

UNIVERZITET U BEOGRADU
FARMACEUTSKI FAKULTET

Milica M. Radan

**ODREĐIVANJE STRUKTURE
FARMAKOFORE, DIZAJN I *IN VITRO*
ISPITIVANJE LIGANADA SA VIŠESTRUKIM
DEJSTVOM KAO POTENCIJALNO
EFIKASNIJIH TERAPEUTIKA SLOŽENIH
NEUROLOŠKIH I MENTALNIH OBOLJENJA**

doktorska disertacija

Beograd, 2022.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF PHARMACY

Milica M. Radan

**PHARMACOPHORE ANALYSIS, DESIGN AND
IN VITRO TESTING OF MULTI-TARGET
LIGANDS AS POTENTIALLY EFFECTIVE
THERAPEUTICS OF COMPLEX
NEUROLOGICAL AND MENTAL DISORDERS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2022.

Mentor doktorske disertacije:

Prof. dr Katarina Nikolić, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet

Članovi komisije:

Dr sc. Teodora Đikić-Stojšić, naučni saradnik
Laboratoire d'Innovation Thérapeutique,
UMR7200 CNRS-Université de Strasbourg, Strasbourg, France

Dr sc. Katarina Vučićević, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet

Dr sc. Milan Senćanski, viši naučni saradnik
Univerzitet u Beogradu - Institut za nuklearne nauke „Vinča“
Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

Dr sc. Milkica Crevar, docent
Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet

Datum odbrane: _____

Mojej porodici

ODREĐIVANJE STRUKTURE FARMAKOFORE, DIZAJN I *IN VITRO* ISPITIVANJE LIGANADA SA VIŠESTRUKIM DEJSTVOM KAO POTENCIJALNO EFIKASNIJIH TERAPEUTIKA SLOŽENIH NEUROLOŠKIH I MENTALNIH OBOLJENJA

SAŽETAK

Disfunkcija serotoninske i dopaminske neurotransmisije u mozgu je u osnovi patofiziologije brojnih neuroloških i mentalnih oboljenja. Definisane protokola koji integriše *in silico* i *in vitro* metode, u cilju proučavanja farmakofore multi-potentnih jedinjenja koja deluju na nivou centralnog nervnog sistema (CNS), predstavlja važan korak u racionalizaciji procesa otkrivanja novih lekova. Primenom simulacija molekulske dinamike i molekuskog dokinga, kao i analize kvantitativnog odnosa strukture i aktivnosti (eng. *3D-Quantitative Structure Activity Relationship*, 3D-QSAR) definisane su ključne strukturne karakteristike dualnih antagonista 5-HT_{2A} i D₂ receptora, sa smanjenim afinitetom za H₁ receptor. Na osnovu dobijenih rezultata izvršeno je pretraživanje baza fragmenata primenom metode virtuelnog skrininga (eng. *Virtual Screening*, VS) u cilju dizajniranja potencijalno bezbednijih i efikasnijih liganada sa višestrukim delovanjem (eng. *multi-target*), pružajući smernice za razvoj novih lekova u terapiji složenih CNS oboljenja. 3D-QSAR analizom bicikličnih α -iminofosfonata definisana je struktura farmakofore selektivnih liganada imidazolinskih I₂ receptora, kao potencijalno novih lekova za lečenje kognitivnih poremećaja. *In vitro* paralelni test permeabilnosti na veštačkim membranama (eng. *Parallel Artificial Membrane Permeability Assay*, PAMPA) je korišćen za određivanje efektivne permeabilnosti ($\log P_e$) kroz krvno-moždanu barijeru (KMB) jedinjenja koja utiču na modulaciju aktivnosti serotoninskog i dopaminskog sistema u mozgu. Dobijeni rezultati su korišćeni u analizi kvantitativnog odnosa strukture i osobina (eng. *Quantitative Structure-Property Relationship*, QSPR) u cilju razumevanja strukturnih karakteristika koje najviše utiču na prolazak jedinjenja kroz KMB. Model formiran primenom metode podržavajućih vektora (eng. *Support-Vector Machine*, SVM) i validiran opsežnom statističkom analizom, je korišćen za predviđanje $\log P_e$ vrednosti dizajniranih dualnih antagonista i liganada I₂ receptora, svrstavajući ih u grupu visoko permeabilnih jedinjenja. Sa ciljem da se dodatno analizira i vizuelizuje proces permeabilnosti centralnodelujućih jedinjenja kroz KMB na molekulskom nivou, korišćene su simulacije usmerene molekulske dinamike (eng. *Steered Molecular Dynamics*, SMD).

Ključne reči: simulacije molekulske dinamike, molekulski doking, 3D-QSAR, virtuelni skrining, 5-HT_{2A}-R, D₂-R, H₁-R, I₂-IR, PAMPA, SMD

Naučna oblast: Farmacija

Uža naučna oblast: Farmaceutsko-medicinska hemija i strukturna analiza

PHARMACOPHORE ANALYSIS, DESIGN AND *IN VITRO* TESTING OF MULTI-TARGET LIGANDS AS POTENTIALLY EFFECTIVE THERAPEUTICS OF COMPLEX NEUROLOGICAL AND MENTAL DISORDERS

ABSTRACT

Disturbances in serotonergic and dopaminergic neurotransmissions in the central nervous system (CNS) play a key role in the pathophysiology of various neurological and mental disorders. Developing an integrative approach through application of *in silico* and *in vitro* methods, in order to analyse pharmacophore of multi-target neuroactive compounds, presents a promising strategy in rationalization of drug design process. Molecular dynamics simulations and molecular docking methods in combination with 3D-quantitative structure activity relationship analysis (3D-QSAR) were used to evaluate crucial structural features of potent dual antagonists of 5-HT_{2A} i D₂ receptors, with lower antagonistic activity on H₁ receptors. The virtual screening of the available fragment libraries was performed with the aim to design novel multi-target compounds with a more effective and safer profile, laying a good foundation for the therapy of complex brain diseases. Moreover, 3D-QSAR analysis of bicyclic α -iminophosphonates was used to reveal the pharmacophore structure of selective imidazoline I₂ receptor (I₂-IR) ligands, as potentially new drugs for the treatment of cognitive disorders. *In vitro* parallel artificial membrane permeability assay (PAMPA) was further employed to examine the effective permeability ($\log P_e$) through blood brain barrier (BBB) of compounds that affect serotonin and dopamine levels in the CNS. Based on the obtained results, quantitative structure-property relationship (QSPR) analysis was performed with the aim to define structural features that mostly affect the permeability of compounds through BBB. Support-vector machine (SVM) method was used to create predictable and reliable QSPR model that was further employed to predict $\log P_e$ values of new designed dual antagonists of 5-HT_{2A}/D₂ receptors and I₂-IR ligands, classifying them into a group of highly permeable compounds. Steered molecular dynamics (SMD) simulations have been carried out to additionally explain and visualize the entire BBB permeation pathway at the molecular level.

Key words: molecular dynamics simulations, molecular docking, 3D-QSAR, virtual screening, 5-HT_{2A}-R, D₂-R, H₁-R, I₂-IR, PAMPA, SMD

Scientific field: Pharmacy

Scientific subfield: Pharmaceutical-medicinal chemistry and structural analysis

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1 Neurološka i mentalna oboljenja	2
1.1.1 Šizofrenija	2
1.1.2 Depresija.....	5
1.1.3 Anksioznost	7
1.1.4 Alchajmerova bolest.....	8
1.1.5 Parkinsonova bolest.....	9
1.1.6 Opšti i specifični simptomi neuroloških i mentalnih oboljenja i poremećaja.....	11
1.2 Receptorski sistemi važni u regulaciji neuroloških i mentalnih oboljenja	13
1.2.1 G-protein spregnuti receptori	13
1.2.2 Serotoninski receptori.....	14
1.2.3 Serotoninski 5-HT _{2A} receptor	15
1.2.4 Serotoninski transporter.....	17
1.2.5 Dopaminski receptori	18
1.2.6 Dopaminski D ₂ receptor.....	19
1.2.7 Dopaminski transporter	21
1.2.8 Histaminski receptori.....	22
1.2.9 Histaminski H ₁ receptor.....	22
1.2.10 Imidazolinski receptori.....	23
1.2.11 Opšte osobine jedinjenja za lečenje neuroloških i mentalnih oboljenja	26
1.3 Kompjuterske metode u dizajniranju lekova	28
1.3.1 Metode zasnovane na strukturi liganda	29
1.3.1.1 Formiranje 3D-QSAR modela.....	29
1.3.1.2 Formiranje QSPR modela.....	32
1.3.1.2.1 Multilinearna regresija.....	33
1.3.1.2.2 Metoda parcijalnih najmanjih kvadrata	33
1.3.1.2.3 Metoda podržavajućih vektora	34
1.3.1.2.4 Veštačke neuronske mreže	34
1.3.1.3 Validacija QSAR/QSPR modela	34
1.3.1.3.1 Interna validacija	34
1.3.1.3.2 Eksterna validacija.....	35
1.3.1.3.3 Domen primenljivosti	37
1.3.2 Metode zasnovane na strukturi ciljnog mesta dejstva	37
1.3.2.1 Molekulska dinamika	38

1.3.2.2	Molekulski doking.....	39
1.3.2.3	Virtuelni skrining.....	40
1.4	Ispitivanje permeabilnosti jedinjenja kroz KMB.....	42
1.4.1	Fizičko-hemijske i farmakokinetičke osobine jedinjenja koja deluju na CNS.....	43
1.4.2	Metode za ispitivanje permeabilnosti kroz KMB.....	45
1.4.2.1	Paralelni test permeabilnosti na veštačkim membranama.....	46
1.4.2.2	<i>In silico</i> metode u proučavanju permeabilnosti jedinjenja kroz KMB.....	47
2.	CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	48
3.	EKSPERIMENTALNI DEO.....	51
3.1	Opšti podaci.....	52
3.1.1	Standardi i rastvarači.....	52
3.1.2	Oprema.....	52
3.1.3	Kompjuterski programi.....	52
3.2	<i>In silico</i> protokol za racionalni dizajn novih dualnih antagonista 5-HT _{2A} i D ₂ receptora, sa smanjenim afinitetom za H ₁ receptor.....	53
3.2.1	Formiranje seta jedinjenja za ispitivanje.....	53
3.2.2	Simulacije molekulske dinamike.....	57
3.2.3	Molekulski doking.....	58
3.2.4	Formiranje i validacija 3D-QSAR modela.....	59
3.2.5	Primena metoda zasnovanih na strukturi fragmenta u dizajniranju novih liganada.....	60
3.2.6	<i>In silico</i> predviđanje ADMET osobina.....	61
3.3	Proučavanje farmakofore selektivnih liganada imidazolinskih I ₂ receptora.....	61
3.3.1	Selektovanje seta jedinjenja za ispitivanje.....	61
3.3.2	Formiranje i validacija 3D-QSAR modela.....	63
3.4	Ispitivanje permeabilnosti kroz KMB jedinjenja koja utiču na modulaciju aktivnosti serotoninske i dopaminske neurotransmisije u CNS-u primenom <i>in vitro</i> i <i>in silico</i> metoda.....	63
3.4.1	Procena permeabilnosti primenom <i>in vitro</i> paralelnog testa permeabilnosti na veštačkim membranama (PAMPA).....	65
3.4.1.1	PAMPA test.....	65
3.4.1.2	Analiza rezultata primenom HPLC metode.....	65
3.4.2	Formiranje prediktivnih QSPR modela.....	66
3.4.2.1	Optimizacija jedinjenja.....	66
3.4.2.2	Računanje molekulskih deskriptora.....	66
3.4.2.3	Formiranje i validacija QSPR modela.....	66
3.4.3	Primena SMD simulacija u proučavanju permeabilnosti jedinjenja kroz KMB.....	67
4.	REZULTATI I DISKUSIJA.....	69

4.1	Proučavanje složene 3D strukture farmakofore i racionalni dizajn novih dualnih antagonista 5-HT _{2A} /D ₂ -R sa smanjenim afinitetom za H ₁ receptor	70
4.1.1	Molekulska dinamika	70
4.1.4	Analiza strukture farmakofore ispitivanih antagonista 5-HT _{2A} -R	77
4.1.5	Interakcije u vezujućem mestu 5-HT _{2A} -R	80
4.1.7	Interakcije u vezujućem mestu D ₂ -R	87
4.1.8	Uporedna analiza rezultata 3D-QSAR studije i molekuskog dokinga za 5-HT _{2A} , D ₂ i H ₁ receptore 89	
4.1.9	Domen primenljivosti formiranih 3D-QSAR modela	93
4.1.10	Racionalni dizajn dualnih antagonista 5-HT _{2A} /D ₂ receptora, sa smanjenim afinitetom za H ₁ -R	94
4.1.11	<i>In silico</i> predviđanje ADMET osobina dizajniranih dualnih antagonista.....	100
4.2	Definisanje farmakofore i predlaganje strukturnih modifikacija za dizajn novih selektivnih liganada imidazolinskih I ₂ receptora.....	101
4.2.1	3D-QSAR studija derivata α -iminofosfonata sa poznatim aktivnostima na I ₂ -IR i α_2 -AR	102
4.2.2	<i>In silico</i> predviđanje fizičko-hemijskih i farmakokinetičkih osobina selektivnih liganada I ₂ -IR .	106
4.3	Primena <i>in vitro</i> PAMPA testa i <i>in silico</i> kompjuterskih metoda u proučavanju permeabilnosti kroz KMB novih CNS aktivnih jedinjenja	107
4.3.1	Rezultati PAMPA testa.....	108
4.3.2	QSPR modelovanje	110
4.3.3	Interpretacija najznačajnijih molekulskih deskriptora.....	114
4.3.4	SMD simulacije	115
4.3.5	<i>In silico</i> predviđanje permeabilnosti kroz KMB proučavanih dualnih antagonista 5-HT _{2A} /D ₂ -R i selektivnih I ₂ -IR liganada	118
5.	ZAKLJUČAK	122
6.	LITERATURA.....	126
7.	PRILOZI.....	160

1. UVOD

Neurološki i mentalni poremećaji predstavljaju vodeći uzrok invaliditeta i narušavanja kvaliteta života ljudi u svetu. Prema podacima Svetske zdravstvene organizacije (eng. *World Health Organization* - WHO), procenjuje se da na globalnom nivou posledice ovih bolesti utiču na živote više od milijardu ljudi, dok više od 165 miliona ljudi (38,2%) u Evropskoj uniji pati od najmanje jedne bolesti iz neuropsihijatrijskog spektra (1–4). Pandemija bolesti izazvane korona virusom 2019 (COVID-19) značajno je uticala na mentalno zdravlje ljudi širom sveta (5). Iako ukupan uticaj na mentalno stanje još uvek nije poznat, moguće je zaključiti da ovi poremećaji predstavljaju sve veće opterećenje zdravstvenog sistema sa izraženim posledicama po društvo (6).

Poremećaji mentalnog zdravlja i neurološki poremećaji pripadaju grupi hroničnih nezaraznih bolesti, koje utiču na emocije, misli, ponašanje i odnose. Oni obuhvataju širok spektar bolesti i stanja, kao što su šizofrenija, depresija, poremećaji anksioznosti, Alchajmerova i Parkinsonova bolest.

1.1 Neurološka i mentalna oboljenja

1.1.1 Šizofrenija

Šizofrenija je hronično mentalno oboljenje za koje se procenjuje da obuhvata oko 1% globalne populacije i koja u značajnoj meri remeti radnu i socijalnu funkcionalnost obolele osobe (7). Karakteriše se pojavom različitih simptoma koji se svrstavaju u tri grupe: pozitivni, negativni i kognitivni simptomi. Pozitivni simptomi se odnose na pojavu halucinacija, deluzija, uznemirenosti i poremećaja mišljenja. Suprotno tome, negativni simptomi su obeleženi socijalnim povlačenjem, nezainteresovanošću (apatija), oskudnim govorom (alogija) i introvertnošću, dok je kognitivna disfunkcija praćena poremećajem pažnje, radnog pamćenja i apstraktnog razmišljanja (8).

Etiologija i patologija šizofrenije još uvek nisu u potpunosti objašnjene, ali ipak postoji nekoliko neurohemijskih teorija koje pružaju bolje razumevanje ovog oboljenja. U osnovi, dolazi do poremećaja ravnoteže različitih neurotransmiterskih sistema u mozgu: dopamina, serotonina, glutamata, gama-aminobuterne kiseline (eng. *Gamma-Aminobutyric Acid*, GABA), noradrenalina, acetilholina, kao i histamina.

Dopaminski sistem

Razvoj dopaminske teorije je uticao na postavljanje osnova za istraživanje i lečenje mentalnih poremećaja (9). Dopaminski sistem u mozgu se sastoji od nigrostrijatnog, mezokortikalnog, mezolimbickog i tuberoinfundibularnog puta. Prema ovoj teoriji kod šizofrenije dolazi do disbalansa u dopaminskoj aktivnosti između mezokortikalnog i mezolimbickog puta. Hiperaktivnost dopaminskih neurona u mezolimbickim strukturama utiče na pojavu pozitivnih simptoma šizofrenije, dok negativni i kognitivni simptomi nastaju usled hipofunkcije u mezokortikalnom delu. Blokada dopaminskih receptora u nigrostrijatnoj regiji je odgovorna za pojavu motornih neželjenih efekata, poznatih kao ekstrapiramidalni neželjeni simptomi (eng. *Extrapyramidal Symptoms*, EPS). Dopamin u tuberoinfundibularnom putu deluje kao faktor inhibicije prolaktina, dok blokiranje njegovih receptora dovodi do hiperprolaktinemije praćene amenorejom, galaktorejom, i ginekomastijom.

Dopaminski receptori predstavljaju ciljno mesto dejstva tipičnih i atipičnih antipsihotika, koji se danas u najvećoj meri koriste u lečenju mentalnih oboljenja. Moguće je razlikovati pet tipova dopaminskih receptora koji se dele u dve klase: D₁ klasa (D₁ i D₅ receptori) i D₂ klasa (D₂, D₃ i D₄ receptori). Dopaminski D₁ i D₂ receptori su široko distribuirani u svim dopaminergičkim putevima. Specifičnu lokalizaciju u limbickom sistemu, odgovornom za kognitivne i emocionalne funkcije, imaju D₃ i D₄ receptori, dok su D₅ receptori prisutni u talamusu, hipotalamusu i hipokampusu. Tipični antipsihotici predstavljaju prvu generaciju antipsihotika, koji antagonizuju

dopaminske D₂ receptore (D₂-R) u mezolimbickoj regiji. Ova grupa lekova efikasno kontroliše pojavu pozitivnih simptoma šizofrenije. Ipak, nedostatak selektivnosti i blokada dopaminskih receptora u drugim regijama je rezultirala pojavom EPS, uključujući tardivnu diskineziju, akatiziju, distoniju i parkinsonizam, kao i pogoršanjem negativnih simptoma (10–12). Iz tog razloga, razvijena je nova grupa bezbednijih i efikasnijih lekova – atipični antipsihotici, poznati kao antagonisti serotoninskih 5-HT_{2A} i dopaminskih D₂ receptora. Takođe, pokazano je da produžena blokada D₂-R utiče na disregulaciju D₁ receptora (D₁-R) u prefrontalnom korteksu i posledično pogoršanje radne memorije. Prema tome, ligandi koji deluju kao agonisti D₁-R mogu imati važnu ulogu u lečenju kognitivnih poremećaja (13). Studije su pokazale da je mogući mehanizam delovanja klopazina, jednog od najpoznatijih antipsihotika, povezan sa aktivacijom D₁-R usled povećanja kortikalnog nivoa dopamina (14). Iako manje eksprimirani u centralnom nervnom sistemu (eng. *Central Nervous System*, CNS) u odnosu na D₁ i D₂ receptore, dopaminski D₃ receptori (D₃-R) se uglavnom nalaze u limbickim strukturama koje su povezane sa kognitivnim i emocionalnim funkcijama. Antagonizam na nivou D₃-R utiče na povećano oslobađanje acetilholina u prefrontalnom korteksu, kao i na neutralizaciju efekata blokiranja glutamatnih N-metil-D-aspartat (eng. *N-methyl-D-aspartate*, NMDA) receptora, što doprinosi poboljšanju kognitivnih funkcija (15,16).

Serotoninski sistem

Uloga serotonina u patogenezi šizofrenije, kao složenog psihijatrijskog oboljenja, takođe je veoma značajna. Otkrićem psihomimetičkog delovanja dietilamid lizergne kiseline (eng. *Lysergic acid diethylamide*, LSD) razvijena je prva serotoninska hipoteza o nastanku šizofrenije, koja je ukazala na deficit serotonina u mozgu pacijenata obolelih od ove bolesti (17,18). Kasnija proučavanja odnosa dopaminske i serotoninske neurotransmisije u mezokortikalnim i mezolimbickim strukturama mozga i otkriće antipsihotičnih efekata klopazina su potisnula prethodne teorije i uslovile formiranje novih (19). Naime, serotoninergički neuroni se projektuju iz središnjeg dela moždanog stabla do kortikalnih, strijatnih i limbickih regija (20). Pokazano je da stimulacija serotoninskih vlakana u dorzalnim jezgrima rafe (lat. *dorsal raphe nucleus*) dovodi do povećanog oslobađanja serotonina u zoni *substantia nigra* gde vrši inhibitornu modulaciju dopaminergičkih neurona (19). Pored toga, uočeno je da serotoninski agonisti vrše inhibiciju dopaminske funkcije u strijatumu i korteksu, smanjujući oslobađanje dopamina ili njegovu sintezu u terminalnim završecima. Navedeni efekti su uglavnom posredovani serotoninskim 5-HT_{2A} receptorima (5-HT_{2A}-R), čiji antagonisti posledično izazivaju povećanje nivoa dopamina u deficitarnim moždanim regijama, nigrostrijatnim i mezokortikalnim (10).

Serotonin u CNS-u deluje kroz nekoliko tipova i podtipova receptora: 5-HT₁ (5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{1E}, 5-HT_{1F}), 5-HT₂ (5-HT_{2A}, 5-HT_{2B}, 5-HT_{2C}), 5-HT₃, 5-HT₄, 5-HT₅, 5-HT₆ i 5-HT₇, koji su široko distribuirani u različitim moždanim strukturama (21). Serotoninski 5-HT_{2A} receptori su predominantno lokalizovani u prefrontalnom korteksu, gde imaju važnu ulogu u regulaciji pamćenja, raspoloženja, kognitivnog i emocionalnog ponašanja (22). Proučavanje odnosa dopaminske i serotoninske neurotransmisije u mezokortikalnim i mezolimbickim strukturama mozga je uticalo na razvoj druge generacije antipsihotika – atipični antipsihotici. Farmakološko delovanje ovih jedinjenja, u odnosu na prvu generaciju, karakteriše antagonizam dopaminskih D₂ i serotoninskih 5-HT_{2A} receptora, što je značajno uticalo na povećanje njihove efikasnosti u terapiji kognitivnih i negativnih simptoma psihoza kao i na smanjenje pojave EPS (23). Pored toga, atipičnost druge generacije antipsihotika je zasnovana na modulaciji serotoninskih 5-HT_{1A} receptora (5-HT_{1A}-R). Ovi receptori su uglavnom lokalizovani u korteksu na glutamatnim piramidalnim ćelijama i GABA-ergičkim neuronima, amigdali, hipokampusu i ventralno tegmentalnoj regiji (*Ventral Tegmental Area*, VTA) (24). Potpuni ili parcijalni agonizam na 5-HT_{1A}-R indirektno utiče na kortikalno oslobađanje dopamina, koje je posredovano dezinhibicijom glutamatnih neurona. Ovaj mehanizam se takođe smatra odgovornim za povećano oslobađanja acetilholina u

hipokampusu i prefrontalnom korteksu, što potencijalno utiče na poboljšanje kognitivnih funkcija (25). Pojedini antipsihotici poput klozapina, ziprazidona, kvetiapina i aripiprazola poseduju parcijalni agonistički efekat na 5-HT_{1A}-R. Ulogu u modulaciji dopaminske i acetilholinske aktivnosti poseduju i serotoninski 5-HT_{2C} receptori (5-HT_{2C}-R). Dominantno su lokalizovani u korteksu, hipokampusu, amigdali i *nucleus accumbens*-u (N_{acc}), gde imaju ulogu u kontroli spavanja, apetita, motornih funkcija i raspoloženja. Atipični antipsihotici poput klozapina deluju kao inverzni agonisti 5-HT_{2C}-R, utičući na povećano oslobađanje dopamina u strijatumu, korteksu i *nucleus accumbens*-u (26).

Glutamatni sistem

Glutamat predstavlja glavni ekscitatorni neurotransmitter u CNS-u. Poremećaj glutamatne neurotransmisije u kortikalnim i limbičkim strukturama, kao i talamusu povezan je sa razvojem negativnih i kognitivnih simptoma mentalnih poremećaja (27). Otkriće psihotomimetičkog delovanja antagonista glutamatnih NMDA receptora je ukazalo na njegovu potencijalnu ulogu u istraživanju patofiziologije šizofrenije (28). Takođe, u *postmortem* studijama obolelih osoba, uočen je poremećaj u gustini glutamatnih receptora, kao i koncentraciji glutamata u prefrontalnom korteksu, talamusu i temporalnom režnju (27). Antipsihotici koji deluju kao antagonisti dopaminskih D₂-R utiču na transmisiju glutamata interakcijom sa NMDA receptorima. Naime, dolazi do povećanog oslobađanja glutamata u strijatumu, regiji koja je odgovorna za kognitivne i motivacione sposobnosti (29). Pored toga, proučavanjem atipičnih antipsihotika dokazan je uticaj serotoninskih 5-HT_{1A} i 5-HT_{2A} receptora na glutamatnu transmisiju. Bihejvioralne i elektrofiziološke studije su pokazale da jedinjenja poput klozapina, olanzapina i risperidona deluju kao parcijalni agonisti na glicin-vezujućem mestu NMDA receptora (25).

Gama-aminobuterna kiselina

Neurotransmitter sa glavnim inhibitornim delovanjem u CNS-u je gama-aminobuterna kiselina (GABA), koja svoje dejstvo ostvaruje putem GABA_A i GABA_B receptora (30). GABA-ergički interneuroni imaju važnu ulogu u regulaciji aktivnosti i sinhronizaciji ostalih neurotransmiterskih sistema, ključnih u procesima učenja, percepcije i kognicije. *Postmortem* studijama je pokazano da promene u kortikalnim GABA-ergičkim neuronima mogu imati važnu ulogu u patofiziologiji šizofrenije (31). Takođe, GABA interneuroni utiču na modulaciju mezolimbickog i mezokortikalnog dopaminskog sistema. Ispitivanja su pokazala da primena agonista GABA receptora može imati potencijalni značaj u regulaciji pozitivnih i negativnih simptoma šizofrenije (32).

Ostali sistemi

Pored navedena četiri sistema koja imaju važnu ulogu u patogenezi i razumevanju šizofrenije, veliki uticaj takođe poseduju holinergički, histaminski, adrenergički i imidazolinski sistemi.

Projekcije holinergičkih neurona se mogu podeliti u dve grupe, jedna grupa je usmerena ka srednjem mozgu i kičmenoj moždini, dok druge projekcije idu ka kortikalnoj regiji i hipokampusu (33). Efekti acetilholina kao glavnog neurotransmitera ovog sistema su posredovani muskarinskim M₁-M₅ receptorima. Oni učestvuju u regulaciji različitih funkcija kao što su: učenje, pamćenje, uzbuđenje, spavanje i budnost. Istraživanja su pokazala da aktivacija M₁ receptora ima pozitivan efekat na neurotransmisiju glutamata, što utiče na poboljšanje kognitivnih poremećaja (25). Ipak, antipsihotici koji deluju antagonistički na nivou muskarinskih receptora dovode do pojave neželjenih efekata kao što su suvoća usta, konstipacija, zamagljen vid i smanjenje pamćenja (10).

Histaminski neuroni učestvuju u inervaciji različitih moždanih regija uključujući: strijatum, korteks, amigdalu i hipokampus. Neselektivno delovanje atipičnih antipsihotika poput klopazina, olanzapina i kvetiapina na nivou histaminskih H_1 receptora (H_1 -R) je uglavnom povezano sa pojavom različitih metaboličkih neželjenih efekata (23,34–37). Takođe, antagonizam na ovom receptoru je odgovoran za nastanak sedativnog dejstva, koji može biti od značaja kod akutnih psihoza. Histaminski H_3 receptori (H_3 -R) pripadaju grupi presinaptičkih autoreceptora koji utiču na inhibiciju oslobađanja histamina, ali i drugih neurotransmitera, dopamina, glutamata, noradrenalina i acetilholina. Pojedine studije su ukazale na potencijalni značaj antagonista H_3 -R na poboljšanje kognitivnih simptoma usled modulacije drugih neurotransmiterskih sistema (25).

Glavne projekcije noradrenalina polaze iz *locus coeruleus*-a i idu do hipokampusa, talamusa, neokorteksa i *substantia nigra-e* (38). Svoje delovanje ispoljava preko noradrenergičkih α i β receptora, koji se nalaze na dopaminergičkim, serotoninergičkim, glutamatergičkim, kao i GABA-ergičkim neuronima (39). Atipični antipsihotici u najvećoj meri deluju kao antagonisti α_1 i α_2 receptora. Smatra se da antagonizam na α_1 receptoru utiče na kontrolu pozitivnih simptoma šizofrenije, usled uticaja na dopaminsku neurotransmisiju u mezolimbičkim i mezokortikalnim strukturama. Ipak, direktni antagonizam ovih receptora je povezan sa povećanjem telesne mase kao neželjenim efektom. S druge strane, istraživanja su pokazala da antagonizam klopazina na α_2 receptoru ima značaj u postizanju njegovog antidepressivnog delovanja usled modulacije dopaminskih neurona u VTA (25).

Agmatin je neurotransmiter imidazolinskog sistema koji čine I_1 , I_2 i I_3 imidazolinski receptori. Široko je distribuiran u CNS-u gde se vezuje za imidazolinske i α_2 adrenergičke receptore, blokira serotoninске 5-HT₃, nikotinske holinergičke i glutamatne NMDA receptore, kao i sintezu azotnog oksida (eng. *Nitric Oxide*, NO) (40). Poremećaji neuromodulatornih aktivnosti usled promene u koncentraciji centralnog agmatina su povezani sa pojavom različitih mentalnih oboljenja (41). Eksperimentalne studije su pokazale da agmatin ublažava kognitivne i bihejvioralne poremećaje, ukazujući na njegovu potencijalnu ulogu u patogenezi šizofrenije (40).

1.1.2 Depresija

Depresija je jedan od najčešćih mentalnih poremećaja koju karakterišu promene raspoloženja, gubitak interesovanja i energije. Procenjuje se da oko 280 miliona ljudi globalno (3,8%) boluje od nekog oblika depresije, kao i da je jedan od glavnih uzroka suicidalnih pokušaja i ishoda (42).

Pored emocionalnih simptoma kao što su apatija, pesimizam, nedostatak samopouzdanja i neodlučnost, depresiju karakteriše i pojava bioloških simptoma poput gubitka apetita, poremećaja spavanja i smanjenog seksualnog nagona (43). Moguće je razlikovati dva tipa depresivnih poremećaja: unipolarna depresija i bipolarni poremećaj, koju karakteriše pojava oscilirajućih depresivnih i maničnih epizoda. Jedna od osnovnih teorija koja objašnjava patofiziološku osnovu depresije je monoaminska hipoteza. Ovom hipotezom se definiše da je depresija uzrokovana deficitom monoaminskih neurotransmitera, serotoninina, noradrenalina i dopamina u CNS-u (44).

Serotoninski sistem

Nedostatak serotoninina u mozgu utiče na pojavu specifičnih simptoma poput depresivnog raspoloženja, straha, razdražljivosti, usamljenosti i samooptuživanja (45). Antidepressivi koji se koriste u terapiji utiču na povećanje koncentracije serotoninina u dorzalnim jezgroma rafe. Brojne studije su pokazale da važnu ulogu u patogenezi depresije imaju serotoninski 5-HT_{1A} i 5-HT_{2A} receptori (46,47). Serotoninski 5-HT_{1A}-R su široko distribuirani u kortiko-limbičkoj regiji koja je ključna za regulaciju emocija i raspoloženja. Kod depresivnih stanja karakteristično se razvija povišen nivo presinaptičkih 5-HT_{1A} autoreceptora koji smanjuju neuronsku aktivnost serotoninina,

kao i smanjen nivo postsinaptičkih 5-HT_{1A} receptora koji utiču na smanjenje odgovora na serotonin (48). Potencijalnu efikasnost u terapiji velike depresije pored agonista 5-HT_{1A}-R su pokazali i antagonisti serotonininskih 5-HT_{2A}-R u monoterapiji ili kombinovanoj terapiji sa inhibitorima serotoniniskog transportera (eng. *Serotonin Transporter*, SERT) (49,50). Smatra se da je njihovo terapijsko delovanje posredovano GABA-ergičkim interneuronima koji utiču na smanjenje aktivnosti piramidalnih ćelija u prefrontalnom korteksu.

Noradrenalinski sistem

Neuronske projekcije noradrenalina kreću iz *locus coeruleus*-a i inervišu limbički sistem, koji ima važnu ulogu u regulaciji emocija. *Postmortem* studijama osoba obolelih od depresije su uočene promene u gustini α_2 adrenoreceptora (α_2 -AR) i smanjeno vezivanje noradrenergičkog transportera u *locus coeruleus*-u (51). Adrenergički α_2 autoreceptori se nalaze presinaptički na serotoninergičkim i noradrenergičkim nervnim završecima, gde vrše supresiju oslobađanja neurotransmitera nakon stimulacije. Pored toga, uočeno je da serotoniniski sistem ispoljava negativan uticaj na noradrenergički sistem mehanizmima posredovanim 5-HT_{2A} i 5-HT_{2C} receptorima, kao i da 5-HT_{2A}-R može uticati na povećano oslobađanje noradrenalina pod dejstvom selektivnih inhibitora preuzimanja serotonina (eng. *Selective Serotonin Reuptake Inhibitors*, SSRI) (45). Smanjenje koncentracije noradrenalina u CNS-u utiče na pojavu simptoma koji su praćeni smanjenjem samopouzdanja, nedostatkom interesovanja, energije i zadovoljstva, pa iz tog razloga primena inhibitora preuzimanja serotonina i noradrenalina (eng. *Serotonin and Norepinephrine Reuptake Inhibitors*, SNRI) ima značajnu efikasnost u lečenju depresije.

Dopaminski sistem

Važnu ulogu u regulaciji emocionalnog stanja takođe ima i neurotransmiter dopamin. Poremećaj aktivnosti dopaminskog mezolimbickog sistema je povezan sa pojavom karakterističnih simptoma depresije (52). Promene na nivou dopaminske neurotransmisije u VTA regiji su uslovljene delovanjem serotoninergičkih neurona koji polaze iz srednjeg dela mozga. Naime, uočeno je da aktivacija 5-HT_{1A}-R utiče na povećano oslobađanje dopamina u prefrontalnom korteksu i N_{acc}, dok aktivacija 5-HT_{2A} i 5-HT_{2C} receptora vrši inhibiciju delovanja dopamina u mezokortikalnoj i mezolimbickoj regiji (45,53).

Ostali sistemi

Modulacija aktivnosti inhibitornih i ekscitatornih neurotransmitera u CNS-u, GABA-e i glutamata, je takođe značajna u kontroli depresivnih poremećaja. Farmakološki mehanizam delovanja se zasniva na pretpostavci da blokada NMDA receptora dovodi do povećanog oslobađanja glutamata usled smanjene inhibicije GABA-ergičkih neurona, dok posledično glutamat aktivira jonotropni AMPA (eng. *α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid*) receptor koji posreduje u ispoljavanju antidepresivnih efekata (54,55). Ketamin je antagonist NMDA glutamatnih receptora koji ispoljava terapijsku efikasnost u lečenju depresije. Brojne studije su pokazale da je sličan mehanizam brzog antidepresivnog delovanja uočen i kod agmatina, endogenog liganda imidazolinskih receptora (56–58). Potencijalni antidepresivni efekat je takođe potvrđen i eksperimentalnim ispitivanjem selektivnog liganda imidazolinskog I₂-R, BU224, koji utiče na povećanje nivoa serotonina u prefrontalnom korteksu i hipotalamusu (59).

U terapiji depresije najčešću primenu imaju lekovi koji pripadaju grupi SSRI i SNRI, koji čine prvu terapijsku liniju, kao i triciklični antidepresivi (eng. *Tricyclic Antidepressants*, TCA) i inhibitori monoamino oksidaze (eng. *Monoamine Oxidase Inhibitors*, MAOI) koji čine drugu liniju (60). TCA čine grupu jedinjenja koja inhibira ponovno preuzimanja amina, u najvećoj meri serotonina i noradrenalina, u presinaptičkim završecima (imipramin, dezipramin, amitriptilin, nortriptilin, klomipramin). Povećanje koncentracije ovih neurotransmitera u sinapsama utiče na

ispoljavanje njihovog antidepresivnog efekta. Ipak, neselektivno delovanje TCA na postsinaptičke α -adrenergičke, muskarinske i histaminske receptore utiče na pojavu brojnih neželjenih efekata (61).

Monoaminoooksidaza (eng. *Monoamine Oxidase*, MAO) je enzim koji ima glavnu ulogu u oksidativnoj deaminaciji biogenih amina. Razlikuju se dve izoforme MAO enzima: MAO-A koji se nalazi u jetri, crevima i placenti, i MAO-B prisutan u trombocitima, jetri i mozgu. Noradrenalin i serotonin su supstrati MAO-A izoforme, dok triptamin, metilhistamin i feniletilamini predstavljaju supstrate MAO-B. Većina antidepresiva svoj efekat ispoljava delujući na MAO-A izoformu, kao što je moklobemid, dok selektivni MAO-B inhibitori imaju važnu ulogu u terapiji neurodegenerativnih bolesti (62,63). Endogeni ligand imidazolinskih receptora, harman, deluje kao potentni selektivni inhibitor MAO-A enzima, i utiče na modulaciju monoaminske neurotransmisije. Studijama je pokazano da sistemska primena selektivnih liganada I_2 -IR dovodi do povećanja koncentracije noradrenalina, serotonina i dopamina u određenim moždanim strukturama (59). Takođe, studije su pokazale da koadministracija antagonista $5-HT_{2A}$ receptora sa SSRI i inhibitorima MAO ima sinergistički efekat u lečenju velike depresije (50,64,65).

1.1.3 Anksioznost

Prema studiji globalnog opterećenja bolestima, anksiozni i depresivni poremećaji su dva najčešća mentalna poremećaja koja su među vodećim uzrocima invalidnosti u svetu (66). Procenjuje se da je prevalenca anksioznih poremećaja na svetskom nivou u 2020. godini oko 374 miliona ljudi, na šta je veliki uticaj imala i pandemija COVID-19 (67).

Anksioznost je mentalno stanje povezano sa strahom koje dovodi do različitih fizioloških, bihejvioralnih, kognitivnih i afektivnih manifestacija. Karakteriše se pojavom preterane zabrinutosti, hiperbudnosti, konfuzije, nervoze i uzbuđenosti, ali i ubrzanim radom srca, ubrzanim disanjem ili tremorom (68,69). Postoje različite vrste anksioznih poremećaja (generalizovani anksiozni poremećaj, panični poremećaj, fobije, post-traumatski poremećaj i opsesivno-kompulsivni poremećaj) koji su često udruženi jedni sa drugima, ali i sa drugim psihijatrijskim oboljenjima (70). U osnovi patofiziologije anksioznosti nalazi se disfunkcija neurotransmiterskih sistema u CNS-u: serotonina, noradrenalina, dopamina i GABA-e (69,71).

Gama-aminobuterna kiselina

Simptomi anksioznosti se razvijaju usled poremećaja u ravnoteži aktivnosti limbičkog sistema, koji je odgovoran za obradu emocija. Povećana aktivnost u ovoj strukturalnoj regiji nastaje usled smanjene inhibitorne neurotransmisije posredovane GABA-om, koja igra ključnu ulogu u modulaciji anksiolitičkog odgovora. Naime, $GABA_A$ je jonski receptor koji poseduje alosterno aktivno mesto čija aktivacija omogućava kontrolu inhibicije neurona u amigdali (72). U terapiji akutnih anksioznih napada najveću prednost imaju benzodiazepini. Oni deluju kao pozitivni alosterni modulatori GABA-e, vezujući se specifično za podtip A receptora i povećavajući njen inhibitorni efekat (73).

Serotoninski, dopaminski i noradrenalinski sistemi

Serotoninski neuroni kod anksioznosti imaju ulogu u regulaciji sna, energije, raspoloženja, apetita i kognitivnih funkcija. Studije su pokazale da različiti anksiozni poremećaji utiču na smanjenje broja $5-HT_{1A}$ receptora u limbičkom sistemu (74). Najveću prednost u odnosu na placebo terapiju su pokazali prethodno opisani SSRI, koji i ovde predstavljaju prvu terapijsku liniju (fluoksetin, sertralin, paroksetin, escitalopram i citalopram). Pored njih, u terapiji se takođe koriste venlafaksin i duloksetin, kao i predstavnici SNRI grupe, a u manjoj meri TCA (69–71). Mehanizam delovanja SSRI kod anksioznih poremećaja je praćen promenama u presinaptičkim i

postsinaptičkim receptorima i signalnim putevima. Presinaptički 5-HT_{1A} autoreceptori su odgovorni za smanjenje akutnog ekstracelularnog povećanja koncentracije serotonina usled primene SSRI. Postsinaptički 5-HT_{1A}-R je glavni inhibitorni serotoninski receptor koji se nalazi na GABA-ergičkim i glutamatergičkim neuronima u limbičkom sistemu i prefrontalnom korteksu. Odgovorni su za indirektnu inhibiciju serotoninske aktivnosti u jezgrima rafe (75). Pored serotonina, noradrenalin takođe vrši modulaciju aktivnosti moždanih regiona, poput amigdale. Presinaptički i postsinaptički α_2 adrenoreceptori imaju važnu ulogu u regulaciji nivoa noradrenalina kod anksioznih poremećaja, dok su periferni β adrenergički receptori odgovorni za pojavu simptoma poput tremora, ubrzanog rada srca i znojenja (76). Eksperimentalna ispitivanja su pokazala da je anksioznost takođe praćena smanjenim oslobađanjem dopamina u medijalnom prefrontalnom korteksu. Prisutna je visoka prevalenca anksioznosti kod Parkinsonove bolesti (PB), za koju je karakterističan nizak nivo dopamina u amigdali i prefrontalnom korteksu (77).

1.1.4 Alchajmerova bolest

Alchajmerova bolest (AB) je neurodegenerativna bolest koju karakteriše gubitak intelektualnih funkcija. Prema najnovijim istraživanjima, procenjuje se da oko 51,6 miliona ljudi širom sveta (0,7%) boluje od demencije uz kontinuirani porast stope prevalencije, incidence, mortaliteta i godina života prilagođenih invaliditetu (eng. *Disability-Adjusted Life Years*, DALYs) (78).

Patogenezu AB karakteriše neurodegeneracija, gubitak holinergičkih neurona, razvoj amiloidnih plakova i spletova neurofibrila (79). Amiloidna kaskadna hipoteza definiše da u osnovi patogeneze AB dolazi do proteolize amiloid prekursor proteina (eng. *Amyloid Precursor Protein*, APP) i formiranja amiloid-beta (eng. *Amyloid-Beta*, A β) agregata koji ispoljavaju neurotoksično delovanje (80). Pored toga, u procesu neurodegeneracije važnu ulogu ima i *Tau* protein (81). Mehanizam delovanja *Tau* proteina još uvek nije u potpunosti razjašnjen ali je poznato da su neurodegenerativna oboljenja poput AB praćena abnormalnom fosforilacijom ovog proteina koji se taloži u obliku neurofibrilarnih vlakana u hipokampusu i neokorteksu (82).

Acetilholinski sistem

Alchajmerovu bolest takođe karakteriše smanjen nivo acetilholina usled degeneracije holinergičkih neurona u bazalnim jedrima prednjeg mozga, što utiče na pojavu simptoma otežanog učenja i pamćenja (83). Holin acetiltransferaza (eng. *Choline Acetyltransferase*, ChAT) je enzim koji učestvuje u sintezi acetilholina. Istraživanja su pokazala da je njegova aktivnost do 50% smanjena kod osoba sa AB (84). Iz tog razloga, farmakološki značaj u terapiji ovog oboljenja imaju lekovi koji utiču na normalizaciju nivoa acetilholina i poboljšanje holinergičke neurotransmisije u hipokampusu, cerebralnom korteksu i amigdali. Najveći uspeh u simptomatskoj terapiji ovog oboljenja su ostvarili inhibitori acetilholinesteraze (eng. *Acetylcholinesterase enzyme*, AChE), enzima koji ima glavnu ulogu u razgradnji acetilholina. Dejstvom ovih lekova dolazi do povećanja koncentracije acetilholina u sinaptičkoj pukotini i povećane transmisije u mozgu, što utiče na poboljšanje kognitivnih funkcija (donepezil, rivastigmin i galantamin). Potencijalno važno ciljno mesto dejstva za lečenje AB čine i muskarinski M₁ receptori. Ispitivanja su pokazala da agonističko delovanje na nivou ovih receptora smanjuje hiperfosforilaciju *Tau* proteina i produkciju A β depozita (85).

Glutamatni sistem

Ekscitatorna glutamatna neurotransmisija posredovana NMDA receptorima ima važnu ulogu u regulaciji optimalne neuronske aktivnosti. Međutim, prekomerna aktivacija NMDA receptora i povećan inluks kalcijuma u postsinaptičku ćeliju izaziva ekscitotoksičnost i ćelijsku smrt, što je u osnovi potencijalnog mehanizma neurodegeneracije u AB (86). Iz tog razloga,

terapijsku efikasnost u lečenju ovog oboljenja je pokazao antagonista NMDA receptora, memantin, koji ispoljava neuroprotektivni efekat sprečavajući prekomernu glutamatnu stimulaciju neurona (79,83).

Serotoninski i dopaminski sistemi

Kognitivna oštećenja u AB su usko povezana i sa poremećajem aktivnosti serotoninskih receptora. Promene u ekspresiji 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, 5-HT₄ i 5-HT₆ receptora u neokorteksu i hipokampusu su uočene kod pacijenata koji boluju od AB (87). Direktnim ili indirektnim mehanizmom delovanja, uticajem na oslobađanje GABA-e, dopamina ili glutamata, ovi receptori regulišu ekscitabilnost neurona i posreduju u ispoljavanju neuroprotektivnog delovanja (88). Pored kognitivnih promena, psihijatrijski simptomi su često prisutni kod pacijenata sa AB, uključujući apatiju, agitaciju, deluzije i depresiju (89). Pretpostavlja se da gubitak holinergičkih neurona posledično dovodi do oštećenja serotoninske i dopaminske transmisije u CNS-u, što može biti glavni faktor za razvoj psihijatrijskih simptoma povezanih sa AB (85). Potvrđujući ovu hipotezu, *postmortem* studijama je pokazano da je gustina D₃-R u *nucleus accumbens*-u povećana, a dopaminska transmisija u amigdali smanjena, dok je nivo serotonina u ventralnom temporalnom korteksu i *prosubiculum*-u smanjen, kao i broj serotoninskih neurona u dorzalnim jezgrima rafe i hipokampusu (90). Terapijsku efikasnost i najbolju bezbednost u lečenju psihoza udruženih sa AB su pokazali atipični antipsihotici aripiprazol i risperidon, kao i novi visoko selektivni inverzni agonista 5-HT_{2A} receptora, pimavanserin. Studije su pokazale da primena lekova poput olanzapina i kvetiapina, koji pored antagonizma 5-HT_{2A}/D₂ receptora deluju i na drugim monoaminskim receptorima, poseduju najmanju efikasnost kao i veći broj neželjenih efekata udruženih sa kardiovaskularnim, metaboličkim i antiholinergičkim simptomima, kao i EPS (90,91). Potencijalnu efikasnost u lečenju AB su pokazali i SSRI, posebno escitalopram, koji utiče na smanjenje akumulacije Aβ depozita u mozgu. Ipak, potrebna su dodatna klinička ispitivanja u cilju potvrde njegove efikasnosti (92).

Imidazolinski sistem

Brojne *in vitro* i *in vivo* studije su ukazale na značaj liganada imidazolinskih receptora kod neurodegenerativnih oboljenja. Smatra se da su neuromodulatorna svojstva endogenog liganda agmatina povezana sa blokiranjem NMDA receptora i smanjenjem ekscitotoksičnosti izazvane povećanjem koncentracije intracelularnog Ca²⁺ (93). Takođe, usled inhibicije aktivnosti azot oksid sintetaze (eng. *Nitric Oxide Synthases*, NOS), agmatin utiče na smanjeno stvaranje NO u makrofagama i astroglialnim ćelijama, što predstavlja osnovu antiinflamatornog procesa u CNS-u. Na ćelijskom nivou, agmatin ali i selektivni ligandi I₂-IR utiču na ekspresiju glijalnog fibrilarnog kiselog proteina (eng. *Glial Fibrillary Acidic Protein*, GFAP) u astrocitima. GFAP predstavlja marker abnormalne proliferacije astrocita (astroglioze), koja ima ulogu u patogenezi neurodegenerativnih promena u AB (93–95).

1.1.5 Parkinsonova bolest

Parkinsonova bolest (PB) je drugi najčešći neurodegenerativni poremećaj koji se karakteriše poremećajem motornih i drugih fizičkih funkcija (96). Uglavnom se razvija u srednjem i starijem životnom dobu, a trenutno se procenjuje da više od 8 miliona ljudi širom sveta boluje od ove bolesti (97).

Postoje dva osnovna patološka procesa u mozgu osoba sa PB: (a) progresivna degeneracija i izumiranje dopaminergičkih neurona u nigrostrijatnim strukturama (*substantia nigra* i *corpus striatum*) i (b) nakupljanje Levijevih tela (eng. *Lewy bodies*) u neuronima, koja predstavljaju intracelularne agregate proteina kao što su α-sinuklein i ubikvitin (98–100). Ipak, do ispoljavanja kliničkih simptoma dolazi tek nakon što se broj dopaminergičkih neurona smanji za 50-70% (99).

Glavni simptomi u PB su pojava tremora u mirovanju, bradikinezija, rigiditet i posturalni poremećaji. Pored motornih simptoma veoma često su prisutni i nemotorni simptomi koji uključuju kognitivne promene, neuropsihijatrijske poremećaje ili poremećaje spavanja (101). Poznato je da se većina simptoma PB razvija usled poremećaja dopaminske transmisije, međutim ovo oboljenje karakterišu i promene u drugim neurotransmiterskim sistemima (acetilholin, serotonin, noradrenalin i glutamat) (102–104).

Dopaminski sistem

Dopaminska neurodegeneracija u PB je praćena disregulacijom D₁/D₂ receptora, kao i dopaminskog transportera (eng. *Dopamine Transporter*, DAT) u nigrostrijatnoj regiji. Agonisti dopaminskih receptora imaju široku primenu u simptomatskoj terapiji PB, utičući na povećanje nivoa dopamina u ovim moždanim strukturama. Najefikasniji lek u lečenju PB je levodopa koja se primenjuje u kombinaciji sa inhibitorima dopa dekarboksilaze (karbidopom i benserazidom). Oni smanjuju ekstracerebralnu razgradnju levodope do dopamina kao i pojavu neželjenih efekata na periferiji. Kao prekursor dopamina, levodopa predstavlja supstitucionu terapiju i značajno utiče na poboljšanje motornih simptoma kod bolesnika sa PB (99,105,106). Ipak, tokom lečenja njena efikasnost se smanjuje, a najčešći neželjeni efekti su pojava nevoljnih pokreta i „*on-off*“ fenomena, koji predstavlja motorne fluktuacije usled pogoršanja bolesti (107). Agonisti dopaminskih receptora poput pramipeksola i ropinirola se koriste u inicijalnim fazama bolesti, ali i kao dopunska terapija levodopi. Ipak, njihova efikasnost kontrolisanja motornih simptoma je manja u poređenju sa levodopom (108). U terapiji takođe imaju primenu i selektivni ireverzibilni inhibitori MAO-B enzima, selegilin i rasagilin, koji sprečavaju intraneuralnu razgradnju dopamina, kao i inhibitori katehol-O-metiltransferaze (eng. *Catechol-O-methyltransferase*, COMT) koji inhibiraju metabolizam levodope i dopamina (entakapon). Jedinjenja koja utiču na povećanje nivoa ekstracelularnog dopamina imaju potencijalno važnu ulogu u ispoljavanju neuroprotektivnog delovanja. *In vitro* i *in vivo* studijama je dokazan neuroprotektivni efekat rasagilina koji utiče na modulaciju ekspresije anti-apoptotskih Bcl-2 (eng. *B-cell lymphoma-2*) proteina (109).

Acetilholinski sistem

Pored toga, važnu ulogu u etiologiji demencije i kognitivne disfunkcije kod PB ima i deficit u holinergičkom sistemu. Uočeno je da dolazi do smanjenja aktivnosti holinergičke transmisije u korteksu, degeneracije holinergičkih neurona u *nucleus basalis of Meynert*-u, kao i smanjenja aktivnosti ChAT. Studije su pokazale da inhibitor holinesteraze, rivastigmin, pruža kognitivna poboljšanja kod pacijenata sa demencijom u PB (110). Suprotno tome, antagonist muskarinskih receptora, benzatropin, poseduje efikasnost u lečenju tremora, ali izaziva kognitivna pogoršanja kao i ostale antiholinergičke neželjene efekte, što ograničava njegovu primenu u terapiji PB.

Serotoninski sistem

Serotoninergički neuroni utiču na oslobađanje dopamina u strijatnoj regiji, dok su interakcije između ova dva neurotransmitera uključene u regulaciju različitih neuroloških procesa. Disfunkcija serotoninske transmisije i progresivno smanjenje nivoa serotonina u korteksu i bazalnim ganglijama je povezana sa razvojem motornih i nemotornih simptoma PB. Studije su pokazale da razvoj agonista 5-HT_{1A} receptora može imati potencijalnu ulogu u lečenju diskinezije izazvane levodopom (111). Depresija, mentalni poremećaji i poremećaji spavanja su veoma često udruženi sa ovim neurodegenerativnim oboljenjem. Prevalenca depresije kod osoba sa PB je veća nego kod populacije bez PB, što je povezano sa smanjenjem ekstracelularne koncentracije serotonina i gubitkom serotoninskih neurona u limbičkoj regiji i jezgrima rafe. Iz tog razloga, upotreba lekova koji deluju na SERT (SSRI) ima važnu ulogu u lečenju depresije kod PB (111). Pojava vizuelnih halucinacija i mentalnih poremećaja kod PB je takođe povezana sa disfunkcijom

serotoninske neurotransmisije u CNS-u. Procenjuje se da oko 50% pacijenata sa PB razvije određeni oblik vizuelnih halucinacija koje su praćene promenama u aktivnosti 5-HT_{2A}-R (112). Takođe, nigrostrijatne lezije utiču na promene u signalizaciji posredovanoj 5-HT_{2A}-R i razvoju simptoma praćenih mentalnim poremećajima kod oko 40% obolelih osoba (113). Primena atipičnih antipsihotika, koji u manjoj meri izazivaju motorne neželjene efekte, omogućava efikasno lečenje ovih simptoma u PB. Pimavanserin je nedopaminergički, inverzni agonista 5-HT_{2A}-R, koji utiče na smanjenje pojave mentalnih poremećaja bez pogoršanja motornih funkcija (114). Serotoninski 5-HT_{2A}-R je takođe povezan sa pojavom poremećaja spavanja, gde su najveću efikasnost u lečenju pokazali TCA, mirtazapin i kvetiapin (104).

Ostali sistemi

U ranim fazama PB, usled formiranja Levijevih tela u *locus coeruleus*-u dolazi do disfunkcije noradrenergičke neurotransmisije i smanjene inervacije korteksa, strijatuma, talamusa, hipotalamusa i malog mozga. Noradrenergički sistem, zajedno sa dopaminergičkim i serotoninergičkim mehanizmima, ima značajnu ulogu u etiologiji depresije kod PB (115). Potencijalno veća efikasnost u lečenju ovog propratnog simptoma je uočena kod inhibitora preuzimanja serotonina i noradrenalina (SNRI) u odnosu na SSRI (110).

Gubitak dopaminskih neurona koji je u osnovi PB je povezan sa povećanjem glutamatergičke aktivnosti u bazalnim ganglijama. Studije su pokazale da primena antagonista NMDA i AMPA receptora utiče na poboljšanje motornih funkcija osoba sa PB. Prema tome, može se zaključiti da selektivna inhibicija hiperaktivnosti glutamata predstavlja efikasnu strategiju u lečenju simptoma koji ne reaguju na terapiju levodopom (116).

Slično AB, i kod ovog neurodegenerativnog oboljenja dolazi do razvoja astroglioze, najverovatnije zbog neuroprotektivnih mehanizama i odgovora na akumulaciju α -sinukleina (117). Prethodno opisani mehanizmi delovanja imidazolinskih I₂-R imaju potencijalnu efikasnost u lečenju kognitivnih poremećaja povezanih sa PB. Takođe, ispitivanja su pokazala da specifični ligandi I₂-IR, 2-BFI i BU224, mogu uticati na lokomotorne funkcije usled povećanja nivoa dopamina u strijatumu i inhibicije MAO enzima, potencijalno povećavajući efikasnost levodope (118).

Lekovi koji se trenutno koriste u PB poboljšavaju svakodnevnu funkciju i kvalitet života obolelih osoba, međutim i dalje postoji velika potreba za razvojem neuroprotektivne terapije koja bi uticala na prevenciju progresije bolesti (100,119).

1.1.6 Opšti i specifični simptomi neuroloških i mentalnih oboljenja i poremećaja

Neurološka i mentalna oboljenja su praćena disfunkcijom različitih neurotransmiterskih sistema u mozgu. Šizofreniju karakteriše razvoj simptoma poput: deluzija, halucinacija, uznemirenosti, socijalnog povlačenja, nezainteresovanosti, kao i kognitivne disfunkcije koji su usko povezani sa disbalansom u aktivnosti serotonina i dopamina, ali i ostalih neurotransmitera kao što su glutamat, GABA, noradrenalin, acetilholin i histamin (120). Složeni patogenetski mehanizmi koji su u osnovi mentalnih poremećaja zahtevaju sagledavanje uticaja različitih receptorskih sistema u cilju razvoja novih, bezbednijih i efikasnijih lekova. Jedinjenja sa višestrukim dejstvom koja utiču na modulaciju aktivnosti različitih neurotransmiterskih sistema u mozgu poseduju značajnu prednost u lečenju simptoma šizofrenije, ali i drugih neuroloških oboljenja. Optimalna modulacija aktivnosti serotoninskog i dopaminskog sistema je u osnovi mehanizma delovanja atipičnih antipsihotika. Jedinjenja sa visokom efikasnošću, poput ziprazidona i risperidona, deluju kao antagonisti 5-HT_{2A} i u manjoj meri D₂ receptora, kao i agonisti/pacijalni agonisti 5-HT_{1A} receptora, utičući ne samo na pozitivne i negativne simptome, nego i na smanjenje kognitivnih poremećaja i pojavu EPS. Sporedno antagonističko delovanje ovih liganada na nivou H₁-R, 5-HT_{2C}-R i M₃-R je

udruženo sa pojavom značajnih metaboličkih neželjenih simptoma kao što su povećanje telesne mase, dijabetes i povišen holesterol (121,122). Prema tome, razvoj liganada sa optimalnim antagonističkim delovanjem na nivou ključnih 5-HT_{2A} i D₂ receptora, kao smanjenom aktivnošću na *off-target* receptorima odgovornim za pojavu metaboličkih neželjenih efekata, predstavlja osnovu terapijske efikasnosti i bezbednosti novih lekova za lečenje neuroloških i mentalnih oboljenja.

Uspostavljajući sinergističko delovanje na nivou serotoninske, dopaminske i glutamatne neurotransmisije, lumateperon predstavlja novi pristup u terapiji šizofrenije ali i drugih neuropsihijatrijskih oboljenja. Ovo jedinjenje deluje kao potentni antagonist 5-HT_{2A}-R i inhibitor ponovnog preuzimanja serotonina. U mezokortikalnoj i mezolimbickoj regiji lumateperon deluje kao presinaptički agonista i postsinaptički antagonist D₂-R, kao i indirektni modulator glutamatnih receptora (123). Pored već ranije odobrene primene u terapiji šizofrenije, u decembru 2021. godine FDA je odobrio primenu lumateperona, kao monoterapije ili dodatne terapije, u lečenju depresivnih epizoda povezanih sa bipolarnim poremećajem (bipolarni poremećaj tip I i II) (124). Studija je pokazala njegovu značajnu efikasnost, podnošljivost i bezbednost, ukazujući na smanjen rizik od pojave kardioloških oboljenja, dijabetesa, dislipidemije, povišene telesne mase i ekstrapiramidalnih simptoma. Dodatno, on se trenutno nalazi u trećoj fazi kliničkih ispitivanja za lečenje unipolarne velike depresije (NCT04985942, NCT05061706). Sagledavajući ključna farmakološka delovanja lumateperona i uzimajući u obzir smanjen afinitet za *off-target* receptore, lumateperon predstavlja važno vodeće (eng. *lead*) jedinjenje u procesu razvoja novih liganada sa višestrukim dejstvom (eng. *multi-target*) za lečenje neuroloških i mentalnih oboljenja.

Neurodegenerativna oboljenja poput Alchajmerove i Parkinsonove bolesti su primarno praćena disfunkcijom acetilholinske i dopaminske neurotransmisije u određenim moždanim strukturama i razvojem specifičnih kognitivnih i motornih simptoma. Međutim, neuromodulatorna svojstva ostalih transmitterskih sistema u mozgu (glutamata, serotonina, noradrenalina) utiču na pojavu različitih simptoma mentalnih poremećaja. Antipsihotici i antidepresivi se uvode u terapiju u cilju suzbijanja halucinacija, paranoidnih deluzija, depresije i anksioznosti kod osoba obolelih od Alchajmerove i Parkinsonove bolesti (90,105,125). Oko 40% pacijenata koji koriste antiparkinsonike je razvilo neki oblik psihoze usled dopaminske disregulacije (99). U cilju suzbijanja psihotičnih epizoda u terapiju se uvode atipični antipsihotici koji imaju manje izražene EPS, poput kvetiapina ili klozapina. FDA je 2016. godine odobrila primenu pimavanserina, inverznog agoniste serotoninskog 5-HT_{2A} receptora za terapiju halucinacija i deluzija kod PB (104). Takođe, trenutno se očekuje zvanična odluka FDA o primeni pimavanserina u lečenju psihoza udruženih sa AB. Depresija je jedan od najčešćih nemotornih simptoma kod PB koju razvija 40-50% pacijenata. Značajnu efikasnost u terapiji depresije udružene sa PB su pokazali lekovi iz grupe SSRI, poput fluoksetina, sertralina, paroksetina, citaloprama i escitaloprama. Ipak, određeno ograničenje u njihovoj primeni predstavlja pojava motornih neželjenih simptoma usled uticaja serotonina na dopaminsku neurotransmisiju u bazalnim ganglijama (126). U terapiji se takođe koristi i venlafaksin, selektivni inhibitor ponovnog preuzimanja serotonina i noradrenalina.

Razvoj novih liganada sa optimalnim profilom aktivnosti na serotoninskim i dopaminskim receptorima, kao i manje izraženom pojavom EPS, ima važnu ulogu u lečenju simptoma mentalnih poremećaja udruženih sa neurodegenerativnim oboljenjima. Jedinjenja sa potencijalnim neuroprotektivnim delovanjem imaju sve veći značaj u istraživanju novih lekova koji mogu uticati na usporavanje progresije Parkinsonove i Alchajmerove bolesti. Na osnovu dokazanog antiinflamatornog i anti-apoptotičkog delovanja liganada imidazolinskih I₂-R, može se zaključiti da ovi receptori predstavljaju važna ciljna mesta dejstva novih, bezbednijih i efikasnijih lekova za neurodegenerativna oboljenja (127,128).

