (izuzev klopamida i indapamida) pri čemu se stvara mogućnost pojave sporednih interakcije sa slobodnim silanolnim grupama i pojave i drugih mehanizama retencije što se može odraziti i na dobijene $\log K_w$ vrednosti.¹²⁵



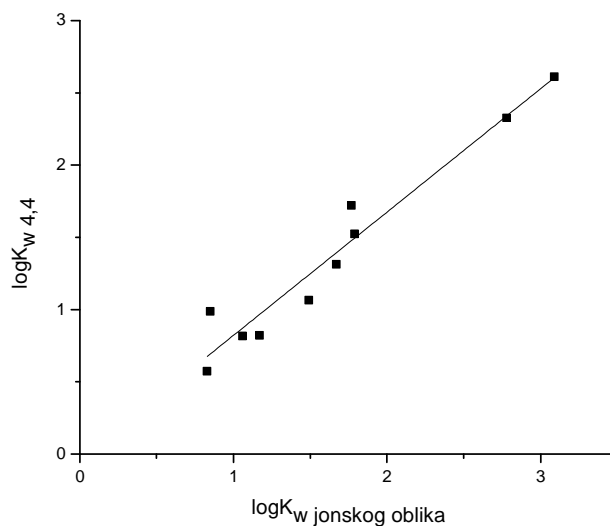
Slika 26. Korelacija između eksperimentalnih i teorijski izračunatih parametara lipofilnosti pri pH 4,4; 7,4 i 9,1.

Usled nedostatka eksperimentalno određenih $\log D$ kao pouzdanijih parametara za poređenje lipofilnosti, za 10 ispitivanih jedinjenja je izvršena korelacija $\log K_{w,4,4}$ sa $\log K_w$ vrednostima jonizovanih formi jedinjenja određenih primenom gradijentne RP-HPLC metode na Xbridge™ C-18 koloni (150 x 4,6 mm, 5 μ M).¹¹⁰ Dobijeni statistički

parametri ($R=0,947$ i $R^2=0,973$) su imali znatno više vrednosti u poređenju sa rezultatima dobijenim korelacijom sa izračunatim $\log D_{4,4}$ ($R=0,662$ i $R^2=0,438$) i ukazuju na visok stepen zavisnosti između $\log K_w$ dobijenih primenom izokratske i gradijentne RP-HPLC metode (Tabela 25., Slika 27.).¹¹⁰

Tabela 25. Eksperimentalne vrednosti $\log K_w$ dobijene primenom izokratske ($\log K_{w4,4}$) i gradijentne ($\log K_{w \text{ jon. oblika}}$) RP-HPLC metode¹¹⁰

Jedinjenje	$\log K_{w 4,4}$	$\log K_{w \text{ jon. oblika}}$ ¹¹⁰
Brimonidin	0,99	0,85
Klonidin	0,82	1,06
Efaroksan	1,31	1,67
Harman	1,72	1,77
Idazoksan	0,82	1,17
Moksonidin	0,57	0,83
Nafazolin	1,52	1,79
Oksimetazolin	2,33	2,78
Tetrahidrozolin	1,06	1,49
Ksilometazolin	2,61	3,09



Slika 27. Korelacija između $\log K_{w4,4}$ određenih izokratskim metodom i $\log K_w$ jonskog oblika određenih gradijentnom RP-HPLC metodom.¹¹⁰

Na osnovu prikazanih zavisnosti između $\log K_w$ i $\log D/\log P$ vrednosti, a imajući u vidu nedostatak eksperimentalno određenih parametara lipofilnosti ($\log D$ i $\log P$), teško je doneti zaključak o pouzdanosti dobijenih $\log K_w$ rezultata u predviđanju lipofilnih karakteristika analiziranih jedinjenja jer se i eksperimentalne i teorijske vrednosti (izračunate primenom različitih programa) zasnivaju na izvesnim aproksimacijama. Pošto $\log D$ uzima u obzir sve molekulske oblike (jonske i neutralne) koji mogu postojati pri datoj pH vrednosti, smatra se da je ovaj deskriptor bolji parametar lipofilnosti u poređenju sa $\log P$, a naročito u razumevanju lipofilne prirode molekula u različitim fiziološkim sistemima.²²⁸ U slučaju ispitivanih α -adrenergičkih i imidazolinskih liganada visok stepen korelacije sa $\log D$ dobijen za pH 7,4 i pH 9,1 ukazuje da se ovaj način u određivanju lipofilnosti može primeniti za preliminarnu procenu lipofilnih karakteristika srodnih jedinjenja, potencijalnih liganada imidazolinskih i α -adrenergičkih receptora.

4.3.4.1. Korelacija $\log K_w$ i nagiba (S)

Smatra se da nagib S iz linearne jednačine (72) takođe daje značajne informacije o lipofilnom ponašanju analita. Korelacijom dobijenih odsečaka ($\log K_{w4,4}$, $\log K_{w7,4}$ i $\log K_{w9,1}$) sa nagibima ($S_{4,4}$, $S_{7,4}$ i $S_{9,1}$) dobijene su sledeće linearne zavisnosti prikazane u Tabeli 26.

Tabela 26. Zavisnost odsečka ($\log K_w$) i nagiba (S)

Jednačine	R	R ²	Standardna greška
$\text{Log}K_{w4,4} = -1,701 - 0,920 S_{4,4}$	0,879	0,773	0,453
$\text{Log}K_{w7,4} = -1,690 - 1,050 S_{7,4}$	0,895	0,800	0,519
$\text{Log}K_{w9,1} = -1,794 - 1,099 S_{9,1}$	0,968	0,937	0,265

Prema nekim autorima visok stepen korelacije odsečka ($\log K_w$) i nagiba (S) ukazuje da se i ovaj parametar može koristiti za procenu lipofilnosti ispitivanih jedinjenja¹¹⁶ kao i da stepen ove zavisnosti može biti mera uniformnosti u retencionom

mehanizmu.¹²⁵ Ako među ispitivanim jedinjenjima nema značajnih razlika u interakcijama analit/stacionarna faza (uglavnom onih koje se odnose na građenje vodoničnih veza i stepen silanofilnih interakcija) uspostavlja se dobra linearna zavisnost između nagiba (S) i odsečka ($\log K_w$):

$$\log K_w = a S + b \quad (72)$$

Najbolja korelacija je dobijena za odsečak i nagib pri pH 9,1 ($R=0,968$ $R^2=0,937$) pa je pri ovoj pH vrednosti ispitan i značaj nagiba u proceni lipofilnosti ispitivanih jedinjenja. Zavisnost nagiba ($S_{9,1}$) od $\log D_{9,1}$ (izračunatog *PHYS* metodom) može se prikazati sledećom jednačinom:

$$S_{9,1} = -0,714 \times \log D_{9,1} - 2,402 \quad (73)$$

$$R=0,825, R^2=0,681, S.E.=0,527, n=29$$

Na osnovu dobijenih statističkih podataka koji su pokazali niži stepen korelacije u odnosu na korelaciju odsečka ($\log K_{w9,1}$) sa lipofilnošću $\log D_{9,1}$ ($R=0,904$, $R^2=0,817$) može se zaključiti da se odsečak ($\log K_{w9,1}$) može smatrati pouzdanijim parametrom u proceni hidrofobnosti ispitivanih α -adrenergičkih i imidazolinskih liganada u odnosu na nagib ($S_{9,1}$).

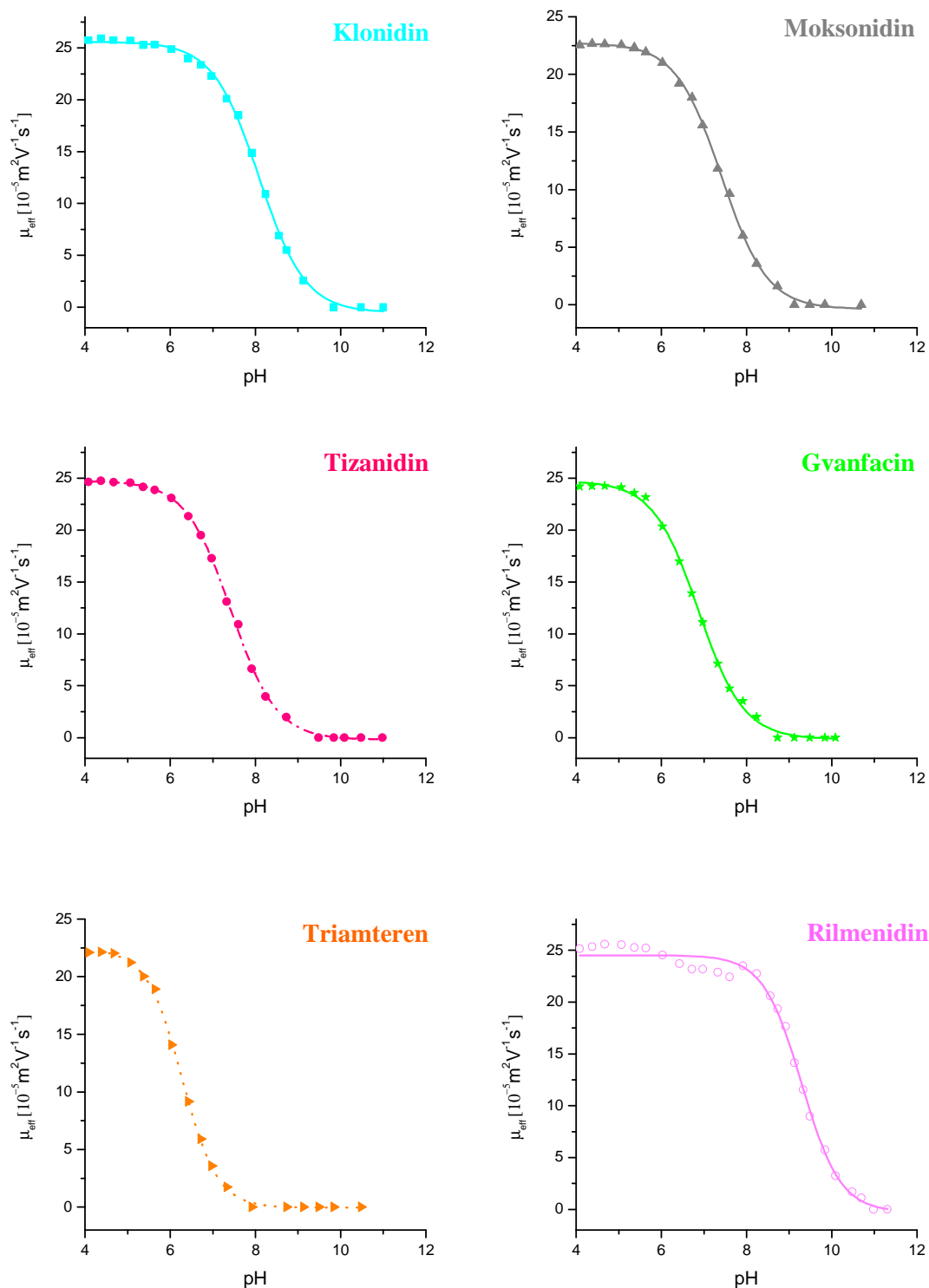
4.4. ODREĐIVANJE KISELINSKO-BAZNIH KONSTANTI JONIZACIJE METODOM KAPILARNE ELEKTROFOREZE

Važni faktori koji utiču na stvarnu jonsku i efektivnu pokretljivost slabih kiselina i baza su pH vrednost, jonska jačina, temperatura i viskoznost elektrolita. Svi nabrojani faktori moraju biti optimizovani tako da se obezbede odgovarajući eksperimentalni uslovi koji će omogućiti što preciznije merenje efektivne elektroforetske pokretljivosti. Konstante jonizacije (pK_a) 9 liganada imidazolinskih i /ili α_2 -adrenergičkih receptora (klonidina, moksonidina, tizanidina, gvanfacina, idazoksana, harmina, harmana, efaroksana, rilmenidina) i diuretika triamterena određene su metodom kapilarne zonske elektroforeze, merenjem efektivne elektroforetske pokretljivosti analita u prisustvu 2% acetona v/v kao neutralnog markera, pri konstantnoj temperaturi (25°C) elektrolita i u opsegu pH vrednosti 4,0-11,0.

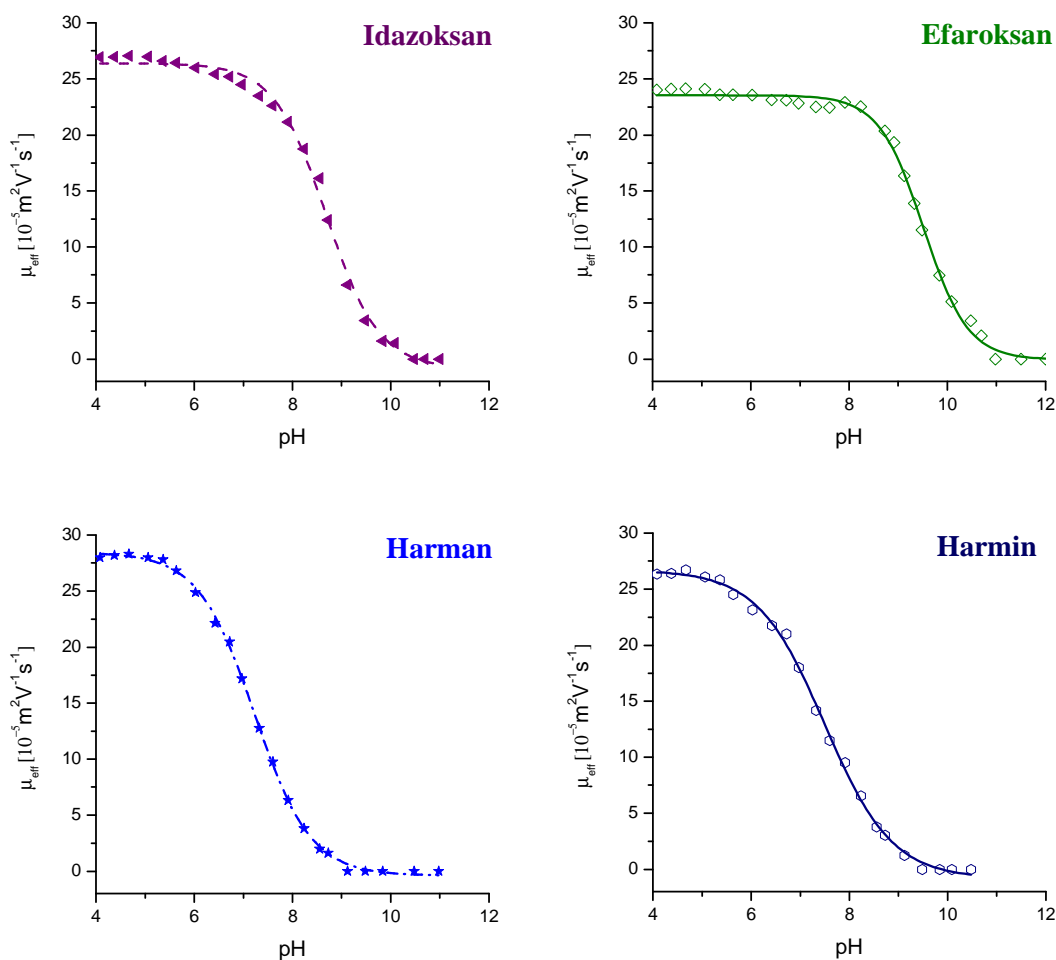
Dati eksperimentalni uslovi (pH 4,0-11,0) omogućili su rad sa elektrolitima konstantne jonske jačine (25 mM) pri čemu su svedene na minimum razlike u viskoznosti pufera kao i promenama elektroosmotskog toka. Za rad u kiseljoj sredini korišćen je acetatni, u neutralnoj fosfatni i u baznoj boratni i fosfatni pufer. Odabrani puferi predstavljaju najčešće korišćene puferne u kapilarnoj elektroforezi jer su kompatibilni sa UV detektorom, imaju odgovarajuću rastvorljivost u vodi i dostupni su u visokom stepenu čistoće.⁹⁵