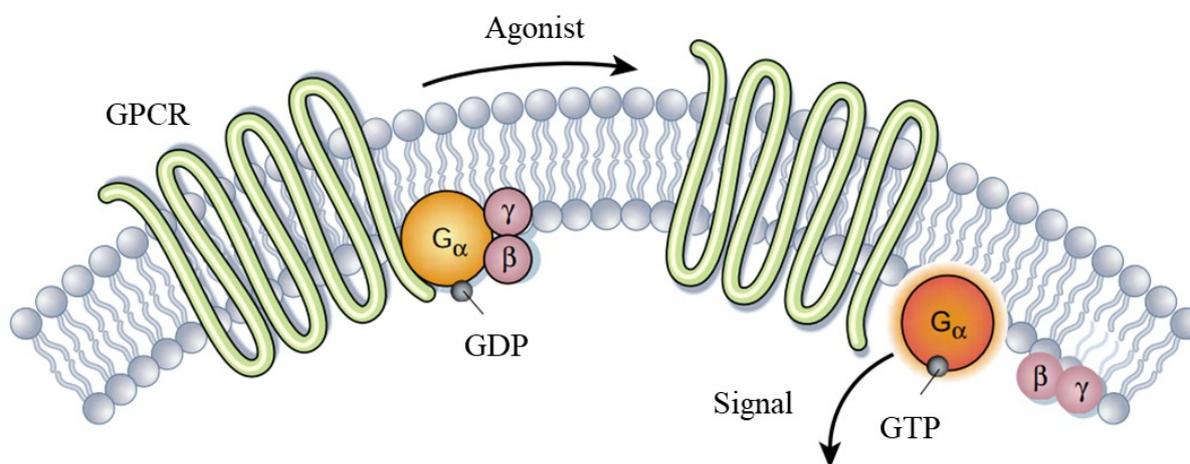
1.2 Receptorski sistemi važni u regulaciji neuroloških i mentalnih oboljenja

1.2.1 G-protein spregnuti receptori

G-protein-spregnuti receptori (eng. *G-Protein Coupled Receptors*, GPCR) predstavljaju najveću familiju membranskih receptora koji posreduju u ćelijskim odgovorima na različite molekule, poput hormona, peptida, neurotransmitera, jona i fotona (129). Procenjuje se da oko 35% lekova koji se danas nalaze na tržištu ostvaruju svoje dejstvo preko GPCR-a, što ukazuje na njihov veliki terapijski značaj kod različitih oboljenja (130,131).

Na osnovu filogenetske analize, G-protein-spregnute receptore je moguće podeliti u nekoliko klasa: klasa A su rodopsinu slični receptori; klasu B čini sekretinska receptorska familija; klasi C pripadaju metabotropni glutamatni receptori; klasa D su gljivični feromonski receptori; klasa E su ciklični adenzin monofosfat (eng. *Cyclic Adenosine Monophosphate*, cAMP) receptori; i klasi F pripadaju uvijeni (eng. *frizzled*) receptori (132). Klasa A predstavlja najveću i najviše istraženu grupu GPCR-a, koja deluje kao ciljno mesto dejstva velikog broja lekova. Sastoje se od jednog polipeptidnog lanca sa sedam transmembranskih (TM) α heliksa međusobno povezanih sa tri ekstracelularna i tri intracelularna prevoja (Slika 1.1). Ekstracelularni domen sadrži amino kraj (N-kraj) i ligand vezujuće mesto, dok intracelularni domen sadrži karbonilni kraj (C-kraj) i povezan je sa G proteinom.

G protein se sastoji od tri subjedinice: alfa (α), beta (β) i gama (γ). Vezivanje liganda za GPCR dovodi do konformacione promene i aktivacije G proteina zamenom guanozin-difosfata (eng. *Guanosine Diphosphate*, GDP) sa guanozin-trifosfatom (eng. *Guanosine Triphosphate*, GTP). Alfa subjedinica zajedno sa vezanim GTP-om se odvaja od beta i gama subjedinica. Pokazano je da obe subjedinice, G_α i $G_{\beta\gamma}$, dovode do aktivacije drugih proteina u signalnim putevima. U zavisnosti od tipa α subjedinice ($G_s\alpha$, $G_i\alpha$, $G_o\alpha$, $G_{q/11\alpha}$, i $G_{12/13\alpha}$) postoje i različiti mehanizmi aktivacije efektora koji uključuju adenilat ciklazu (eng. *Adenylate Cyclase*, AC), cikličnu guanozin monofosfat (eng. *Cyclic Guanosine Monophosphate*, cGMP) specifičnu fosfodiesterazu, fosfolipazu C (eng. *Phospholipase C*, PLC) i faktor razmene guanin nukleotida (eng. *Rho Guanine Nucleotide Exchange Factors*, RhoGEF). Pored toga, zapažena je i uloga $G_{\beta\gamma}$ subjedinice u različitim signalnim putevima delujući na acetilholin regulisane kalijumove kanale (*G-Protein Gated Inward Rectifier Potassium*, GIRK), fosfolipazu C β , adenilat ciklazu, kao i voltažno zavisne kanale za kalcijum (133,134).

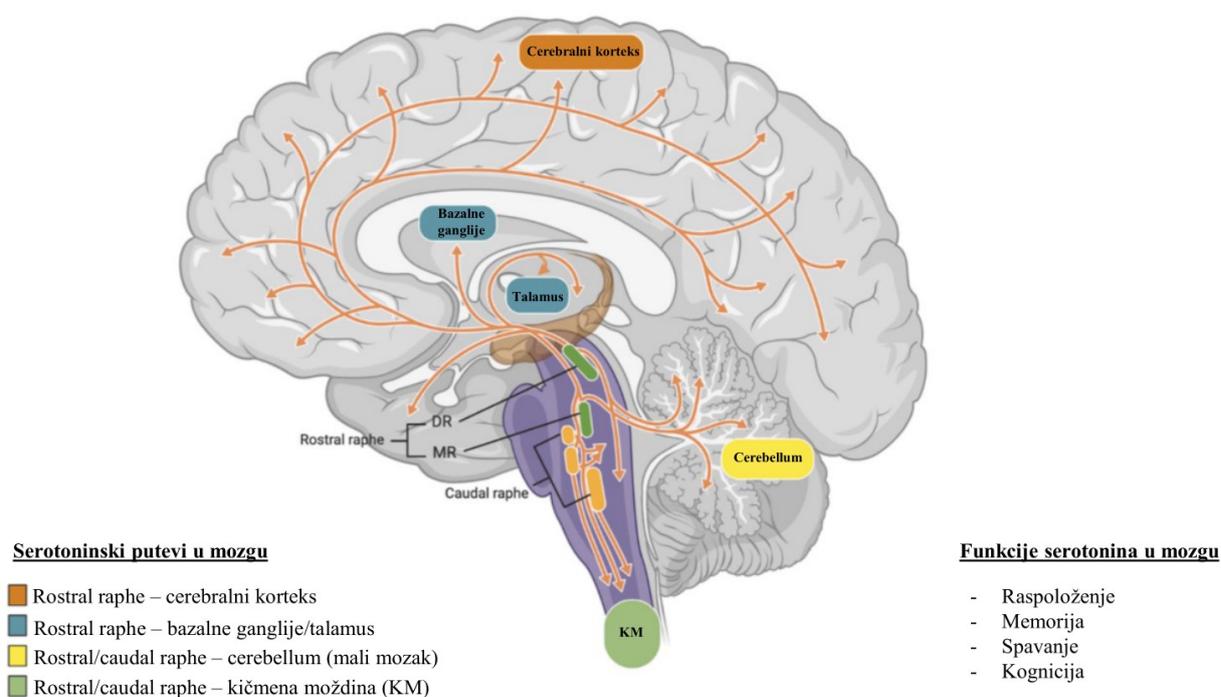


Slika 1.1. Struktura GPCR (135).

1.2.2 Serotoninski receptori

Serotonin ili 5-hidroksitriptamin (eng. *5-hydroxytryptamine*, 5-HT) je neurotransmiter i hormon koji svoje efekte u organizmu ostvaruje preko serotoninskih (5-HT) receptora. U organizmu se serotonin sintetizira iz aminokiseline L-triptofan. Najpre se vrši hidroksilacija triptofana pomoću enzima triptofan hidroksilaze (eng. *Tryptophan Hydroxylase*, TPH) do 5-hidroksitriptofana (eng. *5-hydroxytryptophan*, 5-HTP), a potom dekarboksilaza (eng. *Aromatic Amino Acid Decarboxylase*, AADC) prevodi 5-HTP u 5-HT. Enzim MAO vrši razgradnju serotonina do 5-hidroksiindol acetaldehida, koji se dejstvom aldehyd-dehidrogenaze (eng. *Aldehyde Dehydrogenase*, ALDH) prevodi u finalni metabolit serotonina – 5-hidroksiindol sirćetnu kiselinu (136).

Serotonin je najviše zastupljen u mozgu, gastrointestinalnom traktu i trombocitima. Serotoninski neuroni u mozgu su predominantno smešteni u jezgrima rafe (*raphe nuclei*), koja se nalaze u središnjem delu moždanog stabla, i dele se na *rostral raphe* i *caudal raphe*. Ova jezgra su u najvećoj meri odgovorna za serotoninsku inervaciju drugih regija. Projekcije neurona iz *caudal raphe* se završavaju u donjem moždanom stablu i kičmenoj moždini (KM), dok neuroni koji polaze iz *rostral raphe* (*dorsal raphe* - DR, *median raphe* - MR) inervišu čitav neokorteks, bazalne ganglije i talamus (Slika 1.2).



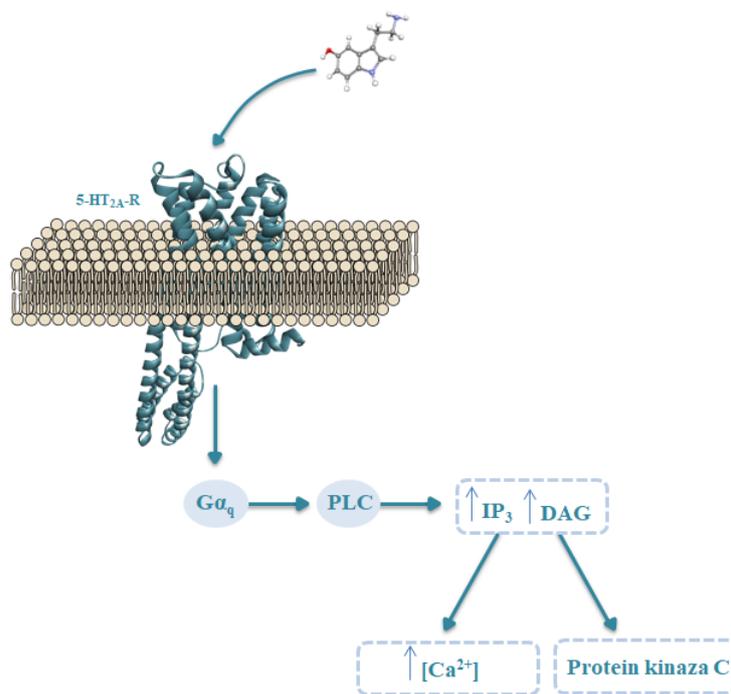
Slika 1.2. Serotoninski putevi u mozgu (137).

Takođe, serotonin je odgovoran za regulaciju velikog broja funkcija kao što su: san, apetit, osetljivost na bol, motorika, kognitivne sposobnosti poput pamćenja i učenja, te regulaciju disanja, kardiovaskularnog sistema i termoregulaciju (138,139). Poremećaj funkcije serotoninskog sistema je povezan sa različitim psihičkim i neurološkim oboljenjima kao što su depresija, zavisnost, anksioznost, šizofrenija, demencija, Parkinsonova bolest, ali i sa ponašanjem koje karakteriše agresivnost, impulsivnost ili poremećaj pažnje (136,140,141). Pored uloge u regulaciji različitih centralnih fizioloških funkcija, serotonin deluje i na oslobađanje drugih neurotransmitera poput GABA-e, dopamina i glutamata.

Serotoninski receptori se mogu klasifikovati u sedam glavnih tipova (5-HT₁₋₇), od kojih se tipovi 1 i 2 dalje dele u podtipove. Osim 5-HT₃ receptora koji je jonski kanal, svi ostali receptori su membranski GPCR koji dovode do aktivacije intracelularnih sekundarnih glasnika. Serotoninski 5-HT₁ (5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{1E}, 5-HT_{1F}) receptori su povezani sa G_i α /G_o α proteinima i dovode do inhibicije adenilat ciklaze, dok su 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} i 5-HT_{2C} receptori povezani sa G_q α proteinima i dovode do aktivacije fosfolipaze C. Pored toga, 5-HT₄, 5-HT₆ i 5-HT₇ receptori se vezuju za G_s α proteinima i dovode do aktivacije adenilat ciklaze. Mehanizam delovanja 5-HT₅ receptora još uvek nije u potpunosti razjašnjen (141).

1.2.3 Serotoninski 5-HT_{2A} receptor

Serotoninski 5-HT_{2A} receptori (5-HT_{2A}-R) su široko rasprostranjeni, kako u CNS-u, tako i na periferiji. U CNS-u se predominantno nalaze u cerebralnom korteksu, klaustrumu i bazalnim ganglijama, gde ispoljavaju različite fiziološke, bihevioralne i psihološke uticaje, dok na periferiji imaju važnu ulogu u regulaciji kontrakcije glatkih mišića krvnih sudova i agregaciji trombocita (142,143). Serotoninski 5-HT_{2A} receptori predstavljaju glavne ekscitatorne receptore među serotoninskim G-protein spregnutim receptorima. Njihov intracelularni odgovor je posredovan vezivanjem za PLC, stimulacijom stvaranja inozitol trifosfata (eng. *Inositol Trisphosphate*, IP₃) i diacilglicerola (eng. *Diacylglycerol*, DAG), aktivacijom protein kinaze C (eng. *Protein Kinase C*, PKC), te krajnjim povećanjem nivoa kalcijuma u ćeliji (Slika 1.3). Pored toga, sve veći značaj u istraživanjima imaju β -arestini i definisanje njihove uloge u prenosu signala između receptora i intercelularnih efektora (144,145).



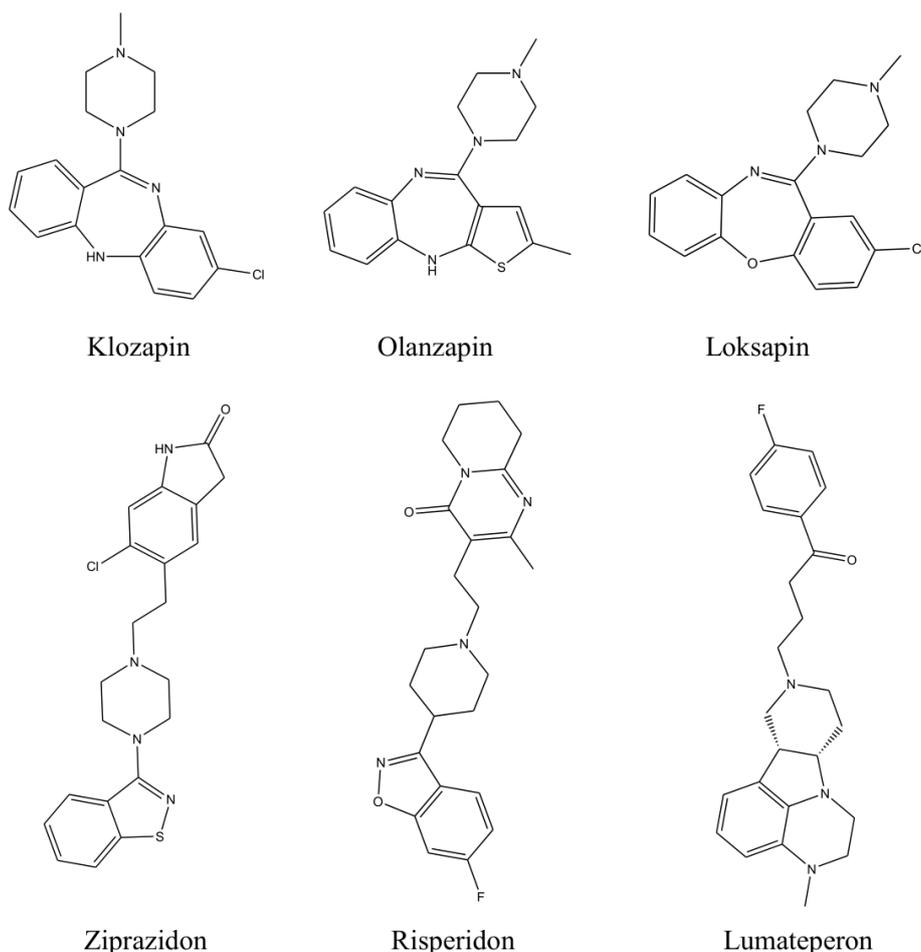
Slika 1.3. Osnovni signalni put 5-HT_{2A}-R.

Proučavanje 3D strukture 5-HT_{2A} receptora je počelo još 1995. godine, kada su autori formirali farmakoforni model na osnovu poznatih serotoninskih agonista i antagonista u cilju proučavanja njihovog načina delovanja i afiniteta vezivanja za aminokiseline u vezujućem mestu (146). Ipak, otkriće kristalne strukture β_2 adrenoreceptora je značajno unapredilo i ubrzalo proučavanje G-protein spregnutih receptora. Na osnovu njega formiran je homologi model 5-HT_{2A}-R koji se koristio u brojnim istraživanjima, verodostojno predstavljajući njegovu trodimenzionalnu

(3D) strukturu (147). Brz razvoj u ovoj oblasti je posledično doveo do izolovanja 3D struktura 5-HT_{2A} receptora u kompleksu sa različitim agonistima i antagonistima koje se mogu naći na *Protein Data Bank (PDB)* i *GPCR* bazama podataka (eng. *GPCR database*, GPCRdb) (148–153).

Zbog široke zastupljenosti u CNS-u, serotoninski 5-HT_{2A}-R predstavljaju važno ciljno mesto dejstva velikog broja lekova. Odgovorni su za psihodelične efekte jedinjenja poput LSD-a, meskalina i psilocina, koji ostvaruju agonistički ili parcijalni agonistički efekat na ovim receptorima (154). Suprotno tome, inhibicija 5-HT_{2A}-R doprinosi efikasnosti atipičnih antipsihotika u kontroli pozitivnih i negativnih simptoma šizofrenije, kao i lečenju depresivnih i anksioznih poremećaja (50,155). Zbog široke rasprostranjenosti u regijama mozga koje su značajne za kontrolu kognitivnih funkcija, učenja i pamćenja, antagonisti ovih receptora imaju važnu ulogu i u lečenju simptoma različitih neurodegenerativnih bolesti (142,156).

Strukturno, antagonisti 5-HT_{2A}-R predstavljaju derivate alkilpiperidina ili alkilpiperazina (Slika 1.4). Prisustvo azota u piperidinskom ili piperazinskom prstenu, koji je pri fiziološkom pH protonovan, je veoma važno za aktivaciju aminergičkih receptora. Asparaginska kiselina (Asp) na poziciji 3.32 je visoko konzervirana (eng. *conserved*) aminokiselina koja učestvuje u formiranju ključne elektrostatičke interakcije sa ligandom preko protonovanog azota (157). Klozapin, olanzapin i loksapin predstavljaju triciklične derivate alkilpiperazina, koji svoj terapijski efekat ostvaruju antagonističkim delovanjem na serotoninskim 5-HT_{2A} i dopaminskim D₂ receptorima. Ipak, pokazano je da klozapin i olanzapin poseduju najveći uticaj na izazivanje metaboličkih neželjenih efekata, poput povećanja telesne mase, hiperglikemije i dislipidemije, usled delovanja na histaminskim H₁, serotoninskim 5-HT_{2C} i muskarinskim M₃ receptorima (35). Novije generacije antipsihotika koji deluju kao antagonisti 5-HT_{2A}/D₂ receptora, risperidon i ziprazidon, su takođe derivati alkilpiperazina, ali sa manjom incidencom neželjenih simptoma. Studije su pokazale da ziprazidon ima manje izražene efekte na povećanje telesne mase, pojavu EPS i hiperprolaktinemiju u odnosu na risperidon, kao i povoljniji uticaj na lečenje depresivnih simptoma udruženih sa šizofrenijom (158). Antipsihotična efikasnost risperidona je slična ziprazidonu, dok značajnu superiornost u poboljšanju negativnih simptoma poseduje u odnosu na haloperidol. Takođe, u poređenju sa haloperidolom, risperidon poseduje smanjen rizik od pojave EPS, dok je rizik od povećanja telesne mase i hiperprolaktinemije povišen. Veliku pažnju u poslednje vreme privlači i lumateperon. Njegov mehanizam delovanja se zasniva na inhibiciji serotoninskog transportera (SERT) i antagonizovanju serotoninskog 5-HT_{2A} receptora. Pored toga, deluje kao antagonista na postsinaptičkim dopaminskim D₂ receptorima, parcijalni agonista na presinaptičkim D₂ receptorima, kao i agonista dopaminskih D₁-zavisnih NMDA i AMPA receptora (123). Utičući na modulaciju aktivnosti serotonina, dopamina i glutamata u CNS-u posredstvom navedenih receptora, lumateperon ostvaruje antipsihotično i antidepresivno delovanje. Zbog smanjenog afiniteta za histaminske i muskarinske receptore, pokazano je da lumateperon u poređenju sa placeboom ne utiče na značajne metaboličke promene, kao i da je bezbedniji u pogledu nastanka ekstrapiramidalnih neželjenih simptoma (159). Na osnovu ovoga moguće je zaključiti da istraživanje i dizajn liganada koji deluju na nivou 5-HT_{2A} receptora ima važnu ulogu u razvoju potencijalno efikasnijih i bezbednijih lekova za različita neurološka i mentalna oboljenja.



Slika 1.4. Hemijske strukture poznatih antagonista 5-HT_{2A}-R.

1.2.4 Serotoninski transporter

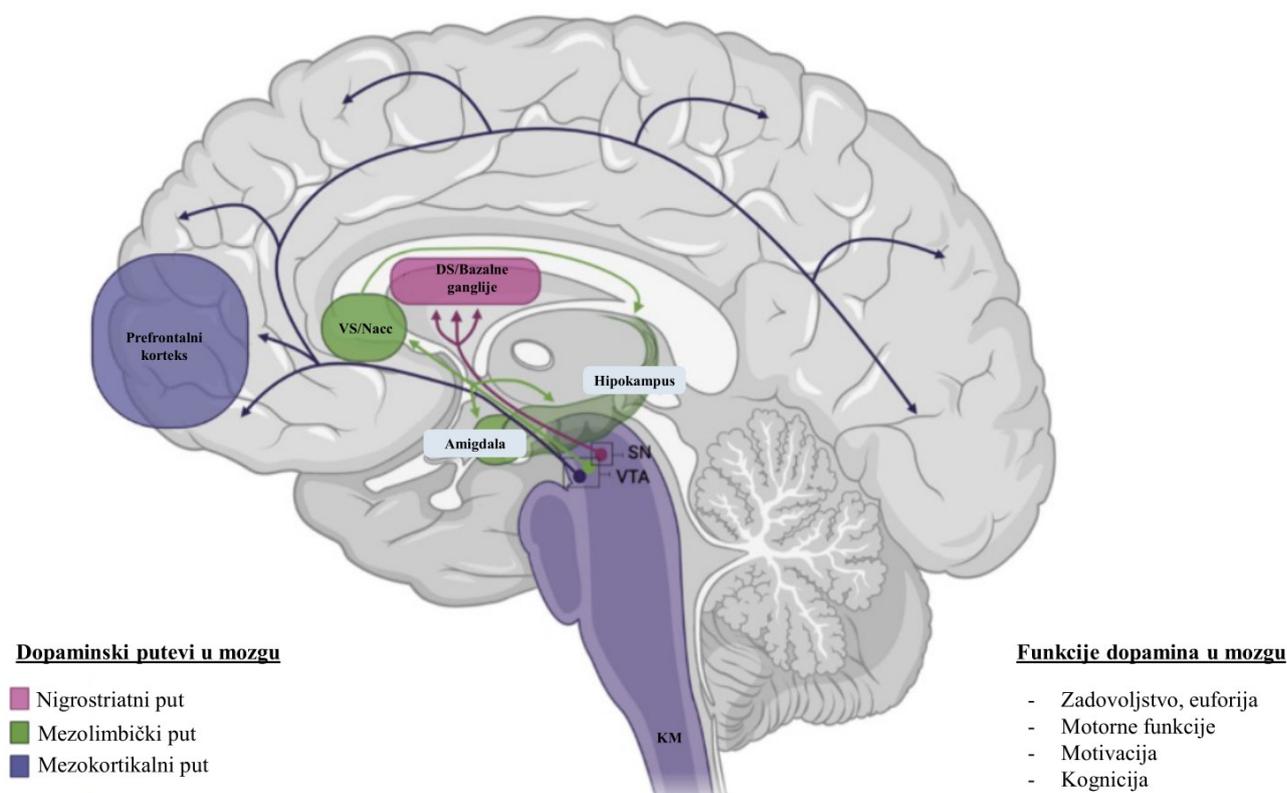
Serotoninski transporter (SERT) je membranski protein koji pripada SLC6 (eng. *Solute carrier 6*) familiji Na⁺/Cl⁻ zavisnih transportera. Odgovoran je za održavanje homeostaze serotonina i njegovo preuzimanje u presinaptičke završetke (160).

Sastoji se od 12 transmembranskih domena koji su međusobno povezani ekstracelularnim i intracelularnim prevojima, dok su oba kraja proteina (N- i C- kraj) lokalizovana intracelularno. Danas postoji veliki broj izolovanih 3D modela serotoninskog transportera u kompleksu sa različitim ligandima, što je omogućilo bolje sagledavanje strukturnih osobina ključnih za njegova farmakološka delovanja (161,162). Takođe, pokazano je da osim aktivnog mesta u transmembranskom domenu, SERT poseduje i alosterno aktivno mesto koje se nalazi ekstracelularno (163).

Disfunkcija serotoninskog transportera je udružena sa pojavom brojnih oboljenja CNS-a, kao što su anksioznost, depresija, epilepsija i Parkinsonova bolest (164). Inhibicija preuzimanja serotonina putem ovog transportera i povećanje njegove koncentracije u sinapsi predstavlja osnovu terapijske efikasnosti TCA i SSRI lekova, koji se koriste u lečenju psihijatrijskih oboljenja.

1.2.5 Dopaminski receptori

Dopamin je kateholamin koji nastaje iz aminokiseline L-tirozin. Dejstvom tirozin hidroksilaze (eng. *Tyrosine Hydroxylase*), tirozin se prevodi u L-dihidroksifenilalanin (levodopa, L-DOPA), a potom DOPA dekarboksilaza (eng. *DOPA decarboxylase*) dovodi do formiranja dopamina. Enzimska inaktivacija se vrši enzimima MAO i COMT, a finalni metaboliti su dihidroksifenilsirćetna kiselina (eng. *3,4-Dihydroxyphenylacetic acid*, DOPAC) i homovalinska kiselina (engl. *Homovanillic acid*, HVA) (165). Dopamin kao neurotransmiter i hormon ima važnu ulogu u kontrolisanju brojnih moždanih funkcija, kao što su učenje, pamćenje, motorna kontrola, spavanje, kontrola raspoloženja i zadovoljstva (166). Pored toga, on ostvaruje različite uloge i na periferiji gde reguliše oslobađanje drugih kateholamina i hormona, utiče na kardiovaskularnu funkciju i gastrointestinalnu pokretljivost (167). Moždane regije bogate dopaminergičkim neuronima čine VTA, *substantia nigra* i hipotalamus, dok se njihovi aksoni dalje projektuju u različite puteve: nigrostrijatni, mezolimbčki, mezokortikalni i tuberoinfundibularni (168). Nigrostrijatni put je prvenstveno odgovoran za kontrolu motornih pokreta i predstavlja nervna vlakna koja se iz zone *substantia nigra* (SN) završavaju u *corpus striatum*-u bazalnih ganglija (Slika 1.5). Mezolimbčke projekcije idu iz VTA do ventralnog strijatuma (VS)/*nucleus accumbens*-a (N_{acc}) i limbčkih struktura, amigdale i hipokampusa, dok mezokortikalni put spaja VTA i prefrontalni korteks (Slika 1.5). Navedene strukture imaju važnu ulogu u regulaciji uzbuđenja, motivacije, zadovoljstva, kao i kognitivnih funkcija. Tuberoinfundibularni put predstavlja neurone koji kreću iz ventralnog hipotalamusa do *eminencia mediana* i utiču na sekreciju hormona (169). Zbog složenih funkcija koje kontroliše, poremećaj dopaminske neurotransmisije je povezan sa razvojem različitih oboljenja poput šizofrenije, Parkinsonove bolesti, endokrinoloških poremećaja, kao i pojavom zavisnosti od određenih supstanci (168).

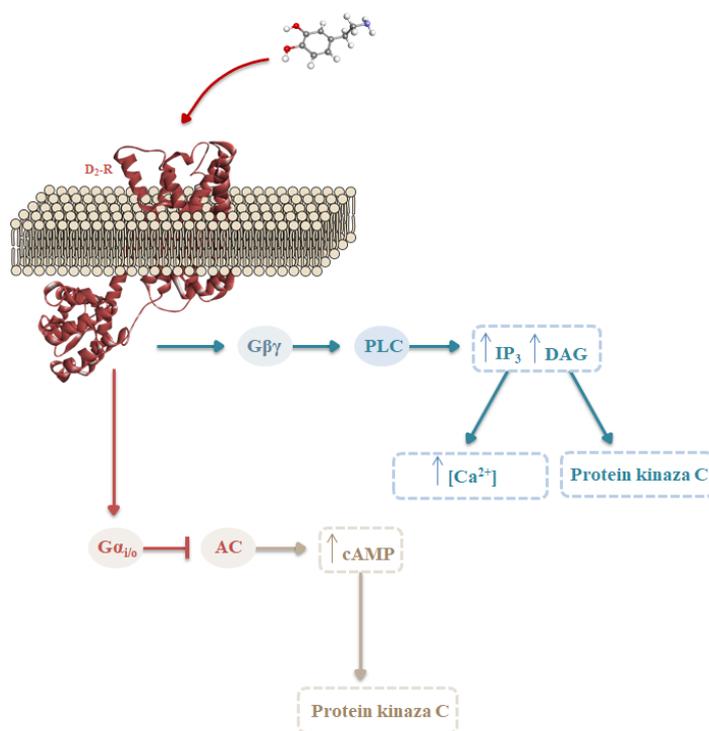


Slika 1.5. Dopaminski putevi u mozgu (137).

Dopaminski receptori takođe pripadaju aminergičkim GPCR koji se mogu podeliti u dve familije: D₁ i D₂. Receptori D₁ familije se vežu za stimulatornu G_qα subjedinicu, koja aktivira adenilat ciklazu i dovodi do povećanja koncentracije sekundarnog glasnika cAMP-a, koji potom utiče na aktivaciju protein kinaze A (eng. *Protein kinase A*, PKA). Suprotno tome, D₂ receptorska familija se veže za inhibitornu α subjedinicu, koja inhibira aktivaciju adenilat ciklaze i stvaranje cAMP-a (170).

1.2.6 Dopaminski D₂ receptor

Dopaminski D₂ receptori (D₂-R) se nalaze u dve izoforme, D_{2S} (eng. *D_{2short}*) i D_{2L} (eng. *D_{2long}*), koje se međusobno razlikuju po prisustvu dodatnih 29 aminokiselina u trećem intracelularnom prevoju D_{2L} receptora. Ipak, obe varijante svoj inhibicioni efekat ostvaruju vezivanjem za G_iα/G_oα subjedinicu, ali i pokretanjem signalnih puteva koji su nezavisni od cAMP-a (Slika 1.6) (170). Izoforma D_{2S} uglavnom predstavlja presinaptičke autoreceptore, dok D_{2L} čine postsinaptički receptori. U najvećoj meri, D₂-R se nalaze u strijatumu, *olfactory tubercle*-u i *nucleus accumbens*-u.

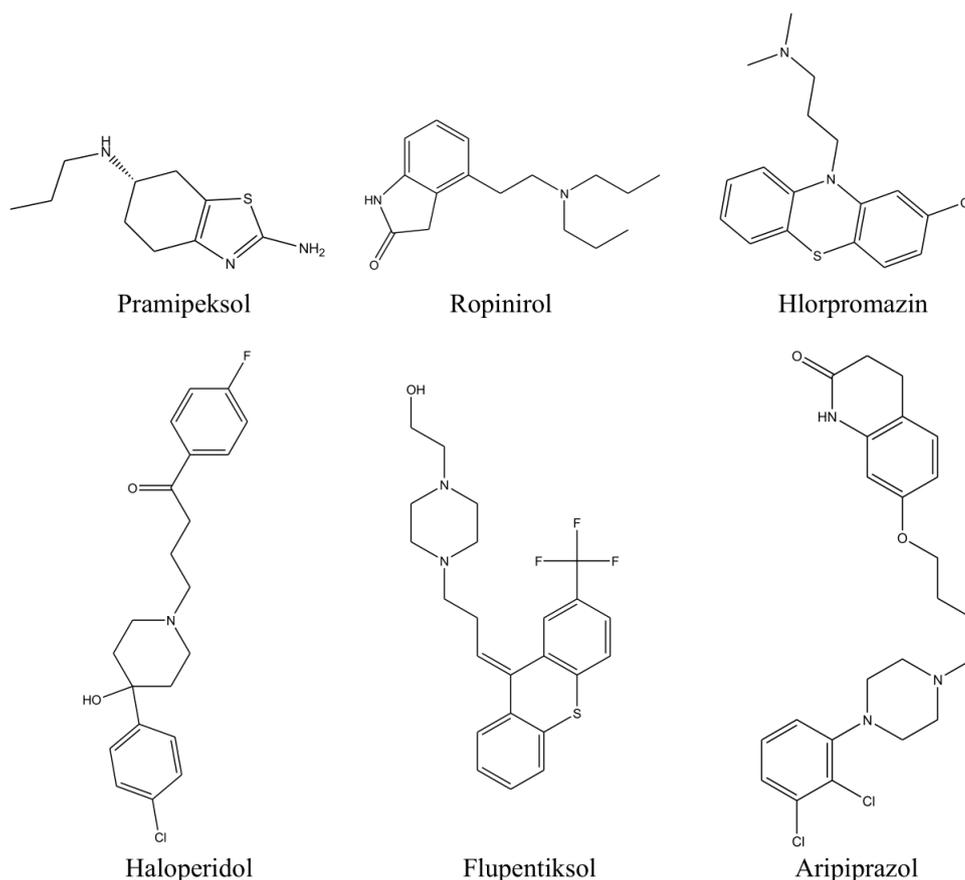


Slika 1.6. Osnovni signalni put D₂-R.

Primarna struktura dopaminskog D₂-R je otkrivena pre više od 30 godina, međutim izolovanje 3D strukture visoke rezolucije je za istraživače predstavljalo veliki izazov (171). Definisanje 3D strukture rodopsina kao i drugih receptora iz GPCR familije, uključujući i D₃ receptor, je doprinelo boljem i detaljnijem razvoju homologih struktura D₂-R, koje su omogućile značajan napredak u proučavanju ligand-receptor interakcija, kao i razvoj novih liganada koristeći pristup zasnovan na strukturi ciljnog mesta dejstva (172,173). Wang i saradnici su 2018. godine izolovali prvu 3D strukturu D₂-R u kompleksu sa atipičnim antipsihotikom risperidonom, nakon čega je usledio razvoj još nekoliko struktura u kompleksima sa različitim agonistima i antagonistima (174–178).

Zbog svoje distribucije u specifičnim moždanim regijama, D₂-R predstavlja ciljno mesto dejstva brojnih antipsihotika i lekova za neurodegenerativne bolesti. Presinaptički lokalizovani dopaminski autoreceptori učestvuju u mehanizmu negativne povratne sprege, čime kontrolišu sintezu i oslobađanje neurotransmitera. Njihova aktivacija u strijatnoj regiji dovodi do smanjenog oslobađanja dopamina i posledično smanjenja lokomotorne aktivnosti. Suprotno tome, aktivacija postsinaptičkih receptora utiče na povećanje lokomotorne aktivnosti (168). Kao što je prethodno navedeno, šizofreniju karakterišu promene u nivou dopamina u određenim strukturnim regijama mozga. Terapijska efikasnost tipičnih i atipičnih antipsihotika u kontroli psihotičnih simptoma šizofrenije, ali i drugih oboljenja, se zasniva na antagonizovanju dopaminskih D₂-R (179). Produžena blokada D₂-R dovodi do disregulacije D₁-R u prefrontalnom korteksu i značajnog pogoršanja radne memorije, ukazujući na potencijalnu efikasnost jedinjenja koja deluju kao agonisti D₁-R u lečenju kognitivnih deficita. Antipsihotici koji antagonizuju D₂-R u strijatumu utiču na oslobađanje acetilholina i pojavu ekstrapiramidalnih neželjenih simptoma, koji se neutrališu ukoliko ligandi koji blokiraju D₂-R deluju i kao antagonisti muskarinskih M₁ receptora, poput olanzapina. Terapijska efikasnost antagonista dopaminskih D₂-R je takođe povezana sa aktivacijom glutamatnih NMDA receptora usled PKA-zavisne fosforilacije NR1 subjedinice (180). Najveći značaj agonista D₂-R u CNS se ogleda u lečenju simptoma Parkinsonove bolesti, koju karakteriše deficit dopamina (181).

Agoniste dopaminskih D₂-R je strukturno moguće podeliti u dve grupe: ergolinski derivati kao što su bromokriptin i pergolid, i neergolinski derivati kao što su pramipeksol, ropinirol i rotigotin (Slika 1.7). Iako je njihova efikasnost u lečenju PB manja u poređenju sa levodopom, pokazano je da ova jedinjenja poseduju i određena dodatna delovanja. Bromokriptin ima ulogu u lečenju hiperprolaktinemije, tumora hipofize, kao i dijabetes melitusa tip 2, dok su pramipeksol i rotigotin pokazali efikasnost u lečenju bipolarnog poremećaja i depresije (168). Potentni antagonisti D₂-R pripadaju grupi tipičnih antipsihotika, koje je moguće hemijski klasifikovati u derivate fenotiazina (hlorpromazin, tioridazin, trifluoperazin), butirofenona (haloperidol, droperidol) i tioksantena (flupentiksol, zuklopentiksol) (Slika 1.7). Najveći nedostatak ove grupe lekova je pojava ekstrapiramidalnih simptoma, poput akatizije, distonije, diskinezije, tremora i ukočenosti, usled blokiranja D₂-R u nigrostrijatnom putu. Takođe, visoke doze tipičnih antipsihotika utiču na pogoršanje kognitivnih i negativnih simptoma antagonizovanjem dopaminskih receptora u mezokortikalnoj regiji. Delovanje na histaminskim H₁-R dovodi do sedacije, pospanosti i povećanja telesne mase, dok je antagonizam na M₁-R praćen pojavom antiholinergičkih neželjenih simptoma (suvoća usta, konstipacija, tahikardija) i kognitivnih poremećaja. Blokiranje α_1 adrenergičkih receptora dovodi do hipotenzivnog efekta. Loš bezbednosni profil ove grupe jedinjenja je uslovio razvoj atipičnih antipsihotika, koji imaju i dodatno delovanje kao antagonisti serotoninskih 5-HT_{2A} receptora (182). Antagonizam na 5-HT_{2A}-R utiče na povećano oslobađanje dopamina u strijatumu usled smanjenja inhibitornog delovanja serotonina, što dovodi do poboljšanja lokomotorne aktivnosti. Specifičan mehanizam delovanja je karakterističan za aripiprazol, lek koji je registrovan za lečenje šizofrenije, depresije, bipolarnog poremećaja i autizma (Slika 1.7). Njegova efikasnost je najviše posredovana parcijalnim agonističkim delovanjem na D₂, kao i 5-HT_{1A} receptorima, dok antagonistički deluje na serotoninskom 5-HT_{2A} receptoru (183). Pored toga, antagonisti centralnih i perifernih D₂ receptora, droperidol, domperidon i metoklopramid, su pokazali terapijsku efikasnost u lečenju nauzeje i povraćanja.



Slika 1.7. Hemijske strukture ligandov D₂-R.

1.2.7 Dopaminski transporter

Dopaminski transporter (DAT) se nahaja na presinaptičkim dopaminskim neuronima v CNS-u, kjer ima pomembno vlogo pri kontroli intrasinaptičkega nivoja dopamina in ohranjanju normalne nevrološke funkcije (184). DAT spada v družino Na⁺/Cl⁻ odvisnih SLC6 monoaminskih transporterov, v katero spadajo tudi transporteri serotonina (SERT), norepinefrina (ang. *Norepinephrine transporter*, NET), glicina in GABA-e (185,186).

Dopaminski transporter predstavlja membranski protein, ki se sestoji iz 12 transmembranskih heliks. Odkritje 3D strukture DAT (iz *Drosophila melanogaster*; dDAT) je v pomembni meri napredovalo raziskovanje njegovega mehanizma delovanja na molekularni ravni. Pokazano je, da dDAT ima več kot 50% identičnosti sekvence s človeškim dopaminskim transporterom (ang. *Human Dopamine Transporter*, hDAT) (187,188).

Disfunkcija dopaminskega transporterja je povezana s razvojem različnih nevroloških in psihijatrijskih obolenj, kot so PB, AB, šizofrenija in depresija (189). Dopaminski transporter predstavlja ciljno mesto delovanja snovi, ki povzročajo odvisnost, kot so kokain in amfetamin, ki s različnimi mehanizmi vplivata na njegovo strukturo in funkcijo. Na primer, kokain se neposredno veže na DAT in deluje kot blokator translokacije dopamina, medtem ko amfetamin predstavlja njegov substrat, ki vpliva na aktivacijo efluksnega sistema in povečanje ekstracelularnega nivoja dopamina (190). Transporterji SERT, NET in DAT sodelujejo pri regulaciji nivoja monoaminskih neurotransmiterov v CNS-u. Triciklični antidepresivi, ki delujejo kot inhibitorji monoaminskih transporterov, so v največji meri selektivni za SERT in NET, medtem ko v manjši meri inhibirajo DAT. Raziskave so pokazale, da akutna uporaba sertralina, ki spada v skupino inhibitorjev prevzemanja serotonina, vpliva

na povećanje nivoa dopamina u strijatumu i *nucleus accumbens*-u (191). Pored toga, bupropion je selektivni dualni inhibitor preuzimanja noradrenalina i dopamina koji se koristi u monoterapiji ili dodatnoj terapiji depresivnih poremećaja (192). Zbog smanjenog delovanja na serotoninški sistem, ali i ostale postsinaptičke receptore, bupropion karakteriše odsustvo specifičnih simptoma antidepresiva, poput sedacije, seksualne disfunkcije i povećanja telesne mase. Anhedonija, odsustvo zadovoljstva, je jedan od simptoma depresije otporan na terapiju klasičnim antidepresivima. Smatra se da potencijalnu efikasnost u suzbijanju ovog simptoma imaju jedinjenja koja utiču na povećanje dopaminergičke neurotransmisije u limbičkoj regiji. Iz tog razloga, veliku pažnju u proučavanju novih antidepresiva imaju trostruki inhibitori SERT, NET i DAT (eng. *Triple reuptake inhibitors, TRIs*) (193). Sagledavajući važnu ulogu dopamina na nivou CNS-a, istraživanje novih hDAT liganada bi omogućilo razvoj terapeutika sa potencijalnim neuroprotektivnim i antidepresivnim delovanjem.

1.2.8 Histaminski receptori

Histamin pripada grupi biogenih amina i ima ulogu neurotransmitera koji je uključen u regulaciju različitih fizioloških procesa. Nastaje iz aminokiseline L-histidina delovanjem specifične L-histidin dekarboksilaze (eng. *L-Histidine decarboxylase*), dok je njegov dalji metabolizam praćen procesima metilacije ili oksidacije. Zbog svoje široke distribucije u perifernom sistemu, histamin je pokazao važnu ulogu u kontrolisanju imunološke, gastrointestinalne, kardiovaskularne i reproduktivne funkcije. Centralno, histaminski neuroni su najviše prisutni u *tuberomamillary nucleus*-u (TMN) hipotalamusa odakle se projektuju u druge delove mozga i utiču na procese budnosti-spavanja, memorije, učenja, oslobađanja hormona kao i kontrole apetita (194,195).

Svoje delovanje histamin ostvaruje preko četiri vrste receptora koji takođe pripadaju familiji rodopsinu-sličnih G-protein spregnutih receptora, H₁, H₂, H₃ i H₄. Histaminski receptori H₁-H₃ se predominantno nalaze u mozgu, dok je H₄ uglavnom prisutan u perifernim tkivima. Posredstvom H₁-R histamin vrši ekscitaciju holinergičkih neurona i utiče na oslobađanje acetilholina. Pored toga, pokazano je da u dorzalnim jezgrima rafe histamin ispoljava inhibitorno delovanje na serotoninške neurone, dok u *locus coeruleus*-u utiče na ekscitaciju noradrenergičke transmisije (196). Histaminski H₃ autoreceptori vrše inhibiciju oslobađanja i sinteze histamina. Studije su pokazale da antagonisti ovih receptora potencijalno utiču na oslobađanje dopamina u prefrontalnom korteksu, što može biti od značaja u terapiji kognitivnih i negativnih simptoma mentalnih poremećaja (197). Takođe, uočeno je da antagonisti H₃-R ne povećavaju oslobađanje dopamina u *nucleus accumbens*-u i strijatumu, ukazujući na značajnu bezbednost ove grupe jedinjenja u pogledu ekstrapiramidalnih neželjenih efekata.

1.2.9 Histaminski H₁ receptor

Histaminski H₁ receptor (H₁-R) je metabotropni aminergički receptor koji je povezan sa G_qα subjedinicom i utiče na aktivaciju fosfolipaze C i posledično formiranje sekundarnih glasnika, IP₃ i DAG. Pored ovoga, postoje i drugi signalni putevi H₁R koji uključuju formiranje arahidonske kiseline, azot-monoksida i cGMP-a. Histaminski H₁ receptori su najviše zastupljeni u regijama mozga koje su odgovorne za bihevioralnu, neuroendokrinu i nutritivnu kontrolu, kao što su talamus, hipotalamus, korteks, holinergička i aminergička jezgra (194).

Kao i ostali receptori iz GPCR familije, histaminski H₁-R se sastoji od sedam transmembranskih domena koji su međusobno povezani sa tri intracelularna i tri ekstracelularna prevoja. Pored aminokiseline u transmembranskom domenu, pokazano je da i aminokiseline iz ekstracelularnog prevoja 2 imaju ulogu u vezivanju liganada za ovaj receptor (198). Do sada su izolovane dve 3D strukture histaminskog H₁-R, u aktivnom i inaktivnom stanju, što je omogućilo

bolje razumevanje strukturnih osobina ovog receptora, kao i interakcija koje se ostvaruju sa histaminom kao agonistom i doksepinom kao antagonistom u vezivnom mestu delovanja (198,199).

Antihistaminici, lekovi koji se koriste za ublažavanje alergijskih reakcija, deluju kao blokatori perifernih histaminskih H_1 -R. Druga generacija antihistaminika, među kojima su najpoznatiji cetirizin, levocetirizin, loratadin, desloratadin i feksofenadin, je pokazala značajno bolju efikasnost i bezbednost u odnosu na prvu generaciju (200). S obzirom na važnu ulogu histamina u regulaciji budnosti i spavanja, centralni histaminski H_1 -R predstavljaju ciljno mesto dejstva lekova za lečenje insomnije (antagonisti H_1 -R), kao i hipersomnije (agonisti H_1 -R) (201). Takođe, poznato je da antihistaminici koji prolaze krvno-moždanu barijeru (KMB), kao i antidepresivi i antipsihotici deluju kao antagonisti histaminskih H_1 -R, što posledično dovodi do smanjenja neuralne aktivnosti i sedacije (202). Tipični i atipični antipsihotici imaju složenu farmakologiju i interaguju sa nizom serotoninskih, dopaminskih, histaminskih, adrenergičkih i muskarinskih receptora. Studije su pokazale da klopazapin, olanzapin i kvetiapin, koji primarno deluju kao antagonisti $5-HT_{2A}$ i D_2 receptora, poseduju visok sedativni efekat usled antagonističke aktivnosti na H_1 -R (203). Triciklični antidepresivi i SSRI takođe ispoljavaju sedativno delovanje koje u slučaju prisustva insomnije može biti poželjno, dok u slučaju hipersomnije predstavlja neželjeni efekat. Histamin i jedinjenja koja deluju kao agonisti H_1 -R u ventromedijalnom hipotalamusu vrše supresiju unošenja hrane, dok delovanje antagonista utiče na povećanje telesne mase (204). Shodno tome, veliki broj antipsihotika i antidepresiva koji zbog svog neselektivnog delovanja antagonizuju i H_1 -R utiču na nishodnu regulaciju ovih receptora, te posledično povećanje apetita i pojavu gojaznosti (205,206). S obzirom na široku primenu ovih lekova kod složenih mentalnih oboljenja, prevalenca gojaznosti u svetu sve više raste (122).

Iako postoje određene razlike među antipsihoticima u intenzitetu pojave metaboličkih neželjenih efekata, razvoj novih liganada, sa optimalnim dualnim antagonističkim delovanjem na nivou $5-HT_{2A}$ i D_2 receptora, kao i smanjenim afinitetom za histaminski H_1 receptor, predstavlja glavnu smernicu za dalja ispitivanja novih potencijalnih antipsihotika.

1.2.10 Imidazolinski receptori

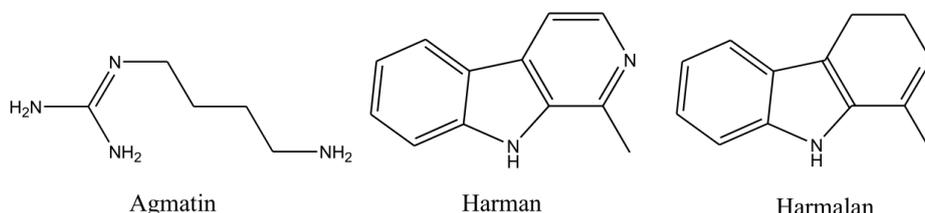
Imidazolinski receptori pripadaju grupi neadrenergičkih receptora, koji su u poslednje vreme tema brojnih multidisciplinarnih istraživanja u cilju boljeg razumevanja njihovih farmakoloških osobina. Istraživanje imidazolinskih receptora kreće sa pronalaženjem klonidina 1960. godine. Inicijalno korišćen kao nazalni dekongestiv, klonidin je pokazao značajan uticaj na krvni pritisak. Najpre je bila prihvaćena hipoteza da klonidin ispoljava hipotenzivni efekat delujući na centralne α_2 -AR. Međutim, proučavanjem noradrenalina, kao i drugih kateholamina, pokazano je da oni ne dovode do efekata sličnih klonidinu u *nucleus reticularis lateralis*-u (NRL). *Bousquet* i saradnici su 1984. godine definisali da centralni hipotenzivni efekat klonidinu sličnih jedinjenja najviše zavisi od imidazolinske strukture koja uslovljava aktivaciju imidazolin-specifičnih receptora u NRL (207). Kasnije studije su pokazale da je hipotenzivni i simpato-inhibitorni efekat rilmenidina posredovan imidazolinskim receptorima u rostralno ventrolateralnoj meduli (RVLM) (208).

Osnovna farmakološka razlika imidazolinskih receptora u odnosu na adrenergičke α_2 receptore je nemogućnost njihove aktivacije kateholaminima. Primarno delovanje imidazolinskih derivata zavisi od aktivacije imidazolinskih receptora, ali je uočeno da ova jedinjenja pokazuju visok afinitet i za α_2 -AR. Za razliku od imidazolinskih receptora čija struktura još uvek nije otkrivena, poznato je da adrenergički α_2 receptori pripadaju GPCR familiji sa tri farmakološka podtipa: α_{2A} , α_{2B} i α_{2C} . Endogeni ligandi poput adrenalina i noradrenalina imaju sličan afinitet za sva tri podtipa. Najveći klinički značaj ima α_{2A} podtip adrenergičkih receptora koji se uglavnom nalazi u CNS-u i odgovoran je za većinu efekata α_2 agonista, poput: sedacije, hipotenzije i analgezije. Efikasnost primene α_2 agonista, kao što su klonidin, gvanfacin i metildopa, u terapiji

esencijalne hipertenzije je dugo proučavana kroz različite studije (209). Smatra se da je glavni mehanizam njihovog delovanja povezan sa inhibicijom oslobađanja noradrenalina preko presinaptičkih α_2 -R, dok je aktivacija mehanizma negativne povratne sprege odgovorna za smanjenje brzine rada srca i krvnog pritiska čime se smanjuje ukupna simpatička aktivnost (210). Uprkos dobroj efikasnosti, prisustvo neželjenih efekata poput sedacije i sušenja usta je potisnulo primenu ovih lekova u terapiji hipertenzije. Otkrivanje značaja imidazolinskih receptora u regulaciji krvnog pritiska je otvorilo nove mogućnosti za unapređenje terapije centralnim antihipertenzivima. Klonidin je neselektivno jedinjenje koje poseduje podjednak afinitet ka imidazolinskim i adrenergičkim α_2 receptorima, dok je rilmenidin razvijen u cilju povećanja selektivnosti ka imidazolinskim receptorima i smanjenja neželjenih efekata posredovanih α_2 -AR (211,212). Studije su pokazale da je optimalna ravnoteža u aktivaciji imidazolinskih i adrenergičkih receptora ključna za ostvarivanje centralnog hipotenzivnog delovanja imidazolinskih derivata. Prema tome, moguće je zaključiti da postoji određena analogija u vezujućim mestima ovih receptorskih sistema.

Imidazolinske receptore je moguće podeliti u tri grupe na osnovu vrste liganada koji ih aktiviraju: I₁-imidazolinski receptori (I₁-IR) koji centralno inhibiraju simpatikus i dovode do sniženja krvnog pritiska; I₂-imidazolinski receptori (I₂-IR) koji imaju važnu ulogu u inflamaciji, analgeziji i neurološkim oboljenjima; i I₃-imidazolinski receptori (I₃-IR) koji učestvuju u regulaciji sekrecije insulina iz pankreasnih β ćelija (59).

Proučavanjem prirode imidazolinskih receptora otkriveno je nekoliko endogenih liganada koji mogu da istisnu klonidin iz receptorskog mesta. Prvi identifikovani ligand bio je agmatin (1-amino-4-guanidinobutan) (Slika 1.8). On nastaje dekarboksilacijom L-arginina dejstvom enzima arginin dekarboksilaze (eng. *Arginine Decarboxylase*). Agmatin je široko distribuiran u telu uključujući mozak gde stupa u interakciju sa brojnim receptorima: imidazolinskim i α -adrenergičkim receptorima; blokira serotoninske 5-HT₃-R, nikotinske holinergičke i NMDA glutamatne receptore; i inhibira sintetazu azot oksida (40). Prethodno je opisana uloga agmatina kod različitih neuroloških i mentalnih oboljenja, kao što su kognitivni poremećaji, depresija, anksioznost i šizofrenija. Drugu grupu endogenih liganada čine β -karbolinski alkaloidi harman i harmalan (Slika 1.8). Oni nastaju kondenzacijom indolamina, triptamina i karboksilnih kiselina kratkog lanca ili aldehida (npr. acetaldehid). β -karbolinski derivati vrše stimulaciju mezolimbičkog sistema, delujući kao selektivni inhibitori MAO-A enzima, i posledično utičući na povećano oslobađanje serotonina i dopamina (213). Pored toga, studije su pokazale da β -karbolini poseduju određeni afinitet vezivanja za 5-HT_{2A} i GABA_A receptore, ukazujući na potencijalnu ulogu ovih derivata u regulaciji neuronske aktivnosti kod depresije (214).



Slika 1.8. Endogeni ligandi imidazolinskih receptora.

Imidazolinski I₁-R

Imidazolinski I₁-R pokazuju najveći afinitet ka 2-aminoimidazolinima poput klonidina, a umereni afinitet ka imidazolinima poput idazoksana. Smatra se da aktivacija I₁-IR dovodi do

povećanog oslobađanja DAG iz fosfolipida, koji potom podstiče sintezu sekundarnih glasnika arahidonske kiseline i niza eikozanoida (215). Ligandi imidazolinskih I₁-R ispoljavaju centralno hipotenzivno delovanje. Klonidin je prvi identifikovani ligand I₁-IR sa antihipertenzivnim dejstvom (Slika 1.9). Istraživanja su pokazala da najveći afinitet poseduje za I₁-IR (pK_i = 7,26) i α₂-AR (pK_i = 7,21), dok je nešto manja aktivnost uočena na I₂-IR (pK_i = 6,02). U cilju smanjenja neželjenih efekata posredovanih aktivacijom α₂-AR, izvršene su strukturne modifikacije klonidina koje su uslovile razvoj liganada sa selektivnim delovanjem na I₁-IR, moksonidina i rilmenidina (Slika 1.9) (216).

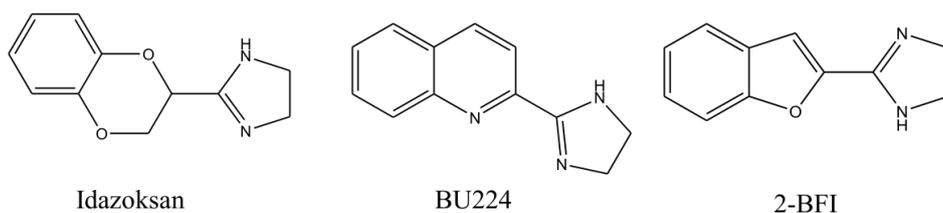


Slika 1.9. Ligandi imidazolinskih I₁ receptora.

Imidazolinski I₂-R

Brojne studije su pokazale da I₂-IR predstavljaju potencijalno važna ciljna mesta dejstva u terapiji različitih psihijatrijskih i neurodegenerativnih oboljenja (59,93,217–221). Naime, ovi receptori se nalaze na spoljašnjoj membrani mitohondrija u astrocitima, koje su bogate reaktivnim jedinjenjima kiseonika i azota. Poremećaj funkcije mitohondrija posledično dovodi do nastanka oksidativnog stresa koji je u osnovi patogeneze brojnih neuroloških oboljenja (222). Proučavanjem selektivnih I₂-IR liganada dokazana je njihova potencijalna efikasnost u terapiji kognitivnih poremećaja neurodegenerativnih bolesti. Pored toga, I₂-IR su visoko homologni sa MAO enzimom, koji učestvuje u oksidativnoj deaminaciji neurotransmitera poput noradrenalina, dopamina i serotonina. Eksperimentalno je dokazano da I₂-IR predstavljaju alosterno aktivno mesto lokalizovano na ovom enzimu, dok je poremećaj njegove funkcije povezan sa razvojem brojnih psihijatrijskih oboljenja (223,224). Ligandi I₂-IR poznati kao BU224 (2-[4,5-dihidroimidaz-2-il]-hinolin) i 2-BFI (2-(2-benzofuranil)-2-imidazolin), reverzibilno inhibiraju A izoformu MAO enzima, što ukazuje na njihov potencijalni mehanizam delovanja (Slika 1.10) (225). Dodatna eksperimentalna ispitivanja su pokazala da 2-DMPI (2-(3,4-dimetoksi-fenil)-4,5-dihidro-1H-imidazol) i 2-BFI, pored inhibicije MAO enzima utiču i na modulaciju dopaminske i serotoninske neurotransmisije, ukazujući na potencijalno antidepresivno delovanje ovih liganada (226,227).

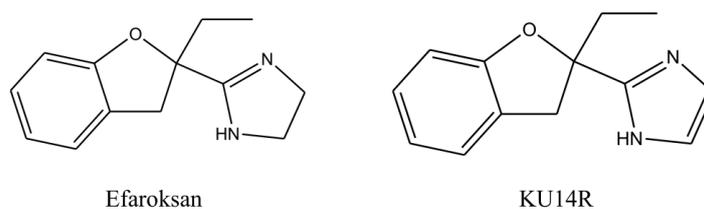
Nedostatak informacija o 3D strukturi I₂-IR ograničava proučavanje funkcije i farmakološku karakterizaciju na metode koje su zasnovane na strukturama selektivnih liganada. Strukturno, ligande I₂-IR je moguće podeliti na derivate imidazolina, koji su najselektivniji, 2-aminoimidazolina, gvanidina i kربولina. Idazoksan je predstavnik grupe imidazolina koji svoje dejstvo ispoljava i kao antagonista α₂-AR. Iako poseduje slabu selektivnost između ova dva receptora (pK_{i12} = 8,37; pK_{iα2} = 7,72), idazoksan predstavlja osnovu za dizajniranje i razvoj novih potentnih i selektivnijih liganada (Slika 1.10) (228). Dizajniranje i sinteza liganada sa selektivnim delovanjem na I₂-IR predstavlja potencijalnu osnovu za razvoj novih lekova za terapiju složenih CNS oboljenja.



Slika 1.10. Ligandi imidazolinskih I₂ receptora.

Imidazolinski I₃-R

Imidazolinski I₃-R imaju ulogu u regulaciji sekrecije insulina iz pankreasnih β ćelija. Smatra se da imidazolinska jedinjenja posredstvom I₃-IR utiču na ATP-osetljive kalijumove kanale (eng. *ATP-sensitive potassium channels*, K_{ATP}), uzrokujući smanjenu brzinu efluksa kalijuma, koja je dalje praćena depolarizacijom membrane i pokretanjem sekrecije insulina (217). Insulinotropni efekat efaroksana, kao agoniste I₃-IR, je posredovan zatvaranjem K_{ATP} kanala (Slika 1.11). KU14R je njegov imidazolni analog koji smanjuje povećanu sekreciju insulina koju aktivira efaroksan (Slika 1.11). Antagonistički efekat KU14R je povezan sa otvaranjem K_{ATP} kanala (229). S obzirom na potencijalnu mogućnost imidazolinskih derivata da utiču na modulaciju sekrecije insulina preko I₃-IR, ovaj receptor može biti ciljno mesto dejstva novih antidijabetičkih lekova.



Slika 1.11. Ligandi imidazolinskih I₂ receptora.