U kiseljoj sredini sva ispitivana jedinjenja su protovana i ostvaruju svoju maksimalnu elektroforetsku pokretljivost. Efektivna elektroforetska pokretljivost pri pH 4,0 kreće se od $22,12 \times 10^{-5} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ (triamteren) do $27,98 \times 10^{-5} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ (harman). U neutralnoj sredini i u blizini pK_a vrednosti ispitivana jedinjenja ostvaruju intermedijernu elektroforetsku pokretljivost dok su u jako baznoj sredini neutralna i putuju zajedno sa EOF markerom pri čemu je i pokretljivost jednaka nuli. Sve pK_a vrednosti analiziranih jedinjenja dobijene su iz nelinearne regresione jednačine koja predstavlja zavisnost efektivne elektroforetske pokretljivosti (μ_{eff}) od pH vrednosti radnog elektrolita (Slika 28. i Slika 29.). Za monoprotionske kiseline i baze moguće je izvršiti linearizaciju opšteg modela. Međutim, na linearnu regresiju nepovoljno utiču promene u pokretljivosti analita do kojih može doći pri niskim pH vrednostima. Upoređivanjem linearne i

nelinearne regresije došlo se do zaključka da nelinearna regresiona analiza omogućuje preciznije određivanje pK_a vrednosti bližih literaturnim podacima, usled čega se ova tehnika smatra metodom izbora.⁹⁵



Slika 28. Zavisnost efektivne elektroforetske pokretljivosti od pH vrednosti elektrolita (klonidin, moksonidin, tizanidin, gvanfacin, triamterena i rilmenidina).



Slika 29. Zavisnost efektivne elektroforetske pokretljivosti od pH vrednosti elektrolita (idazoksan, efaroksan, rilmenidin, triamteren).

Ekperimentalno dobijene vrednosti pK_a su pomoću jednačine 28 prevedene u termodinamičke konstante jonizacije (pK_a^T) koje odgovaraju rastvoru elektrolita čija je jonska jačina jednaka nuli. U Tabeli 27. su date mešovite i termodinamičke konstante jonizacije određene metodom kapilarne elektroforeze, kao i vrednosti dostupne iz literature i izračunate primenom MarvinSketch¹⁷⁵ i ACD programa.²²⁹

Baznost derivata 2-aminoimidazolina potiče od cikličnog gvanidina. Najjača baza među derivatima 2-aminoimidazolina je klonidin sa pK_a 8,08, dok moksonidin (pK_a 7,41) i tizanidin (pK_a 7,42) imaju neznatno niže i vrlo bliske pK_a vrednosti.

Prisustvo heterocikličnog pirimidina u strukturi moksonidina i benzotiadiazola u strukturi tizanidina dovodi do smanjenja baznosti imidazolinskog azota u strukturi ovih jedinjenja u poređenju sa klonidinom kod koga je za 2-aminoimidazolinski prsten vezan 2,6 dihlorfenil supstituent.

Tabela 27. Kiselinske konstante ispitivanih jedinjenja, pK_a i pK_a^T , izračunate i eksperimentalno određene metodom kapilarne elektroforeze

Jedinjenje	$pK_a \pm S.E.$	pK_a^T	Izračunata ¹⁷⁵	Izračunata ²²⁹	pK_a^{lit}
Klonidin	$8,08 \pm 0,02$	8,02	8,16	8,10	8,71 ¹¹⁰ 8,04 ¹¹²
Moksonidin	$7,41 \pm 0,01$	7,35	7,26	7,11	7,84 ¹¹⁰ 7,36 ²³⁰
Tizanidin	$7,42 \pm 0,01$	7,36	7,49	7,48	
Gvanfacin	$6,87 \pm 0,02$	6,8	6,65	7,64	
Triamteren	$6,28 \pm 0,01$	6,21	4,57	6,28	7,16 ¹¹³ 6,2 ¹¹³
Rilmenidin	$9,29 \pm 0,04$	9,23	7,11	7,88	9,3 ¹¹⁴
Idazoksan	$8,69 \pm 0,04$	8,63	7,02	9,51	9,04 ¹¹⁰
Efaroksan	$9,51 \pm 0,03$	9,45	7,46	9,79	10,02 ¹¹⁰
Harman	$7,23 \pm 0,02$	7,16	5,97	8,62	7,21 ¹¹⁰
Harmin	$7,50 \pm 0,03$	7,43	6,15	8,71	7,45 ¹¹¹

¹⁷⁵MarvinSketch

²²⁹ACD software SciFinderScholar 2012

Za razliku od gvanidina koji je izuzetno jaka organska baza sa pK_a 13,6 derivat gvanidina gvanfacin ima znatno manje izražene bazne osobine (pK_a 6,87). Gvanfacin, koji se može posmatrati kao otvoreni analog klonidina je slabija baza od klonidina. Niža pK_a vrednost gvanfacina je posledica jakog negativnog induktivnog efekta karbonilne grupe vezane za azot gvanidina.

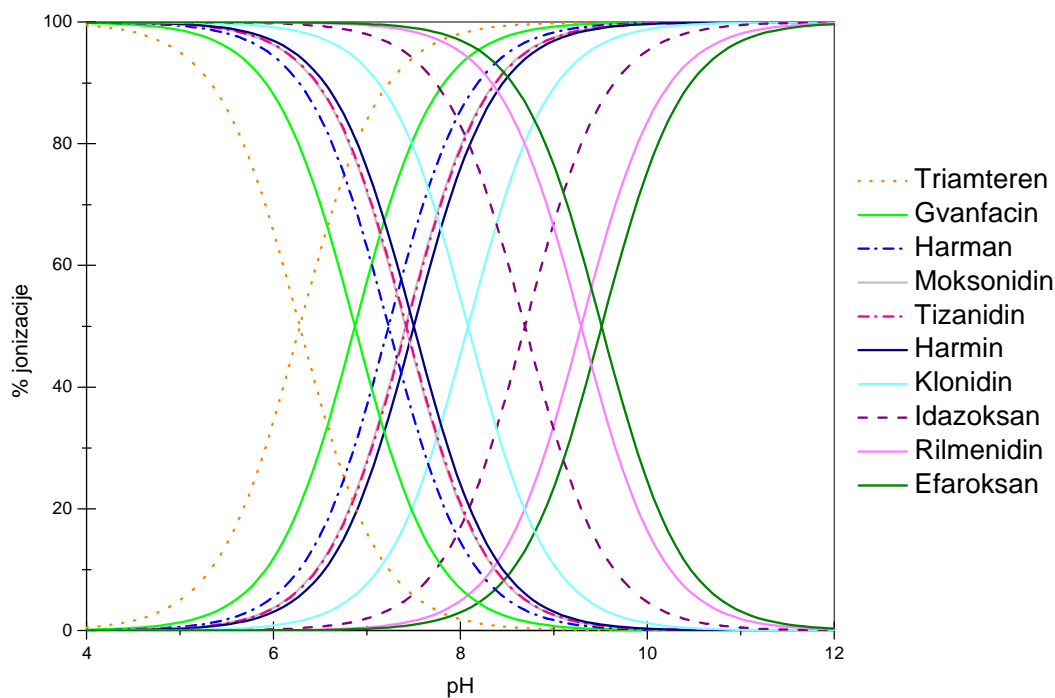
Diuretik triamteren, 2,4,7-triamino-6-fenilpteridin sa pK_a 6,28 je najslabija baza među ispitivanim derivatima gvanidina.

Derivat 2-amino-2-oksazolina rilmenidin je znatno jača baza (pK_a 9,29) od ispitivanih 2-aminoimidazolina. Atom kiseonika u cikličnom oksazolinu svojim mezomernim efektom značajno povećava polarnost $-O-C(NH_2)=N-$ dela strukture što dovodi do povećanja baznosti azotovog atoma u strukturi rilmenidina.¹⁸⁵

Derivati 2-imidazolina, idazoksan i efaroksan sa pK_a vrednostima 8,69 (idazoksan) i 9,51 (efaroksan) pokazuju veći afinitet za proton, odnosno imaju izraženije bazne osobine u poređenju sa supstituisanim 2-aminoimidazolinima.

Baznost derivata β -karbolina (harmana i harmina) potiče od piridinskog azota. Za razliku od piridina (pK_a 5,2) harman i harmin imaju jače izražene bazne osobine sa dobijenim pK_a vrednostima 7,23 za harman i 7,50 za harmin. Prisustvo metoksi grupe u strukturi harmina, što je i jedina razlika između ova dva jedinjenja, povećava njegovu baznost usled pozitivnog mezomernog efekta i povećane elektronske gustine na piridinskom azotu.

Pri fiziološki važnim pH vrednostima 1,0; 7,4 i 9,0 ispitivana jedinjenja se nalaze u različitim oblicima, tako da su pri pH 1,0 potpuno jonizovana, pri pH 7,4 su zastupljena kao smeše jonizovanih i nejonizovanih oblika, osim efaroksana i rilmenidina koji su dominantno prisutni u jonskom obliku i na pH 9,0 samo se gvanfacin i triamteren nalaze u neprotonovanom obliku dok su ostala jedinjenja i dalje u izvesnom stepenu jonizovana i prisutna kao smeše protonovanih i neprotonovanih formi leka. Na Slici 30. je prikazan dijagram raspodele ispitivanih jedinjenja u funkciji pH.



Slika 30. Dijagram raspodele ispitivanih jedinjenja u funkciji pH.

Veoma visok stepen korelacije pK_a vrednosti ($R=0,952$) je dobijen sa podacima dostupnim iz literature. Ako se uporede vrednosti određene kapilarnom zonskom elektroforezom sa pK_a vrednostima dobijenim gradijentnom HPLC metodom¹¹⁰ najpribližniji rezultat je postignut u slučaju harmana sa pK_a 7,23 (CE) i 7,21 (HPLC). U svim ostalim slučajevima (klonidin, moksonidin, idazoksan, efaroksan) odgovarajuće kiselinsko-bazne konstante su veoma bliske i nešto niže za vrednosti određene kapilarnom elektroforezom (od 0,35 pK_a jedinica niže kod idazoksana do 0,64 pK_a jedinice niže kod klonidina) u poređenju sa HPLC metodom. Za razliku od HPLC metode pK_a klonidina određena CE metodom se razlikuje za samo 0,04 pK_a jedinice od vrednosti dobijenih UV spektrofotometrijom. Izuzetno bliski rezultati su postignuti i spektrofotometrijskom i CE metodom u slučaju harmina, 7,50 (CE) i 7,45 (spektrofotometrijski). Kod moksonidina je takođe pK_a dobijena CE metodom znatno bliža vrednostima određenim potencimetrijskom titracijom,²³⁰ nego vrednostima dobijenim HPLC metodom.

Ako se uporede konstante određene kapilarnom elektroforezom sa vrednostima koje računaju različiti programski paketi dobijeni rezultati se veoma razlikuju od jedinjenja do jedinjenja kao i od programa. Kiselinske konstante izračunate ($pK_{a\text{ izr}}$) u MarvinSketch i ACD programu (Tabela 27.) su u visokom stepenu korelacije i vrlo bliske dobijenim eksperimentalnim vrednostima ($pK_{a\text{ eksp}}$) u slučaju: klonidina $pK_{a\text{ eksp}}$ 8,08; $pK_{a\text{ izr}}$ 8,16 (Marvin), $pK_{a\text{ izr}}$ 8,1 (ACD); moksonidina $pK_{a\text{ eksp}}$ 7,41, $pK_{a\text{ izr}}$ 7,26 (Marvin), $pK_{a\text{ izr}}$ 7,1 (ACD) i tizanidina $pK_{a\text{ eksp}}$ 7,42, $pK_{a\text{ izr}}$ 7,49 (Marvin), $pK_{a\text{ izr}}$ 7,48 (ACD).

Za sva ostala jedinjenja između eksperimentalno određenih i izračunatih pK_a vrednosti postoje znatna odstupanja koja iznose i do 2 pK_a jedinice (Tabela 27.) kao na primer u slučaju: rilmenidina $pK_{a\text{ eksp}}$ 9,29, $pK_{a\text{ izr}}$ 7,11 (Marvin), $pK_{a\text{ izr}}$ 7,88 (ACD) i efaroksana $pK_{a\text{ eks}}$ 9,51, $pK_{a\text{ izr}}$ 7,46 (Marvin). Interesantno je i da su u svim slučajevima gde postoje značajne razlike u pK_a vrednostima (harma, harmin, idazoksan), konstante izračunate u MarvinSketch¹⁷⁵ programu su uvek niže, a u ACD programu²²⁹ uvek više u poređenju sa eksperimentalno dobijenim vrednostima (Tabela 27.).

5. ZAKLJUČAK

Na osnovu dobijenih rezultata mogu se izvesti sledeći zaključci:

- Izvršena je QSAR analiza nezavisno na dve grupe eksperimentalnih podataka dobijenih u prisustvu različitih radioliganada ($[^{125}\text{I}]$ PIC i $[^{125}\text{I}]$ LNP911) i različitih ćelijskih linija (humani trombociti i PC12).
 - QSAR studija liganada imidazolinskih i α_2 -adrenergičkih receptora čiji su afiniteti vezivanja određeni na humanim trombocitima u prisustvu radioliganda $[^{125}\text{I}]$ *p*-jodoklonidina ukazala je da porast lipofilnosti ($\log D_{7,4}$) i molarne refraktivnosti, zajedno sa smanjenjem naelektrisanja na atomima azota heterociklusa dovodi do snažnijeg afiniteta ka I₁-IR, dok su lipofilnost ($\log P$) i HOMO energija I₁-IR liganada važni deskriptori I₁-IR/ α_2 -AR selektivnosti. Formirani QSAR model se može koristiti za pouzdano predviđanje afiniteta vezivanja za I₁-IR u rasponu pK_i vrednosti od 5,901 do 8,319.
 - Selektivna aktivacija I₁-IR dovodi do smanjenja neželjenih efekata posredovanih aktivacijom α_2 -AR usled čega formirani QSAR model koji definiše afinitet liganada za I₁-IR zajedno sa modelom za I₁/ α_2 selektivnost može biti veoma koristan u racionalnom dizajniranju novih selektivnih liganada sa povećanim afinitetom ka I₁-IR.
 - QSAR studija liganada imidazolinskih i α_2 -adrenergičkih receptora čiji su afiniteti vezivanja određeni na PC12 ćelijama u prisustvu radiojodiniranog 2-(2-hloro-4-jodo-fenilamino)-5-metil-pirolina ($[^{125}\text{I}]$ LNP911) takođe je ukazala na značaj lipofilnosti ($\log D_{7,4}$) i naelektrisanja na azotu za povećan afinitet ka I₁-IR. Formirani QSAR model se može koristiti za pouzdano predviđanje afiniteta vezivanja za I₁-IR u rasponu pK_i vrednosti od 5,067 do 8,854.
 - *Docking* studije su potvrdile učešće atoma azota u heterocikličnim prstenovima liganada u formiranju intermolekulskih veza sa aminokiselinama u aktivnom domenu IRAS-a. Pored toga, aromatični deo u strukturi liganada stupao je u

hidrofobne interakcije sa aminokiselinama aktivnog mesta što je u skladu sa dobijenom pozitivnom korelacijom između $\log D_{7,4}$ i pK_i (I_1 -IR) vrednosti.

- Izvršena je optimizacija eksperimentalnih uslova za razdvajanje smeše imidazolinskih i α_2 -adrenergičkih liganada (klonidin, moksonidin, rilmenidin, harman, harmin, amilorid, tizanidin, idazoksan, agmatin, gvanfacin, klopamid, efaroksan, *p*-aminoklonidin, gvanabenz, triamteren i indapamid) metodom kapilarne elektroforeze.
 - Ispitan je uticaj koncentracije i pH vrednosti pufera, temperature, napona i različitih koncentracija α -, β - i γ -ciklodekstrina na elektroforetsku pokretljivost i rezoluciju jedinjenja u smeši. Najveći značaj u modifikaciji elektroforetskog ponašanja ispitivanih jedinjenja pokazao je β -ciklodekstrin, a najmanji γ -ciklodekstrin.
 - Preliminarna ispitivanja sprovedena na 15 gvanidinskih/imidazolinskih derivata i uspostavljena matematička zavisnost između migracionog vremena i molekularnih parametara ispitivanih liganada i ligand- β -CD kompleksa ($\log(t) = f[\text{SAS (ligand-}\beta\text{-CD), HOMO (ligand-}\beta\text{-CD), naelektrisanje (ligand)}]$) pokazali su da se na brz i jednostavan način teorijskim proračunima odgovarajućih deskriptora može predvideti elektroforetsko ponašanje novih liganada imidazolinskih receptora.
 - Metodom kapilarne elektroforeze postignuto je razdvajanje smeše 11 strukturno srodnih gvanidinskih/imidazolinskih derivata bliske elektroforetske pokretljivosti korišćenjem neobložene kapilare unutrašnjeg prečnika 50 μm , primenom 30 mM fosfatnog pufera pH 2,0 koji sadrži 15 mM β -CD uz elektrodinamičko injektovanje analita pri naponu od 9 kV i na sobnoj temperaturi od 25 °C.
 - Teorijskim ispitivanjem procesa kompleksiranja ispitivanih liganada sa α -, β - i γ -CD dobijene su važne informacije o interakcijama između analita i različitih ciklodekstrina. Negativne vrednosti energije kompleksiranja dobijene za α -, β - i

γ -CD komplekse ukazale su na tendenciju ispitivanih jedinjenja ka kompleksiranju. Termodinamički parametri: promena entalpije (ΔH°), entropija (ΔS°) i *Gibbs*-ova slobodna energija (ΔG°) izračunati za komplekse svih ispitivanih jedinjenja sa α -, β - i γ -CD ukazali su da kod većine ispitivanih liganada u toku kompleksiranja sa ciklodekstrinima *van der Waals*-ove interakcije i vodonične veze imaju veći značaj od hidrofobnih interakcija.

- Formirani su QSMR modeli koji dovode u korelaciju relativno migraciono vreme ispitivanih gvanidinskih/imidazolinskih derivata sa njihovim sternim, elektronskim i termodinamičkim osobinama u tri različita CE sistema koja sadrže odvojeno α -, β - ili γ -ciklodekstrin.
- Poređenje različitih statističkih metoda (MLR, PLS i ANN) korišćenih u formiranju QSMR modela pokazalo je superiornost linearnih metoda, PLS i postupne MLR, u odnosu na nelinearnu ANN metodu. Raskorak između niskih vrednosti RMSEE i RMSEP i nedovoljno visokih vrednosti Q^2 je uočen kao glavni nedostatak ANN modelovanja. Dobijeni rezultati ukazuju da je LOO-ukrštena validacija važan korak ANN modeliranja i da je njeno izvođenje neophodno u cilju procene predviđajuće sposobnosti formiranih ANN modela.
- Optimalni QSMR modeli: PLS-QSMR(α -CD) model: $RMT=f(\chi(\text{ligand-}\alpha\text{-CD})$ [B3LYP-3-21G(d)]; ΔG (ligand- α -CD) [PM3]); PLS-QSMR(β -CD) model: $RMT=f(\chi(\text{ligand-}\beta\text{-CD})$ [HF-3-21G(d)]; ShpA (ligand)); i MLR-QSMR(γ -CD) model: $RMT=3,78027 - 7,13550 \chi(\text{ligand})$ [B3LYP-3-21G(d)] + 0,00053 PMIX (ligand) pokazali su važnu ulogu deskriptora ligand-CD kompleksa na migraciono ponašanje ispitivanih jedinjenja u datom CE sistemu.
- Predloženi *multi-target* QSMR model, PLS-mQSMR(α -CD, β -CD, γ -CD) model: $RMT=f(\omega\text{-ligand}$ [HF-STO-3G(d)]; SEV-ligand) može biti korišćen u inicijalnoj fazi razvoja CE metode kao brz *screening* model za predviđanje migracionog vremena srodnih antihipertenziva u prisustvu tri različita

ciklodekstrina i za odabir najboljeg ciklodekstrina za razdvajanje analiziranih jedinjenja.

- Ispitan je uticaj stepena jonizacije (kisele, neutralne i bazne sredine) 29 liganada imidazolinskih i α -adrenergičkih receptora na retenciju u RP-HPLC sistemu i pokretljivost u CE sistemu.
 - Primenom linearnih statističkih metoda, postupne MLR i PLS, formirani su QSRR i QSMR modeli koji definišu retenciju i pokretljivost pri tri različite pH vrednosti 4,4; 7,4 i 9,1 i koji se na osnovu dobijenih regresionih i validacionih parametara mogu koristiti kao pouzdani modeli za predviđanje retencije i pokretljivosti novih jedinjenja potencijalnih liganada imidazolinskih i α -adrenergičkih receptora.
 - Najznačajniji molekularni deskriptori u optimalnim QSRR modelima ukazuju da se važne informacije o retencionom mehanizmu u RP-HPLC sistemu mogu dobiti na osnovu 0D-, 1D- i 2D-deskriptora koji nose informacije o hemijskom sastavu jedinjenja, molekularnim osobinama (lipofilnosti) i voluminoznosti molekule. Sa druge strane, pouzdano predviđanje elektroforetske pokretljivosti može se izvršiti računanjem odgovarajućih 2D- i 3D-deskriptora od kojih većina daje informacije o molekularnoj veličini i kompleksnosti, kao i o uticaju naelektrisanja i elektronskih osobina na migraciono ponašanje.
 - Za pojedine odabrane teorijske deskriptore nije bilo jednostavno dovesti u vezu njihovo značenje sa retencijom u hromatografskom sistemu i pokretljivošću u CE sistemu, ali je njihovo prisustvo u odabranim QSRR i QSMR modelima bilo neophodno u cilju dobijanja QSRR/QSMR modela visoke moći predviđanja.
 - Korelacija retencionih parametara $\log K_w$ dobijenih pri tri različite pH vrednosti (4,4, 7,4 i 9,1) sa parametrima lipofilnosti ($\log D_{4,4}$, $\log D_{7,4}$, $\log D_{9,1}$ i $\log P$) izračunatih u različitim kompjuterskim programima pokazala je da na stepen zavisnosti u velikoj meri utiče metoda primenjena u računanju lipofilnosti.

- Na osnovu dobijenih statističkih podataka ($R=0,904$ i $R^2=0,817$) najveći stepen korelacije ostvaren je između $\log K_{w9,1}$ i $\log D_{9,1}$ izračunatog *PHYS* metodom u MarvinSketch programu. Umeren stepen korelacije ($R=0,827$ i $R^2=0,684$) ostvaren je između $\log K_{w7,4}$ i $\log D_{7,4}$ izračunatog *Weighted* metodom. Najniži stepen korelacije ostvaren je u kiseljoj sredini između $\log K_{w4,4}$ i $\log D_{4,4}$ vrednosti računatih *KLOP* metodom ($R=0,662$ i $R^2=0,438$).

- Određene su kiselinsko-bazne konstante jonizacije 10 liganada imidazolinskih i α_2 -AR metodom kapilarne zonske elektroforeze.
 - Na osnovu dobijenih rezultata i visokog stepena korelacije sa konstantama određenim spektrofotometrijskom, potenciometrijskom ili HPLC metodom može se zaključiti da kapilarna zonska elektroforeza predstavlja preciznu metodu za određivanje pK_a vrednosti derivata gvanidina, cikličnih gvanidina, imidazolina, 2-amino-2-oksazolina i β -karbolina.

 - Dostupni programi za teorijsko predviđanje kiselinskih konstanti u slučaju klonidina, moksonidina i tizanidina daju vrlo precizne vrednosti, dok za pojedina jedinjenja postoje odstupanja koja kod rilmenidina i efaroksana iznose i do 2 pK_a jedinice.

 - Pri fiziološki važnim pH vrednostima 1,0, 7,4 i 9,0 ispitivana jedinjenja se nalaze u različitim oblicima, tako da su pri pH 1,0 potpuno jonizovana, pri pH 7,4 su zastupljena kao smeše jonizovanih i nejonizovanih oblika, osim efaroksana i rilmenidina koji su dominantno prisutni u jonskom obliku i na pH 9,0 samo se gvanfacin i triamteren nalaze u neprotonovanom obliku dok su ostala jedinjenja i dalje u izvesnom stepenu jonizovana i prisutna kao smeše protonovanih i neprotonovanih formi leka.

6. LITERATURA

1. Crassous P.A., Denis C., Paris H., Senard J.M. Interest of α_2 -adrenergic agonists and antagonists in clinical practice: background, facts and perspectives. *Curr. Top. Med. Chem.* **2007**, *7*, 187-194.
2. Fairbanks C.A., Stone L.S., Wilcox G.L. Pharmacological profiles of alpha 2 adrenergic receptor agonists identified using genetically altered mice and isobolographic analysis. *Pharmacol. Therapeut.* **2009**, *123*, 224-238.
3. Szabo B. Imidazoline antihypertensive drugs: a critical review on their mechanism of action. *Pharmacol. Therapeut.* **2002**, *93*, 1– 35.
4. Ernsberger P., Graves M.E., Graff L.M., Zakieh N., Nguyen P., Collins L.A., Westbrooks K.L., Johnson G.G. I₁-imidazoline receptors. Definition, characterization, distribution, and transmembrane signaling. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1995**, *763*, 22–42.
5. Head G.A., Mayorov D.N. Imidazoline receptors, novel agents and therapeutic potential. *Cardiovasc. Hematol. Agents Med. Chem.* **2006**, *4*, 17-32.
6. Bousquet P., Feldman J., Schwartz J. Central cardiovascular effects of alpha-adrenergic drugs: differences between catecholamines and imidazolines. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1984**, *230*, 232–236.
7. Parini A., Coupry I., Graham R.M., Uzielli I., Atlas D., Lanier S.M. Characterization of an imidazoline/guanidinium receptive site distinct from the alpha₂-adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 11874-11878.
8. Ernsberger P., Guiliano V., Willette R.N., Reis V. Role of imidazole receptors in the vasodepressor response to clonidine analogs in the rostral ventrolateral medulla. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1990**, *253*, 408–418.
9. Hieble J.P., Ruffolo R.R.Jr. Possible structural and functional relationships between imidazoline receptors and α_2 -adrenoceptors. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1995**, *763*, 8–21.

10. Regunathan S., Reis D.J., Imidazoline receptors and their endogenous ligands, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1996**, *36*, 511–544.
11. Ernsberger P., Haxhiu M.A. The I₁-imidazoline-binding site is a functional receptor mediating vasodepression via the ventral medulla. *Am. J. Physiol.* **1997**, *273*, R1572–R1579.
12. Chan S.L., Brown C.A., Scarpello K.E., Morgan N.G. The imidazoline site involved in control of insulin secretion: Characteristics that distinguish it from I₁- and I₂-sites. *Br. J. Pharmacol.* **1994**, *112*, 1065–1070.
13. Morgan N.G., Chan S.L., Mourtada M., Monks L.K., Ramsden C.A. Imidazolines and pancreatic hormone secretion. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1999**, *881*, 217–228.
14. Bousquet P., Bricca G., Dontenwill M., Feldman J., Grenay H., Belcourt A., Stutzmann J., Tibirica E. From the α 2-adrenoceptors to the imidazoline preferring receptors. *Fundam. Clin. Pharmacol.* **1992**, *6*, 15S–21S.
15. Chan C.K.S., Burke S.L., Head G.A. Contribution of imidazoline receptors and α 2-adrenoceptors in the rostral ventrolateral medulla to sympathetic baroreflex inhibition by systemic rilmenidine. *J. Hypertens.* **2007**, *25*, 147–155.
16. Head G.A., Chan C.K.S., Burke S.L. Relationship between imidazoline and α 2-adrenoceptors involved in the sympatho-inhibitory actions of centrally acting antihypertensive agents. *J. Auton. Nerv. Syst.* **1998**, *72*, 163–169.
17. Bousquet P. I₁ receptors, cardiovascular function, and metabolism. *Am. J. Hypertens.* **2001**, *14*, 317S–321S.
18. Dardonville C., Rozas I. Imidazoline binding sites and their ligands: An overview of the different chemical structures. *Med. Res. Rev.* **2004**, *24*, 639–661.
19. Li J.X., Zhang Y. Imidazoline I₂ receptors: Target for new analgesics? *Eur. J. Pharmacol.* **2011**, *658*, 49–56.