1.2.11 Opšte osobine jedinjenja za lečenje neuroloških i mentalnih oboljenja

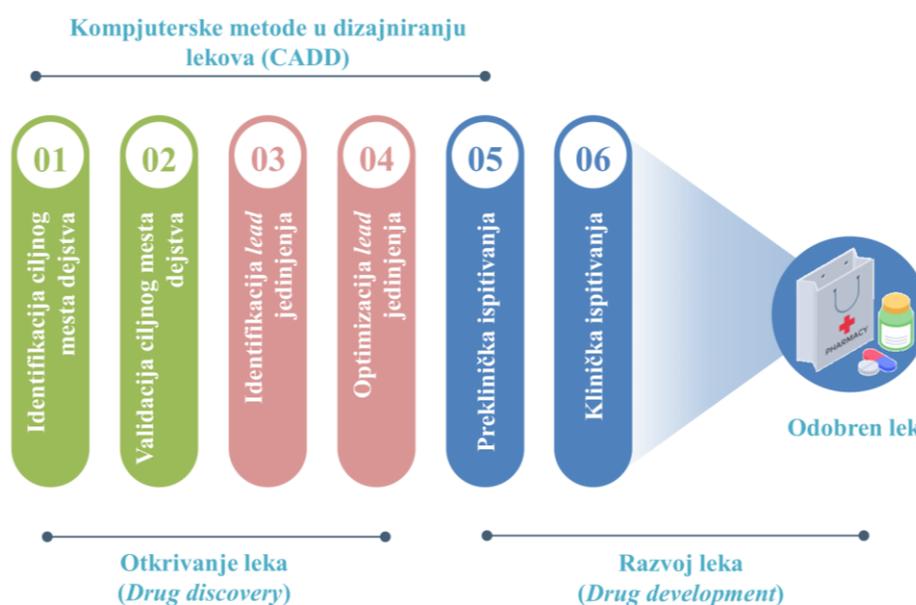
Kao što je prethodno opisano, različiti receptorski sistemi, poput serotoninskih, dopaminskih, histaminskih, adrenergičkih i imidazolinskih, su uključeni u regulaciju složenih patogenetskih procesa neuroloških i mentalnih oboljenja. Klozapin, ziprazidon i risperidon su široko primenjivani atipični antipsihotici koji se koriste u terapiji šizofrenije, ali i drugih neuroloških oboljenja praćenih pojavom psihotičnih simptoma. Klozapin je bio prvi otkriveni atipični antipsihotik sa smanjenim rizikom od pojave EPS, koji se koristio u terapiji mentalnih poremećaja. I dalje se smatra „zlatnim standardom“ u lečenju šizofrenije otporne na druge lekove. Međutim, njegova primena je u najvećoj meri potisnuta zbog izazivanja ozbiljnog neželjenog efekta, agranulocitoze. Složeni farmakološki profil delovanja klozapina na histaminskim (H₁), serotoninskim (5-HT_{2C}), muskarinskim (M₃) i adrenergičkim (α₁) receptorima je praćen pojavom neželjenih efekata poput sedacije, hiperglikemije, dislipidemije i povećanja telesne mase (230). Sa farmakokinetičkog aspekta, klozapin u velikoj meri podleže presistemskom metabolizmu posredstvom CYP3A4 enzima, gde samo 27-50% doze dospeva u sistemsku cirkulaciju (231). Ziprazidon i risperidon pripadaju novijoj grupi atipičnih antipsihotika koji takođe efikasno kontrolišu pozitivne i negativne simptome psihoza, ali sa smanjenom incidencijom neželjenih efekata. Oba jedinjenja poseduju niži afinitet za histaminski H₁ receptor u poređenju sa klozapinom,

što posleđično utiče i na smanjenje metaboličkih neželjenih efekata. Određene studije su pokazale da risperidon pri većim dozama gubi svoju „atipičnost“ jer se povećava afinitet ka D_2 -R i dovodi do pojave EPS. Nakon oralne primene risperidon postiže visoku biološku raspoloživost. U jetri se uglavnom metaboliše preko CYP2D6 enzima, i u manjoj meri CYP3A4, koji utiču na formiranje njegovog aktivnog metabolita, 9-hidroksi-risperidona (231,232). U poređenju sa risperidonom, ziprazidon poseduje bolji bezbednosni profil. Karakteriše ga niska incidenca sedativnih efekata i pojave ekstrapiramidalnih simptoma. Za razliku od većine atipičnih antipsihotika, ziprazidon ne poseduje antiholinergičke neželjene efekte i u manjoj meri utiče na hiperprolaktinemiju. Ipak, glavno neželjeno dejstvo ziprazidona je uticaj na produžavanje QT intervala (233). Ziprazidon karakteriše visoka oralna biološka raspoloživost ($> 60\%$) i visok procenat vezivanja za proteine plazme ($> 99\%$). U najvećoj meri se metaboliše putem CYP3A4 enzima u jetri (233). Novije studije su pokazale važnu ulogu lumateperona u lečenju mentalnih i depresivnih poremećaja (234). Lumateperon deluje kao potentni antagonist 5-HT_{2A}/D₂-R, inhibitor serotoninskog transportera, kao i modulator NMDA receptora. Metaboliše se preko CYP3A4 enzima i u visokom procentu vezuje za proteine plazme (97,4%) (235). U poređenju sa ostalim antipsihoticima, lumateperon poseduje minimalan afinitet za histaminske i muskarinske receptore. Lekovi iz SSRI grupe imaju široku primenu u lečenju oboljenja udruženih sa depresijom. Međutim, primena selektivnih SERT inhibitora je praćena pojavom brojnih neželjenih efekata koji su posredovani povećanjem ekstracelularnog nivoa serotonina. Neželjeni efekti SSRI su u najvećoj meri praćeni pojavom kardiovaskularnih problema, insomnije/hipersomnije, povećanja telesne mase i seksualne disfunkcije. Studije su pokazale da potencijalnu efikasnost u suzbijanju neželjenih efekata antidepresiva imaju ligandi sa antagonističkim delovanjem na serotoninskim 5-HT_{2A}-R (236). Tome doprinosi i činjenica da su odobrene fiksne kombinacije fluoksetina i olanzapina u terapiji velikog depresivnog poremećaja, psihotične depresije i akutne bipolarnе depresije (237). Prema tome, razvoj novih jedinjenja koji utiču na modulaciju aktivnosti različitih receptorskih sistema u mozgu ima veliki značaj u lečenju složenih neuroloških i mentalnih oboljenja. Potencijalno važnu ulogu u lečenju CNS oboljenja imaju i ligandi imidazolinskih I₂-R. Brojne studije su ukazale na neuroprotektivna svojstva selektivnih liganada I₂-IR, ali još uvek nema kandidata koji su ušli u kliničku fazu ispitivanja. LSL60101 je reprezentativno jedinjenje ove grupe za koje je dokazano da poseduje antiinflamatorni efekat koji može uticati na progresiju neurodegenerativnih oboljenja (238). S obzirom na to da je funkcija I₂-IR u fiziološkim uslovima još uvek nepoznata, nova istraživanja u ovoj oblasti će omogućiti proučavanje njihove uloge u različitim neurološkim i mentalnim oboljenjima, kao i formiranje novih terapijskih strategija zasnovanih na primeni selektivnih liganada I₂-IR.

1.3 Kompjuterske metode u dizajniranju lekova

Istraživanje i razvoj novih lekova predstavlja kompleksan i dugotrajan proces koji zahteva velika novčana ulaganja. Farmaceutске kompanije u proseku utroše 2,6 milijardi dolara i više od 10 godina istraživanja do uvođenja leka na tržište (239). Iz tog razloga postoji sve veća potreba za uvođenjem novih metodologija koje bi omogućile ubrzanje procesa istraživanja i razvoja lekova (eng. *Research and Development*, R&D). Identifikacija potencijalnog ciljnog mesta dejstva za određenu bolest, vodećeg (eng. *lead*) jedinjenja, kao i racionalni dizajn čine prve korake u ovom procesu (Slika 1.12). Nakon identifikacije ciljnog mesta dejstva, različite skrining (eng. *screening*) metode omogućavaju pretraživanje velikih baza podataka u cilju identifikacije vodećeg (eng. *lead*) jedinjenja (Slika 1.12). Vodeće (eng. *lead*) jedinjenje predstavlja hemijsko jedinjenje koje poseduje farmakološku aktivnost od interesa. Racionalni dizajn se odnosi na njegovu dalju optimizaciju u cilju povećanja aktivnosti, selektivnosti i poboljšanja farmakokinetičkih osobina (240).

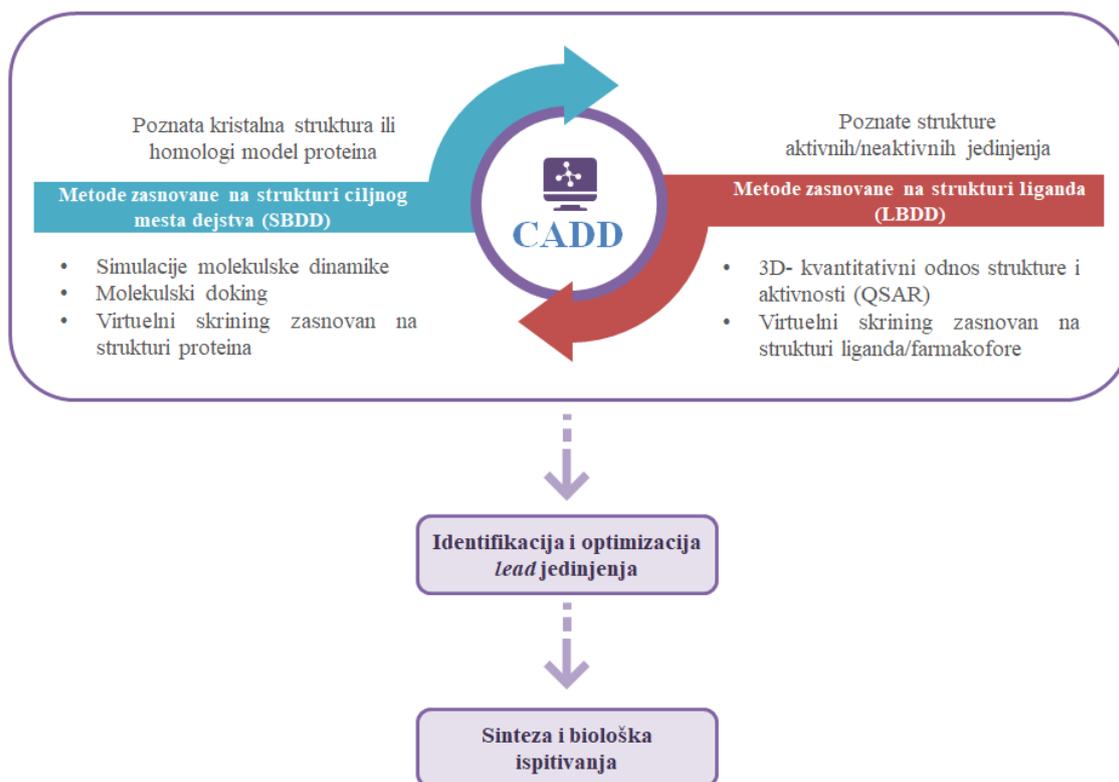
Primena kompjuterskih metoda u dizajniranju lekova (eng. *Computer-Aided Drug Design*, CADD) zauzima sve veći značaj u procesu otkrića i razvoja novih lekova (Slika 1.12) (241,242). Ekonomičnost, pouzdanost i ušteda vremena predstavljaju samo neke od pogodnosti njihovog korišćenja u različitim fazama istraživanja. Poseban značaj zauzimaju u ranim fazama istraživanja omogućavajući analiziranje velikih baza podataka i utičući na smanjenje broja jedinjenja koje je potrebno sintetisati i ispitati *in vitro* (243).



Slika 1.12. Pozicija kompjuterskih metoda u procesu otkrića i razvoja lekova (242).

Na osnovu informacija koje su dostupne o ciljnom mestu dejstva od interesa, kao i ligandima, kompjuterske metode je moguće podeliti u dve grupe (Slika 1.13):

- metode zasnovane na strukturi liganda (eng. *Ligand-Based Drug Design*, LBDD) i
- metode zasnovane na strukturi ciljnog mesta dejstva (eng. *Structure-Based Drug Design*, SBDD).



Slika 1.13. Prikaz najčešće korišćenih kompjuterskih metoda u dizajniranju lekova (CADD) (242).

1.3.1 Metode zasnovane na strukturi liganda

Metode zasnovane na strukturi liganda (eng. *Ligand-Based Drug Design*, LBDD) se nazivaju još i indirektno jer se koriste u slučajevima kada struktura ciljnog mesta dejstva od interesa nije poznata. Dizajniranje novih jedinjenja sa željenim osobinama se zasniva na proučavanju 2D ili 3D struktura već poznatih liganada koji ostvaruju svoje dejstvo na izabranom receptoru. Metoda kvantitativnog odnosa strukture i aktivnosti (eng. *Quantitative Structure-Activity Relationship*, QSAR) kao i metoda kvantitativnog odnosa strukture i osobina jedinjenja (eng. *Quantitative Structure-Property Relationship*, QSPR) su jedne od najčešće korišćenih metoda iz ove grupe.

QSAR/QSPR pristupi se baziraju na primeni različitih matematičkih i statističkih metoda u cilju razvoja modela koji mogu sa određenom tačnošću predvideti biološku aktivnost i osobine jedinjenja na osnovu njihove strukture. U osnovi, formira se matematička zavisnost između biološke aktivnosti (ili neke druge osobine od interesa) jedinjenja i strukturnih osobina (molekulskih deskriptora) jedinjenja. QSAR/QSPR modeli se dalje mogu koristiti za predviđanje aktivnosti/osobina novih strukturnih analoga, kao i proučavanje farmakofore ispitivanih liganada.

1.3.1.1 Formiranje 3D-QSAR modela

3D-QSAR (eng. *3D- Quantitative Structure-Activity Relationship*) modelovanje je jedan od najčešće korišćenih pristupa u QSAR analizi. Zasniva se na primeni deskriptora koji uzimaju u obzir trodimenzionalne (3D) prezentacije molekularskih struktura, omogućavajući bolje razumevanje strukturnih osobina jedinjenja i definisanje ključnih karakteristika koje su važne za ispoljavanje

aktivnosti na određenom ciljnom mestu delovanja (244). Postoji veliki broj metoda koje mogu biti u osnovi 3D-QSAR modela. Jedna od njih je CoMFA (eng. *Comparative Molecular Field Analysis*) čiji je glavni nedostatak zahtev za poravnanjem jedinjenja (245). U cilju prevazilaženja problema prostornog poravnanja struktura, razvijen je GRIND (eng. *GRID Independent Descriptors*) metod.

Polja molekulskih interakcija (eng. *Molecular Interaction Fields*, MIF) imaju veoma važnu ulogu u opisivanju sposobnosti liganda da stupi u interakciju sa makromolekulima, poput receptora ili enzima. MIF-ovi predstavljaju interakciju između jedinjenja tj. funkcionalne grupe i određene hemijske probe koja se nalazi u 3D mreži oko jedinjenja (Slika 1.14). Probe predstavljaju fizičko-hemijske osobine ciljnog mesta dejstva ispitivanog liganda (246). Četiri vrste hemijskih proba se koriste za sagledavanje hidrofobnih, elektrostatičkih i sternih svojstava zamišljenog receptorskog mesta:

- TIP proba – opisuje sterne interakcije i predstavlja oblik jedinjenja;
- DRY proba – opisuje hidrofobne interakcije;
- N1 proba – opisuje grupe koje su donori vodonične veze i definiše prisustvo funkcionalne grupe na jedinjenju sa osobinama akceptora vodonične veze;
- O proba – opisuje grupe koje su akceptori vodonične veze i definiše prisustvo funkcionalne grupe na jedinjenju sa osobinama donora vodonične veze.

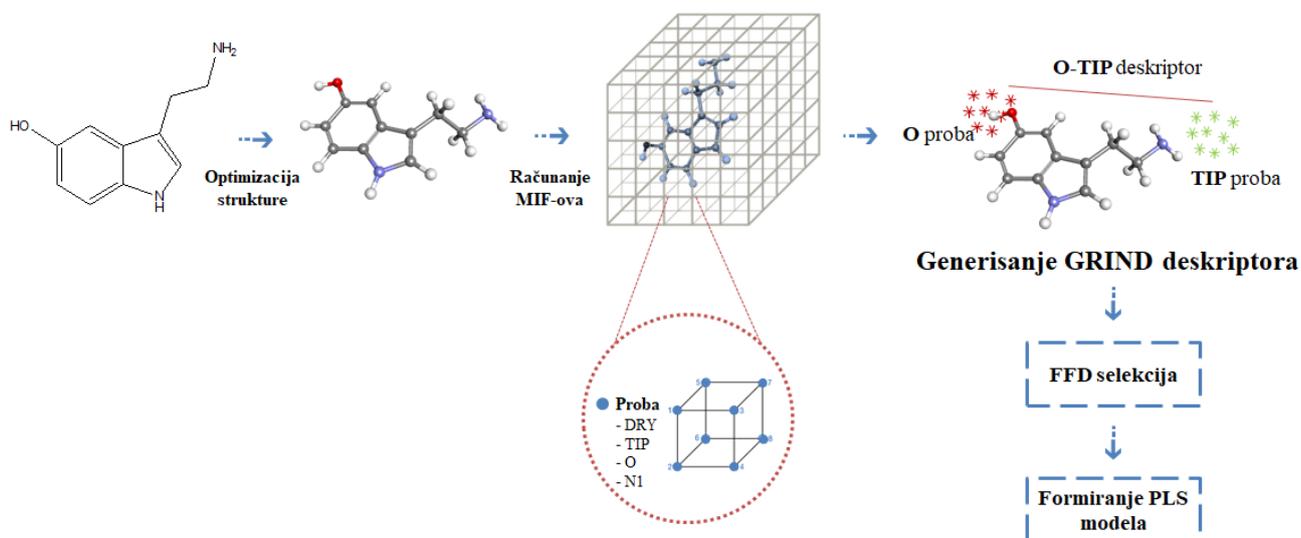
Računanje MIF interakcija se zasniva na primeni Lenard-Džonsovih (*Lennard-Jones*) i Kulonovih (*Coulomb*) potencijala kao što je prikazano u jednačini (1), uzimajući u obzir potencijale molekulske lipofilnosti, polarizabilnosti i potencijal vodonične veze (247).

$$E = E_{VDW} + E_{EL} + E_{HB} + S \quad (1)$$

Gde E_{VDW} definiše *Van der Waals* (VdW) energiju, E_{EL} elektrostatičku energiju, E_{HB} opisuje energiju vodonične veze, a parametar S se odnosi na entropiju.

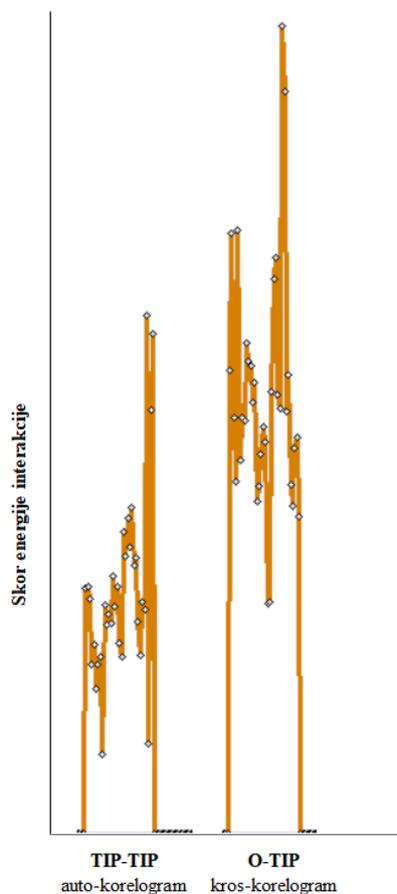
Polja molekulskih interakcija se široko primenjuju u računanju 3D molekulskih deskriptora koji se mogu koristiti za formiranje QSAR modela i proučavanje farmakofore liganada. Takođe, poseduju veoma važnu ulogu u *in silico* dizajnu novih lekova ukoliko struktura ciljnog mesta dejstva nije poznata. Izračunate MIF interakcije između liganda i probe omogućavaju predviđanje vezujućih mesta proučavanih liganada na proteinima.

GRIND deskriptori su 3D molekulski deskriptori koji se dobijaju iz polja molekulskih interakcija (Slika 1.14) (248). GRIND metod za formiranje 3D-QSAR modela se zasniva na računanju GRID nezavisnih deskriptora i generisanju varijabli koje su nezavisne od međusobne pozicije ili orijentacije jedinjenja u 3D mreži (249).



Slika 1.14. Formiranje 3D-QSAR modela na osnovu GRID nezavisnih deskriptora.

Pentacle je jedan od programa koji se bazira na računanju GRIND deskriptora (250). Nakon što se za optimizovano jedinjenje izračuna inicijalno veliki broja MIF-ova, potrebno je izdvojiti regione sa energetski najpovoljnijom interakcijom između liganda i probe, koji se još nazivaju i čvorni regioni (eng. *nodes*). Diskretizacioni algoritmi ALMOND i AMANDA omogućavaju izdvajanje najrelevantnijih regiona iz svakog polja. ALMOND se zasniva na primeni *Fedorov*-og optimizacionog algoritma i vrši izdvajanje regiona uzimajući u obzir intenzitet polja u čvornom regionu, kao i međusobna rastojanja između izabranih čvorova. AMANDA algoritam se zasniva na prefiltriranju čvornih regiona prema graničnoj (eng. *cut-off*) vrednosti energije, u cilju uklanjanja regiona sa slabim i nespecifičnim interakcijama (249,251). Informacije iz MIF-ova se potom prevode u GRIND varijable primenom CLACC (eng. *Consistently Large Auto and Cross correlation*) algoritma u programu *Pentacle* (252). Frakcioni faktorski dizajn (eng. *Fractional Factorial Design*, FFD) se koristi za redukovanje broja inicijalno izračunatih deskriptora, u cilju smanjenja mogućnosti za dobijanje pretreniranih modela (eng. *overfitting*) (253). Finalno generisani GRIND deskriptori predstavljaju parove dve iste probe (npr. TIP-TIP) ili dve različite probe (O-TIP) na određenoj udaljenosti. Rezultati se prikazuju u obliku auto-korelograma i kros korelograma, gde je svaki deskriptor definisan jačinom interakcije između čvornih regiona i odgovarajućom distancom na kojoj se nalaze (Slika 1.15). Program *Pentacle* vrši skaliranje energije interakcije prikazujući je u obliku skora čije su vrednosti u opsegu od 0 (nepoželjne interakcije) do 1 (poželjne interakcije). Na ovaj način se omogućava definisanje značajnosti svakog GRIND deskriptora u formiranom modelu.



Slika 1.15. Prikaz auto-korelograma i kros-korelograma u programu *Pentacle*.

Izračunati GRIND deskriptori se dalje mogu koristiti u analizi glavnih komponenti (eng. *Principal Component Analysis*, PCA), kao i za formiranje regresionih modela primenom metode parcijalnih najmanjih kvadrata (eng. *Partial Least Square Regression*, PLS). Na osnovu PCA analize moguće je izvršiti selekciju jedinjenja za trening i test set prilikom formiranja 3D-QSAR modela. Zbog velikog broja inicijalno izračunatih GRIND deskriptora, PLS analiza predstavlja metodu izbora za generisanje prediktivnih 3D-QSAR modela. U osnovi, PLS je linearni regresioni metod koji omogućava definisanje korelacije između proučavanih GRIND deskriptora (nezavisne varijable-*X*) i biološke aktivnosti (zavisne varijable-*Y*). U cilju prevazilaženja problema velikog broja interkorelišućih deskriptora, PLS analiza vrši projekcije na latentne strukture (eng. *Projection to Latent Structures*). Primarno izračunati deskriptori se transformišu u novi ortogonalni prostor u cilju formiranja manjeg broja novih međusobno nezavisnih varijabli koje se nazivaju latentne varijable (eng. *Latent Variable*, LV). Linearni regresioni model se formira na osnovu nekoliko novih latentnih varijabli, koje predstavljaju linearnu kombinaciju originalnih varijabli (254). Unakrsna validacija (eng. *Cross-Validation*, CV) predstavlja pouzdan način za procenu prediktivnog značaja svake PLS komponente, na osnovu čega se određuje optimalan broj LV u modelu (255). Krajnji rezultat čini skup najznačajnijih nezavisnih varijabli koje najbolje opisuju zavisnu varijablu.

1.3.1.2 Formiranje QSPR modela

QSPR modeli omogućavaju sagledavanje uticaja hemijskih karakteristika jedinjenja, kodiranih u formi molekularskih deskriptora, na određenu osobinu od interesa. Suštinski, molekularski deskriptori predstavljaju hemijske osobine jedinjenja koje su izražene u numeričkoj formi, a

moguće ih je podeliti na: konstitucionalne, topološke, geometrijske, elektronske i termodinamičke deskriptore (256).

Konstitucionalni deskriptori nose informaciju o strukturi jedinjenja, bez informacija o topologiji. Neki od najčešćih deskriptora iz ove grupe su: molekulska masa, broj atoma, vrsta atoma, broj veza i broj prstenova. Njihove vrednosti su iste za različita konformaciona stanja i ne razlikuju se između izomera. Topološki deskriptori pripadaju grupi 2D deskriptora i uzimaju u obzir raspored atoma u jedinjenju. Oni kodiraju informacije o obliku liganda, veličini, prisustvu heteroatoma, prisustvu višestrukih veza, kao i račvanju (257). Za razliku od topoloških deskriptora, geometrijski deskriptori poseduju veću diskriminacionu moć između sličnih hemijskih struktura kao i informacije o molekulskim konformacijama. Zasnovani su na 3D strukturi jedinjenja, pa iz tog razloga njihovom računanju prethodi geometrijska optimizacija proučavanih jedinjenja (256). Opisivanje elektronskih osobina liganada je bazirano na računanju elektronskih deskriptora, dok termodinamički deskriptori korelišu sa određenim fizičko-hemijskim osobinama jedinjenja (256).

Neke od najčešće korišćenih matematičkih metoda za formiranje QSPR modela su: multilinearne regresija (eng. *Multiple Linear Regression*, MLR), metoda parcijalnih najmanjih kvadrata (PLS), metoda podržavajućih vektora (eng. *Support-Vector Machine*, SVM), kao i veštačke neuronske mreže (eng. *Artificial Neural Network*, ANN).

1.3.1.2.1 Multilinearne regresija

MLR je jedna od najčešće korišćenih tehnika za generisanje linearne zavisnosti između proučavanih deskriptora (nezavisne varijable) i osobine jedinjenja (zavisne varijable). Karakterišu je transparentnost i jednostavna interpretacija. Jednačina za MLR model je:

$$Y = a_0 + a_1 \times X_1 + a_2 \times X_2 + a_3 \times X_3 + \dots + a_n \times X_n \quad (2)$$

Zavisna varijabla je predstavljena sa Y , dok su $X_1, X_2, X_3, \dots, X_n$ nezavisne varijable tj. deskriptori praćeni regresionim koeficijentima $a_1, a_2, a_3, \dots, a_n$. Konstanta modela je izražena sa a_0 .

Ograničenje ove metode predstavlja veliki broj deskriptora koje je potrebno ispitati. U tom slučaju je pre formiranja modela potrebno pristupiti njihovoj selekciji primenom određenih metoda kao što su postupna (eng. *stepwise*) MLR analiza ili genetički algoritam (eng. *Genetic Algorithm*, GA). Postupna MLR analiza omogućava selekciju najvažnijih varijabli njihovim postepenim dodavanjem u model i evaluacijom statističke značajnosti u svakom koraku. Ukoliko varijabla nije značajna, ona se uklanja iz modela na osnovu definisanih kriterijuma (258).

1.3.1.2.2 Metoda parcijalnih najmanjih kvadrata

Za razliku od MLR metode, PLS analiza omogućava analiziranje velikog broja interkorelišućih deskriptora. Značajnost svake nezavisne varijable u modelu (X) se procenjuje na osnovu vrednosti VIP (eng. *Variable Importance in the Projection*) parametra. VIP parametar se izračunava kao ponderisana (eng. *weighted*) suma kvadrata PLS težina (eng. *weights*, w) i predstavlja meru uticaja svake varijable prema varijansi objašnjenju PLS komponentom (259). Varijable sa VIP koeficijentom većim od 1 su najznačajnije za predviđanje i proučavanje zavisne varijable. Umerenu značajnost imaju deskriptori sa VIP koeficijentom između 0,5 i 1, dok oni sa VIP vrednostima manjim od 0,5 nemaju značajan uticaj na zavisnu varijablu (260). Prema tome, deskriptori se postepeno uklanjaju iz PLS modela na osnovu njihove izračunate VIP vrednosti dok se ne dobije optimalan model sa najboljim vrednostima statističkih parametara.

1.3.1.2.3 Metoda podržavajućih vektora

Metoda podržavajućih vektora ili SVM pripada metodama mašinskog učenja i ima veliki značaj prilikom pojave problema poput malog broja uzoraka i nelinearne zavisnosti (261). Regresioni SVM model omogućava predviđanje izlazne vrednosti (zavisne varijable) na osnovu definisanih deskriptora koji čine ulazne vrednosti. U osnovi, vrši se preslikavanje podataka u prostor veće dimenzije primenom transformacije jezgra (eng. *kernel*), što je moguće objasniti sledećom jednačinom:

$$K(x, y) = \langle \Phi(x) \times \Phi(y) \rangle \quad (3)$$

Gde se K odnosi na funkciju jezgra, a Φ na preslikavanje iz ulaznog prostora $X \in x, y$ u izlazni. Moguće je razlikovati nekoliko funkcija jezgra za nelinearno transformisanje ulaznog prostora, među kojima je jedna od najčešćih Gausova radijalna bazna funkcija (eng. *Radial Basis Function*, RBF). Nakon transformacije jezgra, u novom prostoru je moguće primeniti postupak linearne zavisnosti. Za validaciju performansi modelovanja najčešće se koristi višeslojna unakrsna validacija (eng. *k-fold cross validation*), sa pet ili deset slojeva, koja je praćena variranjem parametara: C -parametar kapaciteta, ε - ε -neosetljive funkcije gubitka i γ - koji kontroliše amplitudu Gausove funkcije (262).

1.3.1.2.4 Veštačke neuronske mreže

Veštačke neuronske mreže takođe pripadaju metodama mašinskog učenja i zasnivaju se na oponašanju funkcije bioloških neurona i ljudskog mozga. U osnovi, ANN predstavlja skup velikog broja međusobno povezanih neurona koji omogućavaju simulaciju neuroloških procesa u mozgu čoveka (263). Neuronske mreže se strukturno sastoje od nekoliko slojeva: ulaznog, skrivenog i izlaznog sloja. Broj neurona u prvom (ulaznom) sloju zavisi od broja ulaznih varijabli koje se koriste za formiranje matematičkih modela. Skriveni sloj vrši obradu podataka i prosleđuje rezultate do izlaznog sloja, koji predstavlja krajnji rezultat (zavisnu varijablu koja se prati). Složene neuronske mreže se mogu sastojati od više skrivenih slojeva, čiji se optimalan broj neurona određuje procesom treniranja. Svi slojevi su međusobno povezani, dok se jačina veze između neurona definiše težinskim faktorom (eng. *weight*) (264). Hemometrijska analiza primenom ANN metode omogućava prevazilaženje problema nelinearne zavisnosti između ispitivanih varijabli, a značajnu prednost ima u proučavanju velikog broja podataka. Nedostatak ove metode se odnosi na mogućnost formiranja pretreniranih modela tj. modela koji su u velikoj meri prilagođeni trening setu, čime se smanjuje njegova sposobnost predviđanja.

1.3.1.3 Validacija QSAR/QSPR modela

Cilj svake QSAR/QSPR studije je razvoj validiranog modela sa dobrom moći predviđanja. OECD (eng. *Organisation for Economic Co-operation and Development*) principi definišu osnovna pravila koje je potrebno poštovati prilikom razvoja pouzdanog i reproducibilnog QSAR modela (265). Iz tog razloga, neophodno je primeniti različite validacione tehnike u cilju ispitivanja i potvrđivanja pouzdanosti, stabilnosti i prediktivnosti formiranog modela.

1.3.1.3.1 Interna validacija

Interna validacija QSAR/QSPR modela je bazirana na jedinjenjima koja se koriste za razvoj modela tj. trening set jedinjenjima. Statistički parametri koji se najčešće koriste za internu validaciju formiranih modela su: koeficijent determinacije, R^2 (4); predviđena suma kvadrata, PRESS (eng. *Predicted Residual Sum of Squares*) (5); interni validacioni parametar, Q^2 (eng. *Cross-Validated Squared Correlation Coefficient*) (6); kao i srednja kvadratna greška procene, RMSEE (eng. *Root Mean Square Error of Estimation*) (7) (266).

$$R^2 = \frac{\sum(Y_{\text{exp}(treening)} - Y_{\text{pred}(treening)})^2}{\sum(Y_{\text{exp}(treening)} - \bar{Y}_{\text{exp}(treening)})^2} \quad (4)$$

$$PRESS = \sum_{i=1}^n e_{(i)}^2 \quad (5)$$

$$Q^2 = 1 - \frac{PRESS}{\sum(Y_{\text{exp}(treening)} - \bar{Y}_{\text{exp}(treening)})^2} \quad (6)$$

$$RMSEE = \sqrt{\frac{PRESS}{n}} \quad (7)$$

U jednačinama (4) i (6) $Y_{\text{exp}(treening)}$ parametar se odnosi na eksperimentalno dobijene vrednosti zavisne varijable za trening set jedinjenja, dok $Y_{\text{pred}(treening)}$ predstavlja vrednosti predviđene modelom. $\bar{Y}_{\text{exp}(treening)}$ se odnosi na srednju vrednost eksperimentalno dobijene zavisne varijable trening set jedinjenja. Parametar $e_{(i)}$ u jednačini (5) predstavlja razliku između eksperimentalnih i predviđenih Y vrednosti, dok je n u jednačini (7) broj jedinjenja u trening setu.

Interni parametri validacije omogućavaju procenu prediktivnosti i robustnosti modela. Vrednosti Q^2 veće od 0,5 ukazuju na tačnost u predviđanju formiranog QSAR/QSPR modela za trening set jedinjenja. Takođe, greška u predviđanju zavisne varijable formiranim modelom za trening set se definiše RMSEE parametrom, čija vrednost treba biti što manja (255,267).

Ipak, određene studije su pokazale da iako niske vrednosti Q^2 ukazuju na loš model, visoke vrednosti treba razmatrati sa oprezom i uraditi dodatnu validaciju modela (268). Povećanje broja deskriptora u odnosu na broj jedinjenja povećava i šansu za dobijanjem većih Q^2 vrednosti. Parametrima interne validacije nije moguće proceniti prediktivnost modela kada se on primeni za potpuno novi set jedinjenja (test set), koji nije učestvovao u njegovom formiranju. Iz tog razloga, formirani su parametri eksterne validacije koji se računaju na osnovu rezultata analize test seta.

1.3.1.3.2 Eksterna validacija

U cilju procene prediktivnosti i primenljivosti razvijenih QSAR/QSPR modela u proučavanju novog seta podataka koriste se različiti parametri eksterne validacije. Neki od njih su: R_{pred}^2 , kojim se predstavlja stepen korelacije između eksperimentalnih i predviđenih vrednosti za test set jedinjenja (8); kao i srednja kvadratna greška predviđanja, RMSEP (eng. *Root Mean Square Error of Prediction*) (9) (267).

$$R_{\text{pred}}^2 = 1 - \frac{PRESS}{\sum(Y_{\text{exp}(test)} - \bar{Y}_{\text{exp}(treening)})^2} \quad (8)$$

$$RMSEP = \sqrt{\frac{PRESS}{n}} \quad (9)$$

Parametar $Y_{\text{exp}(test)}$ se odnosi na eksperimentalno dobijene vrednosti zavisne varijable za test set jedinjenja, dok je $\bar{Y}_{\text{exp}(treening)}$ srednja vrednost Y varijable za trening set. PRESS parametar se računa prema prethodno navedenoj jednačini (5). U jednačini (9), n se odnosi na broj jedinjenja u test setu.

QSAR/QSPR model sa dobrom moći predviđanja bi trebao imati vrednost R_{pred}^2 veću od 0,5, dok greška predviđanja modela za test set jedinjenja, izražena RMSEP parametrom, treba biti što manja ($\leq 2RMSEE$) (255,266,268).

Interni parametar validacije Q^2 kao i eksterni R^2_{pred} se često koriste za tumačenje prediktivnosti modela, međutim oba parametra zavise od srednje vrednosti Y varijable za trening set jedinjenja. Njihovo računanje je u oba slučaja kontrolisano izrazom „ $\sum(Y_{exp(trening/test)} - \bar{Y}_{exp(trening)})^2$ “. Iz tog razloga, vrednosti ovih parametara su zavisne od opsega zavisne varijable i ne mogu sa tačnošću da predstave devijaciju predviđenih u odnosu na eksperimentalne vrednosti (266). Sa ciljem da se što preciznije opiše prediktivna sposobnost formiranog QSAR/QSPR modela za eksterni test set, razvijeni su parametri r metrike ($r^2_{metrics}$: r^2_m , $r^{/2}_m$, \bar{r}^2_m i Δr^2_m) (269). Računanje se zasniva na sledećim jednačinama:

$$r^2_m = r^2(1 - \sqrt{|r^2 - r^2_0|}) \quad (10)$$

$$r^{/2}_m = r^2(1 - \sqrt{|r^2 - r^{/2}_0|}) \quad (11)$$

Vrednosti kvadrata koeficijenta korelacije između predviđenih i eksperimentalnih vrednosti jedinjenja sa odsečkom (r^2) i bez odsečka (r^2_0) se računaju za određivanje r^2_m . Zamena X i Y osa daje vrednost $r^{/2}_0$ na osnovu koje se računa $r^{/2}_m$. Parametri k i k' su nagibi. Vrednosti r^2 , r^2_0 , $r^{/2}_0$, k i k' se računaju preko sledećih jednačina:

$$r^2 = \frac{[\sum(Y_{exp} - \bar{Y}_{exp})(Y_{pred} - \bar{Y}_{pred})]^2}{\sum(Y_{pred} - \bar{Y}_{pred})^2 \times \sum(Y_{exp} - \bar{Y}_{exp})^2} \quad (12)$$

$$r^2_0 = 1 - \frac{\sum(Y_{exp} - k \times Y_{pred})^2}{\sum(Y_{exp} - \bar{Y}_{exp})^2} \quad (13)$$

$$r^{/2}_0 = 1 - \frac{\sum(Y_{pred} - k' \times Y_{exp})^2}{\sum(Y_{pred} - \bar{Y}_{pred})^2} \quad (14)$$

$$k = \frac{\sum(Y_{exp} \times Y_{pred})}{\sum(Y_{pred})^2} \quad (15)$$

$$k' = \frac{\sum(Y_{exp} \times Y_{pred})}{\sum(Y_{exp})^2} \quad (16)$$

Y_{exp} i Y_{pred} su eksperimentalne i predviđene vrednosti zavisne varijable, dok \bar{Y}_{exp} i \bar{Y}_{pred} predstavljaju njihove srednje vrednosti. Za prihvatljiv i prediktivan model, koeficijenti r^2_m i $r^{/2}_m$ treba da budu veći od 0,5, kao i njihova srednja vrednost, \bar{r}^2_m , dok razlika između njih (Δr^2_m) treba biti manja od 0,2 (269,270).

Parametri r metrike, osim što mogu biti računati kako za trening tako i za test set jedinjenja, mogu se računati i za ceo set podataka ($r^2_{m(overall)}$). U slučajevima kada je broj jedinjenja u test setu mali, prediktivnost modela se može proceniti računanjem $r^2_{m(overall)}$ parametara (266).

Takođe, za dodatnu potvrdu prediktivnosti modela za eksterni set podataka (test set), koristi se i CCC (eng. *Concordance Correlation Coefficient*) parametar. Njegovo računanje je bazirano na sledećoj jednačini:

$$CCC = \frac{2 \sum_{i=1}^n (Y_{exp(test)} - \bar{Y}_{exp(test)})(Y_{pred(test)} - \bar{Y}_{pred(test)})}{\sum_{i=1}^n (Y_{exp(test)} - \bar{Y}_{exp(test)})^2 + \sum_{i=1}^n (Y_{pred(test)} - \bar{Y}_{pred(test)})^2 + n(\bar{Y}_{exp(test)} - \bar{Y}_{pred(test)})} \quad (17)$$

gde su $Y_{exp(test)}$ i $Y_{pred(test)}$ eksperimentalne i predviđene vrednosti zavisne varijable za test set jedinjenja, a n broj jedinjenja u test setu. Idealna vrednost CCC parametra bi trebala biti što bliža 1 (255,271).

1.3.1.3.3 Domen primenljivosti

Osnovna primena formiranog QSAR/QSPR modela se zasniva na njegovoj mogućnosti da što tačnije predvidi proučavanu zavisnu varijablu, koja može biti aktivnost ili neka druga osobina od interesa. Upravo zbog toga neophodna je pažljiva procena njegove tačnosti u predviđanju, koja pored validacije podrazumeva i definisanje domena primenljivosti (eng. *Applicability Domain*, AD). Određivanje AD je takođe jedan od pet osnovnih principa predloženih od strane Organizacije za ekonomsku saradnju i razvoj (eng. *Organisation for Economic Co-operation and Development*, OECD). Suštinski, može se definisati kao hemijski prostor okarakterisan osobinama (molekulskim deskriptorima) jedinjenja koja su korišćena za formiranje modela (trening set jedinjenja) (272). Predviđanje aktivnosti/osobina novih jedinjenja može se smatrati pouzdanim samo ukoliko se ispitivani ligand nalazi unutar definisanog AD za formirani QSAR/QSPR model. Jedna od najčešće korišćenih metoda za definisanje AD je *leverage* pristup, kojim se definiše mera uticaja određene hemijske strukture na model (273).

Leverage vrednost (h) za svako ispitivano jedinjenje iz trening i test seta se računa korišćenjem vrednosti izabranih deskriptora prema sledećoj jednačini:

$$h_i = x_i^T (X^T X)^{-1} x_i \quad (18)$$

gde je x_i vrednost deskriptora određenog jedinjenja, a X matrica deskriptora trening set jedinjenja koja se koriste za formiranje modela (274). U osnovi, h predstavlja meru udaljenosti između x vrednosti za i -to jedinjenje iz ispitivanog seta podataka i srednje x vrednosti za sva jedinjenja. Ukoliko je vrednost nekog deskriptora (x) za određeno jedinjenje značajno veća u poređenju sa ostalim jedinjenjima i h vrednost će posledično biti visoka.

Granična *leverage* vrednost (h^*) se računa prema sledećoj jednačini:

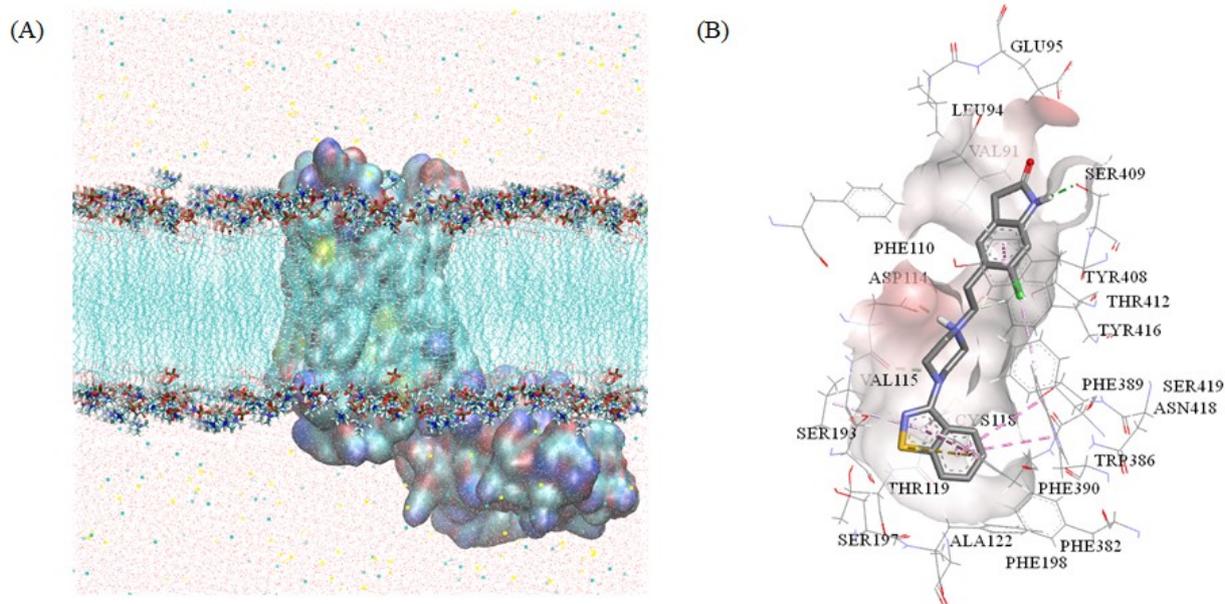
$$h^* = 3 \times (p + 1)/n \quad (19)$$

gde je n broj jedinjenja iz trening seta, a p je broj nezavisnih varijabli. Ukoliko je izračunata *leverage* vrednost (h_i) za određeno jedinjenje veća od granične *leverage* vrednosti (h^*), predviđanje se ne može smatrati pouzdanim i jedinjenje se nalazi van definisanog AD (273).

1.3.2 Metode zasnovane na strukturi ciljnog mesta dejstva

Metode zasnovane na strukturi ciljnog mesta dejstva (eng. *Structure-Based Drug Design*, SBDD), koje se nazivaju još i direktne metode, koriste se u slučajevima kada je poznata 3D struktura receptora od interesa. Sve veći napredak u razvoju brojnih biofizičkih metoda je doveo do otkrivanja više od 180000 proteinskih struktura koje su dostupne u PDB bazi podataka (275). Najčešće korišćene metode za eksperimentalno određivanje 3D modela proteina su: kristalografija bazirana na X-zracima, kriogena elektronska mikroskopija (eng. *Cryogenic Electron Microscopy*, cryo-EM) i nuklearna magnetna rezonanca (eng. *Nuclear Magnetic Resonance*, NMR). Ipak, razumevanje interakcija između liganda (supstrat, inhibitor, antagonista, inverzni agonista) i receptora (enzima, transportera, GPCR ili jonskog kanala) još uvek nije lak zadatak, uprkos dostupnosti jako velikog broja strukturnih informacija. Receptori se izoluju u kompleksu sa određenim agonistom, antagonistom ili bez liganda, pružajući ograničene informacije o načinu vezivanja nekih drugih jedinjenja. Pored toga, dobijeni 3D model receptora zavisi i od primenjene metodologije. Nama dostupan trodimenzionalni oblik samo je jedan od svih mogućih konformacija

sa najnižom energijom. Uprkos određenim nedostacima, izolovanje 3D strukture omogućava dobijanje strukturnih informacija visoke rezolucije o biološkim makromolekulima. Takođe, ima veliki značaj u proučavanju ligand-receptor kompleksa na molekulskom nivou pružajući uvid u osnovna konformaciona stanja liganda i receptora u biološkom sistemu, konformacione promene izazvane interakcijom sa ligandom, kao i u ostvarivanju ključnih intermolekulskih interakcija (276,277). Najčešće korišćene metode zasnovane na strukturi ciljnog mesta dejstva u procesu dizajniranja novih jedinjenja su simulacije molekulske dinamike (MD) i molekulski virtuelni doking (VD) (Slika 1.16).



Slika 1.16. Metode zasnovane na strukturi ciljnog mesta dejstva: (A) simulacije molekulske dinamike i (B) molekulski virtuelni doking.

1.3.2.1 Molekulska dinamika

Uspostavljanje interakcije između liganda i receptora dovodi do promene konformacije oba molekula. Primena jedne rigidne strukture u proučavanju aktivnog mesta često nije dovoljna zbog dinamičke prirode biomolekula. Čak i male konformacione promene, kao što je pomeranje bočnih lanaca, mogu značajno uticati na komplementarnost između aktivnog mesta receptora i proučavanog liganda. Iz tog razloga, primena simulacija MD ima veliki značaj u proučavanju konformacione dinamike fleksibilnih struktura, pružajući važnu osnovu za istraživanje i razvoj novih lekova (278). Sa ciljem da se simulira stvarno ponašanje svih atoma u ligand-receptor sistemu, simulacije MD pružaju uvid u interakcije između receptora i liganda koje nastaju tokom određenog vremenskog perioda, uzimajući u obzir strukturnu fleksibilnost, prisustvo membrane ili uticaj rastvarača (279). Simulacije MD se koriste za dobijanje više konformacionih stanja receptora od interesa, počevši od njegove izolovane 3D strukture ili one nastale homologim modelovanjem.

Proces simulacija MD je zasnovan na drugom Njutnovom zakonu prema sledećoj jednačini:

$$F_i = m_i \times a = m_i \times \frac{dx_i}{dt} = m_i \times \frac{d^2x}{dt^2} \quad (20)$$

gde parametar F_i predstavlja silu koja deluje na i -ti atom sistema, dok je m masa atoma, a a ubrzanje. Ovim zakonom se definiše kretanje atoma i molekula u sistemu pod uticajem energetskog

polja (279,280). Odnos između sile koja deluje na atom sistema usled delovanja potencijalne energije $V(x)$ se može izraziti jednačinom (21):

$$F(\vec{x}_i) = -\nabla_i V(\vec{x}_i) \quad (21)$$

Na osnovu gore navedene jednačine moguće je zaključiti da se sa promenom položaja atoma u sistemu tokom vremena menja i potencijalna energija.

Simulacije MD su bazirane na polju sila (eng. *Force fields*) koja računaju energiju sistema kao funkciju položaja atoma. Potencijalna energija sistema, definisana empirijski razvijenim poljima sila, se može predstaviti sledećom jednačinom:

$$V = \sum_{bonds} K_b (b - b_0)^2 + \sum_{angles} K_\theta (\theta - \theta_0)^2 + \sum_{dihedrals} K_x (1 + \cos(n\chi - \delta)) \\ + \sum_{impropers} K_\phi (\phi - \phi_0)^2 + \sum_{nonbonded} \left(\frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} + \frac{q_i q_j}{\epsilon r_{ij}} \right) \quad (22)$$

Sile u sistemu se sabiraju i izračunata potencijalna energija zavisi od parametara energije vezivanja: (i) oscilacija dužine ravnotežne veze (*bonds*); (ii) oscilacija uglova veza (*angles*); (iii) odstupanja torzionih uglova (*dihedrals*); (iv) odstupanja od koplanarnosti (*impropers*); i parametara energije koja objašnjava *Van der Waals*-ovo privlačenje i elektrostatičke interakcije (*nonbonded*) (281).

Da bi rezultati simulacije MD bili validni neophodno je da određeni uslovi budu definisani, kao što su temperatura, pritisak i vremenski period u okviru kog dolazi do pomeranja atoma. Pomeranje atoma se najčešće definiše u malim vremenskim koracima (10^{-15} s) čime se omogućava adekvatno praćenje sistema i atomskih vibracija. U svakom koraku se računaju sile, vezujuće i nevezujuće (Jednačina 22) koje deluju na atom i vrši se njihovo pomeranje prema Njutnovom zakonu. Proces se ponavlja veliki broj puta kako bi se dobile kontinuirane trajektorije koje traju dovoljno dugo da bi se obezbedio energetski stabilan sistem.

1.3.2.2 Molekulski doking

Molekulski doking predstavlja jednu od najčešće korišćenih kompjuterskih metoda u procesu dizajniranja novih lekova. U osnovi, koristi se za predviđanje predominantne bioaktivne konformacije liganda koja se uklapa u aktivno mesto proteina, definisanje ključnih intermolekulskih interakcija, kao i predviđanje slobodne energije vezivanja liganda za receptor (282). Molekulski doking se bazira na primeni različitih algoritama za pretraživanje konformacija (eng. *Sampling algorithms*) i scoring funkcije za rangiranje predviđenih konformacija prema nivou uklapanja (eng. *Scoring function*) (283). U zavisnosti od stepena fleksibilnosti molekula, doking metode se mogu podeliti na: (i) rigidni doking, u slučaju kada su strukture liganda i proteina rigidne; fleksibilno-rigidni doking, kada je struktura proteina rigidna, a ligand se smatra fleksibilnim; fleksibilni doking, kada su konformacije oba molekula fleksibilne.

Algoritmi za pretraživanje omogućavaju generisanje poza liganda koje se uklapaju u vezivno mesto proteina. Moguće je razlikovati dve vrste računarskih algoritama za pretraživanje: algoritmi sohasitičke optimizacije i algoritmi sa sistematskim pretraživanjem (284). Konformaciono pretraživanje sohasitičkim algoritmima je bazirano na nasumičnoj modifikaciji strukturnih parametara liganda, među kojima su najpoznatiji Monte Karlo metoda i genetski algoritmi (285). Metoda sistematskog pretraživanja se zasniva na malim varijacijama strukturnih parametara,

postepeno utičući na promenu konformacije liganda. Ova grupa uključuje algoritme: iscrpne pretrage (eng. *Exhaustive search*); fragmentacije (eng. *Fragmentation*); i pretraživanje konformacija (eng. *Conformational ensemble*) (284). Za razliku od sistematskog pretraživanja, sohastičke metode ne vrše potpunu pretragu konformacionog prostora pa iz tog razloga obezbeđuju relativno brzo dobijanje rezultata.

Nakon konformacionog pretraživanja, molekularni doking koristi scoring funkcije za rangiranje generisanih konformacija i predviđanje slobodne energije vezivanja. Scoring funkcije se mogu podeliti u tri grupe: funkcije zasnovane na polju sila (eng. *Force field-based*); funkcije zasnovane na empirijskim opažanjima (eng. *Empirical*) i scoring funkcije na bazi znanja (eng. *Knowledge-based*) (286). Funkcije zasnovane na polju sila procenjuju potencijalnu energiju vezivanja uzimajući u obzir vezujuće (intramolekulske) i nevezujuće (intermolekulske) interakcije. Empirijske funkcije koriste eksperimentalno određene afinitete vezivanja, dok trećoj grupi pripadaju scoring funkcije zasnovane na eksperimentalno utvrđenim 3D strukturama molekula (286).

Tačnost rezultata dobijenih molekularnim dokingom moguće je validirati računanjem srednje kvadratne devijacije (eng. *Root-Mean Square Deviation*, RMSD) između dokovane poze liganda i poze preuzete iz 3D strukture. Naime, predviđene konformacije liganda koje su najbližije eksperimentalno izolovanoj konformaciji iz 3D modela bi trebale biti najbolje rangirane. RMSD omogućava kvantifikaciju sličnosti između navedenih konformacija računanjem srednje udaljenosti između njihovih atoma prema sledećoj jednačini:

$$RMSD(a, b) = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (a_{ix} - b_{ix})^2 + (a_{iy} - b_{iy})^2 + (a_{iz} - b_{iz})^2} \quad (22)$$

gde se a_i parametar odnosi na atome jednog molekula, dok b_i predstavlja atome drugog molekula na koordinatama x , y i z . RMSD odstupanje manje od 2Å ukazuje na dobro slaganje između predviđene i inicijalne konformacije (287).

1.3.2.3 Virtuelni skrining

Virtuelni skrining (eng. *Virtual Screening*, VS) predstavlja *in silico* metodu koja omogućava pretraživanje i analizu velikih baza jedinjenja/fragmenata u cilju selektovanja najboljih kandidata za dalju optimizaciju i racionalni dizajn. Postoje tri vrste VS: VS zasnovan na strukturi liganda (eng. *Ligand-Based Virtual Screening*, LBVS), VS zasnovan na farmakofori (eng. *Pharmacophore-Based Virtual Screening*, PBVS) i VS zasnovan na strukturi ciljnog mesta delovanja jedinjenja (eng. *Structure-Based Virtual Screening*, SBVS) (288).

VS zasnovan na strukturi liganda, LBVS, omogućava pretraživanje baza podataka na osnovu sličnosti izračunatih molekularskih deskriptora jedinjenja sa već poznatim aktivnim jedinjenjem. Definisane zajedničke karakteristike izabranog jedinjenja koriste se za pretraživanje velikih baza podataka u cilju izdvajanja najboljih kandidata za dalja eksperimentalna ispitivanja (276).

Farmakofora se definiše kao skup elektronskih i sternih karakteristika jedinjenja koje su neophodne da bi se uspostavile optimalne supramolekulske interakcije sa specifičnim ciljnim mestom delovanja i pokrenuo/blokirao biološki odgovor (289). Na osnovu struktura poznatih aktivnih jedinjenja moguće je generisati farmakoforni model i definisati strukturne karakteristike važne za ispoljavanje biološke aktivnosti. VS zasnovan na farmakofori, PBVS, omogućava pretraživanje baza podataka na osnovu formiranog modela i definisanih farmakofornih osobina (276).

VS zasnovan na strukturi ciljnog mesta dejstva, SBVS, zahteva poznavanje 3D strukture ciljnog mesta delovanja jedinjenja. On omogućava dokovanje jedinjenja iz baze podataka u vezujuće mesto izabranog receptora, sagledavanje specifičnih interakcija koje se formiraju i njihovo rangiranje u cilju selekcije najboljih kandidata za dalja ispitivanja (290).

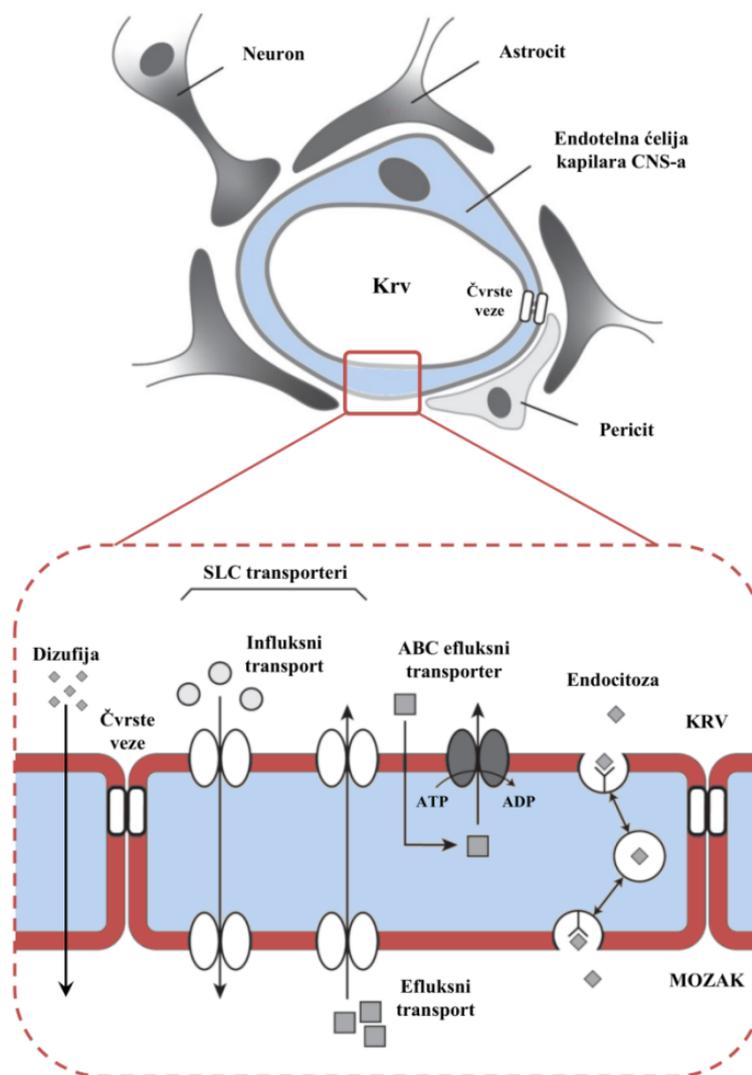
Navedene metode VS imaju široku primenu u pretraživanju virtuelnih baza fragmenata, u cilju identifikacije struktura koje se mogu koristiti u procesu dizajniranja i optimizacije vodećeg (eng. *lead*) jedinjenja.

CADD tehnike imaju široku primenu u različitim fazama istraživanja i razvoja novih lekova. Korišćenje *in silico* kompjuterskih metoda u racionalnom dizajnu novih lekova je značajno uticalo na ubrzavanje procesa identifikacije i optimizacije vodećeg (eng. *lead*) jedinjenja, kao i na minimizaciju mogućih neuspeha u završnim fazama istraživanja. Sa razvojem novih tehnologija nameću se sve veći izazovi u razvoju algoritama koji će obezbediti što tačnije i preciznije rezultate. Uzimajući u obzir složenost bioloških sistema u okviru kojih se vrši proučavanje ligand-receptor kompleksa, integracija komplementarnih LBDD i SBDD pristupa pruža mogućnost razvoja robustnih metodologija koje se mogu koristiti u dizajniranju novih efikasnijih i bezbednijih lekova. Simulacije MD omogućavaju jedinstven uvid u dinamičku prirodu ligand-receptor kompleksa, pružajući važne informacije koje eksperimentalnim tehnikama nisu dostupne. S obzirom na to da receptor podleže konformacionim promenama nakon vezivanja strukturno različitih liganada, primena simulacija MD može biti od ključnog značaja za definisanje odgovarajućeg mesta vezivanja za studiju molekuskog dokinga. Molekulski doking je kompjuterska metoda koja se koristi za proučavanje interakcija između liganda i ciljnog mesta delovanja, kao i za rangiranje liganada na osnovu njihovog afiniteta vezivanja za receptor. S druge strane, LBDD metode imaju značajnu prednost kada struktura ciljnog mesta dejstva nije poznata. 3D-QSAR analiza omogućava formiranje modela koji se mogu koristiti za definisanje korelacije između biološke aktivnosti i strukturnih osobina jedinjenja, kao i za predviđanje aktivnosti novih jedinjenja. Primena SBDD metoda u kombinaciji sa 3D-QSAR analizom omogućava prevazilaženje problema optimizacije bioaktivnih konformacija koje se koriste za formiranje prediktivnih modela. Rezultati dobijeni kombinovanjem navedenih pristupa imaju važnu ulogu u optimizaciji procesa VS, pružajući osnovu za dalja eksperimentalna ispitivanja.

1.4 Ispitivanje permeabilnosti jedinjenja kroz KMB

Uprkos napretku u razumevanju strukture i funkcije CNS-a, razvoj novih lekova za lečenje ovih oboljenja predstavlja veliki izazov. Da bi lek bio odobren za upotrebu i dospeo na tržište neophodno je da zadovolji osnovne kriterijume potentnosti, selektivnosti, terapijske efikasnosti, oralne biološke raspoloživosti (ukoliko se primenjuje oralno), zajedno sa prihvatljivim profilom neželjenih efekata (291). Pored toga, stopa uspeha odobrenja (eng. *Approval success rate*) zavisi i od ciljnog terapijskog područja, gde je pokazano da lekovi koji deluju na nivou CNS-a imaju veoma nisku šansu za uspeh u poređenju sa ostalim (292). Ovo se može pripisati različitim faktorima kao što su složenost patofizioloških mehanizama CNS oboljenja, neprihvatljiv farmakokinetički profil leka, kao i potreba da lekovi prođu kroz KMB u cilju dostizanja i aktivacije/blokiranja ciljnog mesta dejstva od terapijskog značaja (291,293). Uprkos posedovanju visokog afiniteta za vezivanje za određeno ciljno mesto delovanja, brojna jedinjenja su doživela neuspeh u istraživanju usled nemogućnosti da prođu kroz KMB. Mogućnost da lek ispolji svoje delovanje na nivou CNS-a u velikoj meri zavisi od njegovih fizičko-hemijskih osobina, kao i farmakokinetičkog profila. Iz tog razloga, predviđanje ADMET (apsorpcija, distribucija, metabolizam, ekskrecija i toksičnost) osobina i razvoj metoda koje će omogućiti procenu permeabilnosti jedinjenja kroz KMB ima veliki značaj u ranim fazama istraživanja novih lekova za CNS oboljenja (294,295).

KMB predstavlja visoko selektivnu barijeru između krvi i moždanog tkiva. Ova barijera ima važnu ulogu u održavanju homeostaze mozga zahvaljujući svojoj specifičnoj strukturi. Sačinjena je od specijalizovanih endotelnih ćelija, međusobno spojenih čvrstim vezama bez transcelularnih pora, astrocita, pericita i neurona. Osim zaštitne uloge za CNS, KMB reguliše transportne procese između mozga i krvotoka pasivnom difuzijom i aktivnim transportom (Slika 1.17) (296).



Slika 1.17. Mehanizmi prolaska molekula kroz KMB (297).

1.4.1 Fizičko-hemijske i farmakokinetičke osobine jedinjenja koja deluju na CNS

Glavne modifikacije endotelne ćelije krvnih sudova mozga koje ograničavaju prolazak jedinjenja u CNS i stvaranje ultrafiltrata plazme su: čvrsti spojevi između endotelne ćelije, manji broj endocitnih vezikula i nedostatak transcelularnih pora. Iz tog razloga, prolazak lekova kroz KMB u velikoj meri zavisi od njihovih karakteristika permeabilnosti da prođu lipidnu ćelijsku membranu.

Fizičko-hemijske osobine

Većina lekova prolazi KMB procesom transmembranske difuzije, na osnovu gradijenta koncentracije. Lipofilnost je jedan od značajnih faktora koji utiče na distribuciju leka u CNS-u. Generalno, povećanje lipofilnosti je povezano sa povećanom permeabilnosti kroz KMB. Međutim, previše lipofilna jedinjenja imaju tendenciju zadržavanja u membrani kapilara. Pored toga, povećana lipidna rastvorljivost favorizuje apsorpciju od strane perifernih tkiva, što utiče na smanjenje koncentracije leka u krvi (298). Lipofilnost jedinjenja se najčešće izražava parametrima logP (koeficijent raspodele oktanol/voda) i logD (koeficijent raspodele oktanol/voda pri pH 7,4). Za

razliku od logP parametra koji uzima u obzir samo nejonizovani oblik liganda, logD parametar zavisi od prisustva jonizovanih i nejonizovanih oblika u rastvoru. Studije su pokazale da lipofilnost izražena kao logP u opsegu 2–4 i logD u opsegu 0-3 pozitivno koreliše sa pasivnim prolaskom jedinjenja u CNS (299). Lipofilnost može biti procenjena različitim eksperimentalnim metodama koje su zasnovane na primeni visokoeфикаsne tečne hromatografije (eng. *High-Performance Liquid Chromatography*, HPLC), kao i kompjuterskim *in silico* predviđanjima (300).

Prolazak jedinjenja kroz lipidnu membranu takođe zavisi od njegove molekulske zapremine, koja je proporcionalna molekulskoj masi (eng. *Molecular Weight*, MW) jedinjenja i površini. Optimalna molekulska masa CNS aktivnih jedinjenja treba biti manja od 400 Da. Pri povećanju molekulske mase iznad ove vrednosti, permeabilnost kroz KMB nije proporcionalna lipidnoj rastvorljivosti. Smatra se da mala lipofilna jedinjenja prolaze kroz KMB usled formiranja pora unutar fosfolipidnog dvosloja. S obzirom na to da su pore određene veličine, ograničeno je kretanje jedinjenja sa većom zapreminom (301). Studije su pokazale da povećanje površine jedinjenja sa 52 Å², koji ima molekulsku masu od 200 Da, na 105 Å², sa molekulskom masom od 450 Da, značajno smanjuje njegovu permeabilnost kroz KMB (302).

Pored toga, polarna površina (eng. *Polar Surface Area*, PSA) jedinjenja veća od 90 Å² i prisustvo više od osam vodoničnih veza predstavlja ograničavajući faktor za ulazak jedinjenja u CNS. Smatra se da povećanje broja vodoničnih veza poseduje negativan uticaj na permeabilnost usled povećanja slobodne energije koja je neophodna za pomeranje jedinjenja iz vodene sredine u lipidnu membranu. Prema tome, jedinjenja sa optimalnim osobinama za prolazak kroz KMB treba da imaju manje od sedam akceptora vodonične veze i manje od 3 donora vodonične veze (301,303).

Farmakokinetičke osobine

Iako lek ispunjava sve gore navedene uslove za prolazak kroz KMB, od suštinskog značaja je i sagledavanje njegovih farmakokinetičkih osobina koje su u velikoj meri povezane sa fizičko-hemijskim karakteristikama. Različiti farmakokinetički procesi u organizmu utiču na osobine CNS aktivnih jedinjenja, uključujući apsorpciju, metaboličku stabilnost, vezivanje za proteine, kao i toksičnost.

Oralna biološka raspoloživost leka u sistemske cirkulaciji zavisi od njegove permeabilnosti. Transcelularni i paracelularni transport omogućava prolazak leka kroz epitelnu ćelijsku membranu gastrointestinalnog trakta. Apsorpcija leka je takođe zavisna od prethodno navedenih fizičko-hemijskih osobina. Povećanje lipofilnosti može doprineti većoj permeabilnosti, ali i potencijalno većoj mogućnosti da lek bude supstrat za metaboličke enzime, što posledično utiče na smanjenje biološke raspoloživosti. Apsorpciju leka je moguće predstaviti kao odnos koncentracije leka u krvi nakon intravenske i ekstravaskularne primene (npr. oralne) (291).

Presistemski metabolizam u velikoj meri može uticati na sistemsku biološku raspoloživost i toksičnost leka. Brzi oksidativni metabolizam posredstvom citohrom P450 (eng. *Cytochrome* P450, CYP) enzima u jetri i crevima je odgovoran za smanjenje koncentracije leka u krvotoku kao i povećanje eliminacije. CYP izoenzimi predstavljaju najvažniju porodicu biotransformacionih enzima koji su uključeni u metabolizam velikog broja lekova (304). CYP izoforme 3A4 i 2D6 imaju značajan doprinos u metabolizmu lekova koji deluju na nivou CNS-a. U cilju povećanja sistemske biološke raspoloživosti, značajno je da lekovi što manje podležu metabolizmu posredstvom CYP2D6, kao i da u što manjoj meri indukuju CYP3A4. Poseban oprez se zahteva kod lekova koji deluju kao inhibitori ovih enzima, usled mogućeg uticaja na inhibiciju metabolizma drugih lekova kada se istovremeno primenjuju (303).

Vezivanje za proteine plazme predstavlja ključni faktor koji utiče na prolazak jedinjenja kroz KMB. Intenzitet i trajanje delovanja leka su zavisni od koncentracije nevezanog leka u plazmi.

Lipofilnost i kiselo-bazna svojstva utiču na vezivanje lekova za proteine plazme. Hidrofobna i kisela jedinjenja se u većoj meri vezuju za humani serumski albumin (eng. *Human Serum Albumin*, HSA), dok baze imaju veći afinitet ka α_1 -kiselom glikoproteinu (eng. *α_1 -Acid Glycoprotein*, AGP). Pored toga, vezivanje za proteine plazme može uticati na povećanje rastvorljivosti hidrofobnih jedinjenja u plazmi (305). S obzirom na to da je poznato da samo slobodna frakcija leka može proći kroz KMB, vezivanje za proteine plazme CNS aktivnih jedinjenja u značajnoj meri može uticati na njihovu efikasnost. Prolazak jedinjenja kroz KMB pasivnom difuzijom je ograničen i prisustvom ABC (eng. *ATP-Binding Cassette*) efluksnih transportera. P-glikoprotein (eng. *P-gp-Multidrug Resistance Protein 1*, MDR1) je najznačajniji iz ove familije ABC proteina. Nalazi se na luminalnoj membrani KMB i uz hidrolizu adenozin trifosfata (ATP) vrši transport jedinjenja iz endotela u krv (Slika 1.17) (301). Iz tog razloga, P-gp predstavlja jednu od glavnih prepreka u razvoju lekova, kao potencijalnih P-gp liganada, koji deluju na nivou CNS-a. Suprotno tome, pojedini molekuli poput glukoze i aminokiselina predstavljaju supstrate za inluksne transportere koji omogućavaju njihov aktivni transport kroz KMB do CNS-a (306).

Jedan od glavnih uzroka neuspeha CNS lekova u kliničkim ispitivanjima se odnosi na toksičnost. Fizičko-hemijske osobine leka poput lipofilnosti ($ClogP > 3$) i niske polarnosti ($PSA < 75 \text{ \AA}^2$) su povezane sa većim rizikom za razvoj neželjenih efekata (307). Takođe, ispitivanje inhibicije kalijumovih hERG kanala ima veoma važnu ulogu u ranim fazama istraživanja. Pokazano je da većina jedinjenja koja utiče na produžavanje QT intervala poseduje kardiotoksično delovanje usled inhibicije hERG kanala (303).

Predviđanje fizičko-hemijskih i farmakokinetičkih osobina jedinjenja predstavlja važan korak u ranim fazama istraživanja i razvoja lekova. Veliki značaj ima u procesu dizajna novih jedinjenja, analize i optimizacije, kao i u odabiru najboljih kandidata za biološka ispitivanja. Postoje različite *in vivo*, *in vitro* i *in silico* metode za procenu ADMET osobina jedinjenja. Ispitivanja na različitim životinjskim vrstama su sve više potisnuta u ranim fazama istraživanja lekova, usled razvoja preciznih *in vitro* i *in silico* metoda koje mogu da simuliraju složene biološke uslove. *In vitro* ispitivanja farmakokinetičkih osobina se uglavnom zasnivaju na rekombinantnim, subćelijskim, ćelijskim i organskim sistemima. Njihov glavni nedostatak je ekstrapolacija na ceo životinjski i ljudski organizam, ali i resursi koje je potrebno izdvojiti za izvođenje studija (308). Najveća prednost u ranim fazama istraživanja i optimizacije vodećeg (eng. *lead*) jedinjenja se daje *in silico* metodama. Danas postoji veliki broj komercijalnih i nekomercijalnih kompjuterskih programa, kao što su ACD/i-Lab, ADMET Predictor i SwissADME, koji omogućavaju predviđanje fizičko-hemijskih i farmakokinetičkih osobina jedinjenja u kratkom vremenskom periodu, što je značajno u inicijalnim fazama odabira dizajniranih jedinjenja za sintezu.

1.4.2 Metode za ispitivanje permeabilnosti kroz KMB

Različite *in vivo*, *in vitro* i *in silico* metode se mogu koristiti za procenu permeabilnosti jedinjenja kroz KMB. S obzirom na to da ispitivanje permeabilnosti primenom *in vivo* metoda predstavlja veoma kompleksan, skup i dugotrajan proces, danas je razvijeno nekoliko *in vitro* i *in silico* tehnika koje imaju široku primenu u ranim fazama istraživanja lekova u cilju predviđanja permeabilnosti novih jedinjenja kroz KMB (295,309,310).

Najčešće *in vitro* metode koje se primenjuju za procenu permeabilnosti jedinjenja kroz KMB su:

- paralelni test permeabilnosti na veštačkim membranama (eng. *Parallel Artificial Membrane Permeability Assay*, PAMPA),
- tehnika imobilizovane veštačke membrane (eng. *Immobilized Artificial Membrane*, IAM),

- ćelijske kulture: endotelne ćelije mikrosudova goveđeg mozga (eng. *Bovine Brain Microvessel Endothelial Cells*, BBMEC), *Madin-Darby* ćelije psećeg bubrega (eng. *Madin-Darby canine kidney*, MDCK) i ćelije humanog epitela kolorektalnog adenokarcinoma – *Caco-2* ćelije (311–313).

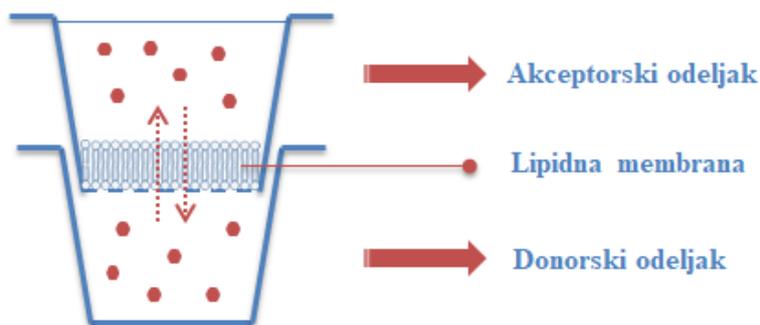
Kvantifikaciju prolaska jedinjenja kroz KMB je moguće izraziti različitim parametrima. Najčešće korišćeni parametar permeabilnosti je $\log BB$, definisan kao logaritam odnosa koncentracije jedinjenja u mozgu i krvi, u stanju ravnoteže. Nažalost, tehnike koje se koriste za merenje $\log BB$ vrednosti, uključujući *in vitro* metode i *in vivo* ispitivanja na pacovima, su veoma dugotrajne i zahtevne što značajno ograničava dostupnost eksperimentalnih podataka (314). Pored toga, permeabilnost jedinjenja kroz KMB je moguće predstaviti i $\log PS$ (eng. *Permeability Surface-area product*) parametrom. Vrednosti ovog parametra se izračunavaju primenom *in vivo* metoda, kao što je *in-situ* perfuzija. Za razliku od $\log BB$ parametra koji se zasniva na merenju koncentracije jedinjenja u stanju ravnoteže, $\log PS$ vrednostima je moguće definisati stepen penetracije jedinjenja kroz KMB (315). S obzirom na to da procena permeabilnosti kroz KMB primenom *in vivo* metoda nije pogodna za brzi skrining jedinjenja, razvijene su različite *in vitro* i *in silico* tehnike. *In vitro* PAMPA test, koji se zasniva na primeni veštačkih membrana, omogućava kvantifikaciju pasivne permeabilnosti koja se izražava $\log P_e$ parametrom (logaritam efektivne permeabilnosti).

1.4.2.1 Paralelni test permeabilnosti na veštačkim membranama

Paralelni test permeabilnosti na veštačkim membranama (PAMPA) predstavlja *in vitro* skrining metodu pogodnu za predviđanje pasivne difuzije jedinjenja kroz različite biološke membranske sisteme (311). Primena ove metode u proučavanju prolaska malih jedinjenja kroz KMB ima veliki značaj u ranim fazama istraživanja, pružajući relativno brze i pouzdane rezultate kako o permeabilnosti, tako i o retenciji jedinjenja u membrani.

PAMPA metod za proučavanje CNS aktivnih jedinjenja se zasniva na određivanju pasivnog transporta jedinjenja kroz veštačku membranu, napravljenu od polarnih moždanih lipida rastvorenih u dodekanu, koji oponašaju fizičko-hemijske osobine KMB (316). Specijalno dizajnirane i komercijalno dostupne mikrotitarske ploče sa 96 polja, koje se sastoje od akceptorske i donorske ćelije međusobno odvojene mikroporoznim filterom, se koriste za sprovođenje PAMPA testa (Slika 1.18). Ispitivano jedinjenje razblaženo u puferu se nalazi u donorskoj ćeliji. Nakon što se filter membrana natopi lipidima, u akceptorski deo se dodaje samo pufer. Procesom pasivne difuzije jedinjenja prelazi iz donorskog u akceptorski deo kroz selektivnu veštačku membranu. Nakon određenog perioda inkubacije uzorci se analiziraju primenom HPLC metode i računanjem efektivne permeabilnosti (317).

Najveći nedostatak ove metode predstavlja nemogućnost predviđanja aktivnog transporta, kao ni efluksa P-gp (318,319). Prednost u ovom slučaju se daje prethodno navedenim *in silico* metodama koje omogućavaju predviđanje najvažnijih ADMET osobina za prolazak jedinjenja kroz KMB, kao i identifikaciju potencijalnih supstrata za P-glikoprotein. Ukoliko jedinjenja nisu identifikovana kao supstrati za P-gp, PAMPA test se može koristiti za pouzdano predviđanje njihove permeabilnosti kroz KMB. Ipak, u određenim slučajevima je pokazano da čak i visoko potentni supstrati za P-gp postižu svoju efikasnost na nivou CNS. Tada je potrebno uzeti u obzir da koncentracije slobodnog leka u plazmi trebaju biti veće od onih koje su predviđene na osnovu podataka o afinitetu za receptor (291).



Slika 1.18. PAMPA sistem korišćen u ispitivanju permeabilnosti kroz KMB.

1.4.2.2 *In silico* metode u proučavanju permeabilnosti jedinjenja kroz KMB

Važnu ulogu u ispitivanju permeabilnosti jedinjenja kroz KMB u ranim fazama istraživanja lekova imaju i *in silico* metode. Nasuprot *in vivo* i *in vitro* metodama, *in silico* pristupi se mogu koristiti za efikasnu i pouzdanu skrining analizu velikog broja jedinjenja. Primena QSAR/QSPR modelovanja omogućava definisanje zavisnosti između eksperimentalno određenih parametara permeabilnosti (npr. $\log BB$, $\log PS$, $\log P_e$) i izračunatih molekulskih deskriptora ispitivanih jedinjenja. Različite metode linearne i nelinearne regresije, uključujući PLS, MLR, SVM i ANN, se mogu koristiti za formiranje matematičkih modela i predviđanje prolaska jedinjenja kroz KMB. Diverzitet u hemijskim strukturama ispitivanog seta podataka definiše hemijski prostor svakog QSAR/QSPR modela u okviru kog je moguće izvršiti pouzdano predviđanje permeabilnosti za nova dizajnirana jedinjenja. Zhang i saradnici su primenom QSAR pristupa ukazali na važnost pojedinih fizičko-hemijskih parametara, poput lipofilnosti, broja vodoničnih veza, polarne površine, kao i *Van der Waals* površine (eng. *Van der Waals surface areas*, VSA) (320). Takođe, drugim *in silico* studijama je pokazana važnost elektrotopoloških i geometrijskih GETAWAY deskriptora, kao i uticaj polarizabilnosti i elektronegativnosti na prolazak jedinjenja kroz KMB (321–324). Tehnološki napredak u računarskim naukama je uslovio razvoj metoda baziranih na simulacijama molekulske dinamike koje na atomskom nivou omogućavaju sagledavanje procesa permeabilnosti. Pojedine studije su pokazale veoma dobru korelaciju između rezultata dobijenih MD simulacijama i eksperimentalno određenih $\log BB$ i $\log PS$ vrednosti, kao i razumevanje osnovnih interakcija i sila koje utiču na translokaciju jedinjenja kroz KMB (325,326).

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Ciljevi ove doktorske disertacije su:

- Razvoj *in silico* protokola za racionalni dizajn jedinjenja sa višestrukim dejstvom (eng. *multi-target*) koja deluju kao dualni antagonisti 5-HT_{2A} i D₂ receptora, sa smanjenim afinitetom za H₁ receptor, integrisanjem inovativnih pristupa zasnovanih na strukturi liganda i ciljnog mesta dejstva.
 - Primena metoda zasnovanih na strukturi ciljnog mesta dejstva, simulacija MD i molekuskog dokinga, u cilju proučavanja konformacionih stanja 5-HT_{2A}, D₂ i H₁ receptora nakon vezivanja strukturno različitih antagonista, kao i generisanje bioaktivnih konformacija ispitivanih jedinjenja.
 - Formiranje 3D-QSAR modela, korišćenjem generisanih bioaktivnih konformacija jedinjenja i validacija izračunavanjem različitih internih i eksternih statističkih parametara.
- Definisane složene 3D-strukture farmakofore liganada sa dualnim antagonističkim delovanjem na 5-HT_{2A} i D₂ receptorima, i povećanim selektivnim delovanjem u odnosu na H₁ receptor, sagledavanjem strukturnih osobina ključnih za ispoljavanje aktivnosti i formiranje osnovnih intermolekulskih interakcija sa aminokiselinama na ciljnim mestima delovanja.
- Racionalni dizajn i *in silico* optimizacija novih dualnih antagonista 5-HT_{2A}/D₂ receptora, sa smanjenim afinitetom za H₁ receptor.
 - Primena savremenih VS metoda zasnovanih na pretraživanju velikih baza fragmenta u cilju dizajna novih dualnih antagonista, pogodnih za *in vitro* ispitivanja i dalje strukturne modifikacije.
 - *In silico* predviđanje aktivnosti novih dizajniranih jedinjenja primenom formiranih 3D-QSAR modela i definisanje ključnih interakcija u vezujućim mestima ispitivanih 5-HT_{2A}, D₂ i H₁ receptora.
 - Predviđanje ADMET osobina i izbor najboljih kandidata za buduću sintezu i biološka ispitivanja.
- Proučavanje strukture farmakofore i predlaganje strukturnih modifikacija za dizajn novih selektivnih liganada imidazolinskih I₂ receptora korišćenjem metoda zasnovanih na strukturi liganda.
 - Razvoj prediktivnih 3D-QSAR modela i definisanje strukturnih osobina važnih za selektivno delovanje liganada na imidazolinskim I₂ receptorima u odnosu na adrenergičke α₂ receptore.
 - Predviđanje fizičko-hemijskih i farmakokinetičkih osobina novih selektivnih liganada imidazolinskih I₂ receptora i predlaganje strukturnih modifikacija u cilju dalje optimizacije i unapređenja njihove aktivnosti i selektivnosti.
- Primena *in vitro* i *in silico* metoda u ispitivanju permeabilnosti kroz KMB jedinjenja koja utiču na modulaciju aktivnosti serotoninske i dopaminske neurotransmisije u CNS-u.

- Proučavanje permeabilnosti kroz KMB jedinjenja koja utiču na nivoe serotonina i dopamina u CNS-u primenom *in vitro* paralelnog testa permeabilnosti na veštačkim membranama (PAMPA).
- Generisanje i validacija prediktivnih QSPR modela u cilju izdvajanja ključnih molekulskih deskriptora koji najviše utiču na permeabilnost ispitivanih jedinjenja kroz KMB.
- Primena simulacija molekulske dinamike u cilju sagledavanja procesa pasivne difuzije proučavanih jedinjenja kroz lipidnu membranu na atomskom nivou.
- Primena formiranih hemometrijskih modela za procenu permeabilnosti kroz KMB dizajniranih dualnih antagonista 5-HT_{2A}/D₂-R i bicikličnih α -iminofosfonata kao selektivnih liganada I₂-IR.

3. EKSPERIMENTALNI DEO

3.1 Opšti podaci

3.1.1 Standardi i rastvarači

Standardi ispitivanih jedinjenja korišćeni u ovoj disertaciji:

citalopram hidrobromid, pramipeksol dihidrohlorid, olanzapin, ropinirol hidrohlorid, kvetiapin fumarat, mirtazapin, risperidon, ziprazidon hidrohlorid, nečistoća Z1 (3-(1-piperazinil)-1,2-benzizotiazol), nečistoća Z2 (6-hlor-5-(2-hloretil)-1,3-dihidro-2H-indol-2-on), nečistoća A1 (7,7'-(butilendioksi)di-3,4-dihidrohlinolin-2(1H)-on) i haloperidol su nabavljeni od Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Supstrati hDAT proteina (AP263/40017925, AO854/40003386, AM879/11741391, AG205/05879010, AO854/12910145, AP124/41027793) su nabavljeni od Specs (Zoetermeer, Netherlands).

- Acetonitril HPLC čistoće (J.T. Baker, Deventer, Netherlands)
- Metanol HPLC čistoće (Merck, Darmstadt, Germany)
- Sirćetna kiselina $\geq 99,8\%$ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Orto-fosforna kiselina 85% (Merck, Darmstadt, Germany)
- Amonijum hidroksid 25% (Carlo Erba, Milano, Italy)
- Polarni lipidi mozga svinje (kataloški broj 141101C) (Avanti Polar Lipids, Inc. Alabaster, AL).
- Dimetilsulfoksid (DMSO) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Dodekan (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Natrijum hlorid (J.T. Baker, Deventer, Netherlands)
- Natrijum hidrogen fosfat (Merck, Darmstadt, Germany)
- Kalijum dihidrogen fosfat (Merck, Darmstadt, Germany)

3.1.2 Oprema

- Tečni hromatograf spregnut sa UV detektorom, Agilent Technologies 1200 HPLC sistem (Santa Clara, CA, USA)
- Zobrax Eclipse Plus C18 kolona, 250 x 4,6 mm, 5 μm dijametar čestica (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany)
- Sistem za prečišćavanje vode (Neiderelbert, Germany)
- Analitička vaga Adventurer-Pro (Ohaus Corporation, Pine Brook, SAD)
- Analitička vaga Mettler Toledo (Zurich, Switzerland)
- pH metar, PHM240 pH/ION-meter (Radiometer, Kopenhagen, Danska)
- Ultrazvučno kupatilo USK (EI Niš, Niš, Srbija)
- Filtracione ploče za PAMPA test od 96 ćelija (MultiScreen-HV, kataloški broj MAHVN4510) (Millipore, Inc. Bedford, MA, SAD)

3.1.3 Kompjuterski programi

- Marvin Sketch 16.10.24 (ChemAxon, 2016, <http://www.chemaxon.com>)
- ChemDraw Ultra 7.0 (CambridgeSoft Corporation, <http://www.cambridgesoft.com>)
- Chem3D Ultra 7.0 (CambridgeSoft Corporation, <http://www.cambridgesoft.com>)
- CHARMM General Force Field (CGENFF) 1.0.0 (ParamChem, 2015, <https://cgenff.paramchem.org/initguess/>)
- PlayMolecule (Acellera, 2017, <https://www.playmolecule.com/>)
- Visual Molecular Dynamics (VMD) 1.9.3 (University of Illinois, 2016, <http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>)

- Nano Scale Molecular Dynamics (NAMD) 2.8 (University of Illinois, 2011, <http://www.ks.uiuc.edu/Research/namd/>)
- AutoDock Vina 1.1.2 (The Scripps Research Institute, 2011, <http://autodock.scripps.edu/>)
- Discovery Studio Visualizer 17.2.0.16349 (Dassault Systèmes BIOVIA, 2017)
- Pentacle 1.07 (Molecular Discovery Ltd, 2009, <http://www.moldiscovery.com/software/pentacle/>)
- SPSS 18.0 (PASW Statistics, Chicago, 2009)
- Fingerprints for Ligands and Proteins (FLAP) 2.2 (Molecular Discovery Ltd, 2016, <https://www.moldiscovery.com/software/flap/>)
- ADMET Predictor 9.5 (Simulation Plus Inc., 2019, <http://www.simulations-plus.com>)
- SwissADME (Swiss Institute of Bioinformatics, 2017, <http://www.swissadme.ch/>)
- Dragon 6.0 (Talete srl, 2010, <http://www.talete.mi.it>)
- Soft independent Modelling of Class Analogy (SIMCA) P+ 12.0 (Umetrics AB, 2008, <http://www.umetrics.com>)
- STATISTICA 13.6 (StatSoft Inc., 2019, <http://www.statsoft.com>)
- Microsoft Office Excel (Microsoft Corporation, 2010, <http://www.microsoft.com>)

3.2 *In silico* protokol za racionalni dizajn novih dualnih antagonista 5-HT_{2A} i D₂ receptora, sa smanjenim afinitetom za H₁ receptor

3.2.1 Formiranje seta jedinjenja za ispitivanje

U ovom istraživanju, strukturno različiti antagonisti 5-HT_{2A} i D₂ receptora, preuzeti iz ChEMBL baze podataka (www.ebi.ac.uk/chembl/), su korišćeni za formiranje 3D-QSAR modela i analizu farmakofore (327). Antagonističke aktivnosti ispitivanih jedinjenja su izražene kao pKi vrednosti (pKi = -logKi) (Tabele A7.1-A7.3). Opseg eksperimentalno dobijenih pKi vrednosti za 5-HT_{2A}-R je bio 5,92-11,00, dok su nešto niže vrednosti za D₂-R, 5,52-9,05, kao i H₁-R, 5,06-9,86. Veliki raspon pKi vrednosti i strukturna različitost ispitivanih jedinjenja pozitivno utiču na formiranje regresionih modela sa dobrim predikcionim sposobnostima i širokom primenljivosti. Dominantni oblici jedinjenja pri fiziološkom pH 7,4 su generisani primenom Marvin Sketch 16.10.24 programa (328). Selektovani oblici su optimizovani i energetski minimizovani primenom semi-empirijske PM3 (eng. *Parameterized Model revision 3*) metode i Hartree-Fock/3-21G metode u Chem3D Ultra 7.0 programu (329–332). Finalne konformacije liganda su odabrane nakon simulacija MD i studije molekuskog dokinga.

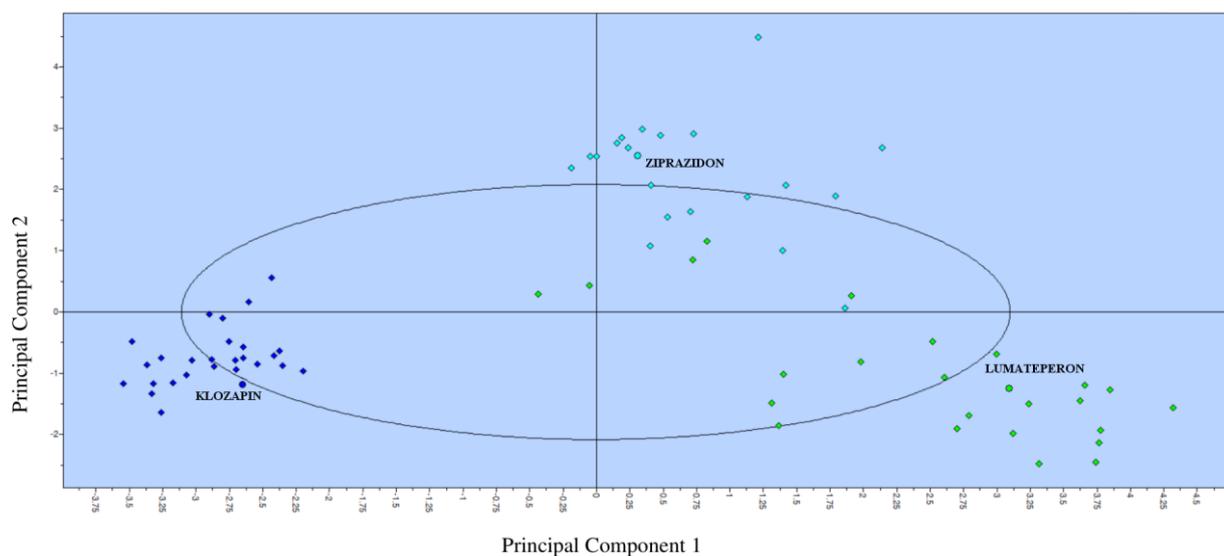
PCA analiza iz programa Pentacle je korišćena za formiranje klastera ispitivanih jedinjenja na osnovu izračunatih GRIND deskriptora. Prema tome, set jedinjenja korišćen za ispitivanje je podeljen u tri različita klastera:

- klaster 1 - triciklični derivati dibenzocikloheptena, koji su strukturni analozi klozapina;
- klaster 2 - derivati 1,2-benzoizotiazola tj. jedinjenja slična ziprazidonu;
- klaster 3 - tetraciklični derivati hinoksalina, analozi lumateperona (Slika 3.1).

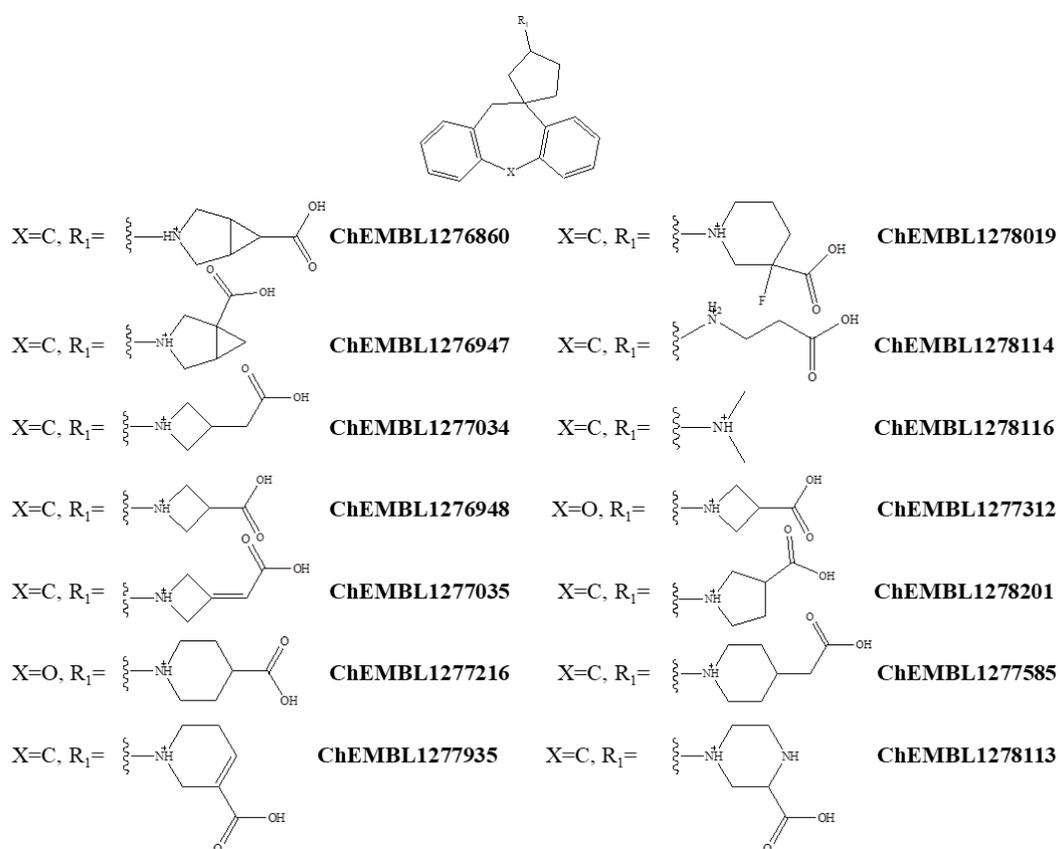
Klozapin, ziprazidon i lumateperon su potentni antagonisti 5-HT_{2A}/D₂-R koji pripadaju grupi atipičnih antipsihotika. Izabrani su kao strukturni predstavnici definisanih klastera zbog svoje široko poznate efikasnosti u lečenju psihotičnih simptoma različitih neuroloških i mentalnih oboljenja. Iz tog razloga, ova jedinjenja predstavljaju dobru osnovu za dalja istraživanja i definisanje strukturnih osobina ključnih za antagonizam na ispitivanim receptorima.

Set za proučavanje farmakofore 5-HT_{2A} i D₂ receptora je generisan od jedinjenja iz klastera 1 (Slike 3.2 i 3.3), klastera 2 (Slika 3.4) i klastera 3 (Slika 3.5), dok je 3D-QSAR model za H₁-R bio

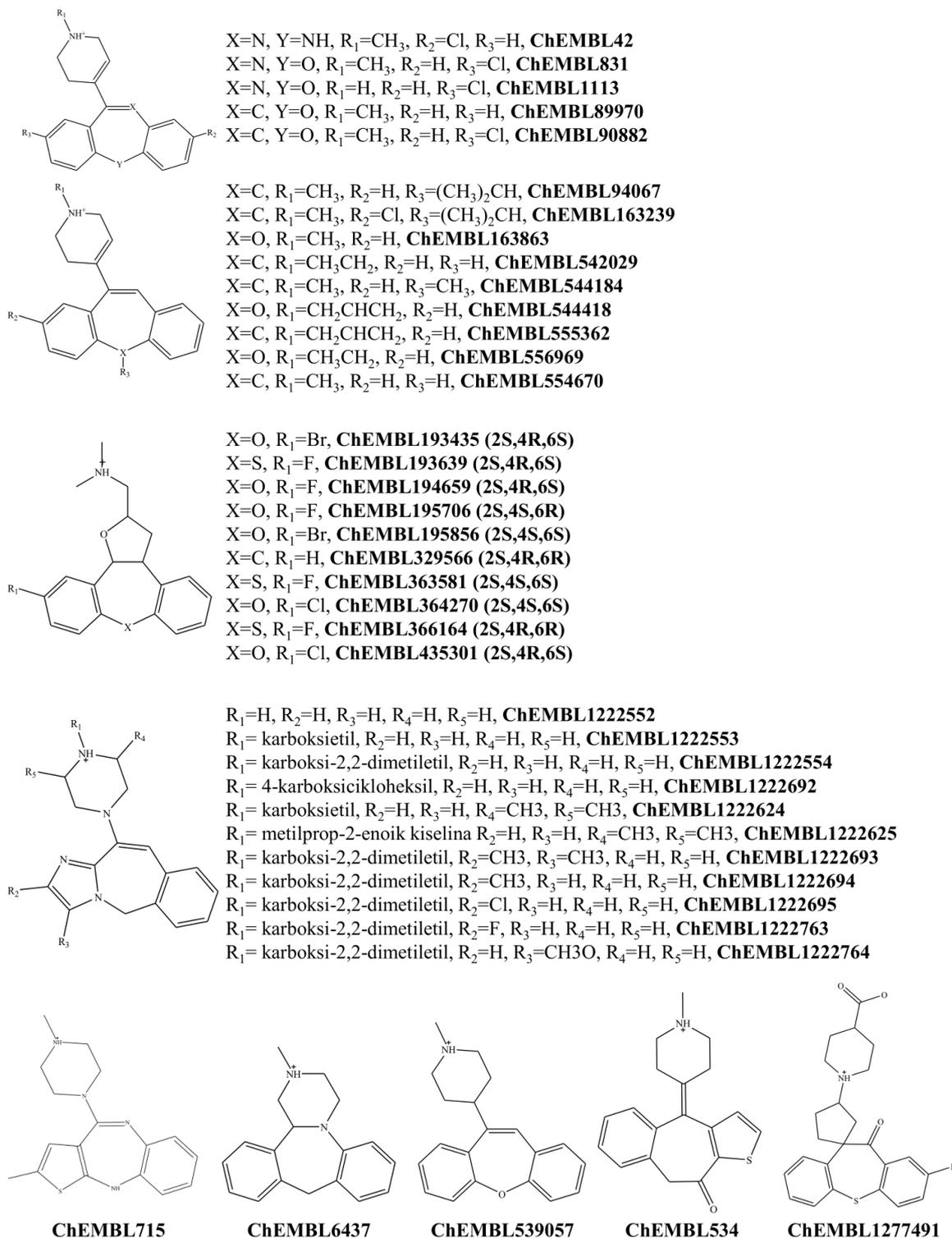
baziran na ligandima iz klastera 1 i 2 (34,333–337). Derivati lumateperona, zbog nedostatka eksperimentalnih podataka o aktivnosti na H₁-R, nisu bili uključeni u formiranje ovog modela.



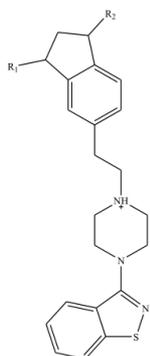
Slika 3.1. PCA grafik ispitivanih antagonista 5-HT_{2A}/D₂-R. Klaster 1- triciklični derivati dibenzocikloheptena (jedinjenja slična klozapinu) su prikazani tamno plavom bojom; klaster 2- derivati 1,2-benzoizotiazola (jedinjenja slična ziprazidonu) su prikazani zelenom bojom, klaster 3- tetraciklični derivati hinoksalina (jedinjenja slična lumateperonu) su prikazani svetlo plavom bojom.



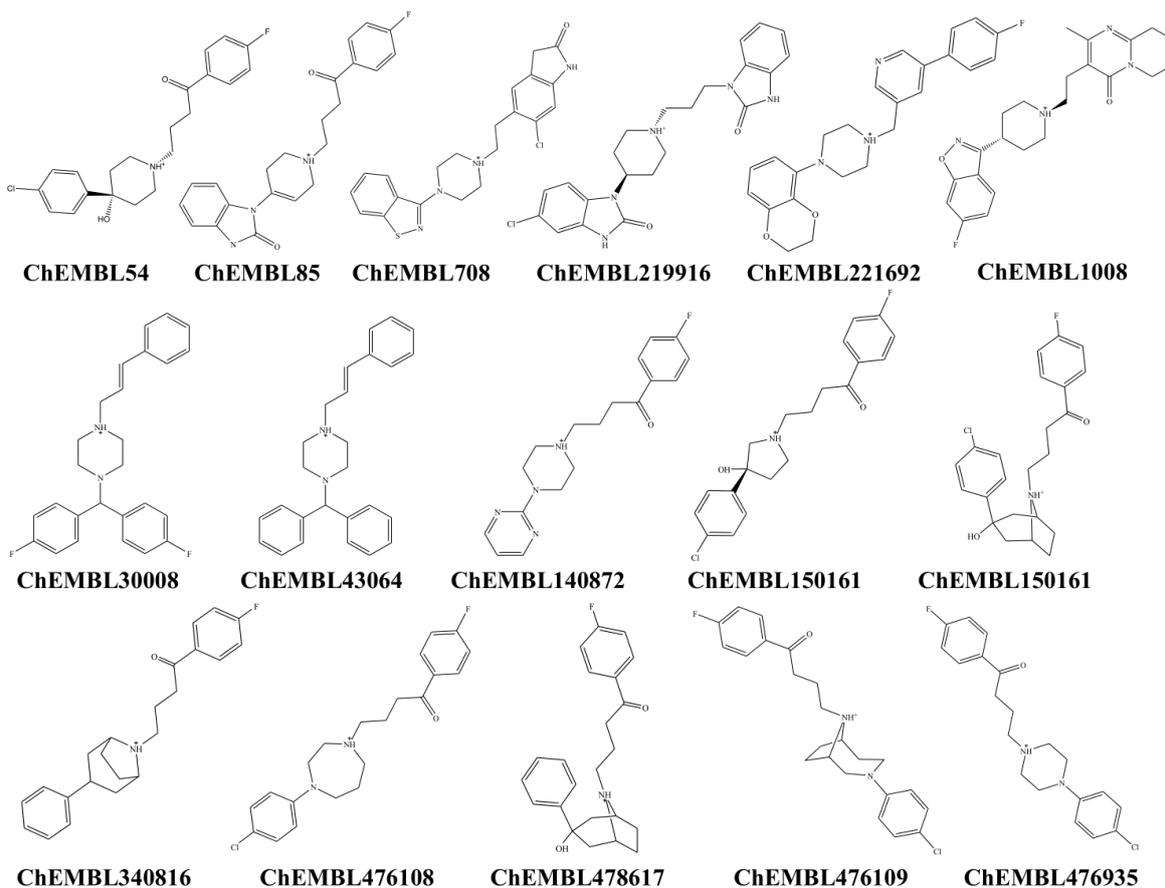
Slika 3.2. Dominantne hemijske strukture jedinjenja iz klastera 1 korišćene za 3D-QSAR modelovanje.



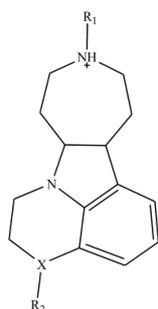
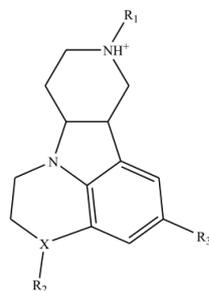
Slika 3.3. Dominantne hemijske strukture jedinjenja iz klastera 1 korišćene za 3D-QSAR modelovanje.



$R_1 = 1,2\text{-oksazol-5-amido}$, $R_2 = \text{H}$, **ChEMBL251834**; $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{acetamido}$, **ChEMBL252030**
 $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{acetamido}$, **ChEMBL252030**; $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{propanamido}$, **ChEMBL252031**;
 $R_1 = \text{fenilpropanamido}$, $R_2 = \text{H}$, **ChEMBL252201**; $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{butanamido}$, **ChEMBL252228**
 $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{ciklopropankarboksamid}$, **ChEMBL252230**;
 $R_1 = \text{H}$, $R_2 = 4\text{-fluorobenzamido}$, **ChEMBL252429**; $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{piridin-3-amido}$, **ChEMBL252430**
 $R_1 = \text{trifluoroacetamido}$, $R_2 = \text{H}$, **ChEMBL252816**; $R_1 = \text{acetamido}$, $R_2 = \text{H}$, **ChEMBL252818**
 $R_1 = \text{propanamido}$, $R_2 = \text{H}$, **ChEMBL253022**; $R_1 = \text{ciklopropanamido}$, $R_2 = \text{H}$, **ChEMBL253024**
 $R_1 = \text{benzamido}$, $R_2 = \text{H}$, **ChEMBL253233**; $R_1 = \text{hlorobenzamido}$, $R_2 = \text{H}$, **ChEMBL253439**
 $R_1 = \text{fenilacetamido}$, $R_2 = \text{H}$, **ChEMBL253878**; $R_1 = \text{metilbenzamido}$, $R_2 = \text{H}$, **ChEMBL253618**
 $R_1 = \text{piridin-3-amido}$, $R_2 = \text{H}$, **ChEMBL398619**; $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{trifluoroacetamido}$, **ChEMBL398711**
 $R_1 = \text{furan-2-amido}$, $R_2 = \text{H}$, **ChEMBL398744**; $R_1 = \text{H}$, $R_2 = 2\text{-metilpropanamido}$, **ChEMBL398525**;
 $R_1 = 3\text{-butanamido}$, $R_2 = \text{H}$, **ChEMBL400235**; $R_1 = 2\text{-metilpropanamido}$, $R_2 = \text{H}$, **ChEMBL400236**
 $R_1 = \text{NH}_2$, $R_2 = \text{H}$, **ChEMBL404000**; $R_1 = 4\text{-fluorobenzamido}$, $R_2 = \text{H}$, **ChEMBL442290**



Slika 3.4. Dominantne hemijske strukture jedinjenja iz klastera 2 korišćene za 3D-QSAR modelovanje.



X=N, R₁= (4-fluorofenil)-4-oxobutil, R₂=CH₃, R₃=H, **ChEMBL3233142(10R, 15S)**
 X=N, R₁= (4-fluorofenil)-4-oxobutil, R₂=H, R₃=H, **ChEMBL3233143**
 X=N, R₁= (4-fluorofenil)-4-oxobutil, R₂=CH₃CH₂, R₃=H, **ChEMBL3233144**
 X=N, R₁= (4-fluorofenil)-4-oxobutil, R₂=PhCH₂, R₃=H, **ChEMBL3233147**
 X=N, R₁= (4-fluorofenil)-4-oxobutil, R₂=CH₃, R₃=CH₃O, **ChEMBL3233149**
 X=N, R₁= fenil-4-oxobutil, R₂=CH₃, R₃=H, **ChEMBL3233406**
 X=N, R₁= (4-fluorofenoksi)propil, R₂=CH₃, R₃=H, **ChEMBL3233409**
 X=N, R₁= [(4-fluorofenil)formamido]etil, R₂=CH₃, R₃=H, **ChEMBL3233410**
 X=N, R₁= 1,2-benzoksazol-3-il)propil, R₂=CH₃, R₃=H, **ChEMBL3233411**
 X=N, R₁= (6-fluoro-1,2-benzoksazol-3-il)propil, R₂=CH₃, R₃=H, **ChEMBL3233412**
 X=N, R₁= (6-fluoro-1H-indazol-3-il)propil, R₂=CH₃, R₃=H, **ChEMBL3233413**
 X=N, R₁= 2,8-dimetil-4-okso-3H,4H,9aH-pirido[1,2-a]pirimidin-3-il]etil, R₂=CH₃,
 R₃=H, **ChEMBL3233416**
 X=N, R₁= (4-fluorofenil)-4-oksobutil, R₂=CH₃, R₃=H, **ChEMBL3233419 (10S, 15R)**
 X=N, R₁= (4-fluorofenil)-4-oksobutil, R₂=CH₃, R₃=H, **ChEMBL3233420 (10S, 15S)**
 X=N, R₁= (4-fluorofenil)-4-oksobutil, R₂=CH₃, R₃=H, **ChEMBL3233421 (10R, 15R)**
 X=C, R₁= (4-fluorofenil)-4-oksobutil, R₂=H, R₃=H, **ChEMBL3233427 (10R,15S)**
 X=C, R₁= (4-fluorofenil)-4-oksobutil, R₂=H, R₃=H, **ChEMBL3233429 (2R,7S)**
 X=S, R₁= (4-fluorofenil)-4-oksobutil, R₂=H, R₃=H, **ChEMBL3233431**
 X=O, R₁= (4-fluorofenil)-4-oksobutil, R₂=H, R₃=H, **ChEMBL3233432**

X=N, R₁= (4-fluorofenil)-4-oksobutil, R₂=CH₃, **ChEMBL3233423**
 X=O, R₁= (4-fluorofenil)-4-oksobutil, **ChEMBL3233433**

Slika 3.5. Dominantne hemijske strukture jedinjenja iz klastera 3 korišćene za 3D-QSAR modelovanje.

3.2.2 Simulacije molekulske dinamike

Simulacije molekulske dinamike pripadaju metodama zasnovanim na strukturi ciljnog mesta dejstva, koje zahtevaju poznavanje njegove 3D strukture i omogućavaju sagledavanje ključnih ligand-receptor interakcija, kao i konformacionih promena. Eksperimentalno određene 3D strukture ispitivanih receptora, 5-HT_{2A}-R (PDB ID: 6a93), D₂-R (PDB ID: 6cm4) i H₁-R (PDB ID: 3rze), su preuzete iz PDB baze podataka (150,174,198).

PlayMolecule internet platforma je korišćena za pripremu proteina i protonovanje pri fiziološkom pH 7,4 (338). Reprezentativna jedinjenja iz svakog klastera su dokovana u izabrane receptore korišćenjem AutoDock (AD) Vina softvera (339). Naime, za svaki protein su urađene tri zasebne simulacije MD sa klozapinom (ChEMBL42), ziprazidonom (ChEMBL708) i lumateperonom (ChEMBL3233142). Koordinate ugljenikovog atoma u α položaju aminokiseline Asp^{3,32} (Asp155 za 5-HT_{2A}-R, Asp114 za D₂-R i Asp107 za H₁-R) su korišćene za centriranje kutije čija je dužina bila 12-18 Å u svim pravcima. Kutija omogućava definisanje mesta vezivanja liganda u proteinu. Program VMD 1.9.3 (eng. *Visual Molecular Dynamics*) je korišćen za pripremu sistema, dok je za simulacije MD upotrebljen program NAMD 2.8 (eng. *Nano Scale Molecular Dynamics*) (340,341). Da bi se simulirali biološki uslovi, receptori su proučavani u membranskom okruženju koje je simulirano sa 1,2-palmitoil-oleoil-sn-glicero-3-fosfoholinom (eng. *1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine*, POPC). Dimenzije membrane prema X i Y koordinatama su postavljene na 80 Å za 5-HT_{2A}-R i 120 Å za D₂-R i H₁-R. Internet servis CGenFF (eng. *CHARMM General Force Field*) je korišćen za parametrizaciju liganada i generisanje topoloških fajlova primenom CHARMM General polja sila (342,343). U cilju formiranja hibridnog sistema, CHARMM36 polja sila su primenjena za definisanje lipida i proteina. Solvatacija formiranog sistema je obezbeđena sa

TIP3P modelom vode, dok je za neutralizaciju korišćen NaCl u koncentraciji od 0,2 M. Granična udaljenost za *Van der Waals* i elektrostatičke interakcije je postavljena da bude do 12 Å.

U suštini, ceo proces simulacija MD je moguće podeliti u tri faze. Prvu fazu predstavlja minimizacija, drugu ekvibracija, dok treću fazu čini produkcija. Faza minimizacije je zbog kompleksnosti sistema u ovom slučaju bila podeljena na više faza. Najpre je izvršena minimizacija lipidnih repova, koji su bili fleksibilni, dok su ostali atomi ostali fiksirani (ligand, protein, voda, joni i lipidne glave). Nakon 1000 koraka minimizacije odrađena je ekvibracija sistema od 0,5 ns. Druga faza minimizacije (1000 koraka) je obuhvatila fiksiranje proteina, omogućavajući molekulima vode, jona i lipida da se adaptiraju na receptor, a potom je urađena ekvibracija od 1 ns. Po završetku, ceo sistem je ekvilibrisan bez ikakvih ograničenja. Faza produkcije je glavna faza simulacija MD u kojoj se svi atomi kreću slobodno. Kao i u nekim dosadašnjim studijama o GPCR, produkciona faza je trajala 50 ns, kako bi se obezbedilo dovoljno dugo vreme za postizanje ravnoteže u sistemu (344,345). Za simulacije je korišćen izotermalno-izobarski (NPT) ansambl pri temperaturi od 310 K i pritisku od 1 atm. Fluktuacije u barostatu su kontrolisane *Langevin*-ovom dinamikom (Nos-Hoover metoda).

Različite analitičke metode su korišćene za procenu stabilnosti sistema poput RMSD analize, SASA (eng. *Solvent Accessible Surface Area*) analize, kao i broja vodoničnih (H) veza. Za vizuelizaciju i validaciju generisanih trajektorija je korišćen VMD 1.9.3. Konformacije proteina i liganda dobijene nakon 50 ns simulacije su dalje istraživane u studiji molekuskog dokinga.

3.2.3 Molekulski doking

Na osnovu konformacija koje su dobijene iz simulacija MD, predviđene su bioaktivne konformacije svih ispitivanih jedinjenja primenom AD Vina softvera.

U studiji MD je proučavano devet različitih kompleksa (5-HT_{2A}-R – klozapin/ziprazidon/lumateperon, D₂-R – klozapin/ziprazidon/lumateperon, H₁-R – klozapin/ziprazidon/lumateperon). Dobijene inaktivne konformacije ispitivanih receptora i referentnih liganada su dalje korišćene kao osnova za generisanje konformacija ostalih liganada. U zavisnosti kojem klasteru pripadaju, sva jedinjenja iz ispitivanog seta su dokovana u odgovarajuću konformaciju receptora. Prema tome, ligandi iz klastera 1 su dokovani u konformaciju proteina simuliranu sa klozapinom, klaster 2 jedinjenja u konformaciju nakon simulacije sa ziprazidonom, dok su ligandi klastera 3 dokovani u konformaciju proteina simuliranu sa lumateperonom. U osnovi, primenjen je fleksibilno-rigidni doking, koji podrazumeva da je struktura liganda fleksibilna, dok se protein smatra rigidnim. Veličina kutije koja definiše ciljno mesto vezivanja je postavljena na 12-18 Å, u zavisnosti od veličine liganda. Kao i u inicijalnom dokingu referentnih liganada i ovde je za centriranje kutije definisan ugljenik u α položaju asparaginske kiseline na poziciji 3.32 (Asp155- 5-HT_{2A}-R, Asp114- D₂-R i Asp107- H₁-R).

Za predviđanje geometrije fleksibilnog liganda, AD Vina primenjuje genetički algoritam, kao sohastičku metodu. Rangiranje formiranih konformacija se vrši na osnovu empirijske procene vezivanja liganda za receptor, koja zavisi od šest energetskih termina:

$$\begin{aligned} \Delta G = & W_{s1} \times gauss_1 + W_{s2} \times gauss_2 + W_R \times Repulsion + W_{hp} \times Hydrophobic + W_{hb} \times HB \\ & + W_{rot} N_{rot} \end{aligned} \quad (24)$$

Prva tri parametra se odnose na sterne uticaje, dok poslednja tri parametra označavaju uticaj hidrofobnih interakcija, vodoničnih veza i gubitak torzione entropije pri vezivanju (346). Procedura

konformacione pretrage u AD Vina je podešena vrednostima parametra *exhaustiveness* na 50, koji kontroliše sveobuhvatnost pretrage, i brojem od 20 generisanih poza za svaki ligand.

Finalne konformacije proučavanih jedinjenja su izabrane na osnovu sličnosti u vezivanju za receptor u odnosu na referentno jedinjenje, kao i vrednosti AD Vina doking skora. Što je doking skor niži, to je generisana konformacija energetski stabilnija. Konformacije liganada formirane na ovaj način su dalje korišćene za 3D-QSAR modelovanje i analizu strukture farmakofore. Za vizuelizaciju i ilustraciju dokovanih kompleksa je korišćen Discovery studio visualizer program (347).

3.2.4 Formiranje i validacija 3D-QSAR modela

U cilju definisanja strukturnih osobina koje su važne za postizanje optimalne aktivnosti i selektivnosti na ispitivanim 5-HT_{2A}, D₂ i H₁ receptorima, formirani su 3D-QSAR modeli u programu Pentacle (250).

Na osnovu rezultata dobijenih PCA analizom (Slika 3.1) i strukturne sličnosti među proučavanim jedinjenjima, ispitivani set za svaki receptor ($n_{5\text{-HT}_{2A}} = 80$, $n_{D_2} = 73$, $n_{H_1} = 48$) je podeljen na trening (70%) i test (30%) set. Jedinjenja iz trening seta služe za formiranje modela, dok test set jedinjenja se koriste za validaciju formiranih modela. Pored toga, prilikom selekcije test set jedinjenja uzeto je u obzir da svako izabrano jedinjenje bude u blizini bar jednog jedinjenja iz trening seta, tako da su pKi vrednosti homogeno distribuirane u proučavanom opsegu. 3D-QSAR model generisan za 5-HT_{2A}-R se sastojao od 54 jedinjenja u trening setu i 26 jedinjenja u test setu (Tabela A7.1), model za D₂-R je imao 49 i 24 jedinjenja u trening i test setu, redom, (Tabela A7.2), dok je 3D-QSAR model za H₁-R formiran sa 32 jedinjenja u trening setu i 16 jedinjenja u test setu (Tabela A7.3).

Pentacle omogućava generisanje regresionih modela na osnovu specifičnih GRID nezavisnih deskriptora, kako je opisano u poglavlju 1.3.1.1. Četiri vrste hemijskih proba (DRY, TIP, N1 i O), sa rastojanjem od 0,5 Å, su korišćene za računanje molekulskih polja interakcija. Diskretizacioni algoritam ALMOND je izabran za izdvajanje najznačajnijih regiona (eng. *hot spots*) koji definišu povoljnu interakciju između liganda i probe, na osnovu intenziteta polja i udaljenosti između selektovanih regiona. Broj filtriranih regiona je postavljen na 100, dok je težinski faktor 50 %. Algoritam CLACC je potom upotrebljen za računanje GRIND deskriptora na osnovu energije interakcije između najznačajnijih regiona.

Dobijeni rezultati su prikazani u obliku korelograma, gde je svaki deskriptor (nezavisna varijabla) definisan interakcijom između dve iste ili različite probe i određenom udaljenošću između njih. Za izdvajanje varijabli sa najznačajnijim uticajem na aktivnost ispitivanih antagonista upotrebljen je frakcioni faktorski dizajn (FFD) (253). Inicijalno izračunati veliki broj deskriptora se smanjuje primenom FFD selekcije, formira se model i računaju statistički parametri validacije. Formiranje modela u programu Pentacle je zasnovano na PLS regresionoj analizi, koja omogućava definisanje zavisnosti između selektovanih deskriptora i zavisne varijable (pKi).

Formirani 3D-QSAR modeli su potom analizirani primenom parametara interne (R^2 , Q², RMSEE) i eksterne (R^2_{pred} , RMSEP, r_{metrics}) validacije (poglavlja 1.3.1.3.1 i 1.3.1.3.2) sa ciljem da se potvrdi njihova pouzdanost i prediktivnost. Pored toga, za svaki model je definisan domen primenljivosti korišćenjem *leverage* pristupa u SPSS 18.0 programu, dok su rezultati prikazani *Williams* grafikom (348). Formiranje domena primenljivosti je zasnovano na vrednostima varijabli trening set jedinjenja, koja se koriste za formiranje modela. Širok spektar eksperimentalne aktivnosti i strukturne različitosti jedinjenja u trening setu omogućava formiranje modela sa širokim domenom primenljivosti, što je od značaja za predviđanje aktivnosti novih jedinjenja.

Formirani i validirani 3D-QSAR modeli su dalje korišćeni za analizu molekulskih deskriptora koji su u značajnoj korelaciji sa biološkim aktivnostima, kao i za kvantitativno predviđanje aktivnosti novih, dizajniranih, jedinjenja.

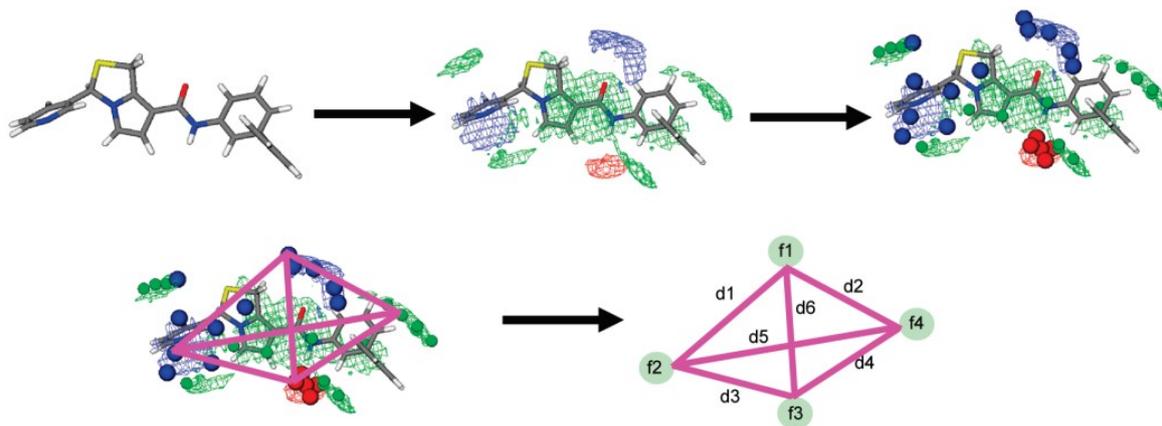
3.2.5 Primena metoda zasnovanih na strukturi fragmenta u dizajniranju novih liganada

Metode zasnovane na strukturi fragmenta (eng. *Fragment-Based Drug Design*, FBDD) su omogućile brzo i efikasno pretraživanje baza fragmenata, pružajući dobru polaznu osnovu za dizajn novih jedinjenja sa potentnim antagonističkim delovanjem na 5-HT_{2A} i D₂ receptorima, kao i smanjenim afinitetom za H₁ receptor (349).

U ovom istraživanju primenjen je FBDD zasnovan na skriningu struktura fragmenata iz dve komercijalno dostupne baze, *Enamine Essential Fragment Library* i *General Fragment Library*. *General Fragment Library* je baza dostupna od *Life Chemicals Inc.*, koja sadrži oko 51000 fragmenata filtriranih prema molekulskoj masi ≤ 300 i lipofilnosti izraženoj ClogP parametrom $\leq 3,0$ (ClogP-oktanol/voda particioni koeficijent). *Enamine Essential Fragment Library* je preuzeta od *Enamine Ltd.* i sastoji se od 320 fragmenata koji su filtrirani prema sledećim parametrima: molekulskoj masi < 250 , ClogP $< 2,5$, broju donora/akceptora vodonične veze < 3 i topološkoj polarnoj površini (eng. *Topological Polar Surface Area*, TPSA) $< 60 \text{ \AA}$. VS fragmenata iz selektovanih baza je urađen pomoću FLAP (eng. *Fingerprints for Ligands and Proteins*) programa na osnovu njihove sličnosti sa strukturnim fragmentima ziprazidona i ChEMBL90882 (350,351). Izabrana jedinjenja predstavljaju dobre vodeće molekule (eng. *lead molecule*) zbog visokog afiniteta za 5-HT_{2A} i D₂ receptore, kao i ostvarivanja ključnih interakcija u vezujućim mestima proučavanih receptora.

Najpre je izvršeno filtriranje *General Fragment Library* u cilju smanjenja velikog broja fragmenata koje sadrži. Fragmenti iz baze su filtrirani na osnovu sličnosti u obliku sa izabranim fragmentima ziprazidona (1,2-benzotiazolom i 1,3-dihidro-2-oksindolom) i ChEMBL90882 (dibenzoksepinom). Selekcija je izvršena na osnovu *Glob-Sum* skora, koji omogućava kvantifikaciju sličnosti između fragmenata. Finalna baza za skrining se sastojala od pre-filtriranih fragmenata *General Fragment Library* i fragmenata iz *Enamine Essential Fragment Library*.

VS u FLAP programu je zasnovan na izračunavanju GRID molekulskih polja interakcija (MIF), uzimajući u obzir četiri vrste proba koje definišu: sterne interakcije (H), interakcije sa donorima H-veza (N1), interakcije sa akceptorima H-veza (O), kao i hidrofobne interakcije (DRY) (352). Nakon određivanja energetski najpovoljnijih interakcija, MIF-ovi se kondenzuju u četiri farmakoforne tačke formirajući kvadriplek (Slika 3.6). FLAP potom vrši preklapanje fragmenata iz baze sa selektovanim fragmentima vodećih (eng. *lead*) jedinjenja poredeći kvadriplete (Slika 3.6). Naime, molekulska sličnost se izračunava na osnovu *Tanimoto* sličnosti (eng. *Tanimoto similarity*) između MIF-ova kandidata iz baze i fragmenata vodećeg (eng. *lead*) jedinjenja. U teoriji, što je veća sličnost između fragmenata to je veća verovatnoća da se na isti način vezuju za receptor. Za rangiranje fragmenata i kvantifikaciju sličnosti korišćen je *Glob-Sum* skor, koji se izračunava sabiranjem skorova GRID proba. Na osnovu vrednosti *Glob-Sum* skora, fragmenti sa najvećom sličnošću sa fragmentima vodećeg (eng. *lead*) jedinjenja su selektovani za racionalni dizajn novih dualnih antagonista (349).



Slika 3.6. Računanje GRID molekularnih polja interakcija i formiranje kvadripleta za pretraživanje preklapanja u bazi (352).

3.2.6 *In silico* predviđanje ADMET osobina

U ovom istraživanju, ADMET Predictor program je korišćen za predviđanje fizičko-hemijskih i farmakokinetičkih osobina ispitivanih i dizajniranih dualnih antagonista 5-HT_{2A} i D₂ receptora (353). Na osnovu dobijenih rezultata, ligandi sa optimalnim ADMET profilom su selektovani kao potencijalni kandidati za dalju optimizaciju i sintezu.

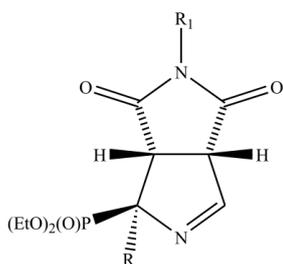
3.3 Proučavanje farmakofore selektivnih liganada imidazolinskih I₂ receptora

3.3.1 Selektovanje seta jedinjenja za ispitivanje

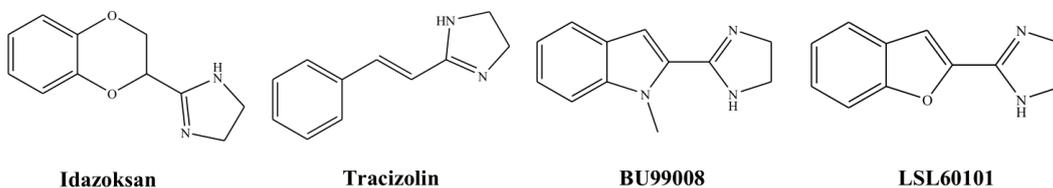
U okviru ove disertacije proučavani su i selektivni ligandi imidazolinskih I₂ receptora, koji imaju potencijalnu ulogu u lečenju neuroloških i mentalnih oboljenja. Nova grupa sintetisanih liganada pripada derivatima bicikličnih α -iminofosfonata (Slika 3.7). *Abás* i saradnici su farmakološki profil i selektivnost ispitali studijama kompetitivnog vezivanja na imidazolinskim I₂ i adrenergičkim α_2 receptorima (218).