20. Lemke T.L., Williams D.A. Foye's Principles of Medicinal Chemistry, Lippincot Williams & Wilkins, Baltimore **2013**, pp. 352-353.
21. Atlas D., Burstein Y. Isolation of an endogenous clonidine-displacing substance from rat brain. *FEBS Lett.* **1984**, *170*, 387–390.
22. Atlas D., Burstein Y. Isolation and partial purification of a clonidine-displacing endogenous brain substance. *Eur. J. Biochem.* **1984**, *144*, 287–293.
23. Li G., Regunathan S., Barrow C.J., Eshraghi J., Cooper R., Reis D.J. Agmatine: An endogenous clonidine displacing substance in the brain. *Science* **1994**, *263*, 966–969.
24. Reis D.J., Regunathan S. Is agmatine a novel neurotransmitter in brain? *Trends. Pharmacol. Sci.* **2000**, *21*, 187–193.
25. Halaris A., Plietz J. Agmatine: Metabolic pathway and spectrum of activity in brain. *CNS Drugs* **2007**, *21*, 885–900.
26. Musgrave I.F., Badoer E. Harmane produces hypotension following microinjection into the RVLM: possible role of I₁-imidazoline receptors. *Br. J. Pharmacol.* **2000**, *129*, 1057–1059.
27. Parker C.A., Anderson N.J., Robinson E.S.J., Price R., Tyacke R.J., Husbands S.M., Dillon M.P., Eglen R.M., Hudson A.L., Nutt D.J., Crump M.P., Crosby J. Harmane and harmalan are bioactive components of classical clonidine-displacing substance. *Biochemistry* **2004**, *43*, 16385–16392.
28. Robinson E.S.J., Anderson N.J., Crosby J., Nutt D.J., Hudson A.L. Endogenous β -carbolines as clonidine-displacing substances. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **2003**, *1009*, 157–166.
29. Nikolic K., Agbaba D. Imidazoline antihypertensive drugs: Selective I₁-imidazoline receptors activation. *Cardiovasc. Ther.* **2012**, *30*, 209-216.

30. Eglen R.M., Hudson A.L., Kendall D.A., Nutt D.J., Morgan N.G., Wilson V.G., Dillon M.P. 'Seeing through a glass darkly': Casting light on imidazoline 'I' sites. *Trends. Pharmacol. Sci.* **1998**, *19*, 381–390.
31. Piletz J.E., Zhu H., Chikkala D.N. Comparison of ligand binding affinities at human I₁-imidazoline binding sites and the high affinity state of alpha-2 adrenoceptor subtypes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1996**, *279*, 694–702.
32. Greney H., Urosevic D., Schann S., Dupuy L., Bruban V., Ehrhardt J.D., Bousquet P., Dontenwill M. [¹²⁵I]2-(2-Chloro-4-iodo-phenylamino)-5-methylpyrroline (LNP 911), a High-Affinity Radioligand Selective for I₁Imidazoline Receptors. *Mol. Pharmacol.* **2002**, *62*, 181-191.
33. Reid J.L. Rilmenidine: A clinical overview. *Am. J. Hypertens.* **2000**, *13*, 106S-111S.
34. Schann S., Bruban V., Pompermayer K., Feldman J., Pfeiffer B., Renard P., Scalbert E., Bousquet P., Ehrhardt J.D. Synthesis and biological evaluation of pyrrolinic isosteres of rilmenidine. Discovery of cis-/transdicyclopropylmethyl-(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.* **2001**, *44*, 1588–1593.
35. Pignini M., Bousquet P., Carotti A., Dontenwill M., Giannella M., Moriconi R., Piergentili A., Quaglia W., Tayebati S.K., Brasili L. Imidazoline receptors: Qualitative structure–activity relationships and discovery of tracizoline and benazoline. Two ligands with high affinity and unprecedented selectivity. *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, *5*, 833–841.
36. Greney H., Ronde P., Magnier C., Maranca F., Rascente C., Quaglia W., Giannella M., Pignini M., Brasili L., Lugnier C., Bousquet P., Dontenwill M. Coupling of I₁ imidazoline receptors to the cAMP pathway: Studies with a highly selective ligand, benazoline. *Mol. Pharmacol.* **2000**, *57*, 1142–1151.

37. Chapleo C.B., Myers P.L., Butler R.C., Davis J.A., Doxey J.C., Higgins S.D., Myers M., Roach A.G., Smith C.F., Stillings M.R. Alpha-adrenoreceptor reagents. 2. Effects of modification of the 1,4-benzodioxan ring system on alpha-adrenoreceptor activity. *J. Med. Chem.* **1984**, *27*, 570–576.
38. Hudson A.L., Chapleo C.B., Lewis J.W., Husbands S., Grivas K., Mallard N.J., Nutt D.J. Identification of ligands selective for central I₂-imidazoline binding sites. *Neurochem. Int.* **1997**, *30*, 47–53.
39. Treder A.P., Andruszkiewicz R., Zgoda W., Ford C., Hudson A.L. New analogues of agmatine with higher affinity to imidazoline receptors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 1009–1011.
40. Ulibarri I., Soto J., Ruiz J., Ballesteros J., Jauregui J.V., Meana J.J. I₂-imidazoline receptors in platelets of patients with Parkinson's disease and Alzheimer's type dementia. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1999**, *881*, 199–202.
41. Raasch W., Muhle H., Dominiak P. Modulation of MAO activity by imidazoline and guanidine derivatives. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1999**, *881*, 313–331.
42. Holt A., Wieland B., Baker G.B. Allosteric modulation of semicarbazide-sensitive amine oxidase activities in vitro by imidazoline receptor ligands. *Br. J. Pharmacol.* **2004**, *143*, 495–507.
43. Nutt D.J., French N., Handley S., Hudson A., Husbands S., Jackson H., Jordan S., Lallies M.D., Lewis J., Lione L., Mallard N., Pratt J. Functional studies of specific imidazoline-2 receptor ligands. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1995**, *763*, 125-139.
44. Martin-Gomez J.I., Ruiz J., Callado L.F., Garibi J.M., Aguinaco L., Barturen F., Javier Meana J. Increased density of I₂-imidazoline receptors in human glioblastomas. *Neuroreport* **1996**, *7*, 1393–1396.
45. Carrieri A., Brasili L., Leonetti F., Pignini M., Giannella M., Bousquet P., Carotti A. 2-D and 3-D modeling of imidazoline receptors ligands: Insights into pharmacophore. *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, *5*, 843–856.

46. Chapleo C.B., Myers P.L., Butler R.C., Doxey J.C., Roach A.G., Smith C.F. Alpha-adrenoreceptor reagents. 1. Synthesis of some 1,4-benzodioxans as selective presynaptic alpha 2-adrenoreceptor antagonists and potential antidepressants. *J. Med. Chem.* **1983**, *26*, 823–831.
47. Giorgioni G., Ambrosini D., Vesprini C., Hudson A., Nasuti C., Di Stefano A., Sozio P., Ciampi O., Costa B., Martini C., Carrieri A., Carbonara G., Enzensperger C., Pignini M. Novel imidazoline compounds as partial or full agonists of D₂-like dopamine receptors inspired by I₂-imidazoline binding sites ligand 2-BFI. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 7085–7091.
48. Hudson A.L., Gough R., Tyacke R., Lione L., Lalies M., Lewis J., Husbands S., Knight P., Murray F., Hutson P., Nutt D.J. Novel selective compounds for the investigation of imidazoline receptors. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1999**, *881*, 81–91.
49. Tyacke R.J., Robinson E.S., Nutt D.J., Hudson A.L. 5-Isothiocyanato-2-benzofuranyl-2-imidazoline (BU99006) an irreversible imidazoline(2) binding site ligand: In vitro and in vivo characterisation in rat brain, *Neuropharmacology* **2002**, *43*, 75–83.
50. Ruffolo R.R.Jr., Waddell J.E. Receptor interactions of imidazolines. IX. Cirazoline is an alpha-1 adrenergic agonist and an alpha-2 adrenergic antagonist. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1982**, *222*, 29–36.
51. Brasili L., Pignini M., Marucci G., Quaglia W., Malmusi L., Lanier S.M., Lanier B. Separation of α -adrenergic and imidazoline/guanidinium receptive sites (IGRS) activity in a series of imidazoline analogues of Cirazoline. *Bioorg. Med. Chem.* **1995**, *3*, 1503–1509.
52. Olmos G., Alemany R., Boronat M.A., Garcia-Sevilla J.A. Pharmacologic and molecular discrimination of I₂-imidazoline receptor subtypes. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1999**, *881*, 144–160.

53. Wikberg J.E.S., Hudson A.L. A series of novel imidazoline I₂-receptor selective Schiff bases of 1-(benzylidenamino)-3,3-dimethylguanidine. *Neurochem. Int.* **1996**, *30*, 95–99.
54. Jasper J.R., Lesnick J.D., Chang L.K., Yamanishi S.S., Chang T.K., Hsu S.A., Daunt D.A., Bonhaus D.W., Eglen R.M. Ligand efficacy and potency at recombinant alpha₂ adrenergic receptors: Agonist-mediated [35S]GTPgammaS binding. *Biochem. Pharmacol.* **1998**, *55*, 1035–1043.
55. Brown C.M., MacKinnon A.C., Redfern W.S., Williams A., Linton C., Stewart M., Clague R.U., Clark R., Spedding M. RS-45041-190: A selective, high-affinity ligand for I₂ imidazoline receptors. *Br. J. Pharmacol.* **1995**, *116*, 1737–1744.
56. MacKinnon A.C., Redfern W.S., Brown C.M. [3H]-RS-45041-190: A selective high-affinity radioligand for I₂ imidazoline receptors. *Br. J. Pharmacol.* **1995**, *116*, 1729–1736.
57. Husbands S., Glennon R.A., Gorgerat S., Gough R., Tyacke R., Crosby J., Nutt D.J., Lewis J.W., Hudson A.L. β-Carboline binding to imidazoline receptors. *Drug. Alcohol. Depend.* **2001**, *64*, 203–208.
58. Proks P., Ashcroft F.M. Phentolamine block of K_{ATP} channels is mediated by Kir6.2, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 11716–11720.
59. Chan S.L.F., Pallett A.L., Clews J., Ramsden C.A., Chapman J.C., Kane C., Dunne M.J., Morgan N.G. Characterization of new efaroxan derivatives for use in purification of imidazoline-binding sites. *Eur. J. Pharmacol.* **1998**, *355*, 67–76.
60. Zhao S., Wang B., Yuan H., Xiao D. Determination of agmatine in biological samples by capillary electrophoresis with optical fiber light-emitting-diode-induced fluorescence detection. *J. Chromatogr. A* **2006**, *1123*, 138–141.
61. Gonzalo-Lumbreras R., Rosales-Conrado N., León-González M.E., Pérez-Arribas L.V., Polo-Díez L.M. Capillary liquid chromatography with diode array and mass spectrometry detection for heterocyclic aromatic amine determination in ready-to-

eat food treated with electron-beam irradiation. *J. Chromatogr. A* **2010**, *1217*, 6778-6784.

62. Parekh S.A., Pudage A., Joshi S.S., Vaidya V.V., Gomes N.A. Rapid and sensitive liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) method for the determination of clonidine in human plasma. *J. Chromatogr. B* **2008**, *867*, 172-178.
63. Qi M.L., Wang P., Wang L. Validated liquid chromatography method for assay of tizanidine in drug substance and formulated products. *Anal. Chim. Acta* **2003**, *478*, 171-177.
64. Toral M.I., Pope S., Quintanilla S., Richter P. Simultaneous determination of amiloride and furosemide in pharmaceutical formulations by first digital derivative spectrophotometry. *Int. J. Pharmaceut.* **2002**, *249*, 117-126.
65. Milovanović S., Otašević B., Zečević M., Živanović LJ., Protić A. Development and validation of reversed phase high performance liquid chromatographic method for determination of moxonidine in the presence of its impurities. *J. Pharmaceut. Biomed.* **2012**, *59*, 151-156.
66. Ibañez G.A., Escandar G.M., Espinosa Mansilla A., Muñoz de la Peña A. Determination of triamterene in pharmaceutical formulations and of triamterene and its main metabolite hydroxytriamterene sulfate in urine using solid-phase and aqueous solution luminescence. *Anal. Chim. Acta* **2005**, *538*, 77-84.
67. Haggag R.S., Belal S.F., Shaalan R.A. Selective stability-indicating methods for the determination of clonidine hydrochloride and/or its related substance, 2,6-dichloroaniline. *J. Food Drug. Anal.* **2011**, *19*, 174-182.
68. Madhavi A., Naidu A., Subba D.V., Srinivasu P. Development and validation of a new LC method for analysis of brimonidine tartrate and related compounds. *Chromatographia* **2009**, *69*, 11-12.

69. Poinso V., Carpené M.A., Bouajila J., Gavard P., Feurer B., Couderc F. Recent advances in amino acid analysis by capillary electrophoresis. *Electrophoresis* **2012**, *33*, 14–35.
70. Kašička V. Recent developments in CE and CEC of peptides (2009–2011). *Electrophoresis* **2012**, *33*, 48–73.
71. Pérez-Fernández V., Domínguez-Vega E., Crego A.L., García M.Á., Marina M.L. Recent advances in the analysis of antibiotics by CE and CEC. *Electrophoresis* **2012**, *33*, 127–146.
72. Altria K., Marsh A., Sanger-van de Griend C. Capillary electrophoresis for the analysis of small-molecule pharmaceuticals. *Electrophoresis* **2006**, *27*, 2263–2282.
73. Chen M.H., Ding W.H. Separation and migration behaviour of positional and structural naphthalenesulfonate isomers by cyclodextrin-mediated capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1033*, 167–172.
74. Chen K.H., Lin C., Liao W.S., Lin W.Y., Hsiao Y.Y. Separation and migration behavior of structurally related phenothiazines in cyclodextrin-modified capillary zone electrophoresis. *J. Chromatogr. A* **2002**, *979*, 399–408.
75. Kou H.S., Chen C.C., Huang Y.H., Ko W.K., Wu H.L., Wu S.M. Method for simultaneous determination of eight cyclic antidepressants by cyclodextrin-modified capillary zone electrophoresis: applications in pharmaceuticals. *Anal. Chim. Acta* **2004**, *525*, 23–30.
76. Juvancz Z., Kendrovics R.B., Iványi R., Sente L. The role of cyclodextrins in chiral capillary electrophoresis. *Electrophoresis* **2008**, *29*, 1701–1712.
77. Lorin M., Delépée R., Morin P., Ribet J.P. Quantification of very low enantiomeric impurity of efroxan using a dual cyclodextrin system by capillary electrophoresis. *Anal. Chim. Acta* **2007**, *592*, 139–145.

78. Foulon C., Danel C., Vaccher M.P., Bonte J.P., Vaccher C., Goossens J.F. Chiral separation of *N*-imidazole derivatives, aromatase inhibitors, by cyclodextrin-capillary zone electrophoresis. Mechanism of enantioselective recognition. *Electrophoresis* **2004**, *25*, 2735-2744.
79. Cucinotta V., Contino A., Giuffrida A., Maccarrone G., Messina M. Application of charged single isomer derivatives of cyclodextrins in capillary electrophoresis for chiral analysis. *J. Chromatogr. A* **2010**, *1217*, 953-967.
80. Borst C., Holzgrabe U. Enantioseparation of dopa and related compounds by cyclodextrin-modified microemulsion electrokinetic chromatography. *J. Chromatogr. A* **2008**, *1204*, 191-196.
81. Davis M.E., Brewster M.E. Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2004**, *3*, 1023-1035.
82. Brewster M.E., Vandecruys R., Peeters J., Neeskens P., Verreck G., Loftsson T. Comparative interaction of 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin and sulfobutylether- β -cyclodextrin with itraconazole: Phase-solubility behavior and stabilization of supersaturated drug solutions. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2008**, *34*, 94-103.
83. Ge X., Huang Z., Tian S., Huang Y., Zeng C. Complexation of carbendazim with hydroxypropyl- β -cyclodextrin to improve solubility and fungicidal activity. *Carbohydr. Polym.* **2012**, *89*, 208-212.
84. Breslow R., Dong S.D. Biomimetic reactions catalyzed by cyclodextrins and their derivatives. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1997-2012.
85. Martín L., León A., Martín M.A., del Castillo B., Menéndez J.C. Detection and characterization of cyclodextrin complexes with β -carboline derivatives by spectroscopic techniques. *J. Pharmaceut. Biomed.* **2003**, *32*, 991-1001.
86. Martín L., León A., Olives A.I., del Castillo B., Martín M.A. Spectrofluorimetric determination of stoichiometry and association constants of the complex of

harmane and harmine with β -cyclodextrin and chemically modified β -cyclodextrins. *Talanta* **2003**, *60*, 493-503.

87. Zheng Y., Albert H.L. Chow A.H.L, Haworth I.S. Molecular Modeling of Flavonoid- β -Cyclodextrin Complexes. *Lett. Drug. Des. Discov.* **2008**, *5*, 512-520.
88. Kahle C., Deubner R., Schollmayer C., Scheiber J., Bauman K., Holzgrabe U. NMR Spectroscopic and Molecular Modelling Studies on cyclodextrin-Dipeptide Inclusion Complexes. *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, *2005*, 1578-1589.
89. Pan W., Zhang D., Zhan J. Theoretical investigation on the inclusion of TCDD with β -cyclodextrin by performing QM calculations and MD simulations. *J. Hazard. Mater.* **2011**, *192*, 1780–1786.
90. Melani F., Giannini I., Pasquini B., Orlandini S., Pinzauti S., Furlanetto S. Evaluation of the separation mechanism of electrokinetic chromatography with a microemulsion and cyclodextrins using NMR and molecular modeling. *Electrophoresis* **2011**, *32*, 3062–3069.
91. Filippa M., Sancho M.I., Gasull E. Encapsulation of methyl and ethyl salicylates by β -cyclodextrin HPLC, UV–VIS and molecular modeling studies. *J. Pharmaceut. Biomed.* **2008**, *48*, 969-973.
92. Liu.L., Guo Q.X. Use of quantum chemical methods to study cyclodextrin chemistry. *J. Incl. Phenom. Macro.* **2004**, *50*, 95–103.
93. Elbashir A.A., Suliman F.O. Computational modeling of capillary electrophoretic behavior of primary amines using dual system of 18-crown-6 and β -cyclodextrin. *J. Chromatogr. A* **2011**, *1218*, 5344-5351.
94. Deng Y., Huang M.J. Capillary electrophoretic separation and theoretical study of inclusion complexes of sulfobutyl ether β -cyclodextrin with estrogens. *Int. J. Quantum. Chem.* **2004**, *100*, 746–752.

95. Poole S.K., Patel S., Dehring K., Workman H., Poole C.F. Determination of acid dissociation constants by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1037*, 445–454.
96. Örnskov E., Linusson A., Folestad S. Determination of dissociation constants of labile drug compounds by capillary electrophoresis. *J. Pharmaceut. Biomed.* **2003**, *33*, 379-391.
97. Wan H., Holmén A.G., Wang Y., Lindberg W., Englund M., Någård M.B., Thompson R.A. High-throughput screening of pKa values of pharmaceuticals by pressure-assisted capillary electrophoresis and mass spectrometry. *Rapid. Commun. Mass. Sp.* **2003**, *17*, 2639–2648
98. Ishihama Y., Nakamura M., Miwa T., Kajima T., Asakawa N. A rapid method for pKa determination of drugs using pressure-assisted capillary electrophoresis with photodiode array detection in drug discovery. *J. Pharm. Sci.* **2001**, *91*, 933–942.
99. Caliaro G.A., Herbots C.A. Determination of pKa values of basic new drug substances by CE. *J. Pharmaceut. Biomed.* **2001**, *26*, 427–434.
100. Včeláková K., Zusková I., Kenndler E., Gaš B. Determination of cationic mobilities and pKa values of 22 amino acids by capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis* **2004**, *25*, 309–317.
101. Foulon C., Danel C., Vaccher C., Yous S., Bonte J.P., Goossens J.F. Determination of ionization constants of *N*-imidazole derivatives, aromatase inhibitors, using capillary electrophoresis and influence of substituents on pKa shifts. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1035*, 131–136.
102. Matoga M., Laborde-Kummer E., Langlois M.H., Dallet P., Bosc J.J., Jarry C., Dubost J.P. Determination of pKa values of 2-amino-2-oxazolines by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A* **2003**, *984*, 253–260.
103. Šolínová V., Kašička V., Koval D., Česnek M., Holý A. Determination of acid–base dissociation constants of amino- and guanidinopurine nucleotide analogs and

related compounds by capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis* **2006**, *27*, 1006-1019.

- 104.** Buckenmaier S.M.C., McCalley D.V., Euerby M.R. Determination of ionisation constants of organic bases in aqueous methanol solutions using capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1026*, 251–259.
- 105.** Vasco de Nogales V., Ruiz R., Rosés M., Ràfols C., Bosch E. Background electrolytes in 50% methanol/water for the determination of acidity constants of basic drugs by capillary zone electrophoresis. *J. Chromatogr. A* **2006**, *1123*, 113–120.
- 106.** Cantua M.D., Hillebrand S., Carrilho E. Determination of the dissociation constants (pKa) of secondary and tertiary amines in organic media by capillary electrophoresis and their role in the electrophoretic mobility order inversion. *J. Chromatogr. A* **2005**, *1068*, 99-105.
- 107.** Sirén H., Shimmo R., Sipola P., Abenet S., Riekkola M.L. Capillary electrophoresis of diuretics and probenecid in methanol. *J. Chromatogr. A* **2008**, *1198–1199*, 215–219.
- 108.** Fang X.M., Gong F.Y., Ye J.N., Fang Y.Z. Determination of ionization constants of saccharides by capillary zone electrophoresis with amperometric detection. *Chromatographia* **1997**, *46*, 137–140.
- 109.** Hagberg J., Duker A., Karlsson S. Determination of dissociation constants of low molecular weight organic acids by capillary zone electrophoresis and indirect UV detection. *Chromatographia* **2002**, *56*, 641–644.
- 110.** Wiczling P., Nasal A., Kubik Ł., Kaliszan R. A new pH/organic modifier gradient RP HPLC method for convenient determination of lipophilicity and acidity of drugs as applied to established imidazoline agents. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2012**, *47*, 1–5.

111. Douglas K.T., Sharma R.K., Walmsley J.F., Hider R.C. Ionization processes of some harmala alkaloids. *Mol. Pharmacol.* **1983**, *23*, 614-618.
112. Tama K.Y., Takács-Novák K. Multi-wavelength spectrophotometric determination of acid dissociation constants: a validation study. *Anal. Chim. Acta* **2001**, *434*, 157-167.
113. Domańska U., Pobudkowska A., Pelczarska A., Żukowski Ł. Modelling, solubility and pK_a of five sparingly soluble drugs. *Int. J. Pharmaceut.* **2011**, *403*, 115–122.
114. The Merck index, Version 12:3. Merck & Co Inc, Whitehouse Station, NJ, USA, **1999**.
115. Lombardo F., Shalaeva M.Y., Tupper K.A., Gao F. ElogD_{oct}: A tool for lipophilicity determination in drug discovery. 2. basic and neutral compounds. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 2490-2497.
116. Perisic-Janjic N., Kaliszan R., Wiczling P., Milosevic N., Uscumlic G., Banjac N. Reversed-phase TLC and HPLC retention data in correlation studies with in silico molecular descriptors and druglikeness properties of newly synthesized anticonvulsant succinimide derivatives. *Mol. Pharmaceut.* **2011**, *8*, 555-563.
117. Nasal A., Siluk D., Kaliszan R. Chromatographic retention parameters in medicinal chemistry and molecular pharmacology. *Curr. Med. Chem.* **2003**, *10*, 381-426.
118. Tchaplá A., Colin H., Guiochon G. Linearity of homologous series retention plots in reversed-phase liquid chromatography. *Anal. Chem.* **1984**, *56*, 621-625.
119. Unger S.H., Chiang G.H. Octanol-physiological buffer distribution coefficients of lipophilic amines by reversed-phase high-performance liquid chromatography and their correlation with biological activity. *J. Med. Chem.* **1981**, *24*, 262-270.

120. Lewis S.J., Mirrlees M.S., Taylor P.J. Rationalisations among heterocyclic partition coefficients part 1: The π -value of phenyl. *Quant. Struct.-Act. Relat.* **1983**, 2, 1-6.
121. Nawrocki J. Silica surface controversies, strong adsorption sites, their blockage and removal. Part I. *Chromatographia* **1991**, 31, 177-192.
122. Kaliszan R., van Straten M.A., Markuszewski M., Cramers C.A., Claessens H.A. Molecular mechanism of retention in reversed-phase high-performance liquid chromatography and classification of modern stationary phases by using quantitative structure-retention relationships. *J. Chromatogr. A* **1999**, 855, 455-486.
123. Giaginis C., Theocharis S., Tsantili-Kakoulidou A. Contribution to the standardization of the chromatographic conditions for the lipophilicity assessment of neutral and basic drugs. *Anal. Chim. Acta* **2006**, 573-574, 311-318.
124. Giaginis C., Theocharis S., Tsantili-Kakoulidou A. Octanol/water partitioning simulation by reversed-phase high performance liquid chromatography for structurally diverse acidic drugs: Effect of *n*-octanol as mobile phase additive. *J. Chromatogr. A* **2007**, 1166, 116-125.
125. Giaginis C., Tsantili-Kakoulidou A. Current state of the art in HPLC methodology for lipophilicity assessment of basic drugs. A Review. *J. Liq. Chromatogr. R. T.* **2008**, 31, 79-96.
126. Soczewiński E., Wachtmeister C.A. The relation between the composition of certain ternary two-phase solvent systems and R_M values. *J. Chromatogr.* **1962**, 7, 311-320.
127. Snyder L.R., Dolan J.W., Gant J.R. Gradient elution in high-performance liquid chromatography : I. Theoretical basis for reversed-phase systems. *J. Chromatogr.* **1979**, 165, 3-30.

128. Miyake K., Mizuno N., Terada H. Effect of hydrogen bonding on the high-performance liquid chromatographic behaviour of organic compounds: Relationship between capacity factors and partition coefficients. *J. Chromatogr.* **1988**, *439*, 227-235.
129. Sherblom P.M., Eganhouse R.P. Correlations between octanol-water partition coefficients and reversed-phase high-performance liquid chromatography capacity factors : Chlorobiphenyls and alkylbenzenes. *J. Chromatogr.* **1988**, *454*, 37-50.
130. Braumann T. Determination of hydrophobic parameters by reversed-phase liquid chromatography: theory, experimental techniques, and application in studies on quantitative structure-activity relationships *J. Chromatogr.* **1986**, *373*, 191-225.
131. Cohen N.C. Guidebook on Molecular modeling in drug design, Academic press, San Diego, California, **1966**, pp. 1-81.
132. CS Chem3D Ultra 7.0 (Property Picker ActiveX Control), Cambridge Soft Corporation, 100 Cambridge Park Dr. Cambridge, MA 02140-2317 USA 2001.
133. Lewars E.G. Computational chemistry: Introduction to the theory and applications of molecular and quantum mechanics. Kluwer Academic Publishers, Massachusetts, USA, **2003**, pp.85, 445-473.
134. Geerlings P., Proft F.D., Langenaeker W. Conceptual Density Functional Theory *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 1793-1873.
135. Bruban V., Feldman J., Greny H. et al. Respective contributions of α -adrenergic and non-adrenergic mechanisms in the hypotensive effect of imidazoline-like drugs, *Br. J. Pharmacol.* **2001**, *133*, 261–266.
136. Piletz J.E., Ivanov T.R., Sharp J.D., Ernsberger P., Chang C.H., Pickard R.T., Gold G., Roth B., Zhu H., Jones J.C., Baldwin J., Reis D.J. Imidazoline receptor antisera-selected (IRAS) cDNA: Cloning and characterization. *DNA Cell Biol.* **2000**, *19*, 319–329.

137. Dontenwill M., Piletz J.E., Chen M., Baldwin J., Pascal G., Ronde P., Dupuy L., Grenay H., Takeda K., Bousquet P. IRAS is an anti-apoptotic protein. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **2003**, *1009*, 400–412.
138. Alahari S.K., Lee J.W., Juliano R.L. Nischarin, a novel protein that interacts with the integrin alpha5 subunit and inhibits cell migration. *J. Cell Biol.* **2000**, *151*, 1141–1154.
139. Piletz J.E., Jones J.C., Zhu H., Bishara O., Ernsberger P. Imidazoline receptor antisera-selected cDNA clone and mRNA distribution. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1999**, *881*, 1–7.
140. Piletz J.E., Wang G., Zhu H. Cell signaling by imidazoline-1 receptor candidate, IRAS, and the nischarin homologue. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **2003**, *1009*, 392–399.
141. Zhang J., Abdel-Rahman A.A. Nischarin as a functional imidazoline (I1) receptor, *FEBS Letters* **2006**, *580*, 3070–3074.
142. Li F., Wu N., Su R.B., Zheng J.Q., Xu B., Lu X.Q., Cong B., Li J. Involvement of phosphatidylcholine-selective phospholipase C in activation of mitogen-activated protein kinase pathways in imidazoline receptor antisera-selected protein, *J. Cell. Biochem.* **2006**, *98*, 1615–1628.
143. Sun Z., Chang C.H., Ernsberger P. Identification of IRAS/Nischarin as an I1-imidazoline receptor in PC12 rat pheochromocytoma cells. *J. Neurochem.* **2007**, *101*, 99–108.
144. Nicolotti O., Carotti A., Carrieri A., Pigni M., Gentili F., Brasili L., Giannella M., Quaglia W., Piergentili A., Bousquet P., Dontenwill M. Pharmacophore development and 3D-QSAR study of I1 imidazoline binding site ligands. *Med. Chem. Res.* **2004**, *13*, 170–189.
145. Liu H., Yao X., Xue C., Zhang R., Liu M., Hu Z., Fan B. Study of quantitative structure–mobility relationship of the peptides based on the structural descriptors and support vector machines. *Anal. Chim. Acta* **2005**, *542*, 249–259.