In silico studija obuhvata generisanje 3D-QSAR modela i proučavanje farmakofore odgovorne za selektivnu delovanje na I₂-IR u odnosu na α_2 -AR. Aktivnosti ispitivanih jedinjenja, prikazane u Tabeli 3.1, su izražene kao pK_i vrednosti. U cilju dodatne validacije i poređenja rezultata, pored selektovanih sintetisanih jedinjenja u studiju su dodata i četiri standarda sa poznatim profilom aktivnosti na ovim receptorima: idazoksan, tracizolin, BU99008 i LSL60101. Formirani ispitivani set pokriva širok spektar eksperimentalne aktivnosti na oba receptora: pK_i_{I₂-IR} = 3,11–10,28 i pK_i _{α_2 -AR} = 3,59–10,27, što obezbeđuje dobar kvalitet i primenljivost formiranih modela.

I u ovom slučaju, za selekciju dominantnih formi jedinjenja pri pH 7,4 korišćen je Marvin Sketch 16.10.24 program, dok je geometrijska optimizacija praćena semi-empirijskom PM3 metodom i Hartree–Fock/3-21G metodom iz Chem3D Ultra 7.0 programa (328,332).



- R=H, R₁=CH₃, **8a**
 R=H, R₁=cikloheksil, **8b**
 R=H, R₁=Ph, **8c**
 R=H, R₁=3-Cl,4-FPh, **8d**
 R=H, R₁=4-MeOPh, **8e**
 R=Ph, R₁=CH₃, **9a**
 R=Ph, R₁=cikloheksil, **9b**
 R=Ph, R₁=Ph, **9c**
 R=Ph, R₁=3-Cl,4-FPh, **9d**
 R=Ph, R₁=4-MeOPh, **9e**
 R=4-FPh, R₁=Ph, **12c**
 R=4-FPh, R₁=3-Cl,4-FPh, **12d**
 R=4-MeOPh, R₁=Ph, **13c**
 R=4-MeOPh, R₁=3-Cl,4-FPh, **13d**
 R=CH₂Ph, R₁=Ph, **14c**
 R=4-FCH₂Ph, R₁=Ph, **15c**
 R=Ph, R₁=CH₂CH₃, **9f**
 R=Ph, R₁=propil, **9g**
 R=Ph, R₁=*t*-butil, **9h**
 R=Ph, R₁=(1-adamantil)metil, **9i**
 R=Ph, R₁=PhCH₂, **9j**
 R=Ph, R₁=PhCH₂CH₂, **9k**
 R=Ph, R₁=4-FPhCH₂CH₂, **9l**
 R=Ph, R₁=Ph(CH₂)₂CH₂, **9m**
 R=Ph, R₁=4-CF₃Ph, **9n**
 R=Ph, R₁=3-CF₃Ph, **9o**
 R=Ph, R₁=4-FPh, **9p**
 R=Ph, R₁=4-ClPh, **9q**
 R=Ph, R₁=2-ClPh, **9r**
 R=Ph, R₁=3-ClPh, **9s**
 R=Ph, R₁=4-BrPh, **9t**
 R=Ph, R₁=3,5-diClPh, **9u**
 R=Ph, R₁=3,5-3,4-diClPh, **9v**
 R=Ph, R₁=2,4,6-triClPh, **9w**
 R=Ph, R₁=3-NO₂Ph, **9x**
 R=Ph, R₁=3-NO₂,6-CH₃Ph, **9y**
 R=Ph, R₁=4-PhPh, **9z**
 R=Ph, R₁=4-CH₃Ph, **9aa**
 R=Ph, R₁=4-PhOPh, **9ab**
 R=Ph, R₁=1-naftil, **9ac**
 R=Ph, R₁=2-Cl,3-piridil, **9ad**
 R=Ph^c, R₁=Ph, **16**



Slika 3.7. Dominantne hemijske strukture I₂-IR liganada korišćene za 3D-QSAR modelovanje.

Tabela 3.1. Set jedinjenja iz trening (*) i test (**) seta korišćenih za formiranje I₂-IR i α₂-AR 3D-QSAR modela.

Jedinjenja	pK _i I ₂ -IR	pK _i α ₂ -AR	Selektivnost I ₂ /α ₂	Jedinjenja	pK _i I ₂ -IR	pK _i α ₂ -AR	Selektivnost I ₂ /α ₂
Idazoksan	7,41**	8,35*	-	9i	7,01**	4,31*	501
Tracizolin	7,58*	4,33*	-	9j	5,26*	8,11*	-
BU99008	7,05**	4,37**	-	9k	6,35*	3,77*	380
LSL60101	8,13*	5,17*	-	9l	< 3	5,65*	-
8a	6,79**	9,49*	5	9m	3,84*	3,44	2
8b	5,74*	5,02	-	9n	< 3	4,73*	-
8c	7,73*	8,49**	-	9o	< 3	±	-
8d	< 3	10,27*	-	9p	< 3	5,34*	-
8e	5,11*	6,14*	-	9q	< 3	±	-
9a	7,97**	5,93**	110	9r	5,09**	6,15**	-
9b	9,74*	9,01*	5	9s	< 3	±	-
9c	10,28*	10,38	1	9t	< 3	±	-
9d	8,56**	6,27**	195	9u	5,81**	6,22*	-
9e	6,65*	4,59*	115	9v	< 3	±	-
12c	< 3	6,77**	-	9w	< 3	5,16*	-
12d	7,55*	3,38*	14791	9x	6,81**	10,18	-
13c	3,39*	3,85*	-	9y	< 3	±	-
13d	7,87*	< 3	74131	9z	7,90*	5,12*	602
14c	6,59**	3,94*	447	9aa	5,44*	±	-
15c	5,35*	7,20*	-	9ab	6,96*	5,43**	34
9f	8,37*	5,85*	331	9ac	3,11*	< 3	-
9g	4,02*	±	-	9ad	7,96*	< 3	91201
9h	7,35*	6,77*	3				

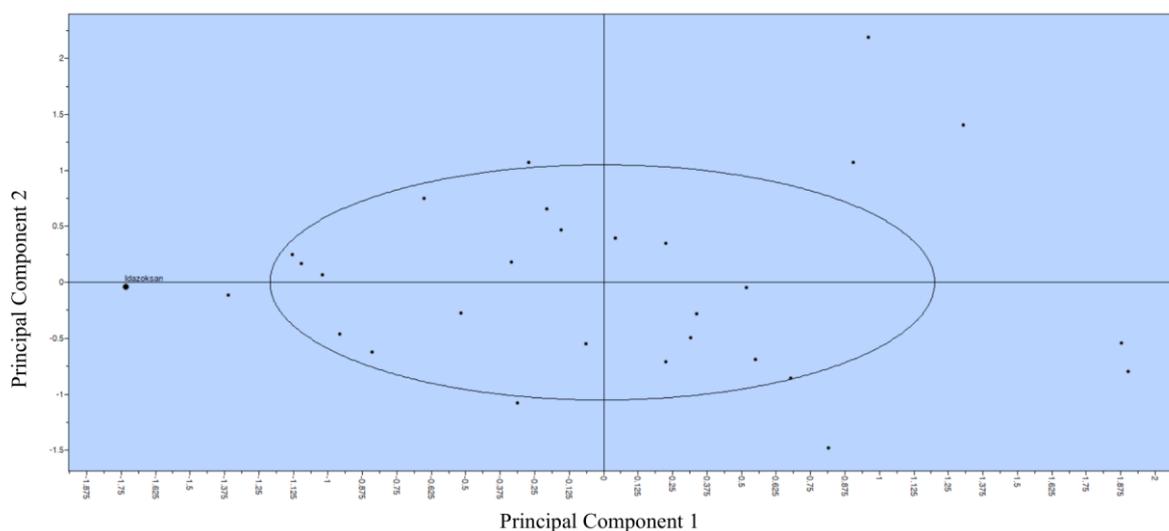
3.3.2 Formiranje i validacija 3D-QSAR modela

Novosintetisani ligandi su korišćeni za formiranje regresionih 3D-QSAR modela, u cilju definisanja kvantitativnog odnosa između strukturnih osobina koje su ključne za selektivno delovanje na I₂-IR u odnosu na α₂-AR i njihove biološke aktivnosti.

Inicijalno formirani set za ispitivanje je za potrebe 3D-QSAR modelovanja podeljen na trening i test jedinjenja prema PCA analizi, uzimajući u obzir da pKi vrednosti budu homogeno raspoređene u čitavom opsegu za oba seta (Slika 3.8). Finalni 3D-QSAR model za I₂-IR je ukupno sadržao 33 jedinjenja, od kojih je 23 bilo u trening setu i 10 u test setu (Tabela 3.1). 3D-QSAR model za α₂-AR je obuhvatao analizu 30 jedinjenja, podeljenih na 21 jedinjenje u trening setu i 9 jedinjenja u test setu (Tabela 3.1).

Program Pentacle je korišćen za formiranje 3D-QSAR modela i računanje GRIND deskriptora prema prethodno opisanoj proceduri u poglavlju 3.2.4 (250). Robustnost i prediktivnost formiranih modela je ispitana kroz opsežnu analizu parametara interne (R², Q², RMSEE) i eksterne (R²_{pred}, RMSEP, T_{metrics}) validacije (poglavlja 1.3.1.3.1 i 1.3.1.3.2). Nakon toga, ispitan je domen primenljivosti primenom *leverage* pristupa u SPSS 18.0 programu u cilju pronalaženja potencijalnih autlajera (jedinjenja koja su izvan domena primenljivosti definisanog trening set jedinjenjima) (348).

ADMET Predictor program i SwissADME internet platforma su korišćeni za definisanje ADMET karakteristika proučavanih liganada I₂-IR (353,354).

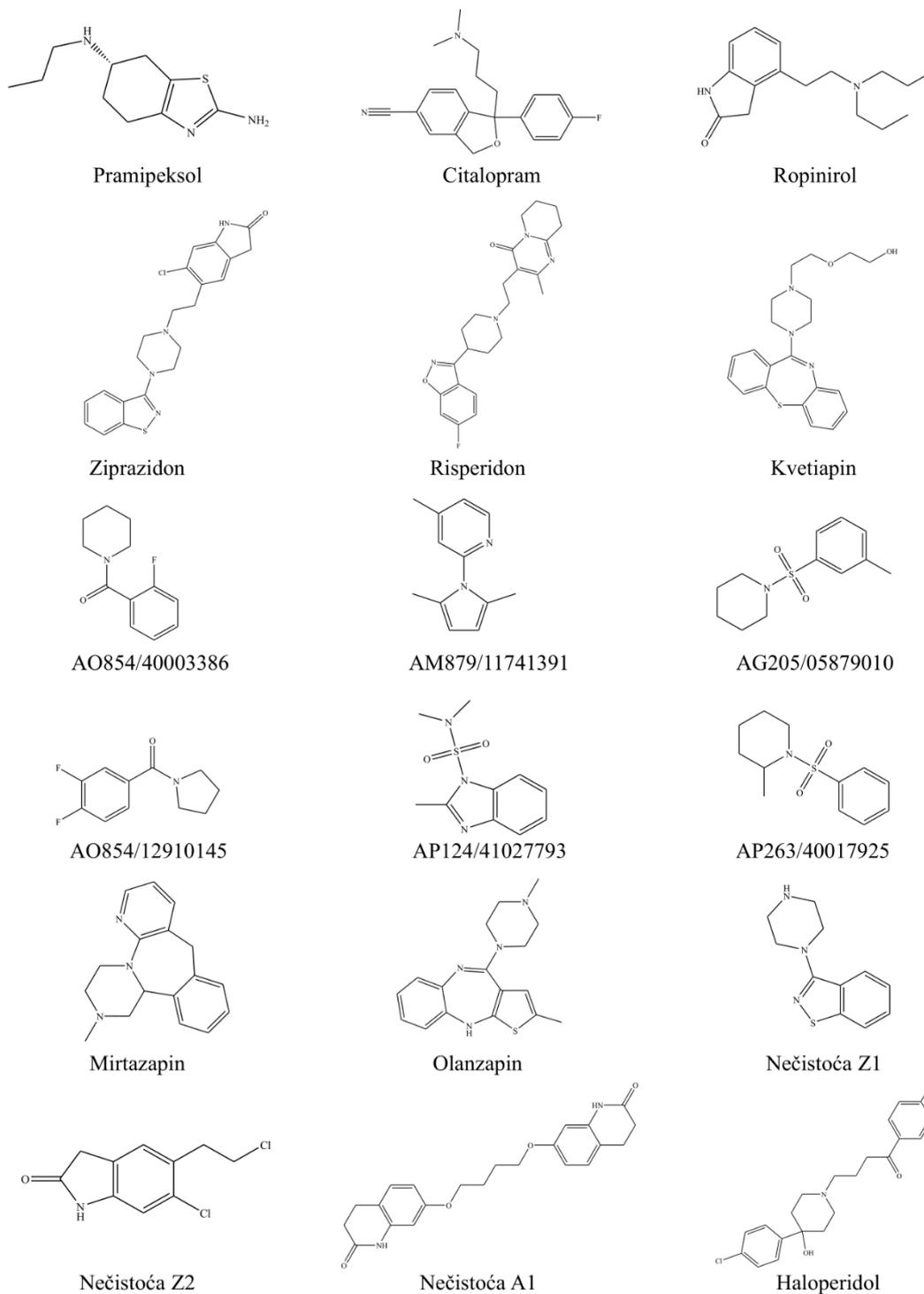


Slika 3.8. PCA grafik za I₂-IR ispitivane ligande.

3.4 Ispitivanje permeabilnosti kroz KMB jedinjenja koja utiču na modulaciju aktivnosti serotoninske i dopaminske neurotransmisije u CNS-u primenom *in vitro* i *in silico* metoda

Osamnaest strukturno različitih jedinjenja koja utiču na modulaciju aktivnosti serotoninske i dopaminske neurotransmisije u CNS-u, 6 hDAT supstrata i 12 CNS standarda, je korišćeno u *in vitro* i *in silico* studijama za procenu permeabilnosti kroz KMB (Slika 3.9) (355). Primenom *in silico* metode VS i naknadnom *in vitro* analizom, Djikic i saradnici su identifikovali šest hDAT

supstrata sa potencijalnim neuroprotektivnim delovanjem (AG205/05879010, AO854/40003386, AO854/12910145, AM879/11741391, AP263/40017925, AP124/41027793) (356). Selektovana jedinjenja su korišćena u ovom istraživanju u cilju procene njihove permeabilnosti kroz KMB i dostizanja ciljnog mesta dejstva od interesa. Pored hDAT supstrata, studija je obuhvatila i jedinjenja sa poznatom efikasnošću u lečenju neurodegenerativnih i psihijatrijskih oboljenja. Nečistoće ziprazidona (Imp Z1 i Imp Z2) i aripirazola (Imp A1) su takođe bile uključene u ispitivani set jedinjenja. Od značaja je napomenuti da nečistoća ziprazidona, Z2, poseduje genotoksični potencijal zbog prisustva alkil halogenidne grupe, što može značajno uticati na bezbednost leka (357).



Slika 3.9. Hemijske strukture jedinjenja korišćenih u PAMPA studiji.

3.4.1 Procena permeabilnosti primenom *in vitro* paralelnog testa permeabilnosti na veštačkim membranama (PAMPA)

3.4.1.1 PAMPA test

Selektovani set jedinjenja je korišćen za procenu efektivne permeabilnosti kroz KMB primenom *in vitro* PAMPA testa, po prethodno opisanom protokolu iz literature (Slika 3.8) (317,324).

Najpre su pripremljeni rastvori neophodni za izvođenje testa:

- Fiziološki pufer (pH 7,4) je pripremljen rastvaranjem 8,0 g natrijum hlorida (NaCl), 2,38 g di-natrijum hidrogen fosfata (Na_2HPO_4) i 0,19 g kalijum dihidrogen fosfata (KH_2PO_4) u vodi (1 L).
- Osnovni rastvor ispitivanih jedinjenja je pripremljen rastvaranjem odgovarajućeg standarda u dimetilsulfoksidu (eng. *Dimethyl Sulfoxide*, DMSO) da se dobije rastvor koncentracije 5 mg/mL.
- Radni rastvori za ispitivana jedinjenja su napravljani razblaživanjem osnovnih rastvora fiziološkim fosfatnim puferom (pH 7,4) do finalne koncentracije od 25 µg/mL.
- Lipidna membrana, sačinjena od lipida mozga svinje (eng. *Porcine Polar Brain Lipid*, PBL) je rastvorena u dodekanu u koncentraciji 20 mg/mL.

Za izvođenje PAMPA testa korišćene su mikrofiltracione ploče od 96 ćelija. Donja ćelija predstavlja donorski deo u kome se nalazilo 300 µL radnog rastvora ispitivane supstance, dok akceptorski deo čini gornji odeljak ispunjen sa 300 µL fiziološkog fosfatnog pufera. Membrana koja razdvaja donorski od akceptorskog dela je natopljena sa 4 µL polarnih lipida rastvorenih u dodekanu. Na donorski deo je pažljivo postavljen akceptorski odeljak, sistem je zaštićen parafilmom i poklopcem, a potom inkubiran 18 h na 25 °C.

Nakon završetka perioda inkubacije, sistem je rastavljen i koncentracije svih ispitivanih supstanci u donorskim i akceptorskim ćelijama, kao i u polaznim rastvorima su određene HPLC metodom sa UV detektorom (metoda je opisana dalje u tekstu). Sva jedinjenja su analizirana u triplikatima, a rezultati su prikazani kao srednje vrednosti. Efektivna permeabilnost (P_e) svih ispitivanih jedinjenja je izračunata primenom sledećih jednačina:

$$VaCa(t) + VdCd(t) = VdCd(0)(1 - R) \quad (25)$$

$$P_e = -\frac{2.303Vd}{A(t-\tau_{lag})} \left(\frac{1}{1+r_v}\right) \log_{10} \left[1 - \left(\frac{1+r_v^{-1}}{1-R}\right) \frac{Ca(t)}{Cd(0)}\right] \quad (26)$$

Gde Va predstavlja zapreminu akceptorske, a Vd zapreminu donorske ćelije. Filtraciona površina je izražena parametrom A (cm^2), t je vreme inkubacije (s), a τ_{lag} je vreme potrebno za zasićenje membrane ~ 20 min. Parametri $Cd(t)$ i $Ca(t)$ predstavljaju koncentracije ispitivanog jedinjenja u donorskim i akceptorskim ćelijama nakon perioda inkubacije (μM), a $Cd(0)$ je koncentracija polaznog rastvora (μM). Parametar R definiše retenciju tj. udeo supstance koji se zadržava u membrani PAMPA sistema. Vrednosti r_v se računaju prema jednačini $r_v = Vd / Va$.

3.4.1.2 Analiza rezultata primenom HPLC metode

Za određivanje koncentracije ispitivanih supstanci nakon inkubacije u PAMPA sistemu, kao i u početnom radnom rastvoru, korišćen je Agilent Technologies 1200 HPLC sistem spregnut sa UV/VIS detektorom. Hromatografska analiza je vršena na koloni Zobrax Eclipse Plus C18, 250 x

4,6 mm, sa veličinom čestica od 5 μm . Volumen injektovanja je bio 20 μL , a protok mobilne faze 1 mL min^{-1} . UV detekcija je vršena na talasnoj dužini od 254 nm. Mobilnu fazu za određivanje koncentracije hDAT supstrata su činili acetonitril i amonijum acetatni pufer (pH 3,9; 25 mM), dok su CNS standardi ispitivani sa smešom metanola i amonijum acetatnog pufera (324,358). Amonijum acetatni pufer je pripremljen rastvaranjem 0,1927 g amonijum acetata u 500 mL dejonizovane vode, uz podešavanje pH rastvorom sirćetne kiseline.

3.4.2 Formiranje prediktivnih QSPR modela

3.4.2.1 Optimizacija jedinjenja

Pored određivanja efektivne permeabilnosti primenom *in vitro* metode, ispitivana jedinjenja su dalje korišćena za *in silico* analizu i formiranje prediktivnih QSPR modela.

Za sva jedinjenja određen je dominantni oblik pri fiziološkom pH 7,4 u Marvin Sketch 16.10.24 programu, koji je potom geometrijski optimizovan primenom semi-empirijske PM3 metode i Hartree-Fock/3-21G metode (328,332).

3.4.2.2 Računanje molekulskih deskriptora

Formiranje QSPR modela zahteva računanje velikog broja molekulskih deskriptora koji sadrže hemijske informacije o strukturi jedinjenja u numeričkoj formi. Formirani modeli omogućavaju definisanje kvantitativne zavisnosti između izračunatih deskriptora i određene osobine koja se modeluje. Iz tog razloga je veoma važno koristiti pouzdanu metodologiju za njihovo izračunavanje (256).

U ovom istraživanju, optimizovane strukture ispitivanih liganada su korišćene za računanje geometrijskih, topoloških, elektronskih i fizičko-hemijskih deskriptora primenom Dragon i ADMET Predictor softvera (353,359). Deskriptori koji su posedovali konstantne vrednosti nisu uključeni u formiranje QSPR modela. Takođe, Dragon program je upotrebljen za definisanje interkorelacije između izračunatih deskriptora. Ukoliko je interkorelacija između parova deskriptora bila veća od 0,99 (PLS regresioni model) ili 0,90 (MLR i SVM analiza) za QSPR modelovanje su selektovani deskriptori sa većim uticajem na zavisnu varijablu, dok su drugi eliminisani. Prilikom formiranja modela, deskriptori su skalirani primenom *unit variance* (UV) metode, a finalni broj molekulskih deskriptora je bio 1484.

3.4.2.3 Formiranje i validacija QSPR modela

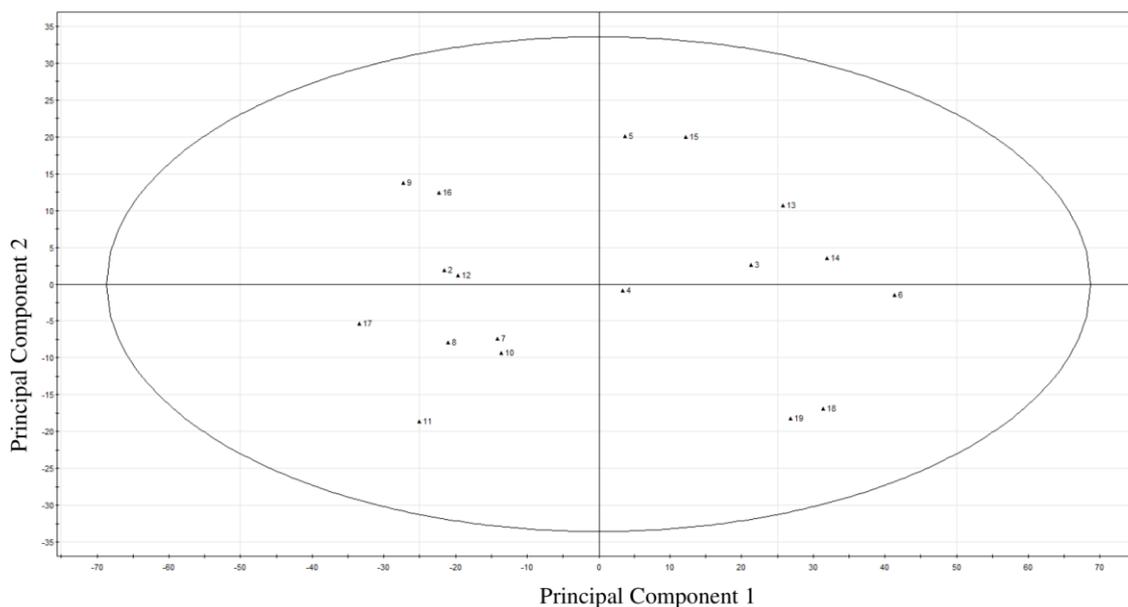
QSPR modelovanje obuhvata primenu različitih matematičkih i statističkih metoda koje omogućavaju definisanje empirijske zavisnosti između zavisne varijable, logaritma efektivne permeabilnosti ($\log P_e$) i izračunatih molekulskih deskriptora ispitivanih jedinjenja.

Za razvoj prediktivnih QSPR modela korišćene su tri različite matematičke metode: PLS regresija, postupna MLR i SVM analiza. PLS i postupna MLR su najčešće korišćene metode za formiranje modela linearne regresije, dok SVM analiza omogućava proučavanje nelinearne zavisnosti. Za formiranje PLS modela korišćen je SIMCA P+ 12.0 program, dok su MLR i SVM modeli formirani u programu STATISTICA 13.6 (360,361). ANN analiza nije korišćena u ovom istraživanju usled mogućnosti formiranja pretreniranih modela za mali broj jedinjenja u ispitivanom setu podataka.

Ispitivani set se sastojao od 18 jedinjenja koja su za formiranje QSPR modela podeljena na trening set od 12 jedinjenja (AM879/11741391, AG205/05879010, AO854/12910145, AP263/40017925, citalopram, pramipeksol, ropinirol, ziprazidon, risperidon, olanzapin, Imp Z2 i

haloperidol) i test set od 6 jedinjenja (AP124/41027793, AO854/40003386, mirtazapin, kvetiapin, Imp Z1, Imp A1). Selekcija je izvršena na osnovu rezultata PCA grafika, uzimajući u obzir da svako jedinjenje iz test seta bude blizu jednog jedinjenja iz trening seta, sa homogeno distribuiranim $\log P_e$ vrednostima (Slika 3.10). Da bi se omogućilo pouzdano poređenje dobijenih rezultata, isti trening i test set je korišćen pri formiranju svih QSPR modela.

Prediktivnost formiranih QSPR modela je analizirana računanjem parametara interne validacije za trening set (Q^2 , RMSEE), eksterne validacije za test set (R^2_{pred} , RMSEP, CCC) kao i parametara za ceo ispitivani set jedinjenja ($r_m^2_{overall}$). Takođe, korišćenjem SPSS 18.0 programa određen je domen primenljivosti izabranog modela (348).



Slika 3.10. PCA grafik liganada korišćenih u PAMPA studiji. 1- pramipeksol; 2-citalopram; 3-ropinirol; 4-mirtazapin; 5-risperidon; 6-AP263/40017925; 7-AO854/40003386; 8-AM879/11741391; 9-AG205/05879010; 10-AO854/12910145; 11-AP124/41027793; 12-kvetiapin; 13-ziprazidon; 14-olanzapin; 15-Imp Z1; 16-Imp Z2; 17-Imp A1; 18-haloperidol.

3.4.3 Primena SMD simulacija u proučavanju permeabilnosti jedinjenja kroz KMB

Primena simulacija MD zauzima sve veći značaj u procesu optimizacije vodećeg (eng. *lead*) jedinjenja. U ovoj studiji je korišćena usmerena molekulska dinamika (eng. *Steered Molecular Dynamics*, SMD) sa ciljem da se objasni i sagleda proces prolaska jedinjenja kroz KMB na molekulskom nivou (362).

SMD simulacije se zasnivaju na delovanju određene sile na deo sistema tj. jedinjenje, usmeravajući ga da se pomera u unapred definisanom pravcu. Moguće je razlikovati SMD sa konstantnom silom koja se primenjuje, kada prisustvo određenih interakcija u sistemu utiče na brzinu kretanja jedinjenja, i SMD sa konstantnom brzinom, kada promenljiva sila deluje na sistem, a brzina ostaje ista. Primena ovih metoda je veoma korisna u proučavanju prolaska jedinjenja kroz različite membrane i membranske proteine (326,363).

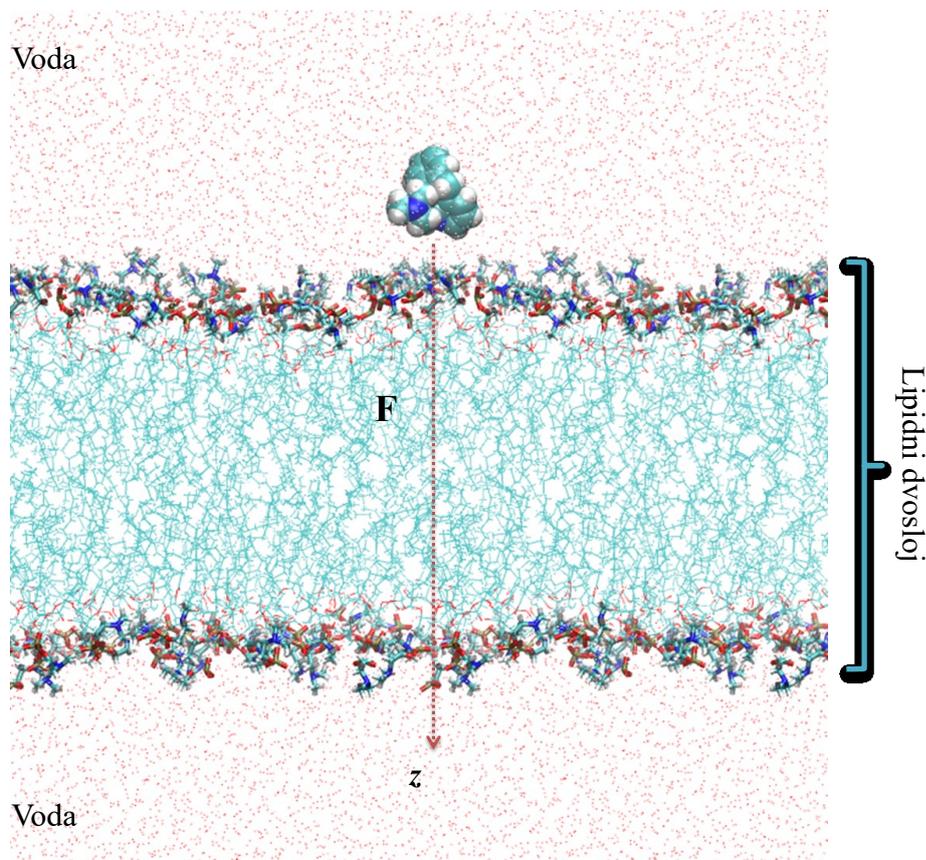
Ispitivana neuroaktivna jedinjenja, koja utiču na modulaciju aktivnosti serotoninskih i dopaminskih sistema u mozgu, su analizirana primenom SMD simulacije povlačenjem konstantnom brzinom kroz lipidni dvosloj, koji imitira KMB. U osnovi, između odabranog jedinjenja koje se

kreće i zamišljenog atoma se formira opruga. Zamišljeni atom se pomera iz početne pozicije prema lipidnom dvosloju, u pravcu z koordinate, konstantnom brzinom (v), prelazeći određeni put za određeno vreme (Slika 3.11). Definisana opruga poseduje elastičnost i po delovanju sile dolazi do njenog razvlačenja ili sabijanja. Elastičnu silu koja deluje na jedinjenje koje se kreće je moguće predstaviti jednačinom (27), gde je Δz pomeranje atoma jedinjenja povezanog za oprugu.

$$F = k(\Delta z - vt) \quad (27)$$

Za pripremu sistema korišćen je VMD 1.9.3 program, dok je za pokretanje SMD simulacija korišćen program NAMD 2.8 (340,364). Za simuliranje KMB izabran je DOPC (eng. *1, 2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine*) lipidni dvosloj formiran pomoću CHARMM-GUI internet platforme (365). CGENFF internet servis je primenjen za parametrizaciju i generisanje topoloških fajlova ispitivanih liganada. Formirani sistem se sastojao od 3299 molekula vode, raspoređenih ispod i iznad DOPC membrane od 72 molekula i jednog ispitivanog liganada (ukupno ~ 19890 atoma).

Početna pozicija ispitivanog jedinjenja je podešena na 30 Å udaljenosti od centra lipida, u pravcu z ose (Slika 3.11). Sistem je najpre minimizovan 0,5 ns sa fiksiranim glavama lipida i ligandom korišćenjem NPT ansambla pri temperaturi od 300 K i pritisku od 1 atm. Ekvilibrisan sistem je korišćen za SMD simulacije, koje su vršene pri temperaturi od 310 K i pritisku od 1 atm. Pomeranje atoma je definisano konstantnom brzinom (v) od 10 Å/n, dok je konstanta sile (k) za oprugu podešena na 5 kcal/molÅ². Vreme trajanja SMD trajektorija je bilo različito (13-20 ns), u zavisnosti od vremena koliko je ligandu bilo potrebno da prođe membranu. U cilju sprečavanja deformacije sistema pod delovanjem primenjene sile, glave lipida su fiksirane, a kretanje molekula u sistemu je ograničeno cilindrom od 8 Å od centralne ose membrane.



Slika 3.11. Šematski prikaz formiranog SMD sistema. Crvena strelica prikazuje silu koja deluje na atom koji se pomera u pravcu z ose.

4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1 Proučavanje složene 3D strukture farmakofore i racionalni dizajn novih dualnih antagonista 5-HT_{2A}/D₂-R sa smanjenim afinitetom za H₁ receptor

Primena višeciljne (eng. *multi-target*) strategije u lečenju kompleksnih oboljenja, kao što su psihijatrijski i degenerativni poremećaji centralnog nervnog sistema, predstavlja osnovu za razvoj novih lekova koji utiču na modulaciju aktivnosti različitih receptora u cilju uspostavljanja fiziološke ravnoteže i postizanja terapijske efikasnosti (366). Bolesti sa složenim patologijama karakteriše disregulacija različitih fizioloških procesa. Iz tog razloga, proučavanje strukture farmakofore i dizajn novih lekova sa višestrukim dejstvom omogućava sagledavanje najvažnijih strukturnih osobina ključnih za optimalno antagonističko delovanje na proučavanim receptorima. Pored pozitivnog uticaja na terapijsku efikasnost, *multi-target* pristup u razvoju novih lekova svojim sinergističkim delovanjem utiče na smanjenje složenosti lečenja, pojave neželjenih efekata i farmakokinetičkih interakcija (367).

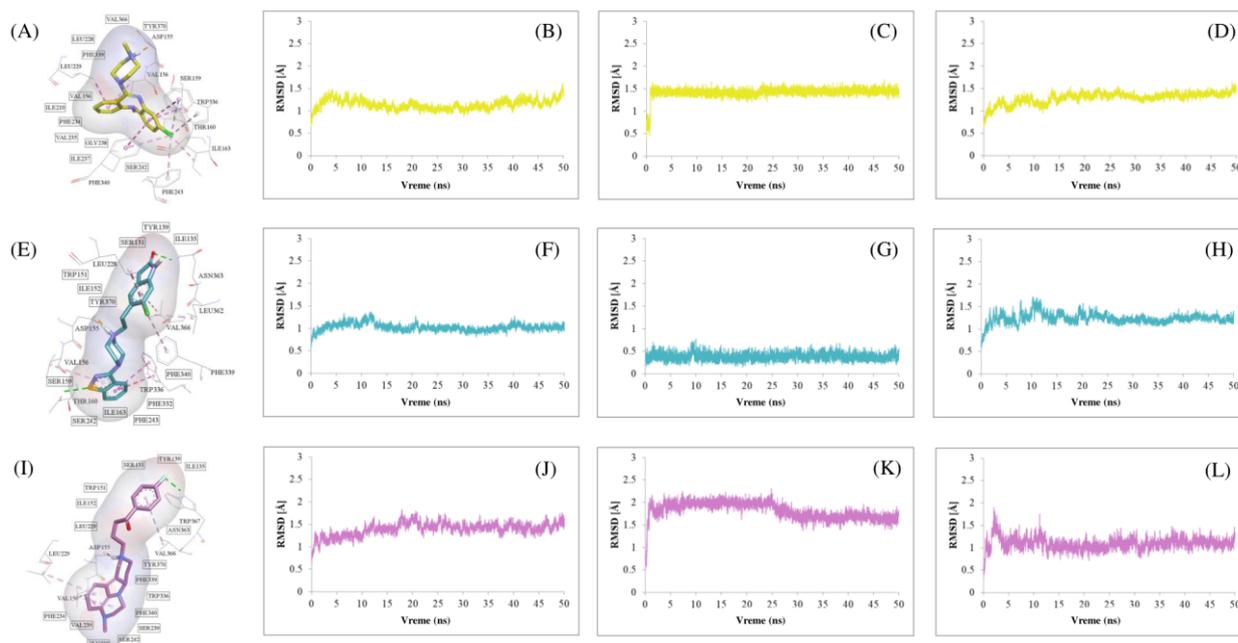
Serotoninski 5-HT_{2A} i dopaminski D₂ receptori predstavljaju važna ciljna mesta dejstva u terapiji brojnih neuroloških i mentalnih oboljenja. Proučavanje složene 3D strukture farmakofore, kombinovanjem različitih kompjuterskih metoda, predstavlja važan korak u racionalnom dizajnu novih dualnih antagonista 5-HT_{2A}/D₂ receptora sa smanjenim delovanjem na druge *off-target* receptore, poput histaminskog H₁ receptora. Definisane *in silico* protokola za razvoj novih potentnih i selektivnih jedinjenja pruža sveobuhvatan uvid u primenu različitih metoda zasnovanih na strukturi ciljnog mesta dejstva, kao i strukturi liganda.

4.1.1 Molekulska dinamika

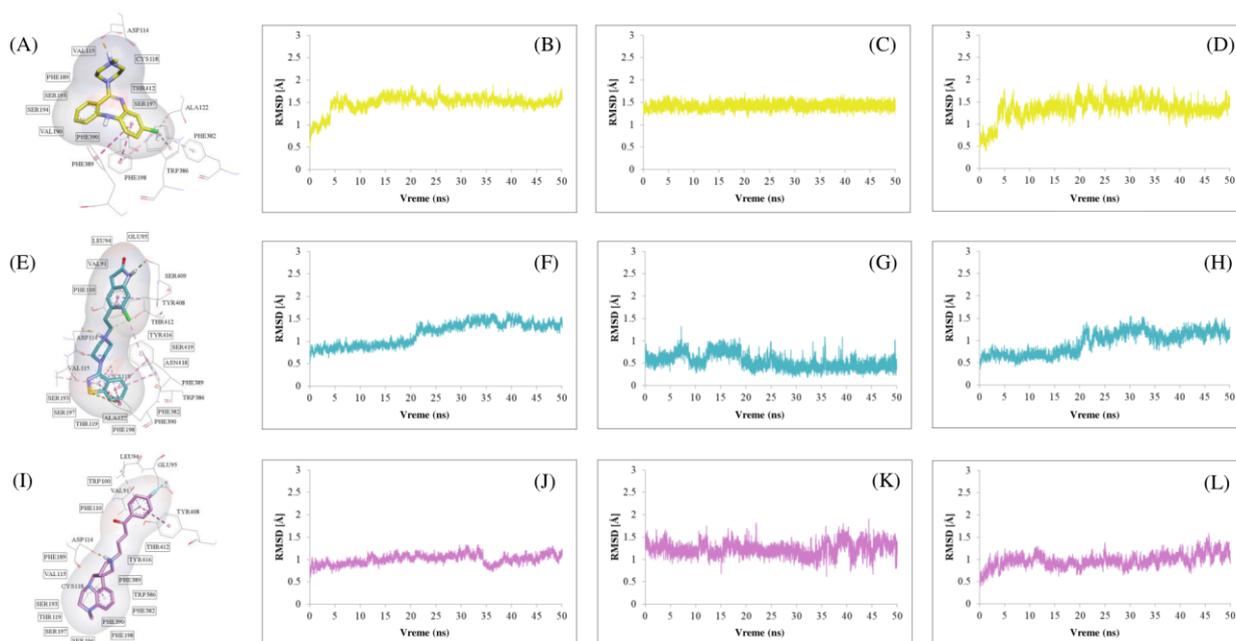
U cilju proučavanja strukture i dinamike 5-HT_{2A}, D₂ i H₁ receptora u kompleksima sa izabranim referentnim ligandima (klozapinom, ziprazidonom i lumateperonom) korišćene su simulacije molekulske dinamike. Ukupno devet simulacija (5-HT_{2A}-klozapin/ziprazidon/lumateperon, D₂-klozapin/ziprazidon/lumateperon i H₁-klozapin/ziprazidon/lumateperon) je analizirano primenom različitih analitičkih metoda u cilju procene njihove stabilnosti tokom 50 ns trajanja simulacije.

Računanje RMSD vrednosti predstavlja jednu od najčešće korišćenih metoda za procenu stabilnosti proteina i praćenje konformacionih promena. Zasniva se na računanju distance između koordinata atoma koji se kreću tokom određenog vremena. Odstupanja manja od 2 Å ukazuju da je sistem postigao ravnotežno stanje i da nema značajnih konformacionih promena (368). Grafici izračunatih RMSD vrednosti skeleta proteina (eng. *backbone*), liganada i teških atoma (eng. *heavy atoms*) vezivnog mesta su prikazani na slikama 4.1 - 4.3. Rezultati dobijenih RMSD vrednosti za skelete proteina ukazuju da su svi kompleksi stabilni nakon inicijalnih 25 ns simulacije, a neki čak i pre. Vrednosti izračunate za 5-HT_{2A} i D₂ receptore u kompleksima sa klozapinom ukazuju da izabrani receptori postaju stabilni nakon 15 ns sa prosečnim RMSD vrednostima od 1,2 Å i 1,6 Å (Slike 4.1-B i 4.2-B). Vrednosti izračunate za proteinske skelete 5-HT_{2A} i D₂ receptora sa ziprazidonom su ostale stabilne na 1 Å i 1,4 Å nakon 25 ns (Slike 4.1-F i 4.2-F), dok je sa lumateperonom došlo do stabilizacije na 1,4 Å za 5-HT_{2A}-R i 1 Å za D₂-R (Slike 4.1-J i 4.2-J). Stabilnost proteinskog skeleta H₁ receptora u kompleksima sa klozapinom i ziprazidonom je dokazana RMSD vrednostima stabilizovanim oko 1,5 Å (Slike 4.3-B i 4.3-F), a sa lumateperonom oko 1,2 Å nakon 5 ns (Slike 4.3-J). Fluktuacije RMSD vrednosti proučavanih liganada manje od 1 Å potvrđuju njihovu stabilnost u vezujućim mestima tokom simulacije (Slike 4.1-4.3- C, G, K). Takođe, RMSD vrednosti izračunate za aminokiseline u vezujućim mestima ukazuju na njihovu potpunu stabilnost tokom trajanja trajektorije od 50 ns (Slike 4.1-4.3- D, H, L).

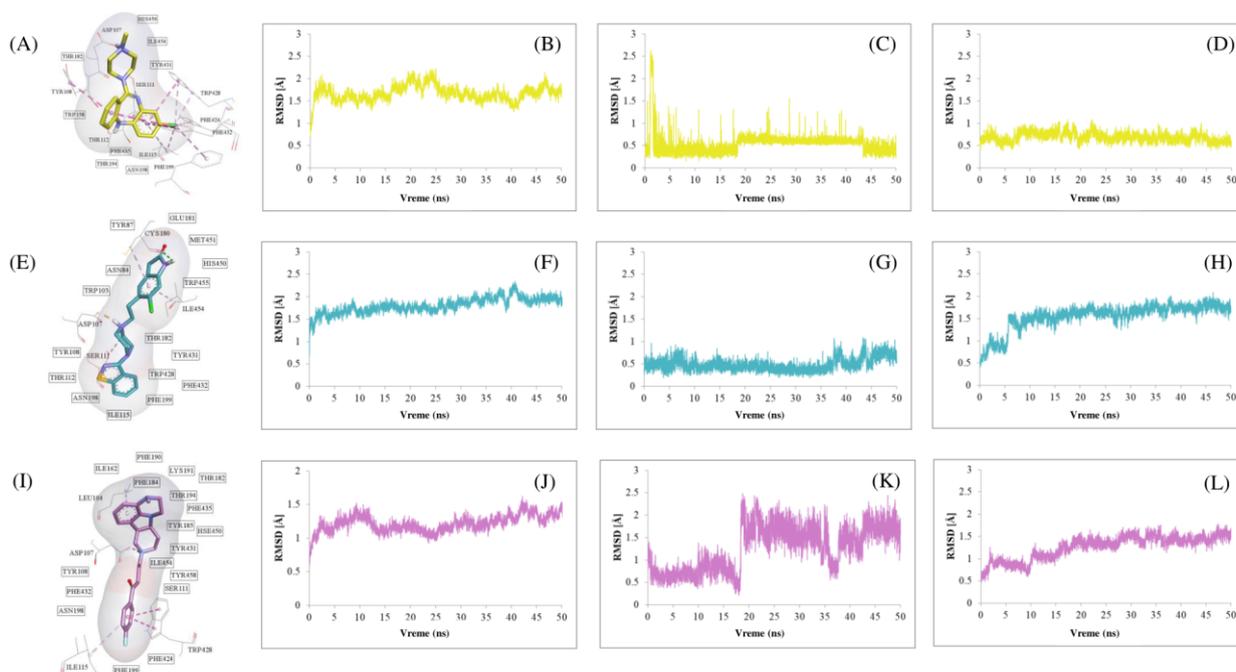
S obzirom da su odstupanja u svim izmerenim RMSD vrednostima bila niža od granične vrednosti od 2 Å, moguće je zaključiti da su proučavani kompleksi postigli ravnotežno stanje tokom 50 ns trajanja simulacije i da ne dolazi do značajnih konformacionih promena u sistemima (327).



Slika 4.1. Kompleksi 5-HT_{2A}-R sa klozapinom (A-žuto), ziprazidonom (E-plavo) i lumateperonom (I-ljubičasto) nakon 50 ns MD simulacije i izračunate RMSD vrednosti. (A) Vezujuće interakcije klozapina u 5-HT_{2A}-R; (B) RMSD proteinskog skeleta 5-HT_{2A}-R/klozapin, (C) RMSD klozapina i (D) RMSD aminokiselina u vezujućem mestu 5-HT_{2A}-R/klozapin; (E) Vezujuće interakcije ziprazidona u 5-HT_{2A}-R; (F) RMSD proteinskog skeleta 5-HT_{2A}-R/ziprazidon, (G) RMSD ziprazidona i (H) RMSD aminokiselina u vezujućem mestu 5-HT_{2A}-R/ziprazidon; (I) Vezujuće interakcije lumateperona u 5-HT_{2A}-R; (J) RMSD proteinskog skeleta 5-HT_{2A}-R/lumateperon, (K) RMSD lumateperona i (L) RMSD aminokiselina u vezujućem mestu 5-HT_{2A}-R/lumateperon. RMSD - srednja kvadratna devijacija.



Slika 4.2. Kompleksi D₂-R sa klozapinom (A-žuto), ziprazidonom (E-plavo) i lumateperonom (I-ljubičasto) nakon 50 ns MD simulacije i izračunate RMSD vrednosti. (A) Vezujuće interakcije klozapina u D₂-R; (B) RMSD proteinskog skeleta D₂-R/klozapin, (C) RMSD klozapina i (D) RMSD aminokiselina u vezujućem mestu D₂-R/klozapin; (E) Vezujuće interakcije ziprazidona u D₂-R; (F) RMSD proteinskog skeleta D₂-R/ziprazidon, (G) RMSD ziprazidona i (H) RMSD aminokiselina u vezujućem mestu D₂-R/ziprazidon; (I) Vezujuće interakcije lumateperona u D₂-R; (J) RMSD proteinskog skeleta D₂-R/lumateperon, (K) RMSD lumateperona i (L) RMSD aminokiselina u vezujućem mestu D₂-R/lumateperon. RMSD - srednja kvadratna devijacija.

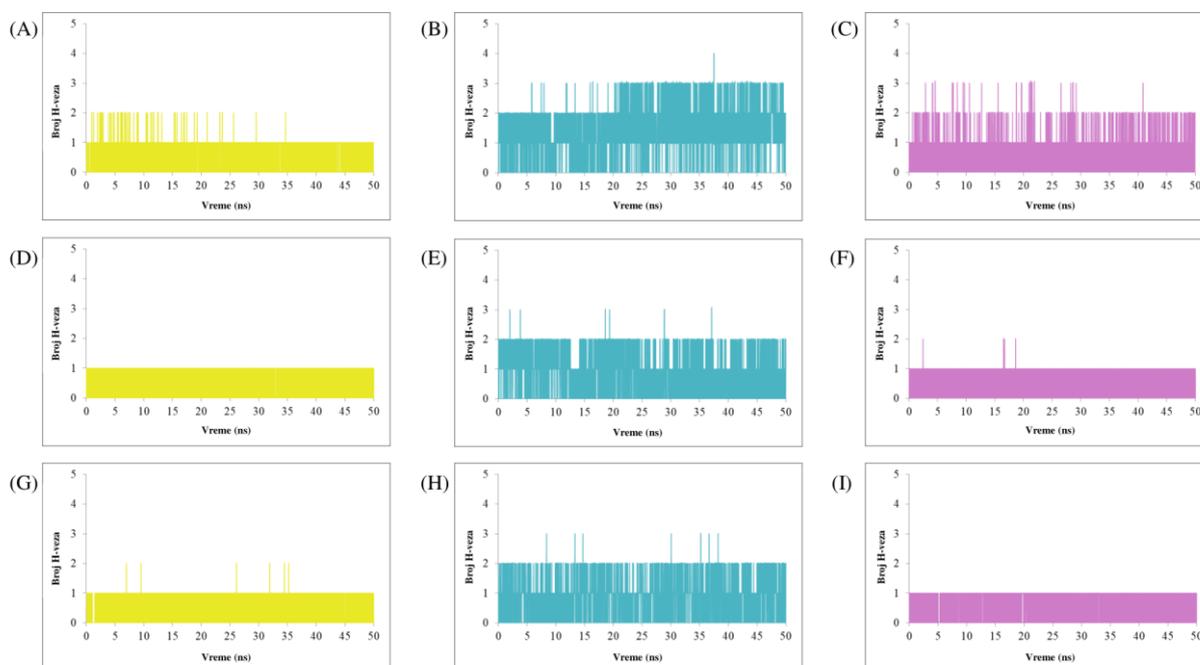


Slika 4.3. Kompleksi H₁-R sa klozapinom (A-žuto), ziprazidonom (E-plavo) i lumateperonom (I-ljubičasto) nakon 50 ns MD simulacije i izračunate RMSD vrednosti. (A) Vezujuće interakcije klozapina u H₁-R; (B) RMSD proteinskog skeleta H₁-R/klozapin, (C) RMSD klozapina i (D) RMSD aminokiselina u vezujućem mestu H₁-R/klozapin; (E) Vezujuće interakcije ziprazidona u

H₁-R; (F) RMSD proteinskog skeleta H₁-R/ziprazidon, (G) RMSD ziprazidona i (H) RMSD aminokiselina u vezujućem mestu H₁-R/ziprazidon; (I) Vezujuće interakcije lumateperona u H₁-R; (J) RMSD proteinskog skeleta H₁-R/lumateperon, (K) RMSD lumateperona i (L) RMSD aminokiselina u vezujućem mestu H₁-R/lumateperon. RMSD - srednja kvadratna devijacija.

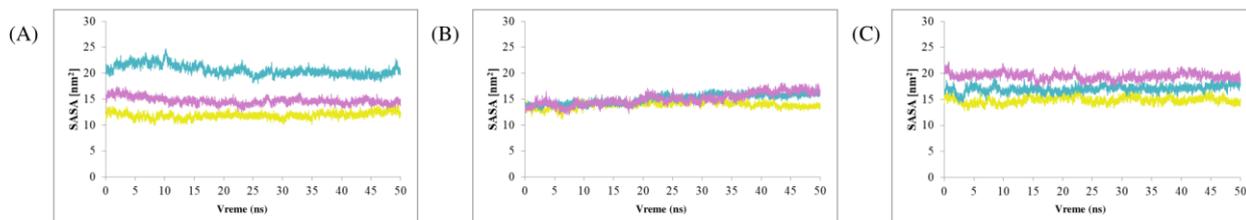
U cilju dalje potvrde stabilnosti proučavanih sistema, izračunat je broj vodoničnih interakcija koje se formiraju tokom vremena trajanja simulacije (369). Osnovni kriterijumi koji opisuju vodonične veze (H-veze) definišu da optimalna udaljenost između akceptora i donora treba biti manja ili jednaka 3,5 Å, a ugao koji se formira manji ili jednak 30°. Rezultati dobijeni u ovoj studiji su prikazani na Slici 4.4. Broj vodoničnih interakcija koji se ostvaruje između proučavanih proteina i liganada je konzistentan tokom čitave produkcionne faze od 50 ns. Takođe, dobijeni rezultati su u skladu sa finalno analiziranim kompleksima. Kao što je prikazano na Slikama 4.4-A, D i G, klopazipin tokom čitavih 50 ns formira samo jednu stabilnu vodoničnu interakciju sa sva tri proučavana receptora, i to sa asparaginskom kiselinom na poziciji 3.32. Suprotno tome, ziprazidon u vezujućem mestu 5-HT_{2A}-R ostvaruje tri interakcije koje se stabilizuju nakon 25 ns simulacije, što je pokazano i RMSD analizom (Slika 4.4-B). Sa D₂ i H₁ receptorima ziprazidon formira dve vodonične interakcije koje su stabilne od samog početka produkcionne faze (Slike 4.4-E i 4.4-H). Broj ostvarenih vodoničnih interakcija između 5-HT_{2A}-R i lumateperona je varirao između dve i tri, da bi poslednjih 20 ns ostao stabilan sa dve interakcije (Slika 4.4-C). Ipak, sa D₂ i H₁ receptorima lumateperon je formirao samo jednu H-vezu koja je održala stabilnost tokom čitavih 50 ns simulacije MD (Slike 4.4-F i 4.4-I).

Visoka stabilnost proučavanih vodoničnih interakcija tokom 50 ns simulacije MD ukazuju na dobro uklapanje liganada u aktivnim mestima proučavanih receptora, bez pojave značajnih devijacija u broju H-veza tokom trajanja simulacije.



Slika 4.4. Broj vodoničnih (H) veza u proučavanim sistemima tokom 50 ns simulacija molekulske dinamike. 5-HT_{2A}-R – klopazipin (A)/ziprazidon (B)/lumateperon (C); D₂-R – klopazipin (D)/ziprazidon (E)/lumateperon (F); H₁-R – klopazipin (G)/ziprazidon (H)/lumateperon (I).

Dodatno, za validaciju rezultata MD izračunate su i vrednosti SASA parametra, uzimajući u obzir aminokiseline iz vezujućeg mesta. SASA parametar se često koristi za definisanje površine proteina koja je dostupna rastvaraču, kao i za predviđanje potencijalnih konformacionih promena u sistemu (370). Dobijeni rezultati su prikazani na Slici 4.5 i ukazuju na stabilnost izračunatih SASA vrednosti tokom simuliranih 50 ns. Takođe, uočeno je da su fluktuacije u svim sistemima manje od 4 nm^2 tokom poslednjih 25 ns. Prema tome, moguće je zaključiti da aktivna mesta u proučavanim kompleksima 5-HT_{2A}, D₂ i H₁ receptora ne podležu značajnim konformacionim promenama u fazi produkcije, dodatno potvrđujući pouzdanost dobijenih rezultata.



Slika 4.5. SASA vrednosti izračunate za aminokiseline u vezujućim mestima proučavanih kompleksa tokom 50 ns simulacije molekulske dinamike. (A) 5-HT_{2A}-R – klozapin (žuto)/ziprazidon (plavo)/lumateperon (ljubičasto); (B) D₂-R – klozapin (žuto)/ziprazidon (plavo)/lumateperon (ljubičasto); (C) H₁-R – klozapin (žuto)/ziprazidon (plavo)/lumateperon (ljubičasto).

Uzimajući u obzir rezultate dobijene računanjem RMSD i SASA vrednosti, kao i sagledavanjem ostvarenih H-veza, može se zaključiti da je 50 ns produkcione faze u simulacijama MD bilo dovoljno da se uspostavi ravnoteža i stabilnost svih proučavanih kompleksa. Iz tog razloga, dobijeni rezultati predstavljaju dobru osnovu za dalja ispitivanja primenom studije molekuskog dokinga i 3D-QSAR modelovanja.

4.1.2 Molekulski doking

Nakon što je dokazano da su svi proučavani kompleksi stabilni tokom simulacija MD i da sistem ne trpi značajne konformacione promene, primenjena je metoda molekuskog dokinga u cilju formiranja bioaktivnih konformacija svih ispitivanih jedinjenja.

Inaktivne konformacije 5-HT_{2A}, D₂ i H₁ receptora u kompleksima sa referentnim antagonistima, koji se nalaze u najverovatnijoj bioaktivnoj konformaciji, su preuzete iz poslednjeg koraka svake MD simulacije. Ostvarene intermolekulske interakcije u ispitivanim sistemima su prikazane na Slikama 4.1-4.3. Uočeno je prisustvo svih hidrofobnih, vodoničnih, kao i elektrostatičkih interakcija koje imaju važnu ulogu u vezivanju za ispitivane 5-HT_{2A}, D₂ i H₁ receptore, što dodatno validira dobijene rezultate (150,174,198). Selektovane konformacije proteina i liganada su dalje korišćene kao osnova za formiranje bioaktivnih konformacija ostalih jedinjenja iz ispitivanog seta podataka.

Na osnovu klastera kojem pripadaju, ispitivana jedinjenja su dokovana u određenu konformaciju receptora. Finalne konformacije ispitivanih jedinjenja su izabrane na osnovu izračunate energije vezivanja i konformacionog preklapanja sa referentnim ligandom. Rezultati studije molekuskog dokinga su prikazani u Tabelama A7.4-A7.6, a validacija je izvršena računanjem RMSD vrednosti. U cilju procene preklapanja geometrije liganada iz 3D struktura i onih dobijenih molekulskim dokingom, urađen je re-doking i izračunate RMSD vrednosti su prikazane u Tabeli 4.1. Za dodatnu validaciju molekuskog dokinga, izračunate su i RMSD

vrednosti teških atoma između konformacija referentnih liganada dobijenih nakon simulacija MD i konformacija dobijenih molekulskim dokingom (Tabela 4.1).

Pošto su sve izračunate vrednosti niže od opšte prihvaćene granične RMSD vrednosti (2 Å), moguće je zaključiti da se rezultati studije molekulskog dokinga mogu smatrati pouzdanim (287).

Tabela 4.1. RMSD vrednosti dobijene re-dokingom jedinjenja iz 3D struktura kao i referentnih jedinjenja iz simulacije MD.

Kompleks	RMSD
5-HT _{2A} -R – risperidon	0,76
D ₂ -R – risperidon	1,26
H ₁ -R – doksepin	0,89
5-HT _{2A} -R – klozapin	1,44
5-HT _{2A} -R – ziprazidon	0,64
5-HT _{2A} -R – lumateperon	1,54
D ₂ -R – klozapin	0,20
D ₂ -R – ziprazidon	0,60
D ₂ -R – lumateperon	0,65
H ₁ -R – klozapin	1,18
H ₁ -R – ziprazidon	1,27
H ₁ -R – lumateperon	1,76

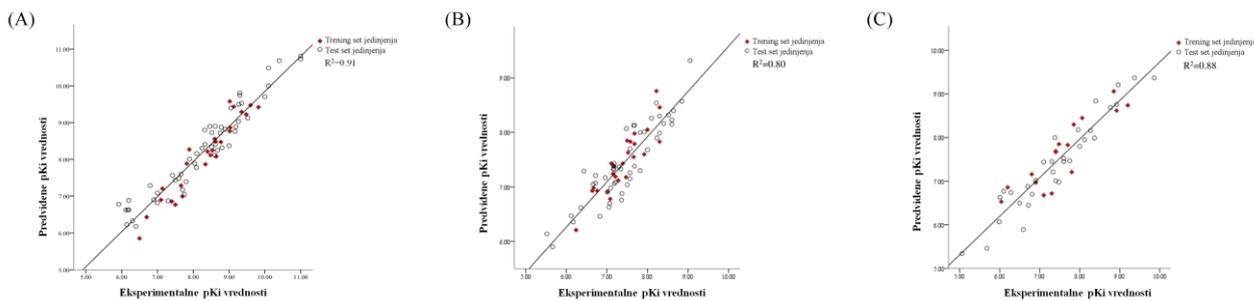
4.1.3 3D-QSAR studija

Sa ciljem da se što tačnije predvide potencijalne bioaktivne konformacije ispitivanih liganada korišćene su studije molekulske dinamike i molekulskog dokinga. Na osnovu dobijenih konformera izračunati su specifični GRIND deskriptori koji predstavljaju strukturne osobine jedinjenja odgovorne za ispoljavanje biološke aktivnosti.

U ovom istraživanju su formirana tri regresiona modela, za 5-HT_{2A}, D₂ i H₁ receptor, u cilju definisanja farmakofore dualnih antagonista 5-HT_{2A}/D₂-R, sa smanjenim afinitetom za H₁-R. Rezultati pKi vrednosti predviđeni formiranim 3D-QSAR modelima su prikazani u Tabelama A7.7-A7.9, dok je odnos predviđenih i eksperimentalnih vrednosti grafički prikazan na Slici 4.6.

U nastojanju da se formiraju pouzdani 3D-QSAR modeli sa dobrom moći predviđanja, izračunati su parametri interne i eksterne validacije (Tabela 4.2). Interna prediktivnost modela je potvrđena visokim vrednostima R² i Q² (> 0,5) i niskim RMSEE vrednostima. Tačnost u predviđanju modela za eksterni set podataka je definisana korišćenjem jedinjenja iz test seta. Dobijene vrednosti statističkih parametara R²_{pred}, r²_m, r²_m i \bar{r}_m^2 veće od 0,5, vrednosti Δr_m^2 niže od 0,2 i niske RMSEP vrednosti su ukazale na dobru stabilnost i prediktivni potencijal formiranih 3D-QSAR modela, koji mogu da se koriste za pouzdano kvantitativno predviđanje aktivnosti novih dizajniranih jedinjenja.

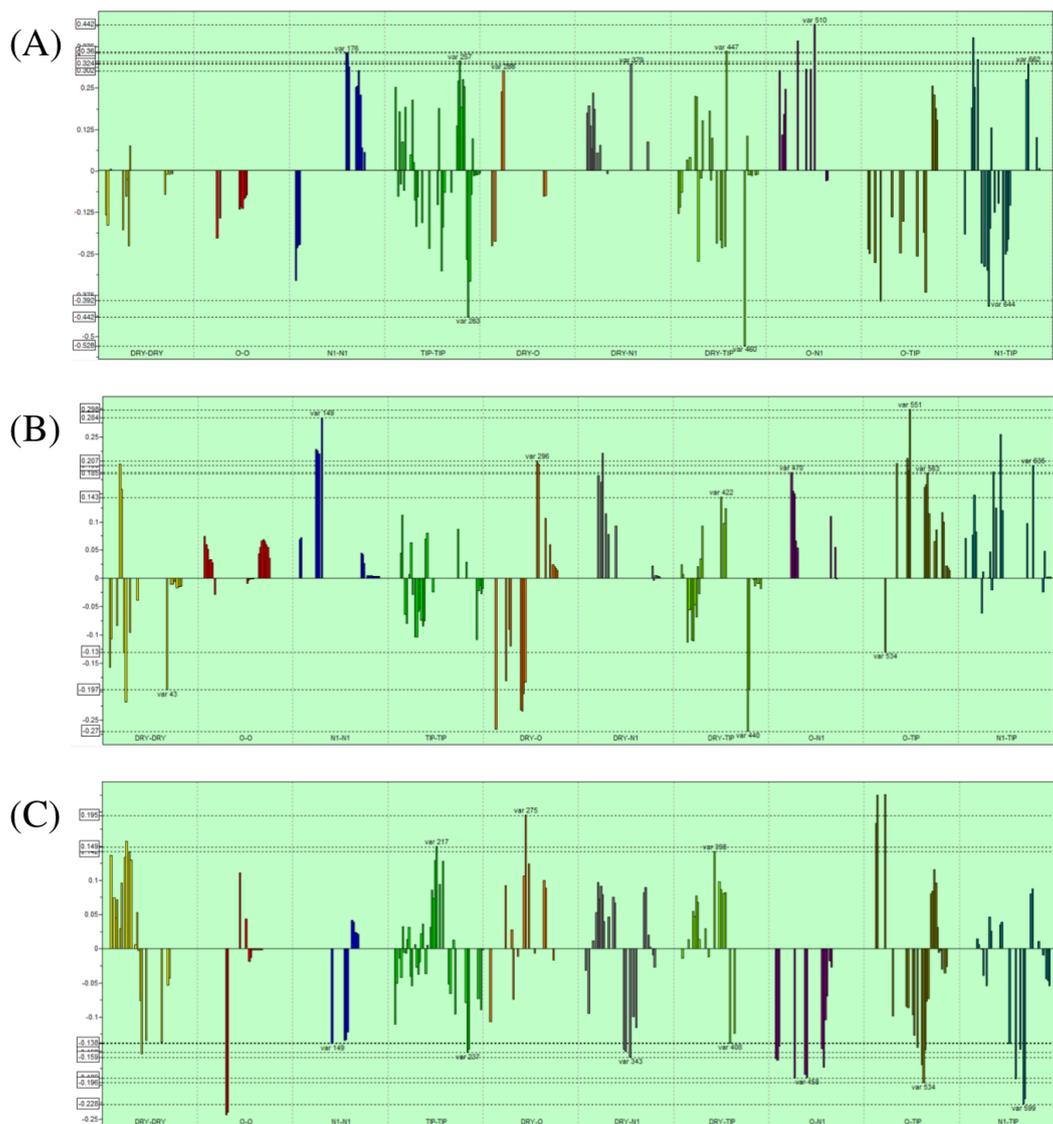
GRIND varijable sa najznačajnijim uticajima na biološku aktivnost ispitivanih jedinjenja na određenom receptoru su prikazane na Slici 4.7. Varijable su predstavljene brojevima i opisuju optimalnu udaljenost između dve iste ili različite hemijske probe. Identifikovane varijable sa pozitivnim uticajem su u direktnoj korelaciji sa proučavanim pKi vrednostima, dok varijable sa negativnim uticajem utiču na smanjenje pKi vrednosti.



Slika 4.6. Odnos predviđenih i eksperimentalnih pKi vrednosti u 3D-QSAR modelima za 5-HT_{2A}-R (A), D₂-R (B) i H₁-R (C).

Tabela 4.2. Rezultati interne i eksterne validacije formiranih 3D-QSAR modela.

Model	Q^2	R^2	$RMSEE$	R^2_{pred}	$RMSEP$	r^2_m	r'^2_m	\bar{r}^2_m	Δr^2_m	$(r^2 - r'^2) / r^2$	k'
5-HT _{2A} -R	0,66	0,92	0,43	0,82	0,38	0,71	0,81	0,76	0,10	0,01	0,97
D ₂ -R	0,61	0,81	0,36	0,77	0,25	0,69	0,76	0,72	0,08	0,00	1,01
H ₁ -R	0,76	0,91	0,34	0,78	0,41	0,78	0,60	0,69	0,18	0,07	1,01
Kriterijum	>0,50	>0,70		>0,50	$\leq 2 \times RMSEP$	>0,50	>0,50	>0,50	<0,20	<0,10	$0,85 \leq k' \leq 1,15$



Slika 4.7. Varijable sa pozitivnim i negativnim uticajem na aktivnost za 3D-QSAR modele: 5-HT_{2A}-R (A), D₂-R (B) i H₁-R (C).

4.1.4 Analiza strukture farmakofore ispitivanih antagonista 5-HT_{2A}-R

Formirani i validirani 3D-QSAR model je omogućio formiranje kvantitativne zavisnosti između izračunatih deskriptora ispitivanih antagonista i biološke aktivnosti na 5-HT_{2A}-R, pružajući jedinstven uvid u najvažnije strukturne karakteristike odgovorne za potentno antagonističko delovanje.

Varijable sa najznačajnijim pozitivnim uticajem na aktivnost ispitivanih antagonista na 5-HT_{2A}-R su: var257 (TIP-TIP: 21,20 - 21,60 Å), var447 (DRI-TIP: 15,60 - 16,00 Å), var379 (DRI-N1: 15,60 - 16,00 Å), var176 (N1-N1: 16,00 - 16,40 Å), var288 (DRI-O: 6,40 - 6,80 Å), var510 (O-N1: 13,60 - 14,00 Å) i var662 (N1-TIP: 20,00 - 20,40 Å), dok su negativan uticaj ispoljile varijable: var460 (DRI-TIP: 20,80 - 21,20 Å), var263 (TIP-TIP: 23,60 - 24,00 Å) i var644 (N1-TIP: 12,80 - 13,20 Å) (Slika 4.7-A). Kratak opis selektovanih varijabli je predstavljen u Tabeli 4.3.

Tabela 4.3. Najvažnije varijable sa pozitivnim i negativnim uticajem na antagonističku aktivnost ispitivanih liganada na 5-HT_{2A}-R.

Varijable	Parovi proba	Udaljenost (Å)	Opis
var176	N1-N1 (pozitivna)	16,00 – 16,40	Dve grupe sa osobinama akceptora vodonične veze na optimalnoj udaljenosti, prisutne kod potentnih liganada iz klastera 2.
var257	TIP-TIP (pozitivna)	21,20 – 21,60	Označava dužinu jedinjenja u klasteru 2 i ima važan uticaj na povećanje aktivnosti jedinjenja za 5-HT _{2A} -R.
var263	TIP-TIP (negativna)	23,60 – 24,00	Nepovoljna udaljenost između dva sterna regiona prisutna kod nekoliko dugih jedinjenja.
var288	DRY-O (pozitivna)	6,40 - 6,80	Definiše udaljenost između hidrofobnog regiona i protonovanog azota kao donora vodonične veze. Prisutna kod svih proučavanih jedinjenja.
var379	DRY-N1 (pozitivna)	15,60 – 16,00	Opisuje poželjnu udaljenost između hidrofobnog regiona i akceptora H-veze. Prisutna kod većine jedinjenja iz klastera 2 i 3.
var447	DRY-TIP (pozitivna)	15,60 – 16,00	Slično var257, opisuje pozitivan uticaj optimalne udaljenosti između hidrofobnih i sternih regiona kod jedinjenja iz klastera 2 i 3.
var460	DRY-TIP (negativna)	20,80 – 21,20	Slično var263, ukazuje da povećanje udaljenosti između hidrofobnih i sternih regiona negativno utiče na aktivnost.
var510	O-N1 (pozitivna)	13,60 – 14,00	Prisustvo akceptora i donora H-veze na određenoj udaljenosti, uočeno kod većine potentnih jedinjenja iz klastera 2.
var644	N1-TIP (negativna)	12,80 – 13,20	Prisutna kod manje aktivnih jedinjenja iz klastera 1 koja poseduju sterni region i akceptora H-veze na manjem rastojanju.
var662	N1-TIP (pozitivna)	20,00 – 20,40	Slično var176 i var379, opisuje akceptora H-veze i sterni region na optimalnom rastojanju. Uglavnom izražena kod jedinjenja iz klastera 2.

Jedinjenja iz klastera 1 su triciklični derivati dibenzocikloheptena sa opsegom pKi vrednosti za 5-HT_{2A}-R od 5,92 do 8,80. Analizom formiranog 3D-QSAR modela je pokazano da samo var288 (DRY-O) ima snažan pozitivan uticaj na aktivnost ispitivanih jedinjenja iz ovog klastera. Visoka vrednost ove varijable, koja opisuje optimalnu udaljenost od 6,40 - 6,80 Å između hidrofobnog centra, tricikličnog prstena, i protonovanog azota kao donora H-veze, je izračunata za najaktivnije jedinjenje iz ove grupe, ChEMBL366164 (pKi = 8,80) (Slika 4.8-A).

Suprotno tome, najveći negativni uticaj na aktivnost ispitivanih antagonista je pokazala varijabla N1-TIP, var644 (Slika 4.8-B). Ona definiše nepovoljnu udaljenost (12,80 - 13,20 Å) između akceptora H-veze, karboksilne grupe, i sternog regiona oko dibenzocikloheptenskog prstena. Specifična dužina jedinjenja iz klastera 1, koja je niža od optimalne (var257), je ograničila prisustvo značajnih varijabli sa pozitivnim uticajem poput: var176 (N1-N1), var257 (TIP-TIP), var379 (DRY-N1), var447 (DRY-TIP), var510 (O-N1) i var662 (N1-TIP), koje su izražene kod potentnih jedinjenja iz klastera 2 i 3.

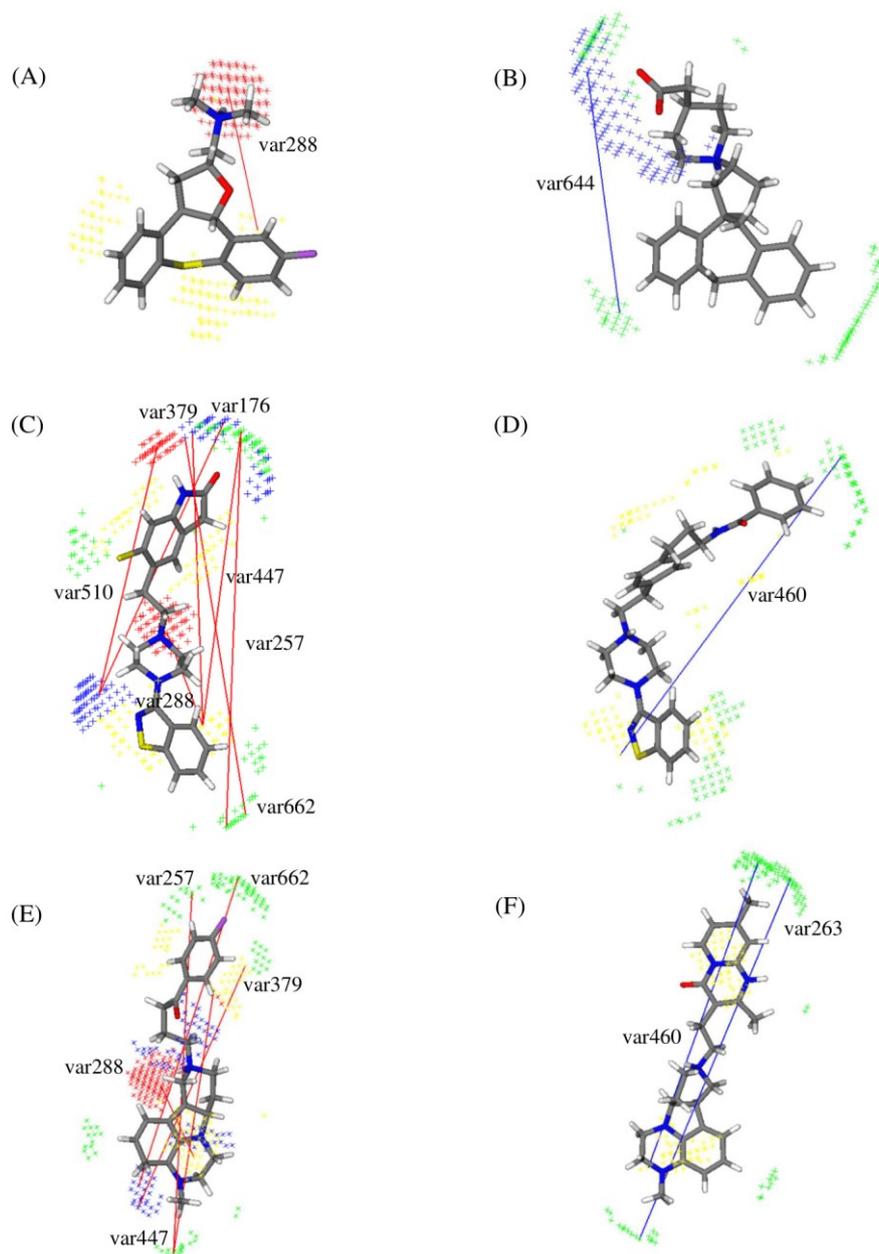
Derivati 1,2-benzoizotiazola čine jedinjenja iz klastera 2 sa opsegom pKi vrednosti 7,00-11,00 za 5-HT_{2A}-R. Sve izračunate GRIND varijable, koje su pokazale značajan pozitivan uticaj na aktivnost ispitivanih antagonista, su prisutne u referentnom jedinjenju ove grupe, ziprazidonu (ChEMBL708) (Slika 4.8-C). 3D-QSAR studijom su izdvojene varijable DRY-TIP (var447: 15,60 - 16,00 Å) i TIP-TIP (var257: 21,20 - 21,60 Å) koje definišu optimalnu dužinu visoko potentnih jedinjenja klastera 2. Njima se opisuje prostorna udaljenost između sterne regije oko oksindolnog prstena i 1,2-benzoizotiazolnog prstena kao sternog ili hidrofobnog centra (Slika 4.8-C). Prema tome, moguće je zaključiti da prisustvo dva heterociklična prstena na određenoj udaljenosti povećava biološku aktivnost i pruža povoljno uklapanje u vezivno mesto 5-HT_{2A}-R. Posmatrajući korelogram N1-N1 primetno je da var176 poseduje snažan pozitivan uticaj na pKi vrednosti, ukazujući na optimalnu udaljenost između dva akceptora H-veze, karbonilnog kiseonika

oksindolnog prstena i azotovog atoma benzotiazolnog prstena, od 16,00 – 16,40 Å (Slika 4.8-C). Važnost vodoničnih interakcija u aktivnom mestu proučavanog 5-HT_{2A}-R je dodatno potvrđena GRIND varijablama DRY-N1, O-N1 i N1-TIP. Većina potentnih jedinjenja iz klastera 2 poseduje visoke vrednosti varijabli N1-TIP (var644: 12,80 - 13,20 Å) i DRY-N1 (var379: 15,60 - 16,00 Å), koje opisuju povoljnu udaljenost između karbonilnog kiseonika oksindolnog prstena, kao akceptora H-veze, i benzotiazolnog prstena kao sternog ili hidrofobnog centra (Slika 4.8-C). Pored toga, O-N1 (var510) varijablom je pokazano da osim akceptora H-veze, i grupe sa donorskim osobinama pozitivno korelišu sa biološkom aktivnosti ispitivanih liganada na 5-HT_{2A}-R. Ona definiše udaljenost između –NH grupe oksindolnog prstena, kao donora, i atoma azota benzotiazolnog prstena kao akceptora H-veze (Slika 4.8-C). Kao i kod jedinjenja iz klastera 1, i ovde je prisutna var288 (DRY-O), koja ukazuje na važnost protonovanog azota piperazinskog prstena za ostvarivanje ključne elektrostatičke interakcije sa aktivnim mestom 5-HT_{2A}-R (Slika 4.8-C) (157).

U okviru klastera 2, nizak afinitet za 5-HT_{2A}-R (pKi = 8,32) je eksperimentalno određen za ChEMBL253233 (Slika 4.8-D). Pokazano je da dodatno uvođenje benzamidnog supstituenta visoko koreliše sa niskom aktivnošću izabranog liganda, što opisuje DRY-TIP varijabla (var460). Naime, ona pokazuje da povećanje udaljenosti između sternih i hidrofobnih regija (20,80 - 21,20 Å), u odnosu na optimalnu udaljenost (var447: 15,60 - 16,00 Å), onemogućava povoljno uklapanje u aktivno mesto 5-HT_{2A}-R (Slika 4.8-D).

Klaster 3 (pKi: 6,15-9,27) je sačinjen od jedinjenja koja predstavljaju tetraciklične hinoksalinske derivate, čiji je strukturni predstavnik lumateperon (ChEMBL3233142). Formiranim 3D-QSAR modelom je pokazano da prisustvo dve grupe sa hidrofobnim osobinama, poput tetracikličnog i benzenovog prstena na optimalnoj udaljenosti, pozitivno koreliše sa pKi vrednostima proučavanih antagonista za 5-HT_{2A}-R, što je opisano varijablama DRY-TIP (var447: 15,60 - 16,00 Å) i TIP-TIP (var257: 21,20 - 21,60 Å) (Slika 4.8-E). Pored toga, važnost akceptorskih osobina hinoksalinskog prstena, u cilju ostvarivanja potencijalne vodonične interakcije sa aminokiselinama iz aktivnog mesta 5-HT_{2A}-R, je definisana var379 (DRY-N1) i var662 (N1-TIP) (Slika 4.8-E). Kao i kod ispitivanih jedinjenja iz klastera 1 i 2, GRIND varijabla DRY-O (var288) je takođe prisutna i kod jedinjenja klastera 3, opisujući udaljenost između tetraciklične strukture i piperazinskog azota (Slika 4.8-E).

Visoke vrednosti negativnih GRIND varijabli TIP-TIP (var263: 23,60 - 24,00 Å) i DRY-TIP (var460: 20,80 - 21,20 Å) ukazuju da prisustvo sternog centra, poput metil grupe, na dužem rastojanju od hinoksalinskog prstena utiče na smanjenje biološke aktivnosti za 5-HT_{2A}-R, kao kod ChEMBL3233416 (pKi = 6,15) (Slika 4.8-F). Niža aktivnost ovog jedinjenja takođe može biti opisana i nedostatkom značajnih varijabli sa pozitivnim uticajem, N1-TIP (var662) i DRY-N1 (var379), zbog povećane udaljenosti između ovih regiona.



Slika 4.8. GRIND varijable iz 3D-QSAR studije sa najznačajnijim pozitivnim (crvene) i negativnim (plave) uticajem na aktivnost ispitivanih antagonista na 5-HT_{2A}-R. Jedinjenja klastera 1: (A) ChEMBL366164 i (B) ChEMBL1277585; jedinjenja klastera 2: (C) ChEMBL708-ziprazidon i (D) ChEMBL253233; jedinjenja klastera 3: (E) ChEMBL3233142-lumateperon i (F) ChEMBL3233416. Hidrofobne regije (DRY) su prikazane žutom bojom, sterne regije (TIP) zelenom, regija donora H-veze (O) je prikazana crvenom bojom dok akceptora H-veze (N1) plavom.

4.1.5 Interakcije u vezujućem mestu 5-HT_{2A}-R

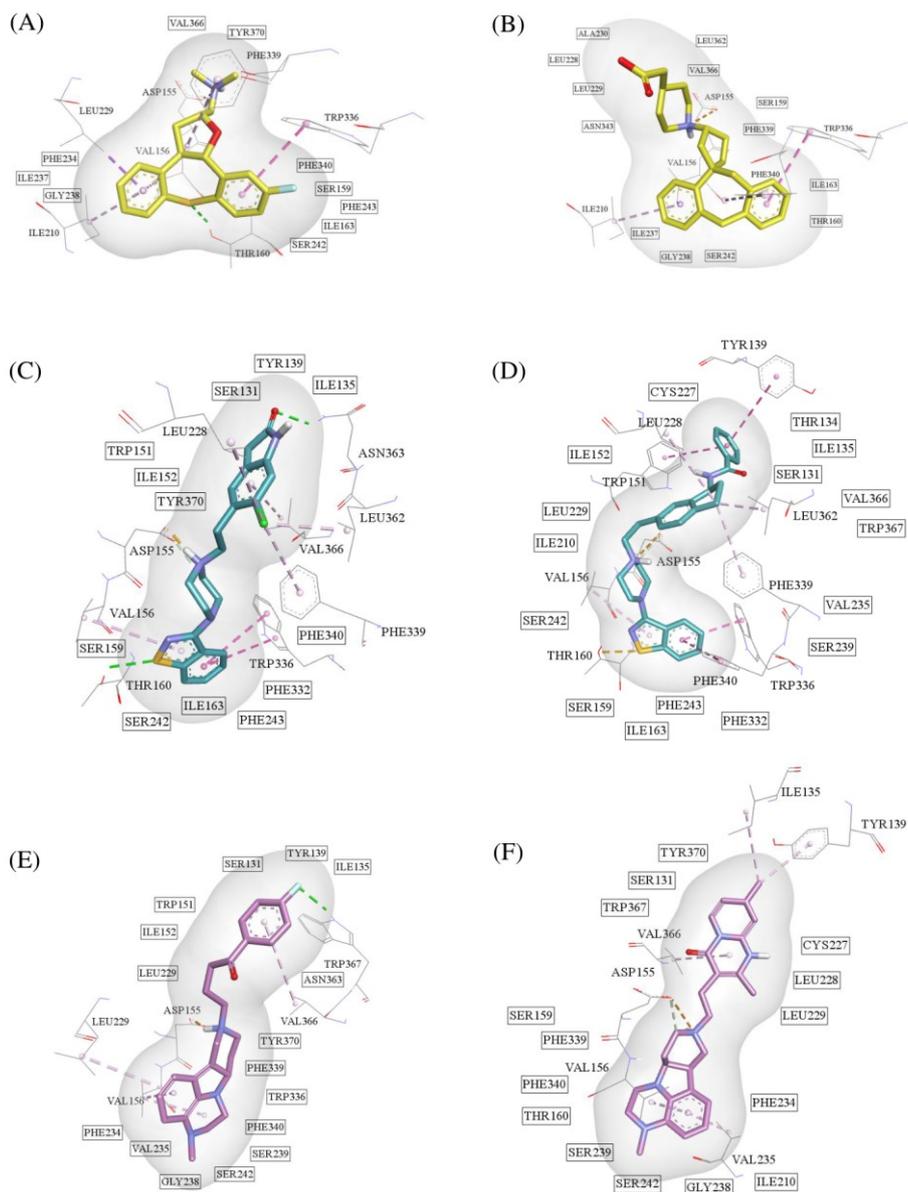
U daljem istraživanju primenjena je studija molekuskog dokinga u cilju validacije rezultata 3D-QSAR analize.

Konformacija 5-HT_{2A}-R nakon simulacije sa klopazinom je korišćena za doking jedinjenja iz klastera 1. Analiza intermolekulskih interakcija ChEMBL366164 i ChEMBL1277585 je ukazala

na povoljno uklapanje triciklične strukture ispitivanih antagonista sa donjim hidrofobnim džepom u aktivnom mestu 5-HT_{2A}-R (Slike 4.9-A i 4.9-B). Naime, ovaj segment je odgovoran za formiranje π - π interakcije sa aminokiselinom Trp336^{6.48}, π -alkil interakcija sa Val156 i Ile210 na pozicijama 3.33 i 4.61, i VdW interakcija sa aminokiselinama iz TM domena 3, 5 i 6: Ser159^{3.36}, Ser242^{5.461}, Ile163^{3.40}, Ile237^{5.42}, Gly238^{5.43}, Phe234^{5.39}, Phe243^{5.47} i Phe340^{6.52} (Slike 4.9-A i 4.9-B). U gornjem delu aktivnog mesta, jedinjenja su učestvovala u formiranju dodatnih hidrofobnih interakcija sa Val366^{7.38} i Tyr370^{7.42}. Pored toga, uočeno je da najaktivnije jedinjenje iz ove grupe usled prisustva atoma sumpora, kao akceptora H-veze, gradi vodoničnu interakciju sa Thr160 na poziciji 3.37 (Slika 4.9-A). Ključna elektrostatička interakcija koja nastaje između suprotno naelektrisanih molekula (eng. *salt bridge*), Asp155^{3.32} i azota iz piperazinskog prstena, je prisutna kod svih ispitivanih jedinjenja (Slike 4.9-A i 4.9-B). Rezultati dobijeni studijom molekuskog dokinga potvrđuju zaključke 3D-QSAR analize za klaster 1.

Za doking jedinjenja iz klastera 2 iskorišćena je struktura 5-HT_{2A}-R nakon simulacije MD sa ziprazidonom. Kao što je prikazano na Slikama 4.9-C i 4.9-D, benzotiazolna grupa ispitivanih jedinjenja takođe uspostavlja kontakt sa najznačajnijim aminokiselinama iz donjeg hidrofobnog područja. Iako manje elektronegativan od atoma kiseonika, sumporov atom ima mogućnost formiranja vodoničnih veza koje mogu uticati na stabilizaciju proučavanog kompleksa (371). Studijom molekuskog dokinga je pokazano da sumpor iz benzotiazolnog prstena ziprazidona formira vodoničnu vezu sa Thr160^{3.37}, kao i ChEMBL366164 iz klastera 1 (Slika 4.9-C). Ovo je moguće potvrditi i varijablama iz formiranog 3D-QSAR modela, var176 (N1-N1) i var510 (O-N1), koje ističu važnost prisustva akceptora H-veze na ovoj poziciji. U odnosu na klaster 1, jedinjenja iz klastera 2 karakteriše prisustvo drugog hidrofobnog regiona, koji je etil piperazinskim mostom odvojen od prvog. Ovaj region se povoljno uklapa u gornji hidrofobni džep ispitivanog 5-HT_{2A}-R, ostvarujući interakcije sa sledećim aminokiselinama: Ser131^{2.60}, Ile135^{2.64}, Ile152^{3.29}, Tyr139, Tyr370^{7.42}, Trp151^{3.28}, Leu228^{45.51}, Leu229^{45.52}, Asn363^{7.35} i Val366^{7.38} (Slika 4.9-C). GRIND varijablama DRY-TIP (var447: 15,60 - 16,00 Å) i TIP-TIP (var257: 21,20 - 21,60 Å) iz 3D-QSAR studije je definisana optimalna udaljenost između opisanih hidrofobnih regiona, dok je pokazano da bilo koje povećanje razdaljine negativno koreliše sa antagonističkom aktivnošću na 5-HT_{2A}-R (var263 i var 460) (Slika 4.9-D). Protonovani azot iz piperazinskog mosta je odgovoran za formiranje interakcije sa Asp155^{3.32} (Slike 4.9-C i 4.9-D). Takođe, uočeno je da jedinjenja sa većim pK_i vrednostima za 5-HT_{2A}-R, poput ziprazidona, formiraju konvencionalnu vodoničnu vezu sa polarnom aminokiselinom iz TM domena 7, Asn363^{7.35} (Slika 4.9-C). Ova interakcija je dodatno potvrđena značajnim varijablama iz 3D-QSAR studije: var176, var379 i var662, koje ističu važnost donorskih i akceptorskih interakcija u aktivnom mestu proučavanog 5-HT_{2A}-R. Suprotno tome, prisustvo benzamidnog supstituenta kod najmanje aktivnog jedinjenja ovog klastera, ChEMBL253233, je izazvalo specifičnu konformaciju koja onemogućava formiranje vodoničnih interakcija (Slika 4.9-D).

Konformacija 5-HT_{2A}-R iz kompleksa sa lumateperonom, dobijena nakon 50 ns simulacije MD, je korišćena za doking tetracikličnih liganada iz klastera 3. Na Slikama 4.9-E i 4.9-F su prikazani lumateperon, kao predstavnik ove grupe, i najmanje aktivno jedinjenje, ChEMBL3233416. Uočeno je da je njihov način vezivanja za 5-HT_{2A}-R sličan ziprazidonu, gde je hinoksalinski prsten pozicioniran u donjem hidrofobnom džepu, dok je benzenski prsten u gornjem, ostvarujući interakcije sa svim važnim aminokiselinama iz ovih regiona. Manja aktivnost ovih derivata u odnosu na ziprazidon može biti opisana nedostatkom vodonične interakcije sa polarnom aminokiselinom Asn363^{7.35}, dok je primećeno da atom fluora interaguje sa Trp367^{7.39} (Slika 4.9-E). Ovo je moguće potvrditi i nedostatkom pozitivnih varijabli iz 3D-QSAR studije, var379 i var662, koje opisuju optimalnu udaljenost između donjeg hidrofobnog/sternog regiona, i akceptora H-veze prisutnog u gornjem heterocikličnom prstenu.



Slika 4.9. Identifikovane intermolekulske interakcije u vezujućem mestu 5-HT_{2A}-R proučavanih liganada: (A) ChEMBL366164, (B) ChEMBL1277585, (C) ChEMBL708-ziprazidon, (D) ChEMBL253233, (E) ChEMBL3233142-lumateperon i (F) ChEMBL3233416. Ljubičastom bojom su prikazane π -alkil i π - π interakcije, vodonične veze su prikazane zelenom, *salt bridge* interakcija je narandžasta, dok su aminokiseline koje formiraju hidrofobne VdW interakcije uokvirene.

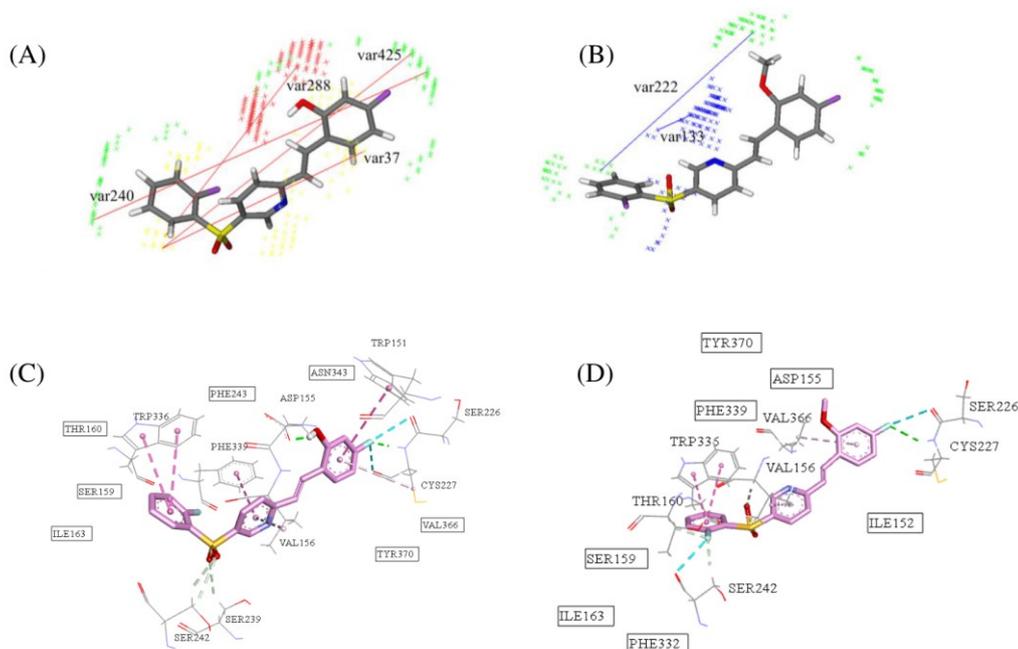
Rezultati dobijeni ovom analizom farmakofore 5-HT_{2A} receptora su u skladu sa rezultatima studije koja je obuhvatila, pored derivata klozapina i ziprazidona, i derivate sulfonilpiridina (372). Najvažnije GRIND varijable iz ove studije su prikazane u Tabeli 4.4. Proučavanjem njihovog uticaja na biološku aktivnost ispitivanog seta jedinjenja na 5-HT_{2A}-R potvrđen je pozitivan uticaj prisustva dva hidrofobna centra na optimalnom rastojanju (var37, var240). Manja udaljenost između sternih regiona, kao kod derivata klozapina, je pokazala negativan uticaj (var222). Iz tog razloga, moguće je zaključiti da dužina jedinjenja sa potentnim antagonističkim delovanjem treba biti zadržana u cilju povoljnog uklapanja u vezivno mesto 5-HT_{2A}-R. Takođe, ova studija je dodatno potvrdila povoljan uticaj donora i akceptora H-veze u cilju ostvarivanja interakcije sa

Asn363 iz TM domena 7, koja može usloviti potencijalnu selektivnost i stabilnost formiranog kompleksa (var288, var361).

Sulfonilpiridinski derivati predstavljaju specifičnu grupu ovog ispitivanog seta jedinjenja sa pKi vrednostima 7,19-9,72. Najaktivnije jedinjenje iz ove grupe, ChEMBL240876, poseduje varijable sa pozitivnim uticajem na aktivnost, poput: var37 (DRY-DRY), var240 (TIP-TIP), var288 (DRY-O) i var425 (DRY-TIP) (Slika 4.10-A). One naglašavaju povoljno rastojanje između hidrofobnih i sternih regija u ispitivanom jedinjenju, kao i važnost prisustva donora H-veze (-OH grupe). Zamena -OH supstituenta sa metoksi grupom, koja može biti samo akceptor H-veze, je rezultirala u smanjenju pKi vrednosti za 5-HT_{2A}-R (ChEMBL240878, pKi = 7,19), što je opisano negativnom TIP-TIP varijablom (var222) (Slika 4.10-B). Ono po čemu se ova grupa razlikuje od ostalih ispitivanih antagonista je nedostatak protonovanog azota u strukturi. Iz tog razloga, značajna GRIND varijabla DRY-O (var262) nije prisutna kod ovih derivata, kao ni interakcija sa ključnom aminokiselinom Asp155^{3,32} (Slike 4.10-C i 4.10-D). Iako ovim jedinjenjima nedostaje centralni alifatični amin, eksperimentalno je pokazano da poseduju visok afinitet vezivanja za 5-HT_{2A}-R (373). Na osnovu toga, moguće je zaključiti da protonovani azot nije neophodan, ali je poželjan u ostvarivanju interakcije sa aminergičkim receptorima pružajući veću stabilnost formiranih kompleksa (372).

Tabela 4.4. Najvažnije varijable sa pozitivnim i negativnim uticajem na antagonističku aktivnost ispitivanih liganada na 5-HT_{2A}-R iz studije koja obuhvata derivate sulfonilpiridina (372).

Varijable	Parovi proba	Udaljenost (Å)	Opis
var37	DRY-DRY (pozitivna)	14,80 – 15,20	Predstavlja optimalnu udaljenost između dva hidrofobna centra.
var262	DRY-O (pozitivna)	4,00 – 4,40	Prisutna kod svih jedinjenja osim kod derivata sulfonilpiridina. Naglašava važnost prisustva protonovanog azota.
var288	DRY-O (pozitivna)	14,40 – 14,80	Definiše udaljenost između hidrofobnog regiona i donora H-veze. Karakteristična za derivate ziprazidona.
var425	DRY-TIP (pozitivna)	18,80 – 19,20	Opisuje povoljnu dužinu visoko potentnih antagonista, predstavljajući udaljenost između hidrofobnih i sternih regiona kod derivata ziprazidona i sulfonilpiridina.
var133	N1-N1 (negativna)	2,80 – 3,20	Nepovoljan uticaj karboksilne grupe na biološku aktivnost kod derivata klozapina.
var240	TIP-TIP (pozitivna)	20,40 – 20,80	Udaljenost između sternih regija kod derivata ziprazidona i sulfonilpiridina.
var361	DRY-N1 (pozitivna)	18,40 – 18,80	Ukazuje na važnost prisustva akceptora H-veze, poput karbonilnog kiseonika, na određenoj udaljenosti od heterocikličnog prstena kao hidrofobnog centra.
var222	TIP-TIP (negativna)	13,20 – 13,60	Opisuje negativnu korelaciju između dužine jedinjenja koja pripadaju derivatima klozapina i biološke aktivnosti na 5-HT _{2A} -R.



Slika 4.10. Identifikovane GRIND varijable i intermolekulske interakcije u vezujućem mestu 5-HT_{2A}-R sulfonilpiridskih derivata: (A) i (C) ChEMBL240876, (B) i (D) ChEMBL240878. Hidrofobne regije (DRY) su prikazane žutom bojom, sterne regije (TIP) zelenom, regija donora H-veze (O) je prikazana crvenom bojom dok akceptora H-veze (N1) plavom. Kod rezultata molekuskog dokinga, ljubičastom bojom su prikazane π -alkil i π - π interakcije, vodonične veze su prikazane zelenom, dok su aminokiseline koje formiraju hidrofobne VdW interakcije uokvirene.

4.1.6 Analiza strukture farmakofore ispitivanih antagonista D₂-R

Formiranim 3D-QSAR modelom za D₂-R omogućeno je sagledavanje najvažnijih strukturnih deskriptora koji utiču na biološku aktivnost ispitivanih antagonista na ovom aminergičkom receptoru.

Najznačajnije varijable sa pozitivnim uticajem na antagonističku aktivnost na D₂-R su: var422 (DRY-TIP : 12,80 - 13,20 Å), var635 (N1-TIP: 20,00 - 20,40 Å), var551 (O-TIP: 12,40 - 12,80 Å), var563 (O-TIP: 17,20 - 17,60 Å), var296 (DRY-O: 14,40 - 14,80 Å), var149 (N1-N1: 7,60 - 8,00 Å) i var470 (O-N1: 6,00 - 6,40 Å), dok su negativan uticaj ispoljile varijable: var534 (O-TIP: 5,60 - 6,00 Å), var440 (DRY-TIP: 20,00 - 20,40 Å) i var43 (DRY-DRY: 17,20 - 17,60 Å) (Slika 4.7-B). Kratak opis selektovanih varijabli je predstavljen u Tabeli 4.5.

Tabela 4.5. Najvažnije varijable sa pozitivnim i negativnim uticajem na antagonističku aktivnost ispitivanih liganada na D₂-R.

Varijable	Parovi proba	Udaljenost (Å)	Opis
var43	DRY-DRY (negativna)	17,20 – 17,60	Udaljenost između dva hidrofobna centra veća od optimalne ima negativan uticaj na aktivnost ispitivanih liganada na D ₂ -R.
var149	N1-N1 (pozitivna)	7,60 – 8,00	Opisuje optimalnu udaljenost između dva akceptora H-veze, uglavnom prisutna kod jedinjenja sa većim pKi vrednostima za D ₂ -R.
var296	DRY-O (pozitivna)	14,40 – 14,80	Definiše udaljenost između hidrofobnog regiona i donora H-veze. Karakteristična za jedinjenja iz klastera 2.
var422	DRY-TIP (pozitivna)	12,80 – 13,20	Opisuje povoljnu udaljenost između hidrofobnih i sternih regiona, svojstvena visoko potentnim jedinjenjima iz klastera 2 i 3.
var440	DRY-TIP (negativna)	20,00 – 20,40	Slično var43, ukazuje da povećanje prostorne udaljenosti između hidrofobnih i sternih regiona negativno utiče na aktivnost.
var470	O-N1 (pozitivna)	6,00 – 6,40	Udaljenost između akceptora i donora H-veze. Prisutna kod svih poučavanih jedinjenja.
var534	O-TIP (negativna)	5,60 – 6,00	Prisutna kod većine nisko potentnih jedinjenja iz klastera 1 koja poseduju donora H-veze i sterna region na udaljenosti nižoj od optimalne.
var551	O-TIP (pozitivna)	12,40 – 12,80	Opisuje udaljenost između protonovanog azotovog atoma, kao donora H-veze, i sternog regiona. Prisutna kod jedinjenja iz sva tri klastera.
var563	O-TIP (pozitivna)	17,20 – 17,60	Slično var296, donor H-veze na određenoj udaljenosti od sternog centra pozitivno koreliše sa aktivnošću jedinjenja iz klastera 2 za D ₂ -R.
var635	N1-TIP (pozitivna)	20,00 – 20,40	Uglavnom izražena kod jedinjenja iz klastera 2 i 3, definiše prostornu udaljenost između akceptora H-veze i sternog regiona.

Opseg ispitivanih pKi vrednosti jedinjenja iz klastera 1 za D₂-R je 5,66-8,64. Varijable sa najvećim intenzitetom koje poseduju pozitivan uticaj na biološku aktivnost su var149, var470 i var551. Za najaktivnije jedinjenje iz ovog klastera, ChEMBL90882 (pKi = 8,60), izračunate su visoke vrednosti navedenih varijabli (Slika 4.11-A). Naime, var149 je N1-N1 tip varijable koja opisuje udaljenost između dva akceptora H-veze, dibenzoksepinskog atoma kiseonika i piperazinskog azota, na rastojanju od 7,60-8,00 Å (Slika 4.11-A). GRIND varijable O-N1 (var470) i O-TIP (var551) dodatno validiraju rezultate 3D-QSAR studije ukazujući na važnost prisustva drugog, protonovanog, atoma azota u prstenu piperazina koji je ključan za uspostavljanje elektrostatičke interakcije sa D₂-R. Var470 definiše prostornu udaljenost (6,00-6,40 Å) između pomenutog atoma azota kao donora H-veze i atoma kiseonika iz dibenzoksepina kao akceptora (Slika 4.11-A). O-TIP varijablom (var551) je opisano rastojanje od 12,40-12,80 Å između protonovanog azota i sterne regije oko tricikličnog prstena (Slika 4.11-A).

Najnižu aktivnost među proučavanim jedinjenjima iz klastera 1 poseduje ChEMBL6437 (pKi = 5,66). 3D-QSAR analizom je pokazano da GRIND varijabla O-TIP (var534) značajno koreliše sa biološkom aktivnošću ove grupe jedinjenja, opisujući nepovoljnu udaljenost između donora H-veze, protonovanog azota i metil supstituenta kao sternog centra (Slika 4.11-B). U poređenju sa jedinjenjima iz klastera 2, jedinjenja iz ove grupe generalno poseduju niže aktivnosti na D₂-R, što je dodatno potvrđeno nedostatkom pozitivnih varijabli: var296, var563 i var635. Takođe, nedostatak heteroatoma sa osobinama akceptora H-veze u tricikličnoj strukturi je dodatno doprineo smanjenju aktivnosti ove grupe jedinjenja.

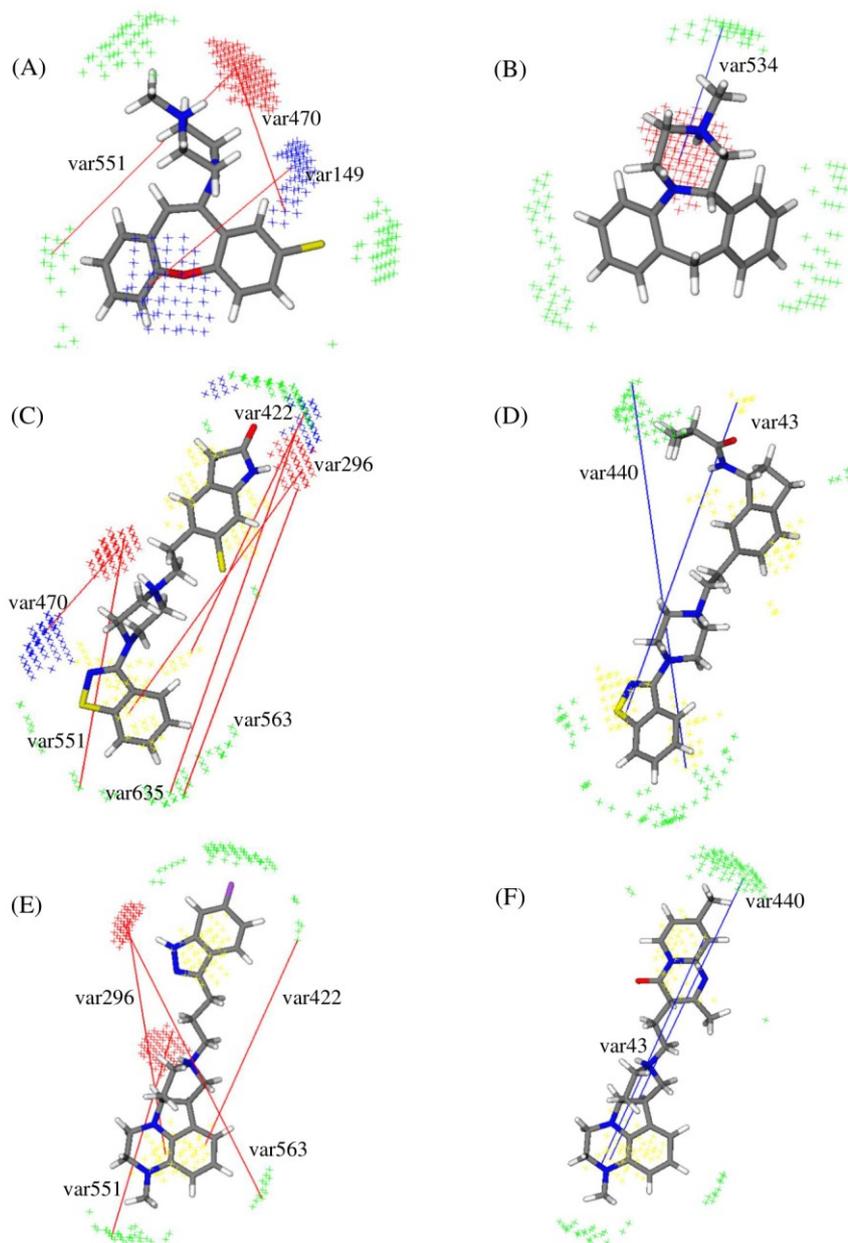
Eksperimentalno dobijene pKi vrednosti ukazuju da jedinjenja iz klastera 2 poseduju visok afinitet za D₂-R (pKi: 7,17-9,05). Za opis varijabli sa najznačajnijim pozitivnim uticajem na aktivnost izabrano je referentno jedinjenje ovog klastera, ziprazidon (pKi_{D₂} = 8,30) (Slika 4.11-C).

Iz kros-korelograma DRY-O moguće je primetiti da var296 poseduje važan uticaj na biološku aktivnost, opisujući optimalno prostorno rastojanje od 14,40-14,80 Å između benzotiazola kao hidrofobnog centra i -NH grupe oksindolnog prstena, kao donora H-veze (Slika 4.11-C). Približna udaljenost je definisana i DRY-TIP varijablom (var422: 12,80-13,20 Å) koja ukazuje na najpovoljniju udaljenost između dva heterociklična prstena (Slika 4.11-C). Kao i kod klastera 1, značajnost protonovanog azota u jedinjenju je potvrđena prisustvom varijabli O-N1 (var470) i O-TIP (var551) (Slika 4.11-C). Pored toga, identifikovano je da većina potentnih jedinjenja iz ovog klastera poseduje visoke vrednosti var563 (O-TIP) i var635 (N1-TIP). Slično već opisanoj var296, GRIND varijabla O-TIP (var563) definiše optimalnu distancu od 17,20-17,60 Å između sterne regije benzotiazolnog prstena i -NH grupe oksindola (Slika 4.11-C). S druge strane, varijabla N1-TIP (var635: 20,00-20,40Å) naglašava da prisustvo akceptora H-veze, poput karbonilnog kiseonika oksindolnog prstena, na optimalnom rastojanju od istog sternog centra pozitivno koreliše sa biološkom aktivnošću proučavanih antagonista (Slika 4.11-C).

ChEMBL400236 predstavlja najmanje aktivno jedinjenje ove grupe na D₂-R (pKi = 7,17). Analiza 3D-QSAR modela je pokazala da GRIND varijable DRY-DRY (var43) i DRY-TIP (var440) poseduju najviše izražen negativan uticaj na aktivnost ovog jedinjenja. Naime, kao i kod 5-HT_{2A}-R, povećanje udaljenosti između sternih i hidrofobnih regija (var43: 17,20 - 17,60 Å i var440: 20,00 - 20,40 Å), usled uvođenja dodatnog supstituenta na oksindolnom prstenu, nepovoljno utiče na uklapanje u vezivno mesto D₂-R (Slika 4.11-D).

U okviru klastera 3, pKi vrednosti za D₂-R su distribuirane u rang 5,52-7,57. Visoku eksperimentalnu aktivnost je pokazalo jedinjenje ChEMBL3233413 (pKi = 7,57). Potencijalno, veća biološka aktivnost ovog jedinjenja u odnosu na ostala iz klastera 3 može biti objašnjena prisustvom donora H-veze, -NH indazola, na optimalnom rastojanju od tetracikličnog prstena kao hidrofobnog ili sternog centra (DRY-O, var296: 14,40-14,80 Å; O-TIP, var563: 17,20 – 17,60 Å) (Slika 4.11-E). Slično jedinjenjima iz klastera 2, prisustvo dva heterociklična prstena je pokazalo pozitivan uticaj na aktivnost ispitivanih jedinjenja za D₂-R. GRIND varijabla DRY-TIP (var422: 12,80-13,20 Å) definiše optimalno rastojanje između njih, dok O-TIP varijabla (var551: 12,40-12,80 Å) potvrđuje važnost protonovanog azota i kod ove grupe jedinjenja (Slika 4.11-E).

Najnižu aktivnost u ispitivanom setu liganada za D₂-R je pokazalo jedinjenje ChEMBL3233416 iz klastera 3 (pKi = 5,52). Baš kao i kod 5-HT_{2A}-R, uvođenje metil supstituenta na većoj udaljenosti od tetracikličnog prstena kao hidrofobnog regiona je pokazalo negativan uticaj na aktivnost ispitivanog jedinjenja (DRY-TIP, var440: 20,00 - 20,40 Å) (Slika 4.11-F). Takođe, moguće je predvideti potencijalno loše uklapanje ChEMBL3233416 u aktivno mesto D₂-R usled veće udaljenosti između dva heterociklična prstena, što je opisano negativnom varijablom DRY-DRY (var43: 17,20-17,60 Å) (Slika 4.11-F). Nedostatak varijabli sa pozitivnim uticajem na aktivnost: var149, var296, var563 i var635, dodatno potvrđuje rezultate koji sugerišu da prisustvo akceptora i donora H-veze na optimalnom rastojanju od tetracikličnog prstena pozitivno koreliše sa antagonističkim delovanjem na D₂-R.



Slika 4.11. GRIND varijable iz 3D-QSAR studije sa najznačajnijim pozitivnim (crvene) i negativnim (plave) uticajem na aktivnost ispitivanih antagonista na D₂-R. Jedinjenja klastera 1: (A) ChEMBL90882 i (B) ChEMBL6437; jedinjenja klastera 2: (C) ChEMBL708-ziprazidon i (D) ChEMBL400236; jedinjenja klastera 3: (E) ChEMBL3233413 i (F) ChEMBL3233416. Hidrofobne regije (DRY) su prikazane žutom bojom, sterne regije (TIP) zelenom, regija donora H-veze (O) je prikazana crvenom bojom dok akceptora H-veze (N1) plavom.

4.1.7 Interakcije u vezujućem mestu D₂-R

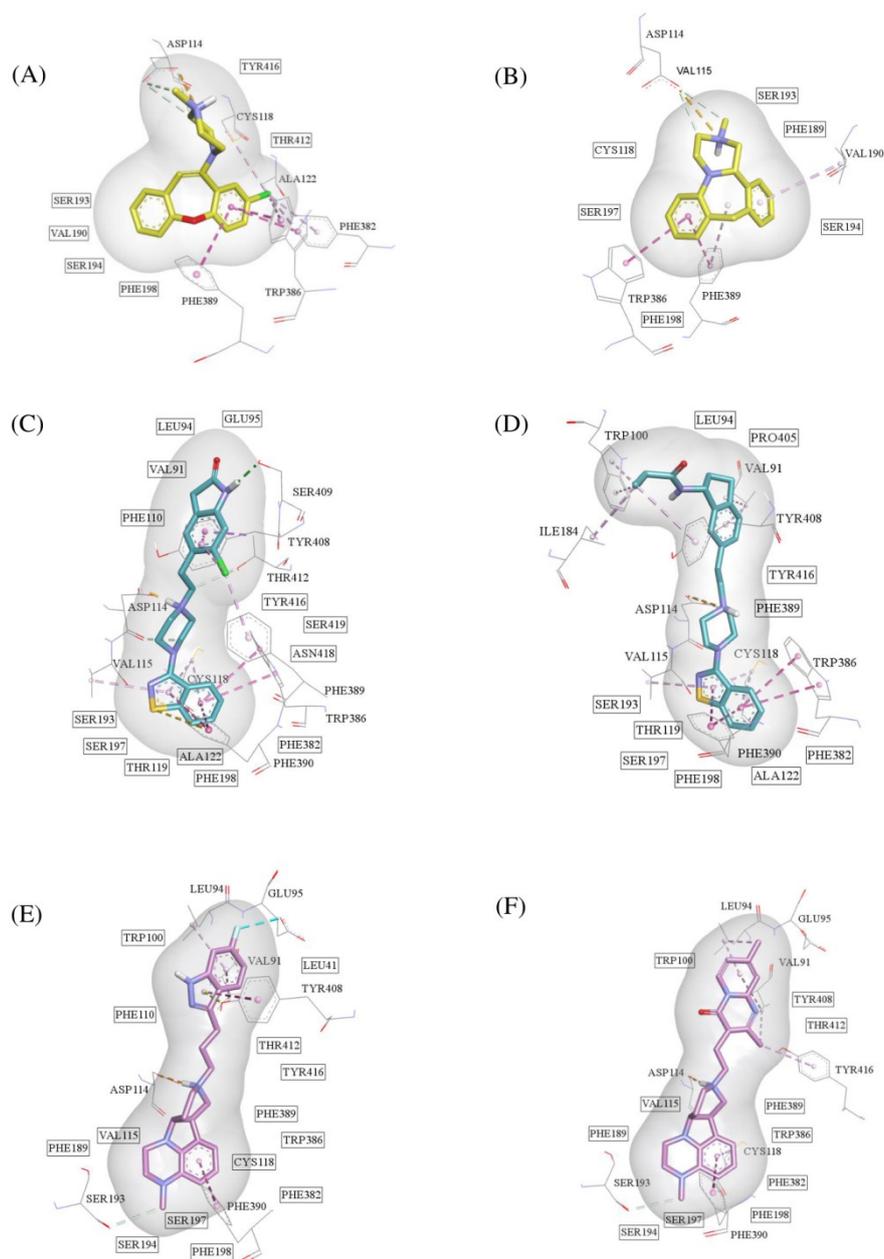
U cilju definisanja ključnih interakcija između proučavanih antagonista i aminergičkog D₂-R, kao i poređenja dobijenih rezultata sa analizom strukture farmakofore primenom 3D-QSAR modelovanja, korišćena je metoda molekuskog dokinga.

Konformacija D₂-R sa klozapinom nakon simulacije MD je primenjena za doking jedinjenja iz klastera 1. Način vezivanja antagonista opisanih u 3D-QSAR studiji, ChEMBL90882 i

ChEMBL6437, je prikazan na Slikama 4.12-A i 4.12-B. Triciklični prsten oba jedinjenja pokazao je dobro uklapanje sa hidrofobnim džepom D₂-R koji je definisan aminokiselinama iz TM domena 3, 5 i 6: Cys118^{3.36}, Ala122^{3.40}, Val190^{5.40}, Ser193^{5.43}, Ser194^{5.44}, Phe198^{5.47}, Phe382^{6.44}, Trp386^{6.48} i Phe389^{6.51} (Slike 4.12-A i 4.12-B). Takođe, uočeno je da aktivnije jedinjenje, ChEMBL90882, formira dve hidrofobne VdW interakcije sa aminokiselinama iz TM domena 7, Thr412 i Tyr416 (Slika 4.12-A). Ključna aminokiselina za delovanje na aminergičkim receptorima, Asp na poziciji 3.32 (Asp114), gradi elektrostatičku interakciju sa protonovanim azotom piperazinskog prstena (Slike 4.12-A i 4.12-B). GRIND varijable O-N1 (var470) i O-TIP (var551) iz 3D-QSAR studije su u skladu sa rezultatima dobijenim molekulskim dokingom. One naglašavaju važnost hidrofobnih i vodoničnih interakcija u aktivnom mestu D₂-R, opisujući optimalnu udaljenost između tricikličnog prstena i tercijarnog amina proučavanih antagonista. U poređenju sa proučavanim jedinjenjima iz klastera 2 i 3, policiklični aromatični derivati klastera 1 poseduju niži afinitet za D₂-R, što je potvrđeno i rezultatima AD Vina doking skora prikazanog u Tabeli A7.5.

Jedinjenja iz klastera 2 su dokovana u konformaciju D₂-R nakon 50 ns simulacije MD sa ziprazidonom kao strukturnim predstavnikom. Rezultati molekulskog dokinga su pokazali da benzotiazolni prsten ove grupe jedinjenja formira interakcije sa donjim hidrofobnim džepom, uključujući aminokiseline: Val115^{3.33}, Cys118^{3.36}, Thr119^{3.37}, Ala122^{3.40}, Ser193^{5.43}, Ser197^{5.461}, Phe198^{5.47}, Phe382^{6.44}, Trp386^{6.48}, Phe389^{6.51}, Phe390^{6.52} i Asn418^{7.45} (Slika 4.12-C). Etil piperazinski linker, osim interakcije sa polarnom asparaginskom kiselinom na položaju 3.32 (Asp114), formira i hidrofobne interakcije sa aminokiselinama iz TM domena 7: Thr412^{7.38}, Tyr416^{7.42} i Ser419^{7.46} (Slika 4.12-C). Navedeni linker ima važnu ulogu u definisanju optimalne udaljenosti između dva heterociklična prstena, koja su pokazala dobro uklapanje sa hidrofobnim regijama D₂-R. Naime, oksindolni prsten formira interakcije sa gornjim hidrofobnim džepom koji je definisan sledećim aminokiselinama iz TM2, TM3 i TM7: Val91^{2.61}, Leu94^{2.63}, Glu95^{2.64}, Phe110^{3.28} i Tyr408^{7.34} (Slika 4.12-C). Dodatno, DRY-TIP varijabla (var422) iz formiranog 3D-QSAR modela ukazuje da uvođenje drugog heterocikličnog prstena pozitivno koreliše sa proučavanim pK_i vrednostima za D₂-R. Kao što je prikazano na Slici 4.12-C, -NH oksindola učestvuje u formiranju vodonične interakcije sa Ser409 na poziciji 7.35. Ova interakcija je uglavnom prisutna kod jedinjenja sa većim pK_i vrednostima, koja poseduju donora H-veze na optimalnom rastojanju od donjeg heterocikličnog prstena, kao što je opisano GRIND varijablama DRY-O (var296) i O-TIP (var563) (Slika 4.11-C). Suprotno tome, amidna grupa najmanje aktivnog jedinjenja iz klastera 2, ChEMBL400236, ne učestvuje u formiranju vodoničnih interakcija u aktivnom mestu D₂-R (Slika 4.12-D). Uvođenje izopropil supstituenta je uslovilo nastanak specifične konformacije ovog liganda, što je potvrđeno i značajnim varijablama iz 3D-QSAR studije sa negativnim uticajem na aktivnost DRY-DRY (var43) i DRY-TIP (var440) (Slika 4.11-D).

Derivati tetracikličnog hinoksalina, koji pripadaju klasteru 3, su dokovani u konformaciju D₂-R nakon simulacije sa lumateperonom. Analiza dokovanih jedinjenja ChEMBL3233413 i ChEMBL3233416 je pokazala da oni stupaju u interakcije sa svim značajnim aminokiselinama iz gornjeg i donjeg hidrofobnog džepa, koje pripadaju TM domenima 2, 3, 5, 6, i 7, kao i ekstracelularnom prevoju 1 (Slike 4.12-E i 4.12-F) (174,177,374). Iako ChEMBL3233413 poseduje donora H-veze u indazolnoj strukturi, specifična orijentacija ovog dela molekula je onemogućila formiranje vodonične interakcije sa polarnim serinom (Slika 4.12-E). Za razliku od metil supstituenta na piridopirimidinskoj strukturi manje aktivnog ChEMBL3233416, atom fluora kod ChEMBL3233413 učestvuje u formiranju dipol-dipol interakcije sa aminokiselinom iz TM domena 2, Glu95^{2.64} (Slike 4.12-E i 4.12-F).



Slika 4.12. Identifikovane intermolekulske interakcije u vezujućem mestu D₂-R proučavanih liganada: (A) ChEMBL90882, (B) ChEMBL6437, (C) ChEMBL708-ziprazidon, (D) ChEMBL400236, (E) ChEMBL3233413 i (F) ChEMBL3233416. Ljubičastom bojom su prikazane π -alkil i π - π interakcije, vodonične veze su prikazane zelenom, *salt bridge* interakcija je narandžasta, dok su aminokiseline koje formiraju hidrofobne VdW interakcije uokvirene.

4.1.8 Uporedna analiza rezultata 3D-QSAR studije i molekuskog dokinga za 5-HT_{2A}, D₂ i H₁ receptore

U cilju razvoja liganada sa višestrukim dejstvom (eng. *multi-target*) i specifičnim profilom selektivnosti, urađene su studije 3D-QSAR modelovanja i molekuskog dokinga za histaminski H₁-R. Iako *multi-target* jedinjenja u terapijskom smislu poseduju brojne prednosti, istovremeno delovanje na više receptorskih sistema može uticati na pojavu različitih neželjenih efekata usled vezivanja za *off-target* proteine. Sporedno antagonističko delovanje na H₁-R je odgovorno za

pojavu metaboličkih neželjenih efekata, povećanja telesne mase, hiperglikemije i dislipidemije (35,375). Iz tog razloga, definisanje strukture farmakofore liganada sa potentnim antagonističkim delovanjem na 5-HT_{2A} i D₂ receptorima i smanjenim afinitetom na H₁ receptoru, predstavlja osnovu za racionalni dizajn novih efikasnijih i bezbednijih jedinjenja koja mogu naći svoju potencijalnu primenu u lečenju neuroloških i mentalnih oboljenja.

Analizom formiranog 3D-QSAR modela za H₁-R definisane su varijable sa najznačajnijim pozitivnim uticajem na aktivnost: var217 (TIP-TIP: 12.40 - 12.80 Å), var398 (DRY-TIP: 10.40 - 10.80 Å) i var275 (DRY-O: 10.80 - 11.20 Å). Negativnu korelaciju sa biološkom aktivnošću na ovom receptoru su pokazale: var237 (TIP-TIP: 20.40 - 20.80 Å), var408 (DRY-TIP: 14.40 - 14.80 Å), var534 (O-TIP: 15.20 - 15.6 Å), var599 (N1-TIP: 16.40 - 16.80 Å), var149 (N1-N1: 10.00 - 10.40 Å), var343 (DRY-N1: 13.20 - 13.60 Å) i var458 (O-N1: 9.60 - 10.00 Å) (Slika 4.7-C). Kratak opis navedenih varijabli je predstavljen u Tabeli 4.6.

Tabela 4.6. Najvažnije varijable sa pozitivnim i negativnim uticajem na antagonističku aktivnost ispitivanih liganada na H₁-R.

Varijable	Parovi proba	Udaljenost (Å)	Opis
var149	N1-N1 (negativna)	10,00 – 10,40	Opisuje negativan uticaj dva akceptora H-veze na određenoj udaljenosti. Uglavnom izražena kod jedinjenja iz klastera 2.
var217	TIP-TIP (pozitivna)	12,40 – 12,80	Definiše optimalnu dužinu jedinjenja iz klastera 1 koja pozitivno koreliše sa aktivnosti na H ₁ -R.
var237	TIP-TIP (negativna)	20,40 – 20,80	Dužina jedinjenja veća od optimalne (var217) negativno koreliše sa aktivnosti na H ₁ -R. Prisutna kod jedinjenja iz klastera 2.
var275	DRY-O (pozitivna)	10,80 – 11,20	Opisuje razdaljinu između protonovanog atoma azota (donor H-veze) i sternog regiona, koja je ključna za aktivnost svih ispitivanih jedinjenja.
var343	DRY-N1 (negativna)	13,20 – 13,60	Nepovoljna udaljenost između hidrofobne regije i akceptora H-veze, karakteristična za jedinjenja iz klastera 2.
var398	DRY-TIP (pozitivna)	10,40 – 10,80	Slično var217, naglašava optimalno rastojanje između hidrofobne i sterne regije u jedinjenjima.
var408	DRY-TIP (negativna)	14,40 – 14,80	Povećanje udaljenosti između hidrofobne i sterne regije negativno utiče na aktivnost jedinjenja na H ₁ -R. Svojstveno ligandima iz klastera 2.
var458	O-N1 (negativna)	9,60 – 10,00	Slično var149, opisuje nepovoljnu udaljenost između donora i akceptora H-veze kod jedinjenja iz klastera 2.
var534	O-TIP (negativna)	15,20 – 15,60	Definiše negativan uticaj kraće udaljenosti između donora H-veze, karboksilne grupe, i sternog regiona kod jedinjenja iz klastera 1.
var599	N1-TIP (negativna)	16,40 – 16,80	Slično var149 i var458, prisutna kod jedinjenja iz klastera 2 koja poseduju akceptora H-veze i sterna region na određenoj udaljenosti.