146. Jalali-Heravi M., Shen Y., Hassanisadi M., Khaledi M.G. Prediction of electrophoretic mobilities of peptides in capillary zone electrophoresis by quantitative structure-mobility relationships using the offord model and artificial neural networks. *Electrophoresis* **2005**, *26*, 1874–1885.
147. Jalali-Heravi M., Shahbazikhah P. Quantitative structure–mobility relationship study of a diverse set of organic acids using classification and regression trees and adaptive neuro-fuzzy inference systems. *Electrophoresis* **2008**, *29*, 363–374.
148. Mittermayr S., Olajos M., Chovan T., Bonn G. K., Guttman A. Mobility modeling of peptides in capillary electrophoresis. *Trac-Trend Anal. Chem.* **2008**, *27*, 407-411.
149. Riahi S., Beheshti A., Ganjali M.R., Norouzi P. A novel QSPR study of normalized migration time for drugs in capillary electrophoresis by new descriptors: Quantum chemical investigation. *Electrophoresis* **2008**, *29*, 4027–4035.
150. Kaliszan R. QSRR: Quantitative Structure-(Chromatographic) Retention Relationships. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 3212–3246.
151. D'Archivio A.A., Maggi M.A, Mazzeo P., Ruggieri F. Quantitative structure–retention relationships of pesticides in reversed-phase high-performance liquid chromatography based on WHIM and GETAWAY molecular descriptors. *Anal. Chim. Acta* **2008**, *628*, 162-172.
152. Goodarzi M., Jensen R., Vander Heyden Y. QSRR modeling for diverse drugs using different feature selection methods coupled with linear and nonlinear regressions. *J. Chromatogr. B* **2012**, *910*, 84-94.
153. Hanna M., de Biasi V., Bond B., Salter C., Hutt A.J., Camilleri P. Estimation of the partitioning characteristics of drugs: a comparison of a large and diverse drug series utilizing chromatographic and electrophoretic methodology. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 2092-2099.

154. Tan L.C., Carr P.W., Abraham M.H. Study of retention in reversed-phase liquid chromatography using linear solvation energy relationships. I: the stationary phase. *J. Chromatogr. A* **1996**, 752, 1–18.
155. Espinosa S., Bosch E., Rosés M. Retention of ionizable compounds on high-performance liquid Chromatography XI. Global linear solvation energy relationships for neutral and ionizable compounds. *J. Chromatogr. A* **2002**, 945, 83-96.
156. Hui Y., Zhou L., Chen X.G., Analysis of ammonia and aliphatic amines in environmental water by micellar electrokinetic chromatography and QSPR modeling of electrophoretic migration time. *Talanta* **2010**, 80, 1619–1625.
157. Park H.J., Choi Y., Lee W., Kim K.R. Enantioseparation of aromatic amino acids and amino acid esters by capillary electrophoresis with crown ether and prediction of enantiomer migration orders by a three-dimensional quantitative structure-property relationship/comparative field analysis model. *Electrophoresis* **2009**, 30, 890–896.
158. Jalali-Heravi M., Garkani-Nejad Z. Prediction of electrophoretic mobilities of sulfonamides in capillary zone electrophoresis using artificial neural networks. *J. Chromatogr. A* **2001**, 927, 211-218.
159. Nasal A., Buciński A., Bober L., Kaliszan R. Prediction of pharmacological classification by means of chromatographic parameters processed by principal component analysis. *Int. J. Pharmaceut.* **1997**, 159, 43-55.
160. Puta R., Perrina C., Questiera F, Coomansa D., Massarta D.L., Vander Heyden Y. Classification and regression tree analysis for molecular descriptor selection and retention prediction in chromatographic quantitative structure–retention relationship studies. *J. Chromatogr. A* **2003**, 988, 261-276.
161. Eric S.M., Pavlovic M., Popovic G.V., Agbaba D.D. Study of retention parameters obtained in RP-TLC system and their application on QSAR/QSPR of

some alpha adrenergic and imidazoline receptor ligands. *J. Chromatogr. Sci.* **2007**, *45*, 140-145.

- 162.** Bodzioch K., Durand A., Kaliszan R., Bączek T., Vander Heyden Y. Advanced QSRR modeling of peptides behavior in RPLC. *Talanta* **2010**, *81*, 1711-1718.
- 163.** Kunal Roy K., Roy P.P. Comparative chemometric modeling of cytochrome 3A4 inhibitory activity of structurally diverse compounds using stepwise MLR, FA-MLR, PLS, GFA, G/PLS and ANN techniques. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 2913-2922.
- 164.** Aschi M., D'Archivio A.A., Maggi M.A., Mazzeo P., Ruggieri F. Quantitative structure-retention relationships of pesticides in reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Anal. Chim. Acta* **2007**, *582*, 235-242.
- 165.** Put R., Perrin C., Questier F., Coomans D., Massart D.L., Vander Heyden Y. Classification and regression tree analysis for molecular descriptor selection and retention prediction in chromatographic quantitative structure-retention relationship studies. *J. Chromatogr. A* **2003**, *988*, 261-276.
- 166.** Golbraikh A., Tropsha A. Beware of q^2 ! *J. Mol. Graph. Model.* **2002**, *20*, 269-276.
- 167.** Todeschini R., Consonni V. *Handbook of Molecular Descriptors*, Wiley-VCH, Weinheim, **2000**.
- 168.** Wold S., Sjöström M., Eriksson L. PLS-regression: a basic tool of chemometrics. *Chemometr. Intell. Lab.* **2001**, *58*, 109-130.
- 169.** Eriksson L., Johansson E., Kettaneh-Wold N., Trygg J., Wikstrom C., Wold S.(Eds.), *Multi- and Megavariate Data Analysis. Basic Principles and Applications I*, 2nd ed., Umetrics Academy, Umeå **2001**, pp. 39-103.

170. S. Agatonovic-Kustrin S., Beresford R. Basic concepts of artificial neural network (ANN) modeling and its application in pharmaceutical research. *J. Pharmaceut. Biomed.* **2000**, *22*, 717-727.
171. Braspenning P.J., Thuijsman F., Weijters A.J.M.M. (Eds), *Artificial Neural Networks: An Introduction to ANN Theory and Practice*, Springer-Verlag Berlin, **1995**, pp. 2.
172. Wold S., Johansson E., Cocchi M., in: Kubinyi H.(Ed.), *3D QSAR in Drug Design, Theory, Methods, and Applications*, ESCOM Science Publishers, Leiden, **1993**, pp. 523-550.
173. Tropsha A. Best practices for QSAR model development, validation, and exploitation. *Mol. Inf.* **2010**, *29*, 476 – 488.
174. ChemDrawUltra Cambridge Soft Corporation, 100 Cambridge Park Dr. Cambridge, MA 02140 USA **2002**.
175. MarvinChemAxon, Budapest, Hungary. www.chemaxon.com/products.html
176. Byre G., Mostad A., Rømming C. Crystal and molecular structure of clonidine hydrochlorid, 2-(2,6-dichlorophenylamino)-2-imidazoline hydrochloride. *Acta Chem. Scand.* **1976**, *B30*, 843-846.
177. Becke A.D. Density functional thermochemistry III. The role of exact exchange. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 5648-5652.
178. Lee C., Yang W., Parr R.G. Colle-Savetti correlation energy formula into a functional of the electron density. *Phys. Rev. B* **1988**, *37*, 785-789.
179. Remko M., Walsh O.A., Richards W.G. Molecular structure and gas-phase reactivity of clonidine and rilmenidine : Two-layered ONIOM calculations. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2001**, *3*, 901-907.

- 180.** Remko M., Van Duijnen P.Th., Swart M. Theoretical Study of Molecular Structure, Tautomerism, and Geometrical Isomerism of *N*-Methyl- and *N*-Phenyl-Substituted Cyclic Imidazolines, Oxazolines, and Thiazolines. *Struct. Chem.* **2003**, *14*, 271-278.
- 181.** Frisch M.J., Trucks G.W., Schlegel H.B., Scuseria G.E., Robb M.A., Cheeseman J.R., Zakrzewski V.G., Montgomery Jr J.A., Stratmann R.E., Burant J.C., Dapprich S., Millam J.M., Daniels A.D., Kudin K.N., Strain M.C., Farkas O., Tomasi J., Barone V., Cossi M., Cammi R., Mennucci B., Pomelli C., Adamo C., Clifford S., Ochterski J., Petersson G.A., Ayala P.Y., Cui Q., Morokuma K., Malick D.K., Rabuck A.D., Raghavachari K., Foresman J.B., Cioslowski J., Ortiz J.V., Baboul A.G., Stefanov B.B., Liu G., Liashenko A., Piskorz P., Komaromi I., Gomperts R., Martin R.L., Fox D.J., Keith T., Al-Laham M.A., Peng C.Y., Nanayakkara A., Gonzalez C., Challacombe M., Gill P.M.W., Johnson B.G., Chen W., Wong M.W., Andres J.L., Head-Gordon M., Replogle E.S., Pople J.A., Gaussian 98 (Revision A.7), Gaussian, Inc., Pittsburgh PA, **1998**.
- 182.** Cammi R., Tomasi J. Remarks on the use of the apparent surface charges (ASC) methods in solvation problems: Iterative versus matrix-inversion procedures and the renormalization of the apparent charges. *J. Comput. Chem.* **1995**, *16*, 1449-1458.
- 183.** ArgusLab 4.0, Mark A. Thompson, Planaria Software LLC, Seattle, <http://www.ArgusLab.com>.
- 184.** Rappi A.K., Casewit C.J. Colwell K.S., Goddard W.A., Skid W.M. UFF, a full periodic table force field for molecular mechanics and molecular dynamics simulations. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 10024-10035.
- 185.** Remko M., Swart M., Bickelhaupt F.M. Theoretical study of structure, pK_a , lipophilicity, solubility, absorption, and polar surface area of some centrally acting antihypertensives. *Bioorgan. Med. Chem.* **2006**, *14*, 1715-1728.

186. Jackman L.M., Jen T. ^1H and ^{13}C Nuclear magnetic resonance studies on the tautomerism, geometrical isomerism, and conformation of some cyclic amidines, guanidines, and related systems. *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 2811-2818.
187. Roy R.K, Krishnamurti S., Geerlings P., Pal S. Local Softness and Hardness Based Reactivity Descriptors for Predicting Intra- and Intermolecular Reactivity Sequences: Carbonyl Compounds. *J. Phys. Chem. A* **1998**, *102*, 3746-3755.
188. Parr R.G., Yang W. *Density-Functional Theory of Atoms and Molecules*, Oxford, University Press, New York **1989**.
189. Iczkowski R.P., Margrave J.L. Electronegativity. *J. Am. Chem. Soc.* **1961**, *83*, 3547-3551.
190. Parr R.G., Pearson R.G. Absolute hardness: Companion parameter to absolute electronegativity. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 7512-7516.
191. Ponti A. DFT-based regioselectivity criteria for cycloaddition reactions *J. Phys. Chem. A* **2000**, *104*, 8843-8846.
192. Molteni G., Ponti A. Arylazide cycloaddition to methyl propiolate: DFT-based quantitative prediction of regioselectivity. *Chem-Eur. J.* **2003**, *9*, 2770-2774.
193. Parr R.G., Szentpaly L.V., Liu S.J. Electrophilicity index. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 1922-1924.
194. Talete srl, DRAGON (Software for Molecular Descriptor Calculation) Version 6.0 - 2010 - <http://www.talete.mi.it/>
195. XNUMBERS, Ver.4.7, March 2006, Multi Precision Floating Point Computing and Numerical Methods for EXCEL/2000 XP.
196. STATISTICA Neural Networks 4.0, StatSoft, Inc., USA 1998.
197. SIMCA P+ program, Version 12.0, Umetrics AB, Umea, Sweden 2008.

- 198.** Nikolic K., Filipic S., Agbaba D. QSAR study of imidazoline antihypertensive drugs. *Bioorgan. Med. Chem.* **2008**, *16*, 7134-7140.
- 199.** Urosevic D., Schann S., Ehrhardt J.D., Bousquet P., Grenay H. LNP 906, the first high-affinity photoaffinity ligand selective for I₁ imidazoline receptors. *Br. J. Pharmacol.* **2004**, *142*, 609–617.
- 200.** Selassie C.D. History of Quantitative Structure-Activity Relationships in Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery, John Wiley & Sons, New York, **2003**, pp. 24.
- 201.** Nikolic K., Filipic S., Agbaba D. QSAR study of selective I₁-imidazoline receptor ligands. *SAR QSAR Environ. Res.* **2009**, *20*, 133-144.
- 202.** Joy S., Nair P.S., Hariharan R., Pillai M.R. Detailed comparison of the protein-ligand docking efficiencies of gold, a commercial package and ArgusLab, a licensable freeware. *In Silico Biology* **2006**, *6*, 601–605.
- 203.** Jones G., Willett P., Glen R.C., Leach A.R., Taylor R. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *J. Mol. Biol.* **1997**, *267*, 727–748.
- 204.** El-Ayoubi R., Menaouar A., Gutkowska J., Mukaddam-Daher S. Urinary responses to acute moxonidine are inhibited by natriuretic peptide receptor antagonist. *Br. J. Pharmacol.* **2005**, *145*, 50 – 56.
- 205.** Connolly M.L. Analytical molecular surface calculation. *J. Appl. Crystallogr.* **1983**, *16*, 548-5588.
- 206.** Filipic S., Nikolic K., Krizman M., Agbaba D. The Quantitative Structure – Retention Relationship (QSRR) analysis of some centrally acting antihypertensives and diuretics. *QSAR Comb. Sci.* **2008**, *27*, 1036-1044.
- 207.** Filipic S., Nikolic K., Vovk I., Krizman M., Agbaba D. The quantitative structure-mobility relationship analysis of imidazoline receptor ligands in cyclodextrins

mediated capillary electrophoresis. *Electrophoresis* **2012**, doi: 10.1002/elps.201200171

- 208.** Terekhova I.V., Scriba G.K.E. Study on complex formation of biologically active pyridine derivatives with cyclodextrins by capillary electrophoresis. *J. Pharmaceut. Biomed.* **2007**, *45*, 688-693.
- 209.** Gupta V.K., Khani H., Ahmadi-Roudi B., Mirakhorli S., Fereyduni E., Agarwal S. Prediction of capillary gas chromatographic retention times of fatty acid methyl esters in human blood using MLR, PLS and back-propagation artificial neural networks. *Talanta* **2011**, *83*, 1014–1022.
- 210.** Zhang Y.X. Artificial neural networks based on principal component analysis input selection for clinical pattern recognition analysis. *Talanta* **2007**, *73*, 68–75.
- 211.** Jalali-Heravi M., Garkani-Nejad Z. Prediction of electrophoretic mobilities of alkyl- and alkenylpyridines in capillary electrophoresis using artificial neural networks. *J. Chromatogr. A* **2002**, *971*, 207-215.
- 212.** González-Arjona D., López-Pérez G., Gustavo-González A. Non-linear QSAR modeling by using multilayer perceptron feedforward neural networks trained by back-propagation. *Talanta* **2002**, *56*, 79-90.
- 213.** Pauling, I., *The Nature of the Chemical Bond*, 3rd edn., Cornell University Press, Ithaca, NY, **1960**.
- 214.** Claessens H.A., Straten M.A. Review on the chemical and thermal stability of stationary phases for reversed-phase liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1060*, 23-41.
- 215.** Heiger D.N. High performance capillary electrophoresis: an introduction, Hewlett-packard GmbH, Waldbronn, Germany, **1992**, 15-22.
- 216.** Ivanciuc O. QSAR Comparative Study of Wiener Descriptors for Weighted Molecular Graphs. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2000**, *40*, 1412-1422.