Formiranim 3D-QSAR modelima za 5-HT_{2A} i D₂ receptore je definisana povoljna udaljenost između dva heterociklična prstena, čije prisustvo pozitivno koreliše sa visokim afinitetom vezivanja (5-HT_{2A}-R: var257 i var447; D₂-R: var422). Suprotno tome, analizom farmakofore za H₁-R je uočeno da prisustvo dva hidrofobna/sterna centra na većem rastojanju utiče na smanjenje biološke aktivnosti, što je definisano varijablama: var237 (TIP-TIP) i var408 (DRY-TIP) (Slika 4.13-B). GRIND varijable TIP-TIP i DRY-TIP sa pozitivnim uticajem na proučavane pK_i vrednosti, var217 i var398, opisuju optimalnu dužinu jedinjenja koja se povoljno uklapa u vezujuće mesto H₁-R (Slika 4.13-A). Najveće vrednosti ovih varijabli su izračunate za triciklične derivate klopazinu sličnih jedinjenja. Dobijeni rezultati su u skladu sa eksperimentalno određenim pK_i vrednostima, koje ukazuju da jedinjenja iz klastera 1 poseduju veći afinitet ka H₁-R u poređenju sa 5-HT_{2A} i D₂ receptorima, dok su suprotna zapažanja kod jedinjenja iz klastera 2 (Tabela A7.3). Takođe, rezultati studije molekuskog dokinga su pokazali značajno veće vrednosti doking skora za jedinjenja iz

klastera 1 proučavana sa H₁-R (Tabela A7.6), u odnosu na vrednosti dobijene za 5-HT_{2A} (Tabela A7.14) i D₂ (Tabela A7.5) receptore.

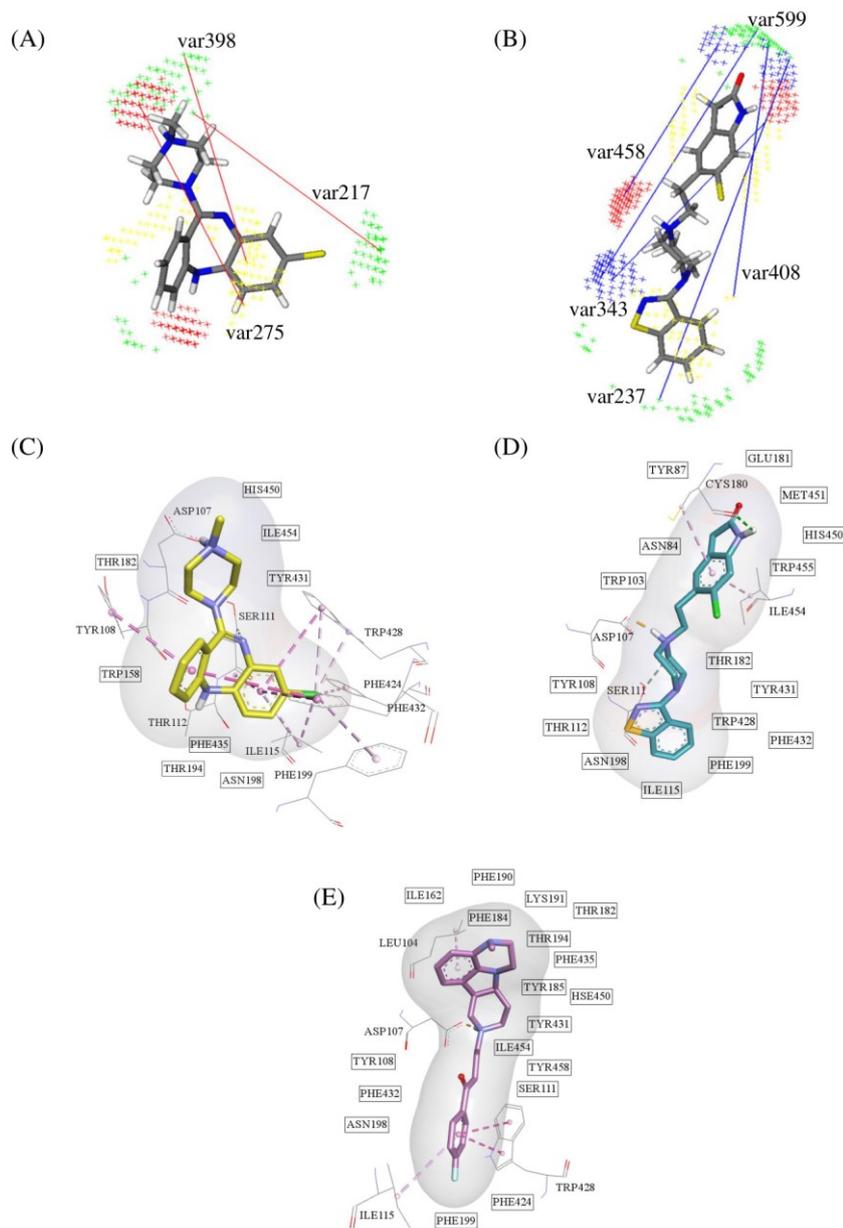
Pored hidrofobnih regija, formirani modeli za 5-HT_{2A} i D₂ receptore su takođe pokazali da pozitivan uticaj na bioaktivnost dualnih antagonista ima i prisustvo grupa sa donorskim i akceptorskim osobinama na određenom rastojanju od heterocikličnog prstena, koji takođe poseduje osobine akceptora H-veze. GRIND varijablama, var379 (DRY-N1) i var662 (N1-TIP), iz formiranog modela za 5-HT_{2A}-R, i var635 (N1-TIP) iz modela za D₂-R, je opisana optimalna udaljenost između akceptora H-veze i heterocikličnog prstena koji ostvaruje povoljne interakcije sa aminokiselinama iz donjeg hidrofobnog džepa proučavanih receptora. Dodatno, značajnost donora H-veze na približnoj udaljenosti je definisana varijablama O-N1 (var510) za 5-HT_{2A}-R i O-TIP (var563) i DRY-O (var296) za D₂-R. Suprotno ovim rezultatima, 3D-QSAR model za H₁-R je izdvojio GRIND varijable, N1-N1 (var149), N1-TIP (var599), DRY-N1 (var343), O-TIP (var534) i O-N1 (var458), koje opisuju negativnu korelaciju između prisutnih donorskih i akceptorskih grupa i ispitivanih pK_i vrednosti (Slika 4.13-B). Na osnovu toga, moguće je zaključiti da prisustvo ovih grupa kod dualnih antagonista može doprineti boljoj selektivnosti ka 5-HT_{2A} i D₂ receptorima u odnosu na H₁-R.

GPCRdb predstavlja internet platformu koja sadrži veliki broj informacija o najvećoj grupi membranskih receptora – GPCR (149). Razvojem GPCRdb omogućen je lakši pristup velikom broju eksperimentalnih podataka, čija je vizuelizacija i analiza dodatno olakšana različitim dijagramima. Fokus je na strukturama, receptorskim mutacijama, interakcijama liganada i poravnanju sekvenci izabranih proteina.

U ovom istraživanju, pomenuta baza podataka je korišćena za proučavanje aminokiselinskog sastava aktivnih mesta 5-HT_{2A}, D₂ i H₁ receptora (Slika 4.14). Poravnanje sekvenci je izvršeno na osnovu položaja aminokiselina u strukturi proučavanih proteina. Na pozicijama 3.32, 3.40, 6.44, 6.48 i 6.52 nalaze se aminokiseline koje su visoko konzervirane među aminergičkim receptorima. Određene razlike u odnosu na H₁-R su prisutne na položajima 3.33 (Tyr108) i 5.40 (Lys191), gde se nalaze polarne aminokiseline tirozin i lizin koje mogu učestvovati u formiranju vodoničnih interakcija, povećavajući afinitet vezivanja liganada za ovaj receptor (198). Takođe, uočeno je da na poziciji 7.35 kod 5-HT_{2A} i D₂ se nalaze aminokiseline sa polarnim osobinama Asn363 (5-HT_{2A}-R) i Ser409 (D₂-R), dok je na istom položaju kod H₁-R prisutna aminokiselina Met451 (Slika 4.14). U poređenju sa metioninom koji ima hidrofobna svojstva, serin i asparagin mogu učestvovati u formiranju vodoničnih interakcija u aktivnim mestima 5-HT_{2A} i D₂ receptora. Prethodno opisane 3D-QSAR studije i studije molekuskog dokinga su naglasile važnost interakcije potentnih dualnih antagonista sa ovim aminokiselinama, koje pored povećanja afiniteta mogu uticati i na stabilizaciju formiranih kompleksa.

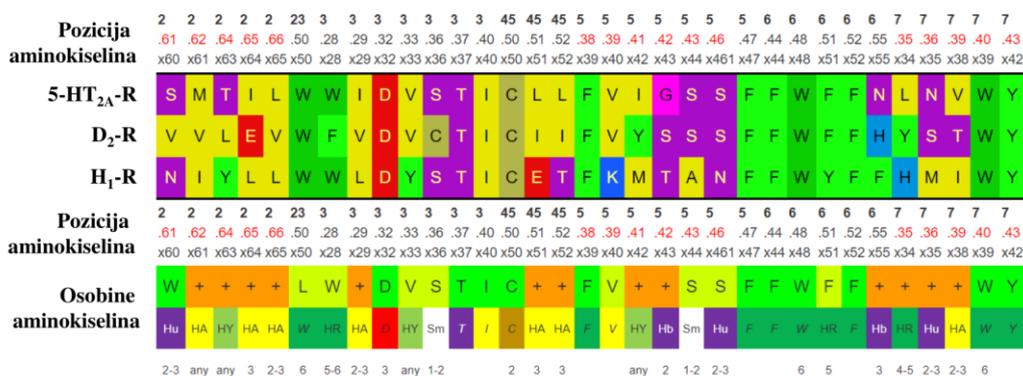
S obzirom da je eksperimentalno pokazano da lumateperon poseduje veoma nizak afinitet za H₁-R, urađene su simulacije MD i studija molekuskog dokinga u cilju sagledavanja njegovog načina vezivanja i interakcija koje ostvaruje (Slika 4.13-E) (34). Analizom je pokazano da lumateperon poseduje više VdW interakcija u gornjem hidrofobnom džepu, u poređenju sa ostalim proučavanim jedinjenjima iz klastera 1 i 2 (Slika 4.13-E). Suprotno tricikličnim derivatima poput klozapina koji ostvaruju značajne interakcije u donjem hidrofobnom džepu H₁ receptora, sačinjenom od aromatičnih aminokiselina, kod lumateperona su uočene interakcije samo sa nekoliko rezidua (Slike 4.13-C i 4.13-E). Aminokiseline poput Trp158^{4.57} i Thr112^{3.37} nisu ostvarile kontakt sa proučavanim ligandom. U poređenju sa ziprazidonom koji formira H-vezu sa cisteinom iz ekstracelularnog prevoja 2 (Cys180), među proučavanim interakcijama lumateperona sa H₁-R nije uočena nijedna elektrostatička interakcija osim sa konzerviranom Asp107^{3.32} (Slike 4.13-D i 4.13-E). Prema tome, dobijeni rezultati su u skladu sa činjenicom da lumateperon poseduje bolji profil selektivnosti za H₁-R u odnosu na druge proučavane antagoniste (376).

S obzirom da je postignuto dobro slaganje između rezultata 3D-QSAR analize i studije molekuskog dokinga, možemo zaključiti da razvijeni regresioni modeli za proučavane receptore mogu dalje biti korišćeni za dizajn i pouzdano predviđanje aktivnosti novih dualnih antagonista 5-HT_{2A}/D₂ receptora, sa smanjenim afinitetom za H₁-R.



Slika 4.13. Identifikovane GRIND varijable i intermolekulske interakcije u vezujućem mestu H₁-R.

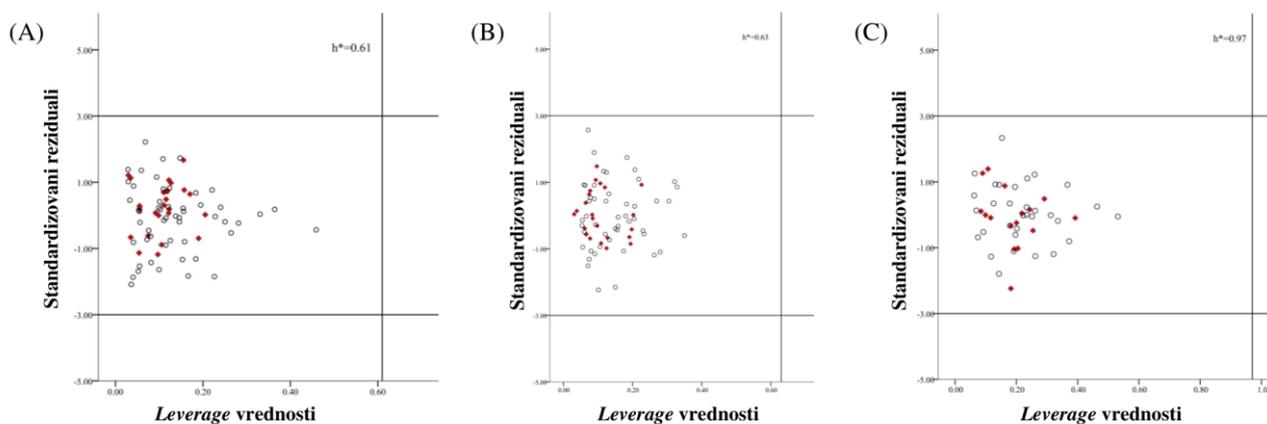
(A) i (C) ChEMBL42-klozapin, (B) i (D) ChEMBL708-ziprazidon, (E) ChEMBL3233142-lumateperon. Hidrofobne regije (DRY) su prikazane žutom bojom, sterne regije (TIP) zelenom, regija donora H-veze (O) je prikazana crvenom bojom dok akceptora H-veze (N1) plavom. Kod rezultata molekuskog dokinga, ljubičastom bojom su prikazane π -alkil i π - π interakcije, vodonične veze su prikazane zelenom, dok su aminokiseline koje formiraju hidrofobne VdW interakcije uokvirene.



Slika 4.14. Poravnanje aminokiselina prema poziciji u vezujućim mestima 5-HT_{2A}, D₂ i H₁ receptora, preuzeto iz GPCRdb. Aminokiseline sa hidrofobnim aromatičnim osobinama su obojene u zeleno, a sa hidrofobnim alifatičnim u žuto. Ljubičasta boja opisuje aminokiseline koje mogu učestvovati u formiranju vodoničnih veza, dok je cistein obojen braon.

4.1.9 Domen primenljivosti formiranih 3D-QSAR modela

Formirani 3D-QSAR modeli za 5-HT_{2A}, D₂ i H₁ receptore su dodatno ispitani predviđanjem domena primenljivosti. Za svaki model je izvučeno deset najznačajnijih varijabli koje su korišćene za definisanje domena i izračunate su granične *leverage* vrednosti, koje su iznosile 0,61 za formirani 3D-QSAR model 5-HT_{2A}-R, 0,63 za model D₂-R i 0,97 za H₁-R. Generisani *Williams* grafici su prikazani na Slici 4.15. Na osnovu dobijenih rezultata možemo zaključiti da nijedno jedinjenje iz proučavanog seta podataka ne odstupa van definisanog domena primenljivosti i da formirani 3D-QSAR modeli mogu biti korišćeni za pouzdano predviđanje antagonističke aktivnosti strukturnih analoga na 5-HT_{2A}, D₂ i H₁ receptorima.

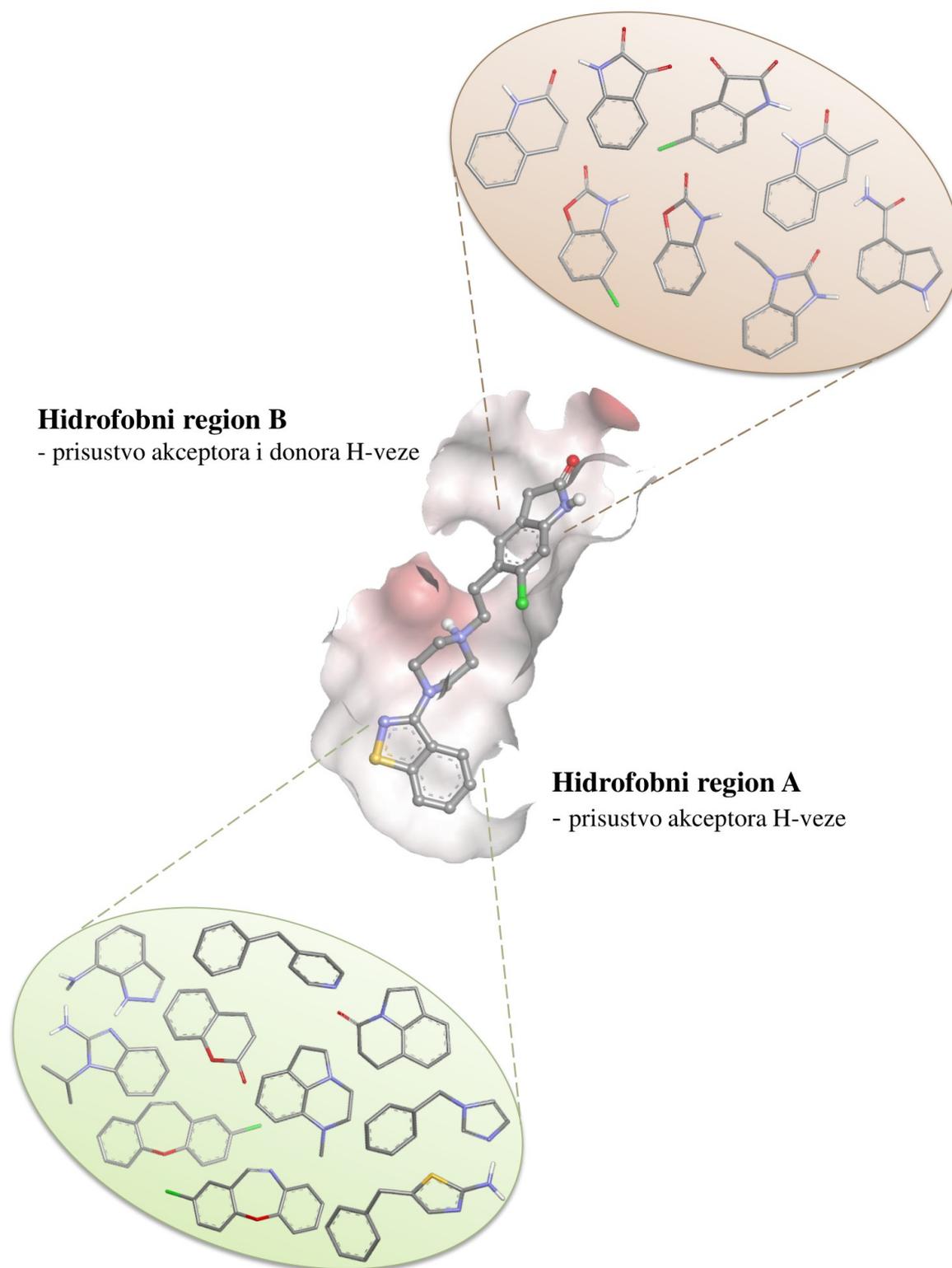


Slika 4.15. Domen primenljivosti formiranog 3D-QSAR modela za 5-HT_{2A}-R (A), D₂-R (B) i H₁-R (C). Crveno su označena test set jedinjenja, dok krugovi simbolizuju trening set jedinjenja.

4.1.10 Racionalni dizajn dualnih antagonista 5-HT_{2A}/D₂ receptora, sa smanjenim afinitetom za H₁-R

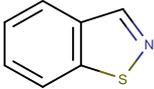
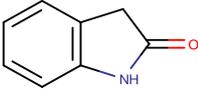
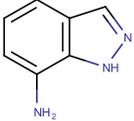
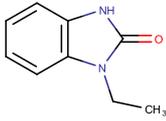
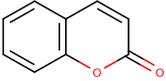
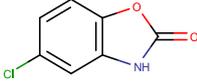
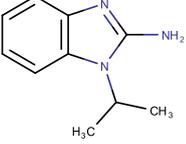
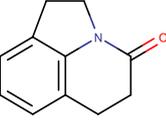
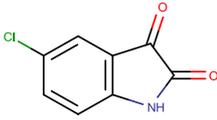
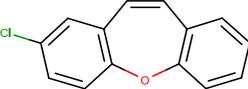
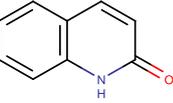
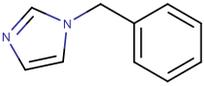
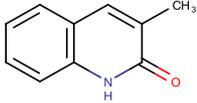
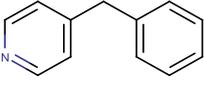
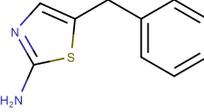
Kombinovanje različitih kompjuterskih metoda zasnovanih na strukturi ciljnog mesta dejstva i liganda, poput simulacija MD, molekuskog dokinga i 3D-QSAR modelovanja, omogućilo je sveobuhvatnu analizu strukture farmakofore dualnih antagonista 5-HT_{2A}/D₂ receptora, sa smanjenim afinitetom za H₁-R. Na osnovu dobijenih rezultata zaključeno je da veće rastojanje između krajnjih lipofilnih i sternih centara jedinjenja pozitivno koreliše sa aktivnošću na 5-HT_{2A} i D₂ receptorima, a negativno sa vezivanjem za H₁-R. Takođe, pozitivan efekat na dualno antagonističko delovanje je pokazalo prisustvo heterocikličnog prstena (A) sa osobinama akceptora H-veze, usled prisustva elektronegativnih atoma kiseonika ili azota, na optimalnoj udaljenosti od drugog prstena (B) koji poseduje i akceptorske i donorske grupe (Slika 4.16). Naime, studijom molekuskog dokinga je dokazana važnost navedenih grupa za uspostavljanje vodoničnih interakcija sa aminokiselinama iz donjeg hidrofobnog džepa, Thr160^{3,37} (5-HT_{2A}-R) i Thr119^{3,37} (D₂-R), i aminokiselinama na poziciji 7.35 iz gornjeg hidrofobnog džepa (Asn363, 5-HT_{2A}-R; Ser409, D₂-R). Analizom farmakofore za H₁-R uočeno je da prisustvo polarnih grupa na većoj udaljenosti utiče na smanjenje aktivnosti za H₁-R. Pored toga, strukturno poravnanje aminokiselina iz aktivnog mesta proučavanih receptora je ukazalo na određene različitosti u sastavu sekvence, posebno na poziciji 7.35. U odnosu na 5-HT_{2A} i D₂ receptore koji poseduju polarne aminokiseline u ovom položaju, kod H₁-R je prisutna nepolarna aminokiselina metionin (Met451), što značajno može uticati na postizanje selektivnosti novih dualnih antagonista.

Nakon definisanja strukturnih osobina koje su važne za postizanje optimalnog antagonističkog delovanja na 5-HT_{2A} i D₂ receptorima, predložena je strategija za racionalni dizajn novih jedinjenja. Ona se zasniva na modifikacijama hidrofobnih regiona A i B, koji su međusobno razdvojeni etil piperazinskim linkerom (Slika 4.16). Potentni ligandi proučavanih receptora, ziprazidon, lumateperon i ChEMBL90882, su izabrani kao vodeća (eng. *lead*) jedinjenja za dizajn novih antagonista. Primena FBDD metode je omogućila generisanje novih jedinjenja sa povoljnim farmakološkim profilom aktivnosti. Strukturni fragmenti dibenzoksepin i 1,2-benzotiazol su korišćeni kao osnova za skrining fragmenata koji se povoljno uklapaju u hidrofobni region A, dok je 1,3-dihidro-2-oksindol primenjen za skrining fragmenata za region B (Slika 4.16, Tabela 4.7). Navedeni fragmenti predstavljaju strukturne delove vodećih (eng. *lead*) jedinjenja koji se dobro uklapaju u hidrofobne regije proučavanih receptora i ostvaruju interakcije sa ključnim aminokiselinama iz aktivnog mesta. Kao što je prethodno opisano, *Enamine Essential Fragment Library* i *General Fragment Library* su korišćene za VS fragmenata na osnovu njihove sličnosti prema odabranim strukturama vodećih (eng. *lead*) jedinjenja. Finalno, na osnovu vrednosti *Glob-Sum* skora selektovano je 14 fragmenata za dalji dizajn novih liganada (Tabela 4.7).

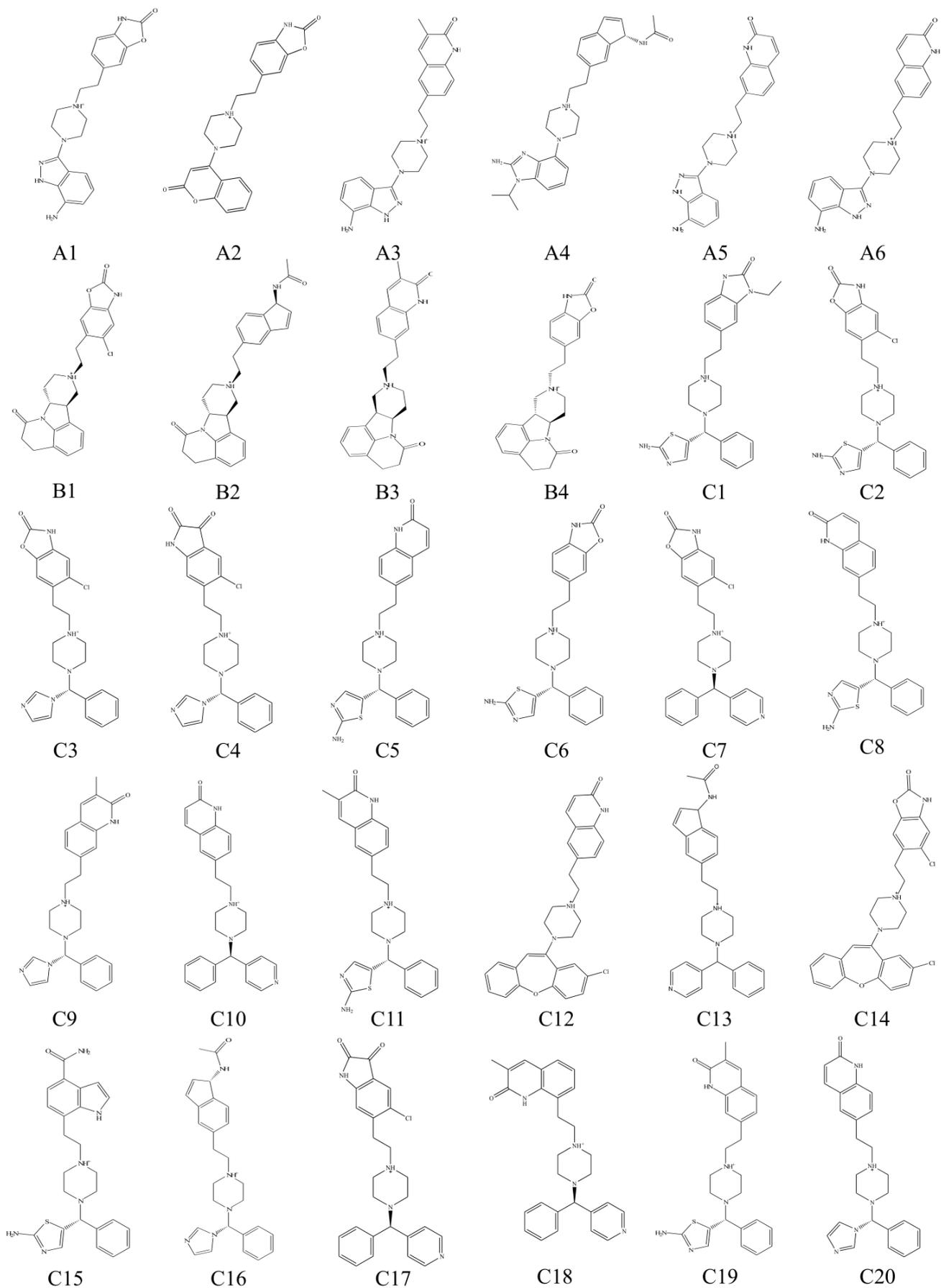


Slika 4.16. Strategija za racionalni dizajn novih dualnih antagonista 5-HT_{2A}/D₂ receptora, sa smanjenim afinitetom za H₁-R.

Tabela 4.7. Fragmenti selektovani nakon skrininga baza.

Hidrofobni region A, osnova za skrining:			Hidrofobni region B, osnova za skrining:		
					
Redni broj fragmenta	Struktura	Glob_sum skor	Redni broj fragmenta	Struktura	Glob_sum skor
1.		1,81	1.		2,44
2.		1,42	2.		2,33
3.		1,36	3.		2,22
4.		1,14	4.		2,20
Hidrofobni region A, osnova za skrining:					
			5.		2,20
Redni broj fragmenta	Struktura	Glob_sum skor			
1.		1,20	6.		1,74
2.		1,19	7.		1,73
3.		1,06			

Primena različitih metoda, poput same modifikacije vodećeg (eng. *lead*) jedinjenja ili spajanje selektovanih fragmenata, je rezultovala dizajnom novih 30 liganada (Slika 4.17). Strukture jedinjenja su najpre optimizovane, a potom dokovane u odgovarajuću strukturu receptora nakon simulacije MD. Konformacije pripremljene na ovaj način su dalje korišćene za predviđanje njihove aktivnosti na proučavanim 5-HT_{2A}, D₂ i H₁ receptorima primenom formiranih i validiranih 3D-QSAR modela. Rezultati su prikazani u Tabeli A7.10.



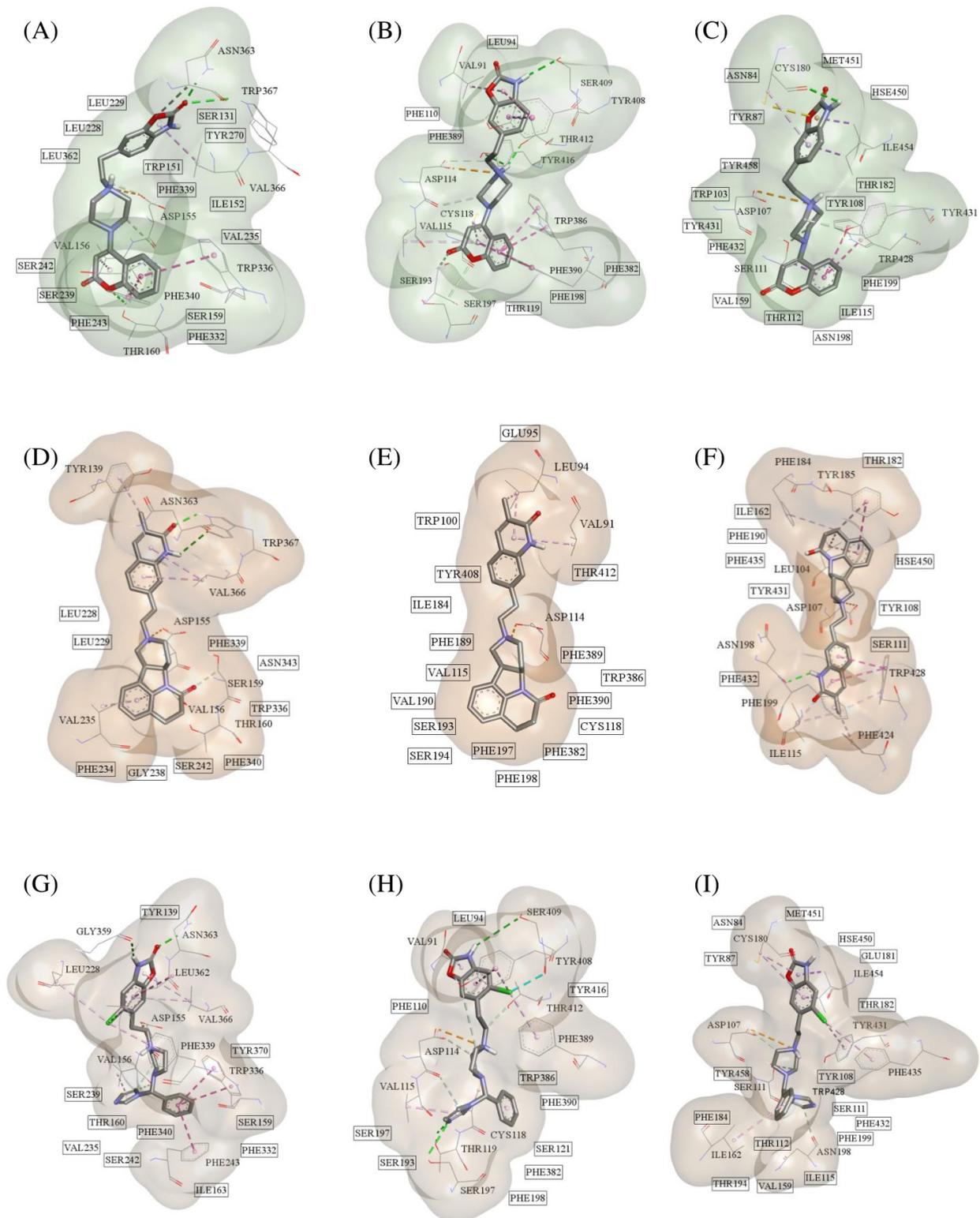
Slika 4.17. Hemijske strukture dizajniranih dualnih antagonista 5-HT_{2A} i D₂ receptora pri pH 7,4.

Na osnovu predviđenih pKi vrednosti, tri jedinjenja sa strukturno različitim fragmentima, A2, B3 i C3, su izabrana za analizu interakcija koje ostvaruju u vezujućim mestima proučavanih receptora (Slika 4.18). Pored predviđenih visokih aktivnosti na 5-HT_{2A} i D₂ receptorima, selektovana jedinjenja su *in silico* pokazala i visok nivo selektivnosti, kao i smanjen afinitet za H₁-R u odnosu na ostala dizajnirana jedinjenja (Tabela A7.10).

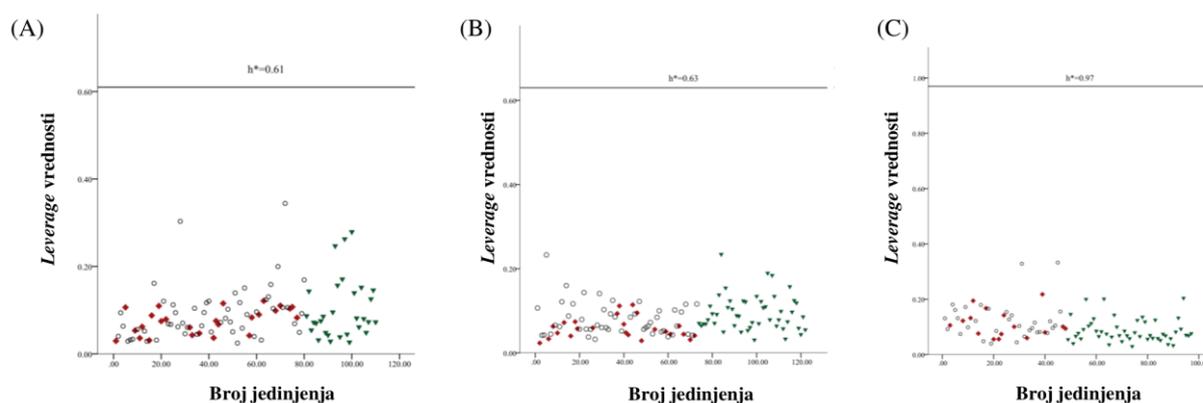
Na osnovu rezultata studije molekuskog dokinga, uočljivo je da sva tri proučavana jedinjenja formiraju alkil- π , π - π i VdW hidrofobne interakcije između aromatičnih heterociklusa i aminokiselina iz vezujućeg mesta u donjem hidrofobnom džepu. Zbog prisustva grupe sa osobinama akceptora H-veze, proučavani ligandi su ostvarili vodonične interakcije sa polarnim aminokiselinama na poziciji 3.37 za 5-HT_{2A}-R (Thr160^{3.37}) i pozicijama 3.37, 5.43 i 5.461 za D₂-R (Thr119^{3.37}, Ser193^{5.43} i Ser197^{5.461}) (Slike 4.18- A, B, D i H). Suprotno tome, u vezujućem mestu histaminskog receptora samo jedinjenje B3 je formiralo interakciju H-veze sa Asn198 iz TM domena 5 (Slika 4.18-F). Kod svih proučavanih kompleksa prisutna je elektrostatička interakcija sa važnom aminokiselinom (Asp) u položaju 3.32 (Slika 4.18). S obzirom na to da je analiza farmakofore dualnih antagonista pokazala da uvođenje hidrofobnog regiona B pozitivno koreliše sa antagonističkim aktivnostima na 5-HT_{2A}-R i D₂-R, a negativno sa aktivnošću na H₁-R, istraženi su različiti fragmenti u ovom položaju. Kao što se vidi sa Slike 4.18, ovaj region je ostvario dobro uklapanje sa gornjim hidrofobnim džepom 5-HT_{2A}-R i D₂-R, koji je dominantno sačinjen od aminokiselina iz TM domena 2, 3 i 7 i ekstracelularnog prevoja 1 ili 2. Prethodnom analizom je pokazano da prisustvo donorskih i akceptorskih grupa u ovom regionu utiče na povećanje aktivnosti ka 5-HT_{2A} i D₂ receptorima i smanjenju aktivnosti za H₁-R. Sva tri selektovana jedinjenja, A2, B3 i C3, formiraju interakciju vodonične veze sa Asn363^{7.35} 5-HT_{2A}-R (Slike 4.18- A, D i G). Takođe, jedinjenja A2 i B3 formiraju H-veze preko karbonilnog kiseonika sa Trp367^{7.39}, dok donorska grupa (-NH) C3 jedinjenja interaguje sa Gly359^{7.31} (Slike 4.18 – A, D i G). Dokovanjem izabranih jedinjenja u dopaminski receptor je pokazano da jedinjenja A2 i C3 ostvaruju interakciju sa Ser409 koji se nalazi na istom položaju (3.37) kao i Asn363 kod 5-HT_{2A}-R (Slike 4.18-B i 4.18-H). Proučavanjem interakcija u aktivnom mestu H₁-R, uočeno je da samo A2 formira interakciju sličnu ziprazidonu, sa Cys180 iz ekstracelularnog prevoja 2 (Slika 4.18-C).

Formiranim 3D-QSAR modelima je predviđena veća antagonistička aktivnost dizajniranih liganada za 5-HT_{2A}-R u odnosu na D₂-R, što može biti od značaja za postizanje optimalne efikasnosti i smanjenja pojave ekstrapiramidalnih neželjenih simptoma (10). Pored toga, predviđeno je da dizajnirana jedinjenja poseduju značajno manje aktivnosti za H₁-R u poređenju sa referentnim jedinjenjima, klozapinom i ziprazidonom (Tabela A7.10).

U cilju validacije predviđenih pKi vrednosti, primenjen je *leverage* pristup da bi se procenilo da li dizajnirana jedinjenja pripadaju domenu primenljivosti formiranih modela. Rezultati su prikazani *Williams* graficima na Slici 4.19. Generalno, moguće je zaključiti da nijedno jedinjenje ne odstupa van definisanog domena, pa iz tog razloga predviđanja aktivnosti formiranim 3D-QSAR modelima se mogu smatrati pouzdanim.



Slika 4.18. Studija molekuskog dokinga za dizajnirana jedinjenja. Identifikovane intermolekulske interakcije: A2 u vezujućem mestu 5-HT_{2A}-R (A), D₂-R (B) i H₁-R (C); B3 u vezujućem mestu 5-HT_{2A}-R (D), D₂-R (E) i H₁-R (F); i C3 u vezujućem mestu 5-HT_{2A}-R (G), D₂-R (H) i H₁-R (I). Ljubičastom bojom su prikazane π -alkil i π - π interakcije, vodonične veze su prikazane zelenom, *salt bridge* interakcija je narandžasta, dok su aminokiseline koje formiraju hidrofobne VdW interakcije uokvirene.



Slika 4.19. Domen primenljivosti formiranog 3D-QSAR modela za 5-HT_{2A}-R (A), D₂-R (B) i H₁-R (C) za dizajnirani set jedinjenja. Zeleno su označena dizajnirana jedinjenja, crveno su označena test set jedinjenja, dok krugovi simbolizuju trening set jedinjenja.

4.1.11 *In silico* predviđanje ADMET osobina dizajniranih dualnih antagonista

ADMET Predictor program je korišćen za predviđanje fizičko-hemijskih i farmakokinetičkih osobina dizajniranih jedinjenja, kao i parametra koji definiše složenost sinteze. Dobijeni rezultati su prikazani u Tabelama A7.11 i A7.12. Parametri poput logP i MlogP definišu lipofilne osobine jedinjenja koje su veoma važne za prolazak kroz KMB. Za sva dizajnirana jedinjenja, izuzev liganda C16, su izračunate optimalne vrednosti parametara solubilnosti i permeabilnosti. Analizom Lipinski parametra je pokazano da sva dizajnirana jedinjenja zadovoljavaju definisane kriterijume (molekulska masa ≤ 500 ; MlogP $< 4,15$; broj N/O < 10 ; broj NH/OH < 5), osim C1 i C16 koji poseduju visoku molekulska masu i logP vrednosti (Tabela A7.11). Polarnost jedinjenja se najčešće izražava TPSA parametrom čije vrednosti ne trebaju biti veće od 140 Å² (377). Vrednosti ovog fizičko-hemijskog parametra su zadovoljene kod svih proučavanih jedinjenja. Proučavanjem parametara koji definišu prolaznost jedinjenja kroz KMB (*BBB_Filter* i *LogBB*) uočeno je da jedinjenja iz grupe A poseduju nešto niže vrednosti u poređenju sa ostalim (Tabela A7.12). S obzirom na to da je delovanje mnogih liganada direktno zavisno od procenta nezvanog oblika za proteine, *in silico* računanje ovog parametra (*hum_fup%*) je pokazalo da dizajnirana grupa B, a posebno jedinjenje B3, poseduje visok procenat slobodne forme u plazmi u poređenju sa vodećim (eng. *lead*) jedinjenjima (Tabela A7.12). Poznato je da izoenzimi CYP450 igraju centralnu ulogu u metabolizmu brojnih jedinjenja, te je izvršeno predviđanje vezivanja proučavanih liganada za CYP2D6 i CYP3A4. Rezultati su pokazali da su sva ispitivana jedinjenja supstrati za ove enzime, dok većina poseduje i inhibitorno delovanje (Tabela A7.12). Takođe, *in silico* predviđanjem ADMET osobina je uočeno da dizajnirani ligandi mogu biti potencijalni supstrati za efluksni P-gp. Procenom toksičnosti ispitivanih jedinjenja zaključeno je da A2 i A6, u poređenju sa ziprazidonom, poseduju značajno manji rizik od pojave kardioloških neželjenih efekata usled inhibitornog delovanja na hERG kalijumove kanale (Tabela A7.12). Pored toga, ADMET analizom je pokazano da dizajnirani ligandi A3-A5, B3, C11 i C12 nisu identifikovani kao inhibitori hERG kanala, što ukazuje na njihovu potencijalno bolju bezbednost u odnosu na vodeća (eng. *lead*) jedinjenja (Tabela A7.12). Sveukupni toksični rizik je izražen parametrom *TOX_Risk* koji ukazuje da sva dizajnirana jedinjenja poseduju niže vrednosti u odnosu na klozapin.

Za procenu složenosti sinteze dizajniranih jedinjenja izračunat je parametar *SynthDiff* koristeći ADMET Predictor program (Tabela A7.11). Računanje se zasniva na osnovu SA (eng. *Synthetic Accessibility*) skora i vrednosti se rangiraju u opsegu od 0 (najlakše za sintezu) do 10 (najteže za sintezu), u zavisnosti od složenosti molekulske strukture i sličnosti fragmenata sa već

poznatim iz baze (378). Na osnovu dobijenih rezultata moguće je zaključiti da jedinjenja iz grupe A poseduju najniže vrednosti *SynthDiff* parametra, posebno A2, dok su najviše vrednosti izračunate za grupu B (Tabela A7.11). U svakom slučaju, potrebno je uzeti u obzir da su novi dualni antagonisti dizajnirani na osnovu komercijalno dostupnih fragmenata, što može značajno uticati na ubrzanje procesa sinteze.

Finalno, na osnovu zaključaka studije molekuskog dokinga, 3D-QSAR modelovanja i *in silico* analize ADMET parametara, jedinjenja A2, B3 i C3 predstavljaju najbolje kandidate za dalju optimizaciju, sintezu i biološka *in vitro* ispitivanja (Tabela 4.8). Dobijeni rezultati predstavljaju osnovu za razvoj novih liganada sa višestrukim dejstvom, kao potencijalno novih lekova u terapiji složenih neuroloških i mentalnih oboljenja.

Tabela 4.8. Predviđene pKi vrednosti za selektovana jedinjenja A2, B3 i C3 sa najboljim osobinama i eksperimentalno određene pKi vrednosti vodećih (*eng. lead*) jedinjenja.

Dizajnirana jedinjenja	pKi _{5-HT_{2A}}	pKi _{D₂}	pKi _{H₁}
A2	9,71	8,82	6,18
B3	9,85	8,06	6,89
C3	10,81	8,16	6,49
<i>Lead</i> jedinjenja	pKi _{5-HT_{2A}}	pKi _{D₂}	pKi _{H₁}
CHEMBL90882	8,52	8,60	/
Klozapin	8,04	6,66	8,96
Ziprazidon	10,10	8,30	7,33
Lumateperon	9,27	7,50	/

4.2 Definisavanje farmakofore i predlaganje strukturnih modifikacija za dizajn novih selektivnih liganada imidazolinskih I₂ receptora

Različita istraživanja su pokazala uticaj serotoninergičkih, dopaminergičkih, adrenergičkih i imidazolinskih sistema u patogenezi strukturnih, funkcionalnih i bihejvioralnih poremećaja (41). Naime, eksperimentalnim ispitivanjima je pokazano da aktivacija imidazolinskih I₂-R endogenim ligandom agmatinom ispoljava neuroprotektivni efekat usled modulacije aktivnosti NMDA receptora, inhibicije sinteze NO i uticajem na sadržaj monoamina u CNS-u (379). Pored potencijalne efikasnosti u lečenju neurodegenerativnih oboljenja, takođe je dokazano da ligandi koji se vežu za I₂-IR učestvuju u modulaciji depresivnih i anksioznih poremećaja (379).

S obzirom da još uvek nema dovoljno podataka o strukturi vezujućeg mesta I₂ receptora, proučavanje potentnih i selektivnih liganada ovog receptora je ključno za razumevanje njegovog farmakološkog delovanja. U okviru ovog istraživanja proučavana je farmakofora selektivnih liganada I₂-IR koji predstavljaju derivate bicikličnog α -iminofosfonata.

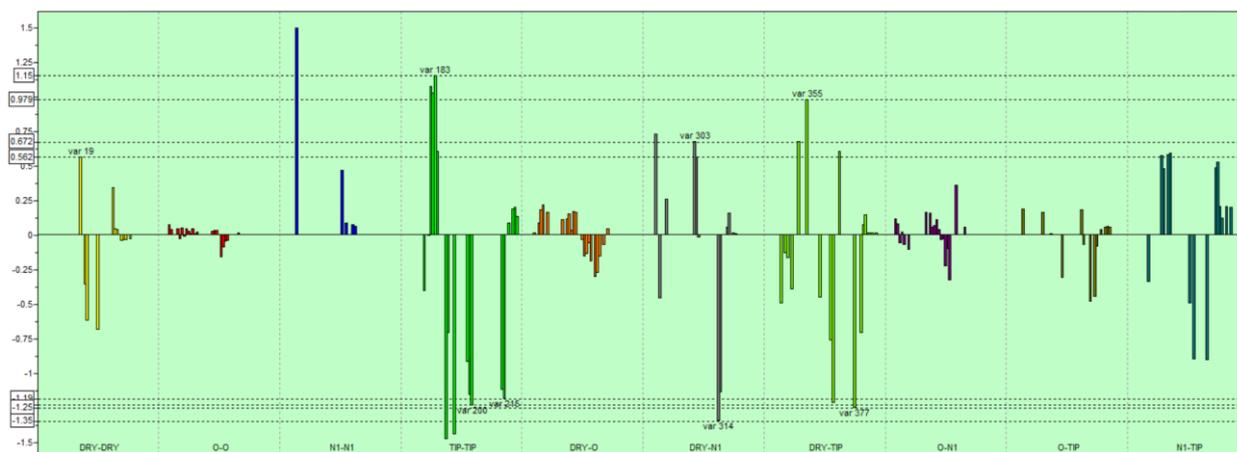
4.2.1 3D-QSAR studija derivata α -iminofosfonata sa poznatim aktivnostima na I₂-IR i α_2 -AR

Studija 3D-QSAR modelovanja je sprovedena u cilju definisanja osnovnih strukturnih osobina koje utiču na postizanje optimalne aktivnosti i selektivnosti proučavanih bicikličnih α -iminofosfonata na nivou I₂-IR i α_2 -AR (Slika 3.6). Formirana su dva 3D-QSAR modela uzimajući u obzir eksperimentalno dobijene pKi vrednosti liganada prikazane u Tabeli 3.4. U cilju validacije formiranih modela i definisanja predikcione sposobnosti, izračunati su različiti statistički parametri. Dobijene vrednosti parametara eksterne validacije poput $R^2_{\text{pred}}(\text{I}_2\text{-IR}) = 0,68$, $R^2_{\text{pred}}(\alpha_2\text{-AR}) = 0,87$ i zadovoljavajuće vrednosti parametara r metrike za test set, su dokazale da razvijeni modeli poseduju dobar prediktivni potencijal za proučavanje novih strukturnih analoga i predviđanje njihove aktivnosti. Rezultati su prikazani u Tabelama 4.9 i 4.10.

Slike 4.20 i 4.21 predstavljaju PLS korelograme sa najvažnijim varijablama sa pozitivnim i negativnim uticajem na aktivnosti ispitivanih liganada na I₂-IR i α_2 -AR receptorskim mestima. GRIND varijable koje su pokazale značajnu pozitivnu korelaciju sa pKi vrednostima bicikličnih α -iminofosfonata za I₂-IR su: DRY-DRY (var19: 7,60-8,00 Å), TIP-TIP (var183: 6,00-6,40 Å), DRY-TIP (var355: 7,60-8,00 Å) i DRY-N1 (var303: 9,20-9,60 Å) (Slika 4.20). Pozitivan efekat na α_2 -AR aktivnosti su pokazale varijable: TIP-TIP (var189: 10,80-11,20 Å), DRY-N1 (var303: 13,20-13,60 Å) i DRY-TIP (var355: 12,40-12,80 Å) (Slika 4.21). Za interpretaciju su korišćena jedinjenja: 9c, koje poseduje visok afinitet za I₂-IR, pKi = 10,28; i 13d, koje poseduje visok nivo selektivnosti, pKi_{I₂-IR} = 7,87, I₂/ α_2 = 74131 (Slika 4.22).

Tabela 4.9. Rezultati 3D-QSAR studije za ligande I₂-IR.

Trening set	pKi _{exp}	pKi _{pred}	Test set	pKi _{exp}	pKi _{pred}
9c	10,28	9,39	9d	8,56	8,00
9b	9,74	9,09	9a	7,97	8,27
9f	8,37	7,78	Idazoksan	7,41	7,92
LSL60101	8,13	8,44	BU99008	7,05	7,84
9ad	7,96	7,52	9i	7,01	6,52
9z	7,90	7,37	9x	6,81	7,32
13d	7,87	8,00	8a	6,79	6,05
8c	7,73	7,76	14c	6,59	6,21
Tracizolin	7,58	7,36	9u	5,81	5,78
12d	7,55	8,55	9r	5,09	5,61
9h	7,35	7,94			
9ab	6,96	6,65	$R^2_{\text{pred}}=0,68 (>0,5)$		
9e	6,65	7,12	RMSEP=0,53		
9k	6,35	5,91	$r^2_{\text{m}}=0,59 (>0,5)$		
8b	5,74	6,87	$r^{2'}_{\text{m}}=0,64 (>0,5)$		
9aa	5,44	5,64	$\Delta r^2_{\text{m}}=0,05 (<0,2)$		
15c	5,35	4,44	$\bar{r}^2_{\text{m}}=0,61 (>0,5)$		
9j	5,26	5,93	$(r^2-r^2_0)/r^2=0,02 (<0,1)$		
8e	5,11	5,07	$k'=1,00 (0,85 \leq k' \leq 1,15)$		
9g	4,02	4,98			
9m	3,84	3,30			
13c	3,39	3,16			
9ac	3,11	3,42			
<hr/>					
$R^2=0,90 (>0,7)$					
$Q^2=0,65 (>0,5)$					
RMSEE=0,60					

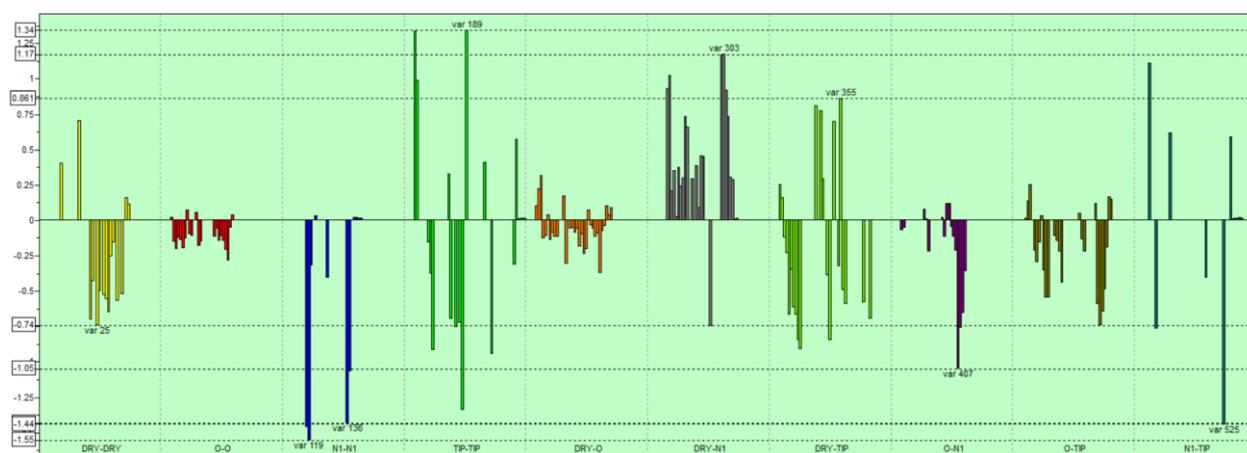


Slika 4.20. PLS grafik sa izdvojenim GRIND varijablama 3D-QSAR modela za I₂-IR. Najznačajnije varijable su označene brojevima.

Tabela 4.10. Rezultati 3D-QSAR studije za ligande α₂-AR.

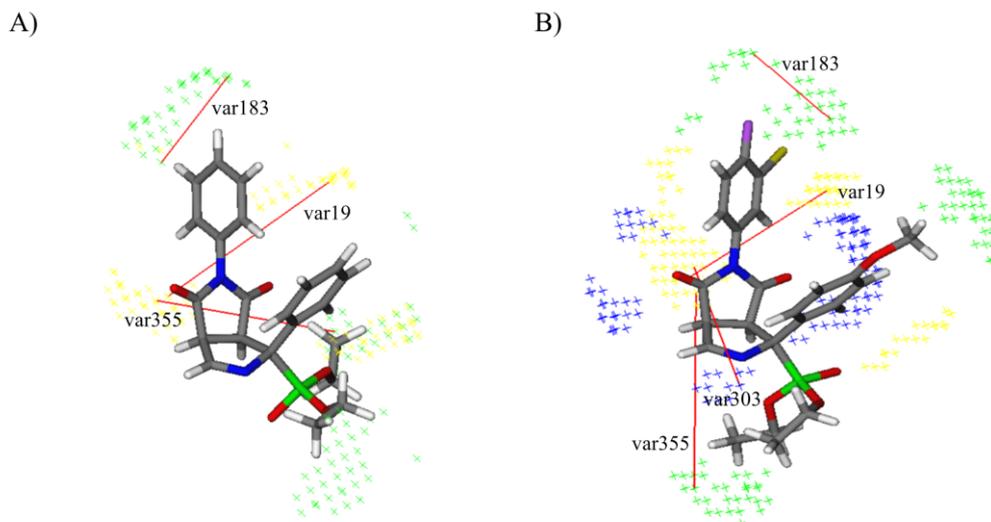
Trening set	pKi _{exp}	pKi _{pred}	Test set	pKi _{exp}	pKi _{pred}
8d	10,27	10,65	8c	8,49	8,47
8a	9,49	9,85	12c	6,77	6,15
9b	9,01	8,41	9d	6,27	6,15
Idazoksan	8,35	7,95	9r	6,15	5,36
9j	8,11	7,91	9a	5,93	5,63
15c	7,20	7,02	9ab	5,43	5,83
9h	6,77	6,88	9w	5,16	5,26
9u	6,22	6,18	9n	4,73	5,02
8e	6,14	6,13	BU99008	4,37	4,86
9f	5,85	5,53			
9l	5,65	5,77			
9p	5,34	5,33			
LSL60101	5,17	5,31			
9z	5,12	5,13			
9e	4,59	4,64			
Tracizolin	4,33	4,49			
9i	4,31	4,48			
13c	3,85	4,31			
9k	3,77	3,47			
14c	3,94	4,32			
12d	3,38	3,11			

$R^2=0,98 (>0,7)$ $Q^2=0,61 (>0,5)$ RMSEE=0,57	$R^2_{pred}=0,87 (>0,5)$ RMSEP=0,42 $r^2_m=0,83 (>0,5)$ $r^{2/}_m=0,71 (>0,5)$ $\Delta r^2_m=0,12 (<0,2)$ $\bar{r}^2_m=0,77 (>0,5)$ $(r^2-r^{2/}_0)/r^2=0,04 (<0,1)$ $k'=0,98 (0,85 \leq k' \leq 1,15)$
--	--



Slika 4.21. PLS grafik sa izdvojenim GRIND varijablama 3D-QSAR modela za α_2 -AR. Najznačajnije varijable su označene brojevima.

GRIND varijabla TIP-TIP, var183, iz 3D-QSAR modela za I_2 -IR poseduje veoma značajan pozitivan efekat na proučavane pKi vrednosti α -iminofosfonata. Ona definiše optimalnu udaljenost između elektron-privlačnih supstituenata *N*-fenil grupe kao sternih centara (6,00-6,40 Å). Najveće vrednosti ove varijable su izračunate za jedinjenja koja poseduju visok profil selektivnosti za I_2 -IR, 12d i 13d (Slika 4.22-B). Iz korelograma 3D-QSAR modela za α_2 -AR uočljivo je da ova varijabla nema značajan efekat na proučavane pKi vrednosti. Prema tome, moguće je zaključiti da prisustvo elektronegativnih atoma, hlora ili fluora, utiče na povećanje aktivnosti i selektivnosti ispitivanih liganada na nivou I_2 -IR u odnosu na α_2 -AR. Važnost hidrofobnih interakcija u vezujućem mestu imidazolinskog receptora potvrđena je varijablama DRY-TIP (var355) i DRY-N1 (var303). Optimalna udaljenost (9,20-9,60 Å) između hidrofobnog centra, bicikličnog prstena i akceptora H-veze, atoma azota iz imino grupe, je definisana sa var303 (DRY-TIP). Suprotno tome, var25 (DRY-DRY) iz 3D-QSAR modela za α_2 -AR definiše da prisustvo fenil supstituenta u α položaju negativno koreliše sa aktivnošću na ovom receptoru. Ovo je u skladu sa eksperimentalnim podacima koji ukazuju da α -nesupstituisani ligandi poseduju veći afinitet za α_2 -AR u odnosu na I_2 -IR (8a, 8c, 8d i 8e). GRIND varijabla DRY-TIP definiše prostorno rastojanje od 7,60-8,00 Å između hidrofobne regije oko bicikličnog prstena i sternog centra, etil fosfonata (Slike 4.22-A i 4.22-B). Takođe, analizom modela za I_2 -IR pokazano je da pozitivnu korelaciju sa ispitivanim pKi vrednostima poseduje i DRY-DRY varijabla (var19). Ona opisuje hidrofobni region oko *N*-fenil grupe, ukazujući da prisustvo aromatičnog supstituenta u ovom položaju može učestvovati u formiranju povoljnih VdW interakcija sa aminokiselinama iz vezujućeg mesta (Slike 4.22-A i 4.22-B). Ovo je moguće potvrditi i eksperimentalnim rezultatima koji ukazuju da prisustvo *N*-alkil grupe umesto *N*-fenil supstituenta, kao kod liganada 8a i 9a, utiče na smanjenje aktivnosti na I_2 -IR.

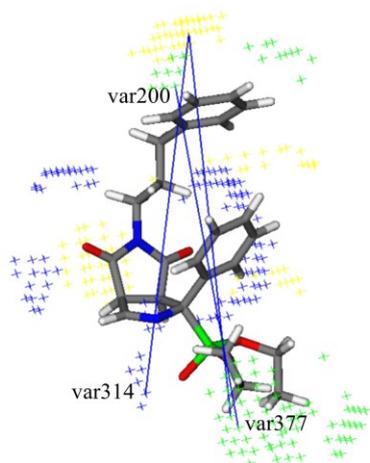


Slika 4.22. GRIND varijable iz 3D-QSAR studije sa najznačajnijim pozitivnim uticajem na aktivnost ispitivanih liganada 9c (A) i 13d (B) na I₂-IR. Sterni regioni (TIP) su prikazani zelenom bojom, hidrofobni centri (DRY) su obojeni žuto, dok su plavom bojom predstavljene grupe sa osobinama akceptora H-veze.

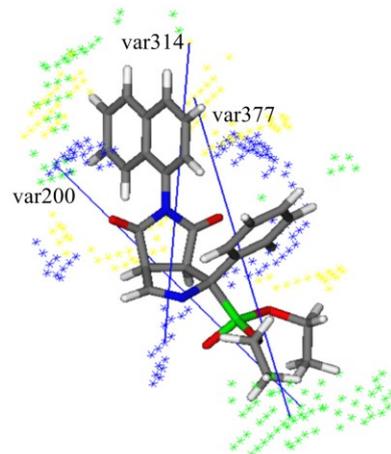
Formiranim 3D-QSAR modelom za I₂-IR takođe su definisane varijable sa negativnim uticajem na aktivnost: TIP-TIP (var200: 12,80-13,20 Å; var215: 18,80-19,20 Å), DRY-N1 (var314: 13,60-14,00 Å) i DRY-TIP (var377: 16,40-16,80 Å) (Slika 4.20). Najznačajniji negativan uticaj na aktivnost ispitivanih liganada na α_2 -AR su pokazale GRIND varijable: N1-N1 (var119: 4,40-4,80 Å; var136: 11,20-11,60 Å), O-N1 (var407: 11,60-12,00 Å) i N1-TIP (var525: 15,60-16,00 Å) (Slika 4.21). Jedinjenja sa najizraženijim negativnim varijablama, 9m (pK_{I₂-IR} = 3,84) i 9ac (pK_{I₂-IR} = 3,11) su prikazana na Slici 4.23.

Kao što se vidi na Slici 4.20, GRIND varijable TIP-TIP, var200 i var215, ispoljavaju značajan negativan uticaj na proučavane pK_i vrednosti za I₂-IR. Obe varijable opisuju nepovoljnu udaljenost između dve sterne regije, etil fosfonata sa jedne strane i supstituenta *N*-maleimid grupe sa druge (Slike 4.23-A i 4.23-B). Visoke vrednosti varijabli su uglavnom izračunate za jedinjenja koja poseduju veću udaljenost između opisanih grupa, poput: 8e, 9e, 9k, 9m, 9z, 9aa, 9ab i 9ac, ukazujući da uvođenje većih supstituenata na *N*-maleimidu nije pogodno za uklapanje u vezujuće mesto imidazolinskog I₂ receptora. Ovaj zaključak takođe potvrđuje i negativna varijabla DRY-N1 (var314: 13,60-14,00 Å), koja ukazuje da povećanje udaljenosti između hidrofobnog regiona aromatičnog prstena i akceptora H-veze, atoma azota iz imino grupe, utiče na smanjenje aktivnosti proučavanih liganada za I₂-IR (Slike 4.23-A i 4.23B). Ovaj trend je uočen kod jedinjenja: 9j, 9m, 9z, 9ab i 9ac. Pored toga, negativnu korelaciju sa ispitivanim pK_i vrednostima za imidazolinski I₂-R je pokazala i GRIND varijabla DRY-TIP (var337) koja opisuje veću razdaljinu (16,40-16,80 Å) između hidrofobnih i sternih regija jedinjenja (8e, 9k, 9j, 9z, 9m, 9ab i 9ac) (Slike 4.23-A i 4.23-B). Sveobuhvatna analiza negativnih varijabli potvrđuje nepovoljno uklapanje dužih jedinjenja u vezivno mesto imidazolinskog I₂ receptora. Ipak, analizom varijabli sa pozitivnim uticajem na aktivnosti proučavanih bicikličnih iminofosfonata za α_2 -AR je pokazano da prisustvo sternog centra na većem rastojanju od etil fosfonata (var355, DRY-TIP: 12,40-12,80 Å) ili akceptora H-veze (var303, DRY-N1: 13,20-13,60 Å) utiče na povećanje aktivnosti na nivou adrenergičkog receptora (8e, 9l i 9j).