- 217.** Burden F. Molecular Identification Number for Substructure Searches. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **1989**, *29*, 225-227.
- 218.** Estrada E. Spectral Moments of the Edge Adjacency Matrix in Molecular Graphs. 1. Definition and Applications to the Prediction of Physical Properties of Alkanes. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **1996**, *36*, 844-849.
- 219.** Estrada E. Spectral Moments of the Edge Adjacency Matrix in Molecular Graphs. 3. Molecules Containing Cycles. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **1998**, *38*, 23-27.
- 220.** Marković S., Gutman I. Spectral Moments of the Edge Adjacency Matrix in Molecular Graphs. Benzenoid Hydrocarbons. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **1999**, *39*, 289-293.
- 221.** Randić M. On Characterization of Cyclic Structures. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **1997**, *37*, 1063-1071.
- 222.** Randić M. Wiener-Hosoya Index A Novel Graph Theoretical Molecular Descriptor. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2004**, *44*, 373-377.
- 223.** Lučić B., Miličević A., Nikolić S., Trinajstić N. Harary Index – Twelve Years Later. *Croat. Chem. Acta* **2002**, *75*, 847-868.
- 224.** Consonni V., Todeschini T., Pavan M. Structure/Response Correlations and Similarity/Diversity Analysis by GETAWAY Descriptors. 1. Theory of the Novel 3D Molecular Descriptors. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2002**, *42*, 682-692.
- 225.** Consonni V., Todeschini T., Pavan M., Gramatica P. Structure/Response Correlations and Similarity/Diversity Analysis by GETAWAY Descriptors. 2. Application of the Novel 3D Molecular Descriptors to QSAR/QSPR Studies. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2002**, *42*, 693-705.
- 226.** Schuur J.H., Selzer P., Gasteiger J. The Coding of the Three-Dimensional Structure of Molecules by Molecular Transforms and Its Application to Structure-

Spectra Correlations and Studies of Biological Activity. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **1996**, *36*, 334-344.

- 227.** Gálvez J., Garcia R., Salabert M.T., Soler R. Charge Indexes. New Topological Descriptors. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **1994**, *34*, 520-525.
- 228.** Bhal S.K., Kassam K., Peirson I.G., Pearl G.M. The Rule of Five Revisited: Applying Log D in Place of Log P in Drug-Likeness Filters. *Mol. Pharmaceut.* **2007**, *4*, 556-560.
- 229.** SciFinder Scholar - CAS, pK_a calculated using Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) Software V11.02 (© 1994-2012 ACD/Labs), <https://scifinder.cas.org/>
- 230.** Balon K., Riebesehl B.U., Müller B.W. Drug liposome partitioning as a tool for the prediction of human passive intestinal absorption. *Pharm. Res.* **1999**, *16*, 882-888.

7. PRILOZI

PRILOG A: Tabele sa vrednostima molekulskih deskriptora koji su korišćeni za formiranje odabranih QSMR i QSRR modela

Tabela 28. Molekulski deskriptori primenjeni u odabranom PLS-QSMR(α -CD) modelu

Jedinjenje	RMT (12 mM α -CD)	X (ligand- α -CD) [B3LYP/3-21G(d)]	ΔG (ligand- α -CD) [PM3]
Agmatin	1,0000	0,282881	-43,8704
Amilorid	2,0588	0,237156	-2,8558
Klonidin	2,1047	0,215331	-7,4981
Moksonidin	2,3456	0,220076	-5,0270
Tizanidin	2,2246	0,240516	-11,7539
Harman	2,0082	0,232581	-8,3252
Harmin	2,1950	0,222438	-2,8370
Rilmenidin	2,9798	0,205131	-2,5734
Idazoksan	2,3000	0,224747	-8,9872
Gvanfacin	2,2688	0,226372	-8,5153
Klopamid	3,3127	0,13666	12,1065
Nafazolin	2,1573	0,205433	-0,3727
S-efaroksan	2,6082	0,227172	-1,1596
R-efaroksan	2,6664	0,208399	2,9593
Triamteren	2,4726	0,236272	4,9391

Tabela 29. Molekulski deskriptori primenjeni u odabranom PLS-QSMR(β -CD) modelu

Jedinjenje	RMT (15 mM β -CD)	χ (ligand- β -CD) HF/3-21G(d)	ShpA (ligand)
Agmatin	1,0000	0,285813	7,1111
Amilorid	2,1045	0,230043	13,0667
Klonidin	2,1617	0,221768	12,0714
Moksonidin	2,2909	0,230163	14,0625
Tizanidin	2,2195	0,254988	14,0625
Harman	2,3452	0,221573	12,0714
Harmin	2,5186	0,223253	14,0625
Rilmenidin	2,4538	0,217946	11,0769
Idazoksan	2,7501	0,205374	13,0667
Gvanfacin	2,8909	0,221470	13,0667
Klopamid	4,0827	0,129712	20,0455
Nafazolin	2,4587	0,196890	14,0625
S-efaroksan	2,9635	0,199693	14,0625
R-efaroksan	3,0221	0,195785	14,0625
Triamteren	2,9266	0,238849	17,0526

Tabela 30. Molekulski deskriptori primenjeni u odabranom postupnom MLR-QSMR(γ -CD) modelu

Jedinjenje	RMT (6 mM γ -CD)	χ (ligand) B3LYP/3-21G(d)	PMIX (ligand)
Agmatin	1,0000	0,3961395	83,650
Amilorid	2,0249	0,2681250	582,089
Klonidin	2,0673	0,2776625	669,651
Moksonidin	2,2924	0,2644975	765,270
Tizanidin	2,1287	0,2962320	987,017
Harman	1,9026	0,2891220	341,199
Harmin	2,0249	0,2775380	419,997
Rilmenidin	2,0981	0,2844040	440,090
Idazoksan	2,0053	0,2676600	285,679
Gvanfacin	2,3648	0,2813395	819,184
Klopamid	3,5049	0,1216335	1100,240
Nafazolin	2,1260	0,2578515	512,245
Efaroksan	2,2587	0,2595955	526,440
Triamteren	2,5707	0,2777555	538,534

Tabela 31. Molekulski deskriptori primenjeni u odabranom PLS-mQSMR (α -CD, β -CD, γ -CD) modelu

Jedinjenje	RMT (12 mM α -CD)	RMT (15 mM β -CD)	RMT (6 mM γ -CD)	ω -ligand [HF/STO- 3G(d)]	SEV (ligand)
Agmatin	1,0000	1,0000	1,0000	0,197521	122,235
Amilorid	2,0588	2,1045	2,0249	0,073299	142,468
Klonidin	2,1047	2,1617	2,0673	0,078135	165,590
Moksonidin	2,3456	2,2909	2,2924	0,075549	180,346
Tizanidin	2,2246	2,2195	2,1287	0,092709	176,728
Harman	2,0082	2,3452	1,9026	0,112134	159,059
Harmin	2,1950	2,5186	2,0249	0,103845	182,526
Rilmenidin	2,9798	2,4538	2,0981	0,090704	173,126
Idazoksan	2,3000	2,7501	2,0053	0,076307	165,281
Gvanfacin	2,2688	2,8909	2,3648	0,079984	171,380
Klopamid	3,3127	4,0827	3,5049	0,002431	274,703
Nafazolin	2,1573	2,4587	2,1260	0,063016	183,421
S-efaroksan	2,6082	2,9635	2,2587	0,067442	193,786
R-efaroksan	2,6664	3,0221	2,2587	0,067706	192,694
Triamteren	2,4726	2,9266	2,5707	0,095223	180,721

Tabela 32. Molekulski deskriptori primenjeni u odabranom PLS-QSRR modelu pri pH 4,4

Jedinjenje	VE2_ Dz(p)	SpMax5_ Bh(e)	SpMax5_ Bh(i)	SM02_ EA (ri)	SM04_ EA (ri)	logK _{w4,4}
Amilorid	0,227	2,744	2,858	3,681	5,207	1,118
Brimonidin	0,223	2,907	2,951	3,880	5,373	0,988
Karvedilol	0,168	3,462	3,514	4,416	5,919	3,755
Klonidin	0,249	2,659	2,809	3,626	5,068	0,816
Klopamid	0,202	3,310	3,367	4,148	5,741	2,001
Klozapin	0,182	3,111	3,206	4,244	5,776	2,938
Doksazosin	0,159	3,458	3,502	4,552	6,079	3,416
Efaroksan	0,227	2,884	2,941	3,898	5,574	1,312
Efedrin	0,256	2,854	2,925	3,422	4,918	0,560
Gvanfacin	0,232	2,821	2,868	3,666	5,165	1,732
Harman	0,235	2,899	2,974	3,809	5,401	1,719
Harmin	0,204	3,085	3,176	3,920	5,527	2,149
Idazoksan	0,241	2,789	2,876	3,752	5,200	0,821
Indapamid	0,196	3,270	3,309	4,299	5,919	2,685
Maprotilin	0,184	3,322	3,406	4,257	6,034	2,902
Mianserin	0,187	3,168	3,233	4,140	5,688	2,478
Moksonidin	0,230	2,900	2,994	3,694	5,116	0,572
Nafazolin	0,229	2,870	2,947	3,860	5,364	1,522
Olanzapin	0,191	3,134	3,228	4,145	5,625	1,640
Oksimetazolin	0,200	3,091	3,165	4,086	5,834	2,326
Fenilefrin	0,256	2,707	2,806	3,422	4,894	0,086
Pseudoefedrin	0,256	2,854	2,925	3,422	4,918	0,598
Rilmenidin	0,259	2,655	2,778	3,679	5,272	0,924
Tamsulosin	0,178	3,461	3,533	4,255	5,761	2,220
Tetrahidroz.	0,231	2,800	2,892	3,809	5,345	1,065
Tizanidin	0,233	2,670	2,809	3,862	5,391	0,745
Triamteren	0,206	2,902	3,023	4,026	5,559	1,749
Tramazolin	0,232	2,994	3,094	3,819	5,276	1,547
Ksilometazolin	0,207	3,079	3,162	4,016	5,735	2,610

Tabela 33. Molekulski deskriptori primenjeni u odabranom PLS-QSRR modelu pri pH 7,4

Jedinjenje	Ho_Dt	SM3_Dt	VE2_Dt	H_D/Dt	LogD _{7,4}	logK _{w7,4}
Amilorid	23,436	12,880	0,242	180,505	-0,440	1,051
Brimonidin	34,696	14,901	0,228	406,188	-0,010	1,078
Karvedilol	58,541	17,873	0,168	1050,430	1,940	4,151
Klonidin	24,484	13,189	0,247	196,719	1,070	0,979
Klopamid	36,117	15,163	0,192	420,060	1,500	1,987
Klozapin	53,520	16,951	0,191	1003,680	3,110	3,850
Doksazosin	66,291	18,035	0,157	1276,760	1,630	3,673
Efaroksan	31,798	14,261	0,241	339,381	1,810	1,333
Efedrin	19,244	11,821	0,275	116,533	-0,800	0,570
Gvanfacin	23,447	13,019	0,244	178,329	1,500	1,918
Harman	33,834	14,751	0,188	438,283	2,090	2,760
Harmin	36,589	15,211	0,185	513,704	1,830	2,883
Idazoksan	31,939	14,391	0,244	342,498	0,900	0,854
Indapamid	43,456	16,077	0,190	610,063	1,880	2,552
Maprotilin	49,212	16,530	0,181	863,821	1,440	2,578
Mianserin	57,771	17,022	0,153	1133,270	3,680	3,912
Moksonidin	27,235	13,715	0,230	243,188	0,290	0,627
Nafazolin	33,312	14,678	0,238	369,540	0,270	1,521
Olanzapin	49,863	16,636	0,197	882,170	2,860	3,228
Oksimetazolin	31,198	14,279	0,209	314,900	1,520	2,327
Fenilefrin	19,323	11,937	0,274	120,986	-1,370	0,038
Pseudoefedrin	19,244	11,821	0,275	116,533	-0,800	0,609
Rilmenidin	21,121	12,253	0,257	128,200	1,630	0,904
Tamsulosin	44,252	16,503	0,172	585,461	0,230	2,752
Tetrahidrozolin	31,942	14,418	0,244	351,329	0,200	1,082
Tizanidin	31,882	14,475	0,236	343,719	0,700	1,123
Triamteren	38,333	15,355	0,213	511,109	1,370	1,918
Tramazolin	33,312	14,678	0,238	369,540	1,230	1,513
Ksilometazolin	29,824	14,073	0,216	282,476	1,790	2,594

Tabela 34. Molekulski deskriptori primenjeni u odabranom postupnom MLR-QSRR modelu pri pH 9,1

Jedinjenje	nBM	SpMin6_Bh(p)	logD _{9,1}	logK _{w9,1}
Amilorid	8	0,859	-0,500	0,984
Brimonidin	12	0,912	0,350	1,263
Karvedilol	21	1,512	3,140	4,214
Klonidin	7	0,609	1,510	1,471
Klopamid	9	1,361	1,220	1,869
Klozapin	13	1,263	3,380	3,950
Doksazosin	18	1,525	2,030	3,605
Efaroksan	7	1,061	2,130	1,848
Efedrin	6	0,874	0,750	1,010
Gvanfacin	8	0,844	1,570	2,002
Harman	15	0,873	2,100	2,780
Harmin	15	0,970	1,850	2,950
Idazoksan	7	0,879	1,050	1,535
Indapamid	15	1,219	1,470	2,353
Maprotilin	12	1,237	3,000	3,089
Mianserin	12	1,340	3,980	3,921
Moksonidin	7	0,712	0,860	0,748
Nafazolin	12	0,971	1,520	1,757
Olanzapin	12	1,376	3,080	3,285
Oksimetazolin	7	1,242	2,740	2,600
Fenilefrin	6	0,837	-0,050	0,389
Pseudoefedrin	6	0,874	0,750	1,102
Rilmenidin	1	1,123	1,800	1,485
Tamsulosin	14	1,589	1,610	3,065
Tetrahidrozolin	7	0,963	1,470	1,317
Tizanidin	11	0,747	1,280	1,342
Triamteren	17	1,062	1,370	1,932
Tramazolin	7	1,013	1,250	1,736
Ksilometazolin	7	1,239	3,000	2,786

Tabela 35. Molekulski deskriptori primenjeni u odabranom PLS-QSMR modelu pri pH 4,4

Jedinjenje	Ho_Dz(e)	ATS6s	ATS7s	ATSC6m	$\mu_{\text{eff}4,4}$
Amilorid	15,452	5,096	4,849	11,518	25,939
Brimonidin	16,588	4,721	4,559	20,778	23,357
Karvedilol	31,490	5,828	5,746	31,894	18,061
Klonidin	14,367	4,586	4,316	11,589	25,952
Klopamid	23,453	6,055	5,358	27,723	0,000
Klozapin	23,225	5,527	5,496	24,117	22,697
Doksazosin	33,293	6,031	5,970	37,297	15,795
Efaroksan	16,979	4,995	4,554	17,491	24,099
Efedrin	13,287	4,504	3,970	9,804	25,942
Gvanfacin	15,995	4,759	4,885	11,992	24,242
Harman	12,859	4,267	3,714	7,381	28,192
Harmin	15,234	4,627	4,362	10,368	26,410
Idazoksan	14,926	4,549	4,180	10,684	26,969
Indapamid	24,654	6,051	5,432	22,255	0,000
Maprotilin	21,867	5,526	5,282	29,870	20,559
Mianserin	20,017	5,451	5,144	26,449	22,471
Moksonidin	16,576	5,043	4,752	18,018	22,669
Nafazolin	16,141	4,803	4,588	12,496	25,941
Olanzapin	22,532	5,423	5,347	28,823	33,632
Oksimetazolin	21,650	5,603	5,341	27,125	20,276
Fenilefrin	13,024	4,622	4,159	9,555	25,780
Pseudoefedrin	13,287	4,504	3,970	9,804	26,633
Rilmenidin	14,957	4,716	4,174	14,173	25,350
Tamsulosin	30,556	5,993	5,754	42,323	17,310
Tetrahidrozolin	15,662	4,835	4,304	15,558	25,680
Tizanidin	15,618	4,701	4,480	8,561	24,770
Triamteren	18,302	5,279	5,041	13,191	22,146
Tramazolin	16,744	4,866	4,677	14,859	24,393
Ksilometazolin	20,619	5,386	5,177	23,582	21,032

Tabela 36. Molekulski deskriptori primenjeni u odabranom postupnom MLR-QSMR modelu pri pH 7,4

Jedinjenje	GGI6	R7u+	Mor28s	HATS2i	$\mu_{\text{eff}7,4}$
Amilorid	0,203	0,024	0,250	0,216	21,786
Brimonidin	0,237	0,044	-0,404	0,493	13,247
Karvedilol	0,350	0,014	-2,082	0,316	13,057
Klonidin	0,180	0,035	-0,645	0,500	19,607
Klopamid	0,285	0,015	0,001	0,418	0,000
Klozapin	0,538	0,021	-1,088	0,382	9,204
Doksazosin	0,808	0,019	-0,941	0,332	3,137
Efaroksan	0,115	0,025	0,591	0,504	22,704
Efedrin	0,100	0,027	0,672	0,469	23,199
Gvanfacin	0,345	0,029	-0,597	0,425	5,083
Harman	0,080	0,051	-0,334	1,018	11,752
Harmin	0,258	0,029	-0,356	0,872	13,636
Idazoksan	0,081	0,030	0,556	0,573	23,293
Indapamid	0,356	0,019	0,035	0,351	0,000
Maprotilin	0,320	0,018	2,157	0,384	18,696
Mianserin	0,385	0,021	-1,364	0,385	12,234
Moksonidin	0,261	0,039	-1,077	0,595	10,907
Nafazolin	0,096	0,023	0,035	0,465	24,180
Olanzapin	0,498	0,018	-1,522	0,420	10,679
Oksimetazolin	0,354	0,017	0,912	0,396	19,061
Fenilefrin	0,101	0,032	-1,168	0,444	21,650
Pseudoefedrin	0,100	0,024	-0,695	0,476	23,691
Rilmenidin	0,000	0,020	0,418	0,601	22,551
Tamsulosin	0,568	0,015	0,574	0,343	14,444
Tetrahidrozolin	0,093	0,025	-0,188	0,486	24,299
Tizanidin	0,180	0,039	0,312	0,697	12,077
Triamteren	0,342	0,049	1,215	0,413	1,140
Tramazolin	0,096	0,021	-0,311	0,483	22,988
Ksilometazolin	0,302	0,017	0,468	0,419	19,943

Tabela 37. Molekulski deskriptori primenjeni u odabranom postupnom MLR-QSMR modelu pri pH 9,1

Jedinjenje	SM1_Dz (Z)	SM15_EA (dm)	HOMO [B3LYP/3-21G(d,p)]	ISH	$\mu_{\text{eff},1}$
Amilorid	1,064	8,807	-0,206	0,898	6,416
Brimonidin	0,933	3,118	-0,347	0,971	0,000
Karvedilol	0,827	0,000	-0,202	0,845	1,693
Klonidin	1,002	3,118	-0,381	0,925	2,575
Klopamid	1,239	0,000	-0,052	0,939	-9,640
Klozapin	0,797	2,817	-0,197	0,885	0,000
Doksazosin	1,087	5,589	-0,181	0,862	0,000
Efaroksan	0,429	10,324	-0,204	0,875	16,361
Efedrin	0,331	0,000	-0,381	0,796	18,047
Gvanfacin	1,089	4,730	-0,213	0,932	0,000
Harman	0,251	0,000	-0,211	0,925	0,000
Harmin	0,429	0,000	-0,208	0,938	1,305
Idazoksan	0,580	9,644	-0,208	0,885	6,627
Indapamid	1,239	0,113	-0,052	0,909	-10,382
Maprotilin	0,134	9,151	-0,309	0,927	19,402
Mianserin	0,251	4,933	-0,181	0,899	0,000
Moksonidin	0,960	6,946	-0,194	0,938	0,000
Nafazolin	0,251	7,650	-0,334	0,875	24,644
Olanzapin	0,787	5,749	-0,188	0,939	1,241
Oksimetazolin	0,429	6,194	-0,330	0,901	19,556
Fenilefrin	0,496	0,000	-0,332	0,907	8,661
Pseudoefedrin	0,331	0,000	-0,380	0,954	9,299
Rilmenidin	0,429	5,595	-0,200	0,958	14,065
Tamsulosin	1,151	0,000	-0,324	0,890	2,472
Tetrahidrozolin	0,251	9,039	-0,360	0,829	25,047
Tizanidin	1,094	6,946	-0,071	0,906	0,000
Triamteren	0,693	0,000	-0,195	0,892	0,000
Tramazolin	0,357	3,118	-0,359	0,820	23,713
Ksilometazolin	0,251	6,194	-0,347	0,883	20,627

Tabela 38. Parametri lipofilnosti koji su pokazali najviši stepen korelacije sa odgovarajućim $\log K_{w4,4}$, $\log K_{w7,4}$ i $\log K_{w9,1}$ vrednostima

Jedinjenje	LogD _{4,4} KLOP	LogD _{7,4} Weighted	logD _{9,1} PHYS	ALOGP
Amilorid	-2,07	-0,50	-0,32	-0,779
Brimonidin	-2,03	-1,00	0,63	-0,055
Karvedilol	-0,38	2,06	3,30	4,015
Klonidin	-0,76	0,25	1,79	1,061
Klopamid	1,44	1,57	1,41	2,810
Klozapin	0,56	3,12	3,19	3,947
Doksazosin	-0,41	1,91	2,21	2,592
Efaroksan	-0,75	1,76	2,04	2,193
Efedrin	-2,61	-0,81	0,63	0,004
Gvanfacin	0,67	1,34	1,41	1,999
Harman	0,15	1,99	2,25	2,455
Harmin	-0,13	1,82	2,16	2,439
Idazoksan	-2,00	0,62	0,72	1,191
Indapamid	2,64	2,63	2,36	3,262
Maprotilin	0,34	1,27	2,77	2,886
Mianserin	1,29	3,71	3,69	3,706
Moksonidin	-0,74	-0,31	0,20	0,988
Nafazolin	-1,40	-0,48	0,99	0,573
Olanzapin	0,76	3,16	3,34	3,215
Oksimetazolin	-0,21	0,75	2,29	1,770
Fenilefrin	-3,38	-1,40	-0,14	-0,641
Pseudoefedrin	-2,61	-0,81	0,63	0,004
Rilmenidin	-1,34	1,40	1,67	1,960
Tamsulosin	-1,36	0,42	1,92	1,612
Tetrahidrozolin	-1,29	-0,41	1,13	0,697
Tizanidin	-1,28	0,30	1,67	2,207
Triamteren	0,88	1,11	1,08	1,017
Tramazolin	-0,57	0,01	0,74	1,245
Ksilometazolin	0,15	1,03	2,54	2,037

PRILOG B: Spisak publikovanih radova i saopštenja

Publikovani radovi:

1. **Filipic S.**, Nikolic K., Krizman M., Agbaba D. The Quantitative Structure–Retention Relationship (QSRR) analysis of some centrally acting antihypertensives and diuretics. *QSAR and Combinatorial Science* **2008**, *27*, 1036-1044.
2. Nikolic K., **Filipic S.**, Agbaba D. QSAR study of imidazoline antihypertensive drugs. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **2008**, *16*, 7134-7140.
3. Nikolic K., **Filipic S.**, Agbaba D. QSAR study of selective I₁-imidazoline receptor ligands. *SAR and QSAR in Environmental Research* **2009**, *20*, 133-144.
4. **Filipic S.**, Nikolic K., Vovk I., Krizman M., Agbaba D. The quantitative structure-mobility relationship analysis of imidazoline receptor ligands in cyclodextrins mediated capillary electrophoresis. *Electrophoresis* **2012**, doi: 10.1002/elps.201200171.

Saopštenja na međunarodnim naučnim skupovima štampana u izvodu

1. **S. Filipić**, M. Križman, M. Prošek, D. Agbaba, Separation of α_2 -agonists and some diuretics using EKC ,13th *International Symposium on Separation Sciences*, Štrbske Pleso, High Tatras, Slovak Republic, June 27-29, 2007.
2. **S. Filipic**, K. Nikolic, M. Krizman, D. Agbaba, Theoretical Study of Inclusion Complexes between β -cyclodextrin and guanidine/imidazoline analogs. XXth *International Symposium in Medicinal Chemistry*, Vienna, Austria, August 31–September 4, 2008.
3. K. Nikolic, **S. Filipic**, D. Agbaba, The QSAR study of selective I₁-Imidazoline Receptor Ligands, *17th European Symposium on QSAR in “omics” and Systems Biology*, Uppsala, Sweden, September 21-26, 2008.
4. **S. Filipic**, K. Nikolic, D. Agbaba, QSAR Study of Imidazoline Antihypertensive Drugs. *Vienna Summer School on Drug Design*, Vienna, Austria, september 13-18, 2009.
5. **S. Filipić**, K. Nikolić, I. Vovk, M. Križman, D. Agbaba, Razdvajanje i migraciono ponašanje antihipertenziva sa centralnim dejstvom i diuretika metodom kapilarne elektroforeze uz primenu ciklodekstrina. *V Kongres farmaceuta Srbije sa*

međunarodnim učešćem, Beograd, Srbija, 13-17 oktobar, 2010. *Arh. farm.* 2010; 60: 912-913.

6. **S. Filipic**, K. Nikolic, I. Vovk, M. Krizman, D. Agbaba, The Quantitative structure retention relationship (QSRR) analysis of some centrally acting antihypertensives and diuretics in cyclodextrin-mediated capillary electrophoresis. *Fifth congress of pharmacy of Macedonia with international participation*, Ohrid, Macedonia, september, 21-26, 2011.
7. **S. Filipic**, K. Nikolic, I. Vovk, M. Krizman, D. Agbaba, Partial least squares analysis (PLS) of electrophoretic behaviour of some centrally acting antihypertensives and diuretics. *Second congress of pharmacists of Bosnia and Herzegovina with international participation*, Banja Luka, Bosnia and Herzegovina, november 17-20, 2011.

8. Biografija

Slavica Filipić je rođena 31.01.1980. godine u Loznici. Osnovnu školu i Gimnaziju završila je u Krupnju kao nosilac Vukove diplome, a Farmaceutski fakultet u Beogradu upisala je školske 1999/2000. godine i diplomirala 2005. godine sa prosečnom ocenom 9,45. Po završetku fakulteta, obavila je pripravnički staž i položila stručni ispit za farmaceute. Od novembra 2005. godine zaposlena je kao saradnik na Katedri za farmaceutsku hemiju, a 2007. godine izabrana je u zvanje asistenta za užu naučnu oblast Farmaceutska-medicinska hemija i strukturna analiza.

U toku naučno-istraživačkog rada bila je saradnik na dva projekta iz oblasti hemije koje finansira Ministarstvo za nauku i zaštitu životne sredine Republike Srbije, kao i na bilateralnom projektu između Farmaceutskog fakulteta u Beogradu i Hemijskog instituta u Ljubljani. Doktorsku disertaciju pod nazivom **„Kvantitativni odnosi strukture, aktivnosti i retencionih osobina liganada imidazolinskih i alfa₂ adrenergičkih receptora“** uradila je pod rukovodstvom prof. dr Danice Agbaba i dr Katarine Nikolić. Autor je i koautor 10 radova štampanih u časopisima od međunarodnog značaja od kojih 4 rada čine deo doktorske teze, i 11 saopštenja sa naučnih skupova od kojih su 7 rezultati iz doktorske disertacije.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Славица Филипић

број индекса 9/06

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Квантитативни односи структуре, активности и ретенционих особина

лиганада имидазолинских и алфа₂ адренергичких рецептора“

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанта

У Београду, 24.12.2012.

Славица Филипић

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: Славица Филипић

Број индекса: 9/06

Студијски програм: фармацеутска хемија

Наслов рада: „Квантитативни односи структуре, активности и ретенционих особина лигананда имидазолинских и алфа₂ адренергичких рецептора“

Ментор: др сц. Даница Агбаба, редовни професор и др сц. Катарина Николић,
виши научни сарадник

Потписани/а Славица Филипић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанта

У Београду, 24.12.2012.

Славица Филипић

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

„Квантитативни односи структуре, активности и ретенционих особина

лиганада имидазолинских и алфа₂ адренергичких рецептора“

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанта

У Београду, 24.12.2012.

Славиза Филић