A)

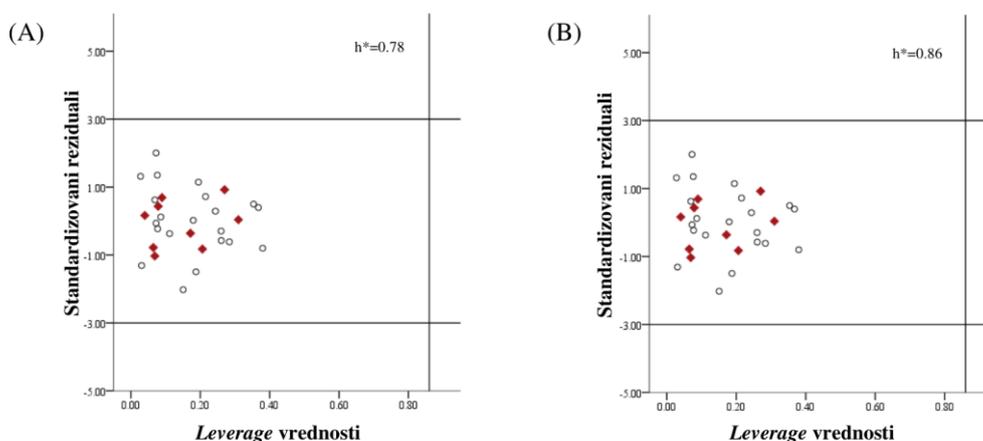


B)



Slika 4.23. GRIND varijable iz 3D-QSAR studije sa najznačajnijim negativnim uticajem na aktivnost ispitivanih liganada 9m (A) i 9ac (B) na I₂-IR. Sterni regioni (TIP) su prikazani zelenom bojom, hidrofobni centri (DRY) su obojeni žuto, dok su plavom bojom predstavljene grupe sa osobinama akceptora H-veze.

Domen primenljivosti 3D-QSAR modela za I₂ i α_2 receptore je definisan primenom *leverage* pristupa, a formirani *Williams* grafici su prikazani na Slici 4.24. Dobijeni rezultati ukazuju da sva ispitivana jedinjenja iz test seta pripadaju definisanim domenima, sugerišući da se formirani i validirani modeli mogu koristiti za pouzdano predviđanje pK_i vrednosti novih analoga na proučavanim receptorima.



Slika 4.24. Domen primenljivosti formiranog 3D-QSAR modela za I₂-IR (A) i α_2 -AR (B). Crveno su označena test set jedinjenja, dok krugovi simbolizuju trening set jedinjenja.

4.2.2 *In silico* predviđanje fizičko-hemijskih i farmakokinetičkih osobina selektivnih liganada I₂-IR

Proučavani biciklični α -iminofosfonati, sa potentnim delovanjem na I₂-IR (pK_i > 7,00), su korišćeni za analizu fizičko-hemijskih i farmakokinetičkih osobina primenom ADMET Predictor i

SwisADME programa. Rezultati izračunatih parametara su prikazani u Tabelama A7.13 i A7.14. Na osnovu vrednosti parametara solubilnosti ($\log S$) i lipofilnosti ($\log P_{o/w}$) moguće je zaključiti da sva ispitivana jedinjenja poseduju dobar profil biološke raspoloživosti (Tabela A7.13). Analizom je uočeno da uvođenje aromatičnih supstituenata u ligandu utiče na povećanje $\log P$ vrednosti kao i afiniteta vezivanja za albumin, istovremeno smanjujući rastvorljivost u vodi (9z, 9d, 12d i 13d). Polarnost bicikličnih derivata je ispitana i računanjem TPSA parametra, čije su vrednosti bile u okviru graničnih ($20\text{\AA}^2 < \text{TPSA} < 130\text{\AA}^2$) (Tabela A7.13). Dodatno su osobine dobre biološke raspoloživosti ($M\log P \leq 4.15$; molekulska masa ≤ 500 ; broj N/O ≤ 10 ; broj OH/NH ≤ 5) ispitane Lipinski parametrom. Zbog molekulske mase veće od 500 Da, jedinjenja 9z i 13d su prekršila jedan od kriterijuma Lipinskog (Tabela A7.13). U poređenju sa proučavanim standardima (idazoksan, tracizolin i BU99008), α -iminofosfonati se u značajno većem procentu vežu za proteine plazme, što može biti uslovljeno većim brojem aromatičnih grupa (Tabela A7.14). U poređenju sa idazoksanom, većina ispitivanih jedinjenja poseduje niži rizik za vezivanje za CYP enzime, dok nijedno jedinjenje nije identifikovano kao supstrat efluksnog P-gp (Tabela A7.14). Pored toga, proučavani ligandi su pokazali značajno niži rizik za izazivanje toksičnog delovanja u odnosu na standardna jedinjenja (idazoksan, tracizolin i BU99008) (Tabela A7.14). Za sva jedinjenja je kvalitativnom analizom predviđen visok procenat mogućnosti prolaska kroz KMB (Tabela A7.14).

Teorijska studija novosintetisanih bicikličnih α -iminofosfonata je omogućila razumevanje ključnih strukturnih osobina za selektivno delovanje na imidazolinskim I_2 -R u odnosu na adrenergičke α_2 -R, koje mogu poslužiti kao osnova za strukturne modifikacije novih liganda. 3D-QSAR analizom je pokazano da najveći pozitivan uticaj na aktivnost i selektivnost proučavanih liganada ima prisustvo elektronegativnih supstituenata na optimalnom rastojanju od 6,00-6,40 Å. Takođe, GRIND varijable DRY-DRY (var19), DRY-N1 (var303) i DRY-TIP (var355) definišu da uvođenje aromatičnih supstituenata sa hidrofobnim svojstvima u položajima R i R₁ (Slika 3.6) pozitivno koreliše sa aktivnošću na I_2 -IR i omogućuju ostvarivanje povoljnih VdW interakcija sa aminokiselinama iz vezujućeg mesta. Povećanje udaljenosti između ovih regiona je pokazalo negativan uticaj na aktivnost (DRY-TIP: var377) ispitivanih liganada na I_2 -IR, dok je pozitivna korelacija uočena kod 3D-QSAR modela za α_2 -AR (DRY-TIP, var355). Takođe, *in silico* predviđanje ADMET osobina u ranim fazama istraživanja, pored toga što utiče na smanjenje investicija neophodnih u daljim ispitivanjima, omogućava i preliminarnu selekciju najboljih kandidata pogodnih za *in vitro* ispitivanja. Jedinjenje 9d je pokazalo optimalan profil aktivnosti i selektivnosti na proučavanim receptorima ($K_{iI_2-IR} = 2,8$ nM; $K_{i\alpha_2-AR} = 53$ μ M; $K_{iI_1-IR} = 912$ μ M) (218). *In vitro* i *in vivo* studijama je dokazano potencijalno neuroprotektivno delovanje ovog strukturnog predstavnika, čija dalja optimizacija može usloviti razvoj nove grupe jedinjenja za lečenje kognitivnih poremećaja kod neuroloških bolesti.

4.3 Primena *in vitro* PAMPA testa i *in silico* kompjuterskih metoda u proučavanju permeabilnosti kroz KMB novih CNS aktivnih jedinjenja

Jedinjenja proučavana u okviru ove disertacije predstavljaju potencijalno nove terapeutike za lečenje složenih neuroloških i mentalnih oboljenja. Imajući u vidu da se ciljna mesta dejstva od interesa (serotoniniski, dopaminski i imidazolinski receptori) nalaze unutar CNS-a, procena permeabilnosti proučavanih liganada kroz KMB je od suštinskog značaja u ranim fazama istraživanja. Formiranje prediktivnih modela koji će omogućiti sagledavanje ključnih strukturnih osobina za prolazak kroz KMB, kao i pouzdano predviđanje permeabilnosti predstavlja prvi korak u izboru najboljih kandidata za dalja *in vitro* ispitivanja.

4.3.1 Rezultati PAMPA testa

U okviru ovog istraživanja, strukturno različiti ligandi koji utiču na modulaciju aktivnosti serotoninske i dopaminske neurotransmisije u CNS-u su korišćeni za procenu pasivne permeabilnosti kroz KMB primenom *in vitro* PAMPA testa. Ispitivani set se sastojao od ukupno osamnaest jedinjenja, među kojima se pored poznatih CNS standarda i njihovih nečistoća nalaze i novi supstrati hDAT proteina (Slika 3.8). Pramipeksol i ropinirol predstavljaju potentna jedinjenja efikasna u lečenju PB, dok ostali ligandi pripadaju grupama poznatih antipsihotika i antidepresiva.

Na osnovu rezultata dobijenih iz PAMPA testa, primenom jednačina (25) i (26) izračunate su efektivne permeabilnosti ($\log P_e$) proučavanih liganada i prikazane u Tabeli 4.11, zajedno sa dostupnim eksperimentalnim vrednostima iz literature za $\log BB$ parametar. $\log BB$ je takođe parametar permeabilnosti kroz KMB, koji predstavlja logaritam odnosa koncentracije leka u mozgu i krvi. Visoke vrednosti $\log P_e$ parametra su u direktnoj korelaciji sa visokom propustljivošću kroz KMB barijeru, dok niske $\log P_e$ vrednosti poseduju negativan uticaj.

Prema izračunatim $\log P_e$ vrednostima za procenu permeabilnosti kroz KMB korišćenjem PAMPA testa, moguće je izvršiti određenu klasifikaciju jedinjenja u četiri grupe (380):

- nepermeabilna jedinjenja: $\log P_e < -6,14$;
- jedinjenja sa niskom permeabilnošću: $-6,14 < \log P_e < -5,66$;
- srednje permeabilna jedinjenja: $-5,66 < \log P_e < -5,33$;
- visoko permeabilna jedinjenja: $\log P_e > -5,33$.

Tabela 4.11. Rezultati PAMPA studije

Jedinjenje	$\log BB_{\text{exp}}$	P_e	$\log P_e$
Pramipeksol	-	5,19E-05	-4,29
Citalopram	0,99 (381)	2,68E-04	-3,57
Ropinirol	-0,30 (382)	2,97E-05	-4,44
Mirtazapin	0,53 (383)	2,42E-04	-3,54
Risperidon	-0,02 (382)	2,15E-04	-3,67
AP263/40017925	-	3,28E-04	-3,66
AO854/40003386	-	4,10E-04	-3,47
AM879/11741391	-	3,69E-04	-3,38
AG205/05879010	-	3,21E-05	-4,45
AO854/12910145	-	3,45E-04	-3,46
AP124/41027793	-	3,69E-04	-3,43
Kvetiapin	-	1,67E-05	-4,78
Ziprazidon	-	1,08E-06	-5,88
Olanzapin	0,33 (384)	1,22E-04	-3,85
Imp Z1	-	4,67E-05	-4,42
Imp Z2	-	1,04E-04	-3,98
Imp A1	-	1,64E-04	-3,79
Haloperidol	1,34 (385)	1,70E-04	-3,65

Proučavanjem literaturnih podataka o eksperimentalno određenim $\log BB$ vrednostima uočeno je da ropinirol poseduje najnižu permeabilnost u odnosu na ostala jedinjenja ($\log BB = -0,30$), što je u skladu sa izračunatom efektivnom permeabilnosti iz PAMPA analize ($\log P_e = -4,44$). Suprotno tome, visoka permeabilnost definisana $\log BB$ vrednostima haloperidola ($\log BB = 1,34$),

citaloprama ($\log BB = 0,99$) i mirtazapina ($\log BB = 0,53$) je potvrđena i izračunatim $\log P_e$ vrednostima za ova jedinjenja ($\log P_e$ (haloperidol) = -3,65; $\log P_e$ (citalopram) = -3,57; $\log P_e$ (mirtazapin) = -3,54) (Tabela 4.11).

Uzimajući u obzir definisane granične vrednosti, moguće je zaključiti da sva ispitivana jedinjenja, uključujući nove supstrate za hDAT kao i ostale ligande koji utiču na nivoe serotonina i dopamina u CNS-u izuzev ziprazidona, poseduju visok nivo permeabilnosti kroz KMB ($\log P_e > -5,33$). Nešto niža vrednost $\log P_e$ u odnosu na ostala jedinjenja je izračunata za ziprazidon, koji je klasifikovan u grupu nisko permeabilnih ($-6,14 < \log P_e (-5,88) < -5,66$).

S obzirom na to da se PAMPA analiza bazira na proučavanju pasivne permeabilnosti liganada, predviđanje njihovog vezivanja za efluksni P-gp predstavlja važan korak u validaciji dobijenih rezultata. Primena ADMET Predictor programa je omogućila *in silico* predviđanje potencijalnog vezivanja za P-gp proučavanih jedinjenja (Tabeli 4.12). Analizom je pokazano da hDAT supstrati kao i risperidon, pramipeksol, haloperidol i nečistoće ziprazidona nisu supstrati za P-gp, dok je za kvetiapin, citalopram i ziprazidon predviđeno da vrše inhibiciju ovog transportera. S druge strane, mirtazapin, ropinirol, olanzapin i nečistoća aripiprazola su identifikovani kao supstrati ovog proteina, ali ne i inhibitori. Iako se smatra da efluks posredstvom P-gp može ograničiti prolazak jedinjenja kroz KMB, njihova intrinzična pasivna permeabilnost može biti dovoljna za postizanje optimalne koncentracije slobodnog leka u mozgu (386).

U cilju dodatne validacije rezultata dobijenih *in vitro* PAMPA testom, kao kontrolno jedinjenje korišćena je levodopa, za koju je poznato da prolazi KMB aktivnim transportom. Uzorci analizirani u triplikatu su ukazali na prisustvo levodope u donorskim, ali ne i u akceptorskim ćelijama. Prema tome, moguće je zaključiti da je primenjena PAMPA metoda omogućila pouzdano predviđanje pasivne permeabilnosti kroz KMB proučavanih jedinjenja koja deluju na nivou CNS.

Tabela 4.12. *In silico* predviđanje vezivanja proučavanih liganda za P-gp.

Jedinjenje	P-gp supstrat	P-gp inhibitor
Pramipeksol	Ne (45%)	Ne (93%)
Citalopram	Da (75%)	Da (79%)
Ropinirol	Da (95%)	Ne (78%)
Mirtazapin	Da (59%)	Ne (93%)
Risperidon	Ne (86%)	Da (73%)
AP263/40017925	Ne (71%)	Ne (93%)
AO854/40003386	Ne (86%)	Ne (93%)
AM879/11741391	Ne (80%)	Ne (93%)
AG205/05879010	Ne (80%)	Ne (78%)
AO854/12910145	Ne (86%)	Ne (93%)
AP124/41027793	Ne (63%)	Ne (93%)
Kvetiapin	Da (86%)	Da (52%)
Ziprazidon	Da (68%)	Da (97%)
Olanzapin	Da (82%)	Ne (78%)
Imp Z1	Ne (54%)	Ne (93%)
Imp Z2	Ne (67%)	Ne (93%)
Imp A1	Da (99%)	Ne (59%)
Haloperidol	Ne (60%)	Da (97%)

4.3.2 QSPR modelovanje

Rezultati dobijeni PAMPA studijom su dalje korišćeni za QSPR analizu u cilju formiranja pouzdanih modela za *in silico* predviđanje permeabilnosti liganada kroz KMB. Tri različite matematičke metode, postupna MLR, PLS i SVM, su primenjene za definisanje zavisnosti između efektivne permeabilnosti ($\log P_e$) i strukturnih osobina jedinjenja, izraženih u formi molekulskih deskriptora.

Za procenu linearne zavisnosti između proučavanih parametara primenjene su postupna MLR i PLS analize. Formirani modeli su validirani primenom parametara interne i eksterne validacije, a dobijeni rezultati su prikazani u Tabeli 4.13.

Tabela 4.13. Parametri interne i eksterne validacije za formirane QSPR modele.

Model	Q^2	R^2	RMSEE	R^2_{pred}	RMSEP	r^2_m	r'^2_m	\bar{r}^2_m	Δr^2_m	k'	CCC
MLR	0,86	0,86	0,26	-0,10	0,55	/	/	/	/	/	/
PLS	0,58	0,73	0,39	0,64	0,32	0,69	0,44	0,57	0,25	0,99	0,86
SVM	0,78	0,81	0,32	0,57	0,35	0,72	0,55	0,63	0,12	0,98	0,98
Kriterijum	> 0,50	> 0,70		> 0,50	$\leq 2 \times \text{RMSEE}$	> 0,50	> 0,50	> 0,50	< 0,20	$0,85 \leq k' \leq 1,15$	≈ 1

MLR model je ukazao da najveći uticaj na proučavane $\log P_e$ vrednosti ima lipofilnost izražena ALOGP2 (eng. *Squared Ghose-Crippen octanol-water partition coefficient*) deskriptorom i energija solvatacije prikazana SolvEMt_3D (eng. *Length of the solvation energy moment vector*) parametrom, kao što je prikazano u jednačini (28).

$$\log P_e = -2.78 - 0.04 \text{ SolvEMt_3D} - 0.06 \text{ ALOGP2} \quad (28)$$

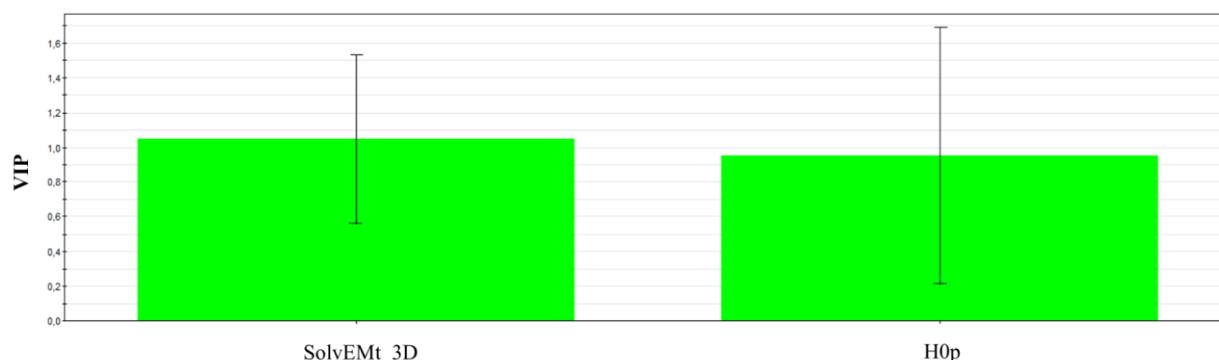
Negativan koeficijent značajnosti ALOGP2 deskriptora, koji predstavlja kvadratnu vrednost ALOGP, ukazuje na paraboličnu zavisnost između izračunatih vrednosti i $\log P_e$ parametra. Analizom je pokazano da jedinjenja sa veoma visokim vrednostima ALOGP2, poput ziprazidona, kao i veoma niskim vrednostima, poput ropinirola i pramipeksola, poseduju i niske $\log P_e$ vrednosti (Tabela 4.14). Iz formirane jednačine (28) za MLR model takođe je moguće zaključiti da SolvEMt_3D deskriptor poseduje negativan uticaj na ispitivane $\log P_e$ vrednosti.

Iako formirani MLR model karakterišu visoke vrednosti parametara interne validacije, analizom je pokazano da poseduje loš prediktivni potencijal za eksterni set jedinjenja, usled vrednosti $R^2_{\text{pred}} < 0,5$ (Tabela 4.13).

Tabela 4.14. Izračunate vrednosti deskriptora selektovane MLR modelom i predviđene $\log P_e$ vrednosti za trening i test set (*) jedinjenja.

Jedinjenje	ALOGP2	SolvEMt_3D	$\log P_{e_{pred}}$
Pramipeksol	0,02	36,99	-4,12
Citalopram	4,67	24,99	-3,97
Ropinirol	1,96	37,81	-4,27
Risperidon	3,09	21,62	-3,74
AP263/40017925	7,65	12,90	-3,70
AM879/11741391	8,25	2,26	-3,35
AG205/05879010	8,27	20,07	-4,01
AO854/12910145	4,48	9,57	-3,38
Ziprazidon	18,14	54,51	-5,90
Olanzapin	10,34	10,77	-3,79
Imp Z2	5,78	36,07	-4,44
Haloperidol	15,11	5,11	-3,88
Mirtazapin*	9,58	2,27	-3,43
AO854/40003386*	5,60	9,50	-3,45
AP124/41027793*	2,26	13,24	-3,38
Kvetiapin *	10,01	29,23	-4,45
Imp Z1*	4,69	7,20	-3,31
Imp A1*	8,88	34,81	-4,59

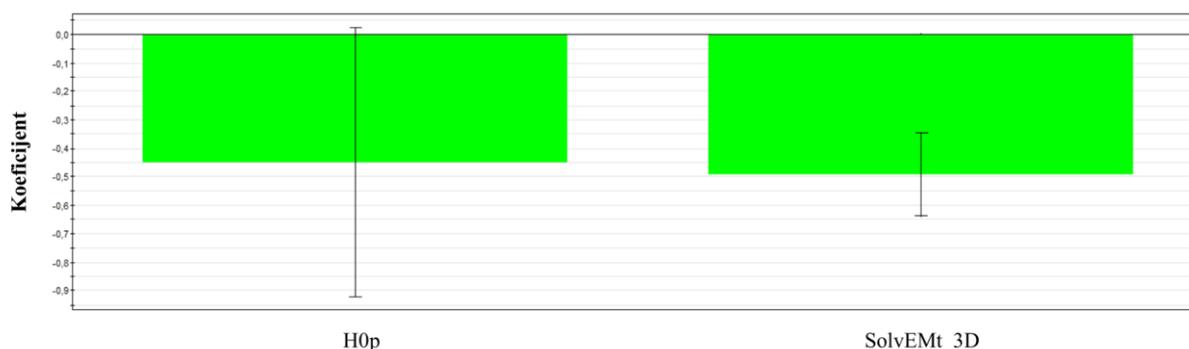
Primenom PLS regresione analize formiran je model sa takođe dve značajne varijable: H_{0p} (eng. *H autocorrelation of lag 0 / weighted by polarizability*) i SolvEMt_3D, koje su rangirane prema vrednostima VIP koeficijenta. Izračunata značajnost za SolvEMt_3D, deskriptor iz ADMET Predictor programa, je 1,0, dok je VIP vrednost za H_{0p} , iz Dragon programa, iznosila 0,95 (Slika 4.25). Vrednosti selektovanih deskriptora zajedno sa predviđenim $\log P_e$ vrednostima su prikazane u Tabeli 4.15. Takođe, analizom je pokazano da oba deskriptora poseduju negativan uticaj na ispitivane $\log P_e$ vrednosti (Slika 4.26).



Slika 4.25. VIP vrednosti selektovanih deskriptora SolvEMt_3D i H_{0p} za formirani PLS model.

Tabela 4.15. Izračunate vrednosti deskriptora selektovanih PLS modelom i predviđene $\log P_e$ vrednosti za trening i test set (*) jedinjenja.

Jedinjenje	H _{0p}	SolvEMt_3D	$\log P_{e_{pred}}$
Pramipeksol	1,25	36,99	-4,27
Citalopram	1,33	24,99	-4,14
Ropinirol	1,16	37,81	-4,13
Risperidon	1,27	21,62	-3,97
AP263/40017925	1,21	12,90	-3,67
AM879/11741391	1,13	2,26	-3,30
AG205/05879010	1,28	20,07	-3,95
AO854/12910145	1,05	9,57	-3,32
Ziprazidon	1,79	54,51	-5,56
Olanzapin	1,37	10,77	-3,90
Imp Z2	1,49	36,07	-4,65
Haloperidol	1,33	5,11	-3,69
Mirtazapin*	1,24	2,27	-3,48
AO854/40003386*	1,11	9,50	-3,42
AP124/41027793*	1,27	13,24	-3,77
Kvetiapin *	1,31	29,23	-4,21
Imp Z1*	1,51	7,20	-4,05
Imp A1*	1,15	34,81	-4,05



Slika 4.26. Prikaz koeficijenata izabranih deskriptora u formiranom PLS modelu.

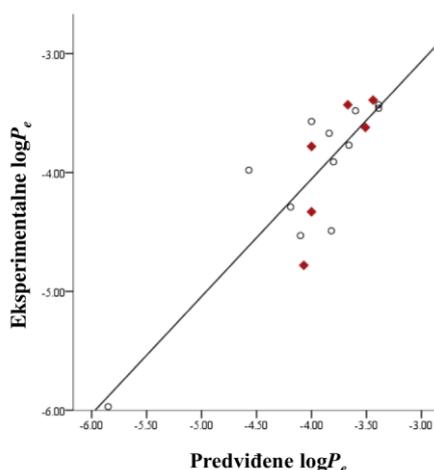
Formirani PLS model je takođe validiran računanjem parametara interne i eksterne validacije (Tabela 4.13), gde je pokazao određene prednosti u odnosu na MLR model. U cilju dodatne procene robustnosti PLS modela, urađena je analiza permutacije zavisne varijable (*Y scrambling*). Test je baziran na randomizaciji *Y* matriksa, dok *X* vrednosti ostaju nepromenjene. Formira se novi model i računaju parametri $Q^2_{intercept} < 0,05$ i $R^2_{intercept} < 0,40$ (387). Formirani PLS model je pokazao dobro uklapanje u definisane granične vrednosti: $Q^2_{int} = -0,24$ i $R^2_{int} = -0,0024$. S obzirom da je PLS metod takođe pokazao određena ograničenja u računanju parametara eksterne validacije (Tabela 4.13), deskriptori selektovani ovim modelom su dalje primenjeni za SVM modelovanje.

SVM metod ima široku primenu u proučavanju nelinearne zavisnosti između podataka. Model je formiran primenom RBF funkcije i variranjem parametara optimizacije: C (10-45), ϵ (0,01-0,10) i γ (0,10-1,00) u cilju postizanja najmanje greške (RMSE) desetostruke ukrštene

validacije (261). Finalni model se sastojao od 5 podržavajućih vektora, dok su vrednosti C , ε i γ parametara iznosile: 43, 0,09 i 0,125, redom (Tabela 4.16). Statistički parametri validacije QSPR-SVM modela su prikazani u Tabeli 4.13. Visoke vrednosti Q^2 i R^2 , izračunate za trening set jedinjenja, su potvrdile internu prediktivnost, dok parametri poput R^2_{pred} , $r_{metrics}$ i CCC u okviru graničnih vrednosti ukazuju na mogućnost primene formiranog modela za pouzdana predviđanja permeabilnosti novih jedinjenja. Zbog boljeg uklapanja parametara eksterne validacije, SVM model je pokazao veću predikcionu sposobnost u odnosu na PLS analizu (Tabela 4.13). Grafički prikaz odnosa predviđenih i eksperimentalnih $\log P_e$ vrednosti je dat na Slici 4.27.

Tabela 4.16. Rezultati QSPR-SVM studije za trening i test set (*) jedinjenja.

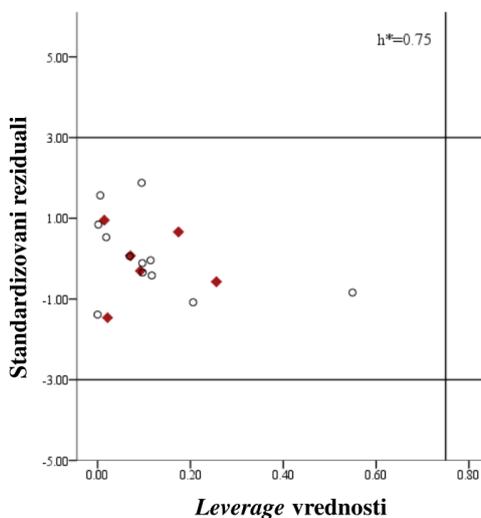
Jedinjenje	$\log P_{e \text{ exp}}$	$\log P_{e \text{ pred}}$
Pramipeksol	-4,29	-4,19
Citalopram	-3,57	-3,40
Ropinirol	-4,53	-4,10
Risperidon	-3,67	-3,84
AP263/40017925	-3,48	-3,60
AM879/11741391	-3,43	-3,39
AG205/05879010	-4,49	-3,82
AO854/12910145	-3,46	-3,39
Ziprazidon	-5,97	-5,85
Olanzapin	-3,91	-3,80
Imp Z2	-3,98	-4,57
Haloperidol	-3,77	-3,67
Mirtazapin*	-3,62	-3,51
AO854/40003386*	-3,39	-3,44
AP124/41027793*	-3,43	-3,68
Kvetiapin *	-4,78	-4,08
Imp Z1*	-4,33	-4,00
Imp A1*	-3,79	-4,00



Slika 4.27. Odnos predviđenih i eksperimentalnih $\log P_e$ vrednosti u formiranom SVM modelu.

Dodatno, za formirani QSPR-SVM model predviđen je domen primenljivosti računanjem granične *leverage* vrednosti ($h^* = 0,75$). *Williams* grafik je prikazan na Slici 4.28. Dobijeni rezultati

su ukazali da nijedno jedinjenje iz test seta ne odstupa od definisanog domena, što implicira da formirani i validirani SVM model može biti korišćen za pouzdano predviđanje permeabilnosti kroz KMB strukturno sličnih jedinjenja.



Slika 4.28. Domen primenljivosti formiranog QSPR-SVM modela. Crveno su označena test set jedinjenja, dok krugovi simbolizuju trening set jedinjenja.

4.3.3 Interpretacija najznačajnijih molekulskih deskriptora

Interpretacija statistički najznačajnijih molekulskih deskriptora omogućava razumevanje strukturnih osobina koje imaju ključnu ulogu u prolasku jedinjenja kroz KMB. Izabrani SVM model sa najboljim predikcionim osobinama se zasniva na računanju dva molekulska deskriptora: H_{0p} i $SolvEMt_3D$.

H_{0p} pripada grupi GETAWAY (eng. *GEometry, Topology, and Atom-Weights Assembly*) deskriptora koji se računaju iz matrice molekuskog uticaja (eng. *Molecular Influence Matrix, MIM*), tj. matičnog prikaza molekula izraženog sa H i definisanog jednačinom:

$$H = M \times (M^T \times M)^{-1} \times M^T \quad (29)$$

gde je M molekulski matriks sastavljen od centriranih Dekartovih koordinata (x , y i z) atoma molekula u određenoj konformaciji, uzimajući u obzir atome vodonika. Matriks je simetrične dimenzije, $A \times A$, gde je A broj atoma u molekulu. Dijagonalni elementi matrice molekuskog uticaja su izraženi parametrom h_{ii} (0-1) koji označava uticaj svakog atoma u molekulu na definisanje oblika celog molekula. Atomi koji su više udaljeni od centra molekula imaju veće vrednosti h_{ii} i posledično veći uticaj (388,389).

H_{0p} je autokorelacioni deskriptor koji sadrži topološke i geometrijske informacije izražene u funkciji polarizabilnosti, molekulske mase, VdW zapremine i elektronegativnosti. Njegovo računanje je zasnovano na jednačini (30) (389).

$$H_k(w) = \sum_{i=1}^A \sum_{j \geq i}^A h_{ij} \times w_i \times w_j \times \delta(d_{ij}; h_{ij}; k) \quad \text{za } k = 0, 1, 2, \dots, D \quad (30)$$

gde h_{ij} predstavlja vandijagonalne elemente molekulskog matriksa uticaja H , w je težinski faktor, a Dirakova δ funkcija se definiše kao:

$$\delta(d_{ij}; h_{ij}; k) = \begin{cases} 1 & \text{ako je } d_{ij} = k \text{ i } h_{ij} > 0 \\ 0 & \text{ako je } d_{ij} \neq k \text{ ili } h_{ij} \leq 0 \end{cases} \quad (31)$$

Za određeni atom i , samo oni atomi j , na topološkoj udaljenosti d_{ij} sa pozitivnim h_{ij} vrednostima, se uzimaju u obzir procene uticaja jer imaju najveću šansu da interaguju sa i -tim atomom.

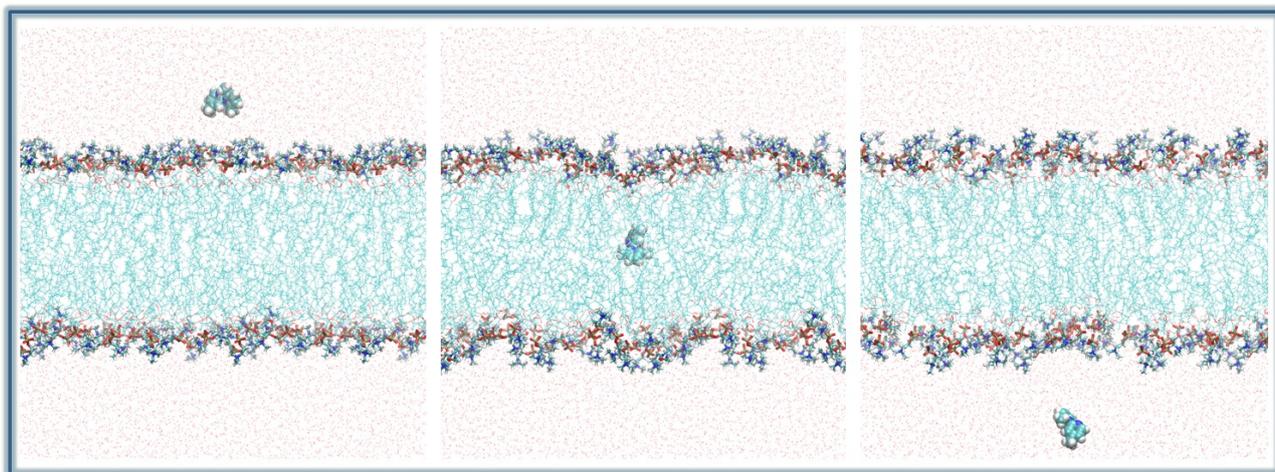
H_{0p} pripada grupi 3D deskriptora koji uzima u obzir položaj atoma u matriksu i vrši procenu uticaja na osnovu polarizabilnosti na topološkoj udaljenosti 0 u trodimenzionalnom molekulskom prostoru. Najveće vrednosti ovog deskriptora su izračunate za olanzapin, ziprazidon i njegove nečistoće, Z1 i Z2, usled prisustva atoma hlora i sumpora u jedinjenju. Poznato je da ovi atomi imaju najveće vrednosti polarizabilnosti i posledično najveći uticaj na smanjenje permeabilnosti kroz KMB (390). Suprotno tome, jedinjenja sa najnižim vrednostima ovog deskriptora su: AO854/40003386, AO854/12910145 i AM879/11741391, koja poseduju i najveće $\log P_e$ vrednosti. Iz tog razloga, moguće je zaključiti da uvođenje atoma fluora umesto hlora, uklanjanje atoma sumpora iz liganda ili zamena sulfonamida sa amidskom funkcionalnom grupom može imati pozitivan uticaj na povećanje permeabilnosti kroz KMB. Osim polarnih karakteristika, H_{0p} uzima u obzir i geometrijske osobine jedinjenja koje zavise od 3D strukture. Primećeno je da jedinjenja sa metil supstituentom na aromatičnom prstenu, poput AG205/05879010, poseduju više H_{0p} vrednosti i niže $\log P_e$ vrednosti u odnosu na jedinjenja sa metil grupom na zasićenom heterociklusu, AP263/40017925, što je potencijalno uslovljeno različitim konformacionim stanjima ispitivanih liganada. Predložene strukturne promene su u skladu sa smernicama koje su definisane za dizajn efikasnijih i bezbednijih dualnih antagonista 5-HT_{2A}/D₂-R. Prisustvo amidске funkcionalne grupe u strukturi dizajniranih liganada je pokazalo značajan pozitivan uticaj na povećanje aktivnosti na proučavanim 5-HT_{2A} i D₂ receptorima.

SolvEMt_3D je drugi selektovani deskriptor, izračunat u ADMET Predictor programu, koji se definiše kao dužina vektora momenta energije solvatacije. On takođe poseduje negativnu korelaciju sa proučavanim $\log P_e$ vrednostima, pa je povećanje njegove vrednosti praćeno smanjenjem efektivne permeabilnosti. Teorijski, ovaj deskriptor takođe karakteriše polarnost molekula. Jedinjenja koja poseduju više polarnih grupa i koja su protonovana pri fiziološkom pH imaju i više vrednosti SolvEMt_3D a niže $\log P_e$, poput ziprazidona i ropinirola.

Definisanje uticaja SolvEMt_3D i H_{0p} deskriptora je pružilo jedinstvene informacije o uticaju topoloških i geometrijskih faktora, kao i faktora polarizabilnosti na prolazak ispitivanih liganada kroz KMB. Predložene strukturne modifikacije mogu poslužiti kao osnova za dalju optimizaciju ispitivanih liganada u cilju poboljšanja njihovih osobina permeabilnosti. Takođe, formirani i validirani QSPR-SVM model može biti korišćen za brzo i pouzdano predviđanje permeabilnosti strukturno srodnih jedinjenja koja utiču na modulaciju aktivnosti serotoninske i dopaminske neurotransmisije u CNS-u.

4.3.4 SMD simulacije

Primena SMD metodologije u ovom istraživanju je omogućila kvalitativnu analizu procesa permeabilnosti ispitivanih jedinjenja kroz KMB. Sistem je pripremljen prema postupku datom u Eksperimentalnom delu 3.4.3, a Slika 4.29 prikazuje ligand AM879/11741391 koji se nalazi na različitim pozicijama u odnosu na DOPC lipidni dvosloj.



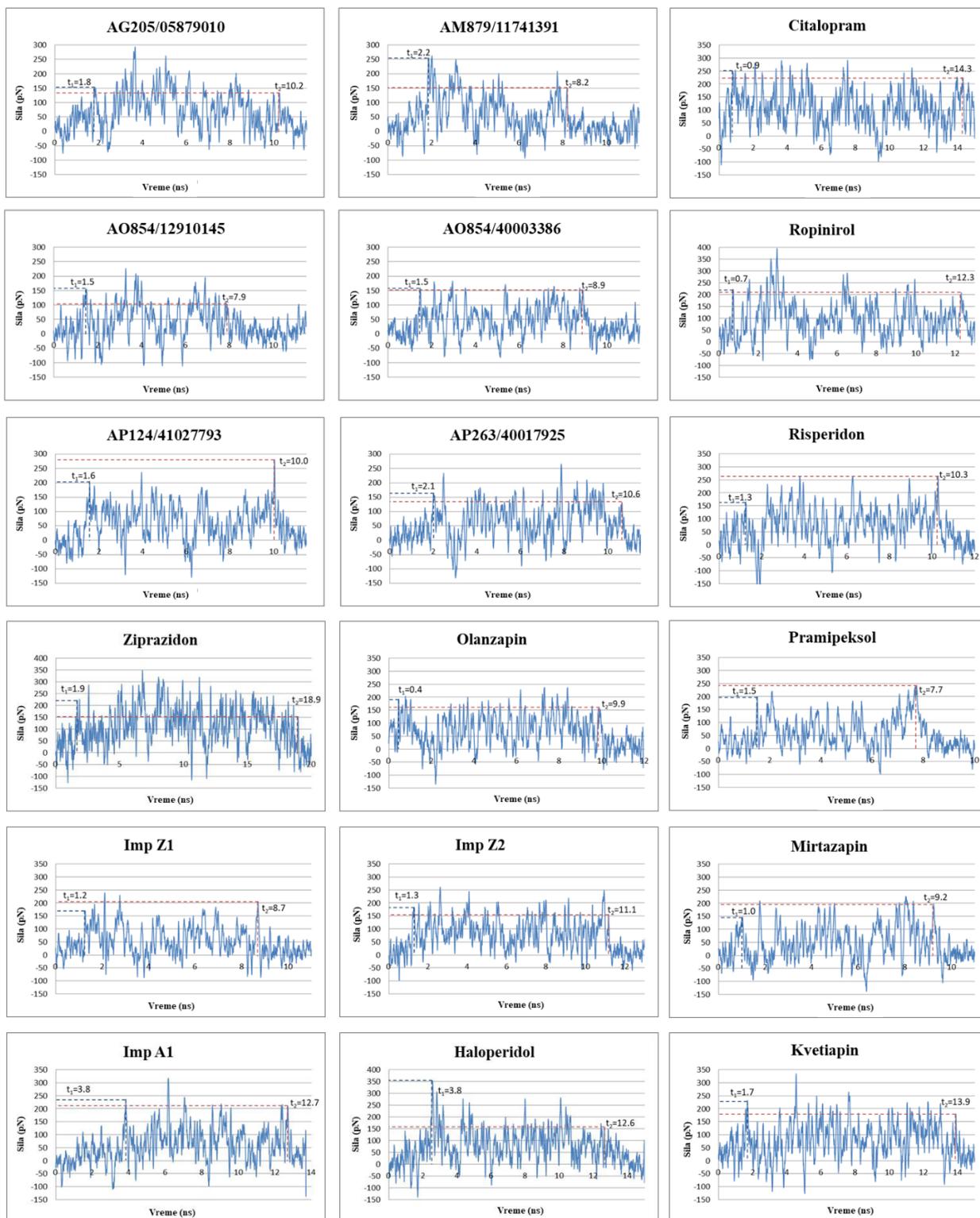
Slika 4.29. SMD simulacija jedinjenja AM879/11741391 koji se kreće u pravcu z ose, iz vode u lipidni dvosloj i opet izlazi u vodu sa druge strane.

Ligandi su proučavani u zasebnim sistemima, analizirajući maksimum primenjene sile na svako jedinjenje u funkciji vremena, kao i vreme potrebno da jedinjenje prođe kroz lipidni dvosloj koji imitira KMB (Slika 4.30). Na početku svake SMD simulacije, jedinjenje se kreće u vodenoj sredini gde maksimum sile koja deluje na njega ne prelazi preko 150 pN. Kako se jedinjenje primiče DOPC membrani i ulazi u hidrofobne regije (t_1), dolazi do ostvarivanja jačih interakcija u sistemu koje utiču i na povećanje sile koja deluje na jedinjenje sve dok ne izađe opet u vodenu sredinu. Maksimalna vrednost sile je uočena kod ropinirola, 395,88 pN (Slika 4.30). Nakon izlaska iz lipidnog dvosloja i ponovnog ulaska u vodenu sredinu (t_2), sila koja deluje na jedinjenje se značajno smanjuje i postaje stabilnija.

Pored toga, ispitivana jedinjenja su analizirana uzimajući u obzir i vreme potrebno da jedinjenje prođe DOPC membranu, računajući razliku između dva pika, na prikazanim graficima, u vremenima t_2 i t_1 . Rezultati predstavljeni u Tabeli 4.17 su pokazali značajnu negativnu korelaciju sa ispitivanim $\log P_e$ vrednostima iz PAMPA studije ($r_{\text{time}/\log P_e} = 0,66$). Prema tome, moguće je zaključiti da je najduži period prolaska kroz lipidnu barijeru imao ziprazidon (17 ns), dok je hDAT supstrat, AM879/11741391, prošao za 6 ns (Slika 4.30). Dobijeni rezultati su u skladu sa eksperimentalno izračunatim $\log P_e$ vrednostima.

Proučavani sistem, koji imitira prolazak jedinjenja kroz KMB, je definisan promenljivom elastičnom silom koja deluje na atome sa konstantnom brzinom kretanja. Iz tog razloga, izračunate su vrednosti maksimalne sile koja deluje na svako jedinjenje, F_{max} (Tabela 4.17). Dobijeni rezultati poseduju umereno značajnu, negativnu korelaciju sa $\log P_e$ vrednostima iz PAMPA studije ($r_{F_{\text{max}}/\log P_e} = -0,50$), gde je povećanje vrednosti F_{max} praćeno smanjenjem $\log P_e$ vrednosti. Eksperimentalnom analizom je uočeno da ziprazidon, ropinirol i kvetiapin poseduju najnižu efektivnu permeabilnost ($\log P_e$) kroz KMB, što je u skladu sa izračunatim F_{max} vrednostima iz SMD simulacije (Tabela 4.17). Prema tome, možemo zaključiti da jedinjenja sa niskom permeabilnošću ($\log P_e < 5,66$) zahtevaju veću silu koja deluje na sistem da bi prošli kroz proučavanu membranu.

SMD simulacije jedinjenja koja utiču na modulaciju aktivnosti serotoninskog i dopaminskog sistema u mozgu su omogućile sagledavanje njihovog prolaska kroz KMB, pružajući detaljne informacije o silama koje deluju na sistem u procesu translokacije. Generalno, ova metodologija može da se koristi za brzu i pouzdanu skrining analizu strukturno različitih jedinjenja i predviđanje njihove relativne permeabilnosti kroz KMB. Takođe, SMD simulacije predstavljaju osnovu za dalje, složenije proračune slobodne energije (380).



Slika 4.30. Grafički prikaz sile koja deluje na jedinjenje u funkciji vremena tokom SMD simulacije.

Tabela 4.17. Rezultati SMD simulacije. Vreme predstavlja period potreban da jedinjenje prođe kroz DOPC membranu (t_2-t_1).

Jedinjenje	Vreme (ns)	F_{\max} (pN)	$\log P_e$
Pramipeksol	6,20	240,44	-4,29
Citalopram	13,40	292,15	-3,57
Ropinirol	11,60	395,88	-4,44
Mirtazapin	8,20	226,51	-3,54
Risperidon	9,00	265,35	-3,67
AP263/40017925	8,50	265,47	-3,66
AO854/40003386	7,40	183,10	-3,47
AM879/11741391	6,00	262,42	-3,38
AG205/05879010	8,40	293,09	-4,45
AO854/12910145	6,40	226,45	-3,46
AP124/41027793	8,40	281,11	-3,43
Kvetiapin	12,20	334,69	-4,78
Ziprazidon	17,00	348,53	-5,88
Olanzapin	9,50	237,50	-3,85
Imp Z1	7,50	239,88	-4,42
Imp Z2	9,80	261,18	-3,98
Imp A1	8,90	317,60	-3,79
Haloperidol	10,00	352,50	-3,65

4.3.5 *In silico* predviđanje permeabilnosti kroz KMB proučavanih dualnih antagonista 5-HT_{2A}/D₂-R i selektivnih I₂-IR liganada

In silico modeli, koji omogućavaju definisanje odnosa između molekulskih deskriptora i osobina od interesa, imaju važnu ulogu u ranim fazama istraživanja novih lekova. Zasnovani na eksperimentalnim podacima poznatih liganada, modeli validirani opsežnim statističkim proračunima obezbeđuju pouzdana predviđanja u okviru svog domena primenljivosti.

Strukturna raznovrsnost jedinjenja, kao i potvrđena eksterna prediktivnost omogućavaju pouzdano kvantitativno predviđanje permeabilnosti srodnih CNS kandidata kroz KMB primenom formiranog QSPR-SVM modela. Iz tog razloga, dizajnirani dualni antagonisti 5-HT_{2A}/D₂-R, kao i ligandi imidazolinskih I₂-R su analizirani formiranim modelom u cilju procene njihove efektivne permeabilnosti i potencijalnog delovanja na ciljnim mestima dejstva unutar CNS-a. Model formiran na osnovu eksperimentalno dobijenih podataka iz PAMPA studije je primenjen za predviđanje $\log P_e$ vrednosti novog seta podataka. Dobijeni rezultati su prikazani u Tabeli 4.18.

Tabela 4.18. Predviđene $\log P_e$ vrednosti za dizajnirane dualne antagoniste 5-HT_{2A}/D₂-R i ligande I₂-IR formiranim QSPR-SVM modelom. Za jedinjenja sa * su prikazane eksperimentalno dobijene $\log P_e$ vrednosti iz PAMPA studije.

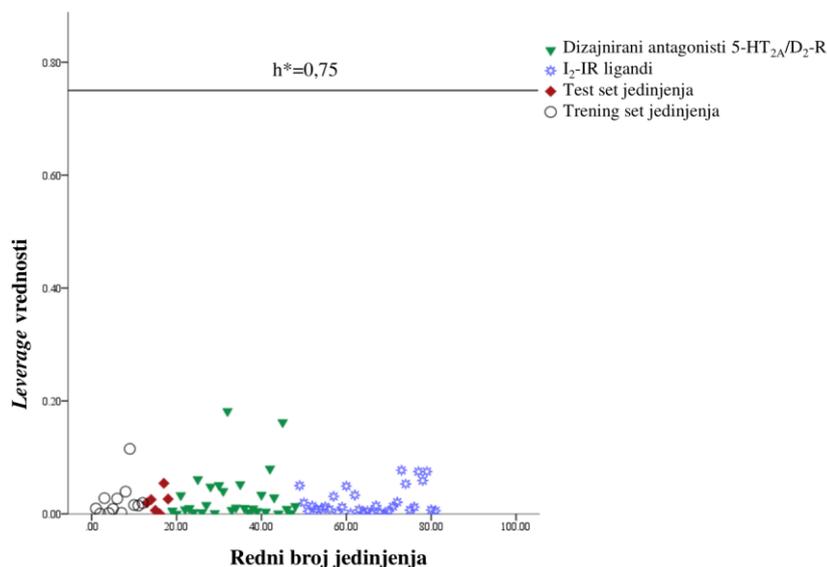
Redni broj	Jedinjenje	SolvEMt_3D	H _{0p}	$\log P_e$	Klasa
1	Pramipeksol*	1,57	0,10	-4,29	Trening
2	Citalopram*	1,40	0,12	-3,57	Trening
3	Ropinirol*	1,58	0,06	-4,53	Trening
4	Risperidon*	1,33	0,11	-3,67	Trening
5	AP263/40017925*	1,11	0,08	-3,48	Trening
6	AM879/11741391*	0,35	0,05	-3,43	Trening
7	AG205/05879010*	1,30	0,11	-4,49	Trening
8	AO854/12910145*	0,98	0,02	-3,46	Trening
9	Ziprazidon*	1,74	0,25	-5,97	Trening
10	Olanzapin*	1,03	0,14	-3,91	Trening
11	Imp Z2*	1,56	0,17	-3,98	Trening
12	Haloperidol*	0,71	0,12	-3,77	Trening
13	Mirtazapin*	0,36	0,09	-3,62	Test
14	AO854/40003386*	0,98	0,04	-3,39	Test
15	AP124/41027793*	1,12	0,10	-3,43	Test
16	Kvetiapin*	1,47	0,12	-4,78	Test
17	Imp Z1*	0,86	0,18	-4,33	Test
18	Imp A1*	1,54	0,06	-3,78	Test
19	A1	1,23	0,09	-3,78	5-HT _{2A} /D ₂ -R
20	A2	1,44	0,12	-4,18	5-HT _{2A} /D ₂ -R
21	A3	1,69	0,09	-4,26	5-HT _{2A} /D ₂ -R
22	A4	1,35	0,08	-3,84	5-HT _{2A} /D ₂ -R
23	A5	1,55	0,09	-4,12	5-HT _{2A} /D ₂ -R
24	A6	1,55	0,12	-4,27	5-HT _{2A} /D ₂ -R
25	B1	1,72	0,06	-4,17	5-HT _{2A} /D ₂ -R
26	B2	1,33	0,10	-3,91	5-HT _{2A} /D ₂ -R
27	B3	1,52	0,07	-3,99	5-HT _{2A} /D ₂ -R
28	B4	1,74	0,08	-4,33	5-HT _{2A} /D ₂ -R
29	C1	1,46	0,14	-4,31	5-HT _{2A} /D ₂ -R
30	C2	1,55	0,21	-5,07	5-HT _{2A} /D ₂ -R
31	C3	1,80	0,17	-5,00	5-HT _{2A} /D ₂ -R
32	C4	2,01	0,17	-5,37	5-HT _{2A} /D ₂ -R
33	C5	1,53	0,16	-4,55	5-HT _{2A} /D ₂ -R
34	C6	1,64	0,16	-4,71	5-HT _{2A} /D ₂ -R
35	C7	1,83	0,18	-5,15	5-HT _{2A} /D ₂ -R
36	C8	1,29	0,15	-4,24	5-HT _{2A} /D ₂ -R
37	C9	1,53	0,11	-4,22	5-HT _{2A} /D ₂ -R
38	C10	1,63	0,15	-4,66	5-HT _{2A} /D ₂ -R
39	C11	1,60	0,14	-4,49	5-HT _{2A} /D ₂ -R
40	C12	1,73	0,19	-5,09	5-HT _{2A} /D ₂ -R
41	C13	1,34	0,14	-4,19	5-HT _{2A} /D ₂ -R
42	C14	1,83	0,22	-5,55	5-HT _{2A} /D ₂ -R
43	C15	1,76	0,16	-4,88	5-HT _{2A} /D ₂ -R
44	C16	1,40	0,13	-4,17	5-HT _{2A} /D ₂ -R
45	C17	2,00	0,18	-5,41	5-HT _{2A} /D ₂ -R

46	C18	1,30	0,15	-4,21	5-HT _{2A} /D ₂ -R
47	C19	1,40	0,13	-4,23	5-HT _{2A} /D ₂ -R
48	C20	1,68	0,13	-4,57	5-HT _{2A} /D ₂ -R
49	Idazoksan	0,66	0,01	-3,22	I ₂ -IR
50	8a	1,36	0,05	-3,74	I ₂ -IR
51	8b	1,06	0,07	-3,55	I ₂ -IR
52	8c	1,18	0,11	-3,83	I ₂ -IR
53	8e	1,17	0,08	-3,70	I ₂ -IR
54	9a	1,28	0,08	-3,76	I ₂ -IR
55	9b	0,88	0,09	-3,54	I ₂ -IR
56	9c	1,21	0,13	-4,05	I ₂ -IR
57	9d	1,20	0,17	-4,34	I ₂ -IR
58	9e	1,25	0,12	-3,95	I ₂ -IR
59	9f	1,12	0,09	-3,70	I ₂ -IR
60	9g	1,33	0,09	-3,90	I ₂ -IR
61	9h	1,20	0,09	-3,78	I ₂ -IR
62	9i	1,36	0,10	-3,98	I ₂ -IR
63	9j	1,11	0,14	-4,01	I ₂ -IR
64	9k	1,36	0,13	-4,16	I ₂ -IR
65	9m	1,45	0,12	-4,20	I ₂ -IR
66	9r	1,25	0,16	-4,31	I ₂ -IR
67	9u	0,96	0,20	-4,39	I ₂ -IR
68	9x	1,80	0,11	-4,58	I ₂ -IR
69	9z	1,43	0,15	-4,38	I ₂ -IR
70	9aa	0,90	0,11	-3,69	I ₂ -IR
71	9ab	1,29	0,14	-4,16	I ₂ -IR
72	9ac	1,16	0,14	-4,04	I ₂ -IR
73	9ad	1,38	0,15	-4,32	I ₂ -IR
74	12d	0,86	0,17	-4,10	I ₂ -IR
75	13c	1,35	0,12	-4,06	I ₂ -IR
76	13d	0,90	0,16	-3,99	I ₂ -IR
77	14c	1,25	0,15	-4,19	I ₂ -IR
78	15c	1,26	0,13	-4,09	I ₂ -IR

U cilju procene pouzdanosti dobijenih rezultata, izračunate su *leverage* vrednosti za novi set jedinjenja i predviđeno njihovo uklapanje u domen primenljivosti formiranog QSPR-SVM modela. Za računanje su korišćene vrednosti najznačajnijih molekulskih deskriptora, SolvEMt_3D i H_{0p} iz ADMET Predictor i Dragon programa. Rezultati prikazani na Slici 4.31 ukazuju da nema odstupanja van definisane granične vrednosti (h^*), pa se predviđanja formiranog modela za sva ispitivana jedinjenja mogu smatrati pouzdanim.

Proučavanjem predviđenih $\log P_e$ vrednosti za dizajnirane dualne antagoniste 5-HT_{2A}/D₂-R uočeno je da većina jedinjenja pripada grupi visoko permeabilnih ($\log P_e > -5,33$), izuzev C4, C14 i C17 koja se svrstavaju u grupu srednje permeabilnih jedinjenja ($-5,66 < \log P_e < -5,33$) (Tabela 4.18). Naime, C4 i C17 jedinjenja karakteriše prisustvo dve karbonilne grupe na dihidroindolnom prstenu, što je uslovalo značajno veće vrednosti SolvEMt_3D deskriptora u odnosu na ostale dizajnirane antagoniste. S obzirom na to da pomenuti deskriptor negativno koreliše sa $\log P_e$ vrednošću, povećanje njegove vrednosti je uticalo na značajno smanjenje efektivne permeabilnosti

ovih jedinjenja. Jedinjenje C14 poseduje više vrednosti oba deskriptora u odnosu na jedinjenja sa visokom permeabilnošću. Osim polarnosti jedinjenja, SolvEMt_3D i H_{0p} uzimaju u obzir i geometrijske osobine jedinjenja, koje takođe mogu uticati na predviđanja formiranim modelom. Izabrani ligandi A2, B3 i C3, pripadaju grupi visoko permeabilnih jedinjenja, sa vrednostima $\log P_e$ parametra -4,18, -3,99 i -5,00, redom.



Slika 4.31. Domen primenljivosti formiranog QSPR-SVM modela za dualne antagoniste 5-HT_{2A}/D₂-R i ligande I₂-IR.

Grupa selektivnih liganada imidazolinskih I₂-R je takođe analizirana formiranim QSPR-SVM modelom s obzirom na potencijalnu efikasnost u lečenju CNS oboljenja. Analizom je pokazano da se sva jedinjenja mogu klasifikovati u grupu visoko permeabilnih, sa $\log P_e$ vrednostima većim od -5,33. Dobijeni rezultati su u skladu sa prethodnim studijama koje su obuhvatile eksperimentalno ispitivanje efektivne permeabilnosti idazoksana i 9d jedinjenja, ukazujući takođe na visok nivo njihove permeabilnosti kroz KMB (218,324).

5. ZAKLJUČAK

Iako se trenutno na tržištu nalazi širok spektar lekova za neurološka i mentalna oboljenja, ipak postoji velika potreba za razvojem novih, bezbednijih i efikasnijih terapeutika. Neurološke i mentalne bolesti predstavljaju složena patološka stanja koja su praćena disregulacijom različitih bioloških sistema u mozgu. Primena višeciljnog (eng. *multi-target*) pristupa u njihovom lečenju predstavlja osnovu terapijske efikasnosti novih lekova koji utiču na modulaciju aktivnosti različitih receptora i uspostavljanje fiziološke ravnoteže. S obzirom na to da se radi o veoma izazovnom i zahtevnom procesu, korišćenje *in silico* kompjuterskih metoda u kombinaciji sa *in vitro* ispitivanjima može značajno ubrzati proces otkrivanja novih lekova i pružiti dobru osnovu za dalja istraživanja.

U okviru ovog istraživanja primenjene su savremene CADD metode u cilju sveobuhvatne analize složene 3D-strukture farmakofore dualnih antagonista 5-HT_{2A}/D₂-R, sa smanjenim afinitetom za H₁-R. Integracijom različitih metoda zasnovanih na strukturi ciljnog mesta dejstva i liganda generisan je *in silico* protokol koji je omogućio definisanje strukturnih osobina odgovornih za potentno antagonističko delovanje na proučavanim receptorima, kao i onih koje potencijalno mogu uticati na pojavu metaboličkih neželjenih efekata. Ispitivani set podataka se sastojao od strukturno veoma različitih jedinjenja sa širokim spektrom eksperimentalne aktivnosti. Simulacije MD i molekulski doking su korišćeni za generisanje specifičnih bioaktivnih konformacija proučavanih liganada, koje su dalje primenjene u formiranju prediktivnih 3D-QSAR modela. Formirani i validirani modeli su pružili važne informacije o strukturnim karakteristikama jedinjenja koje značajno korelišu sa ispitivanim pK_i vrednostima i utiču na biološku aktivnost i selektivnost. Dobijeni rezultati su ukazali da veće rastojanje između krajnjih lipofilnih i sternih centara liganda, kao i prisustvo dve hidrofobne regije sa akceptorima i donorima H-veze na optimalnom rastojanju utiču na povećanje aktivnosti za 5-HT_{2A} i D₂ receptore, dok negativno korelišu sa aktivnošću na H₁-R. Pored toga, rezultati dobijeni 3D-QSAR studijom su validirani studijom molekuskog dokinga koja je omogućila sagledavanje ključnih intermolekulskih interakcija u vezujućim mestima proučavanih receptora. Uočeno je da akceptorske grupe liganda u donjem hidrofobnom džepu ostvaruju važne vodonične veze sa aminokiselinama Thr160^{3,37} (5-HT_{2A}-R) i Thr119^{3,37} (D₂-R), dok donorske i akceptorske grupe u gornjem hidrofobnom džepu formiraju interakciju sa polarnom aminokiselinom na poziciji 7.35 (Asn363, 5-HT_{2A}-R; Ser409, D₂-R). Navedene interakcije mogu igrati potencijalno važnu ulogu u stabilizaciji formiranih kompleksa i postizanju selektivnosti u odnosu na H₁-R.

Na osnovu dobijenih rezultata, urađen je VS komercijalno dostupnih baza fragmenata u cilju identifikacije najboljih struktura za dizajn novih potentnih 5-HT_{2A}/D₂-R antagonista, sa smanjenim afinitetom za H₁-R. Farmakoforna analiza je pružila osnovu za definisanje strategije u dizajnu novih dualnih antagonista čije su aktivnosti na proučavanim receptorima predviđene formiranim 3D-QSAR modelima. Molekulski doking je pružio uvid u intermolekulske interakcije koje potencijalno mogu obezbediti visok nivo željene aktivnosti i selektivnosti dizajniranih jedinjenja.

Nakon toga, urađeno je *in silico* predviđanje ADMET osobina u cilju izbora najboljih kandidata za buduća ispitivanja. Jedinjenja A2, B3 i C3, su pokazala najbolji odnos aktivnosti i selektivnosti na proučavanim 5-HT_{2A}, D₂ i H₁ receptorima u odnosu na vodeća (eng. *lead*) jedinjenja, kao i zadovoljavajući profil fizičko-hemijskih i farmakokinetičkih osobina, pružajući dobru osnovu za dalja istraživanja i optimizaciju.

Pored toga, u cilju sagledavanja novih terapijskih mogućnosti u lečenju neuroloških oboljenja, proučavana je farmakofora selektivnih liganada imidazolinskih I₂ receptora. Usled ograničenja u dostupnosti strukture ovog receptora, informacije dobijene analizom kvantitativnog odnosa strukture i aktivnosti omogućavaju definisanje vezivnog mesta i potencijalnih interakcija ključnih za ostvarivanje potentnog delovanja. Istraživanje je obuhvatilo grupu nosintetisanih bicikličnih α -iminofosfonata. 3D-QSAR analizom je pokazano da najveći uticaj na selektivnost

ispitivanih I₂-IR liganada u odnosu na α_2 -AR poseduje prisustvo elektronegativnih supstituenata na optimalnom rastojanju. Takođe, prisustvo aromatičnih grupa, koje mogu učestvovati u formiranju potencijalnih hidrofobnih interakcija u vezujućem mestu, pozitivno koreliše sa ispitivanim pK_i vrednostima za I₂-IR. Povećanje udaljenosti između definisanih hidrofobnih regija u α položaju bicikličnog prstena i supstituenta *N*-maleimid grupe je pokazalo pozitivan uticaj na povećanje aktivnosti za α_2 -AR. Pored toga, primenom ADMET Predictor programa izvršeno je predviđanje fizičko-hemijskih i farmakokinetičkih karakteristika proučavanih liganada.

Sposobnost prolaska kroz KMB predstavlja ključnu osobinu svih centralnodelujućih jedinjenja. Brojne studije su pokazale da je manja terapijska efikasnost jedinjenja u prekliničkim i kliničkim ispitivanjima veoma često povezana sa smanjenim transportom do ciljnog mesta dejstva u CNS-u. Iz tog razloga, proučavanje permeabilnosti kroz KMB jedinjenja koja ostvaruju svoje efekte na nivou CNS-a ima najveći značaj u ranim fazama istraživanja lekova. U ovoj studiji je ispitana permeabilnost kroz KMB jedinjenja koja utiču na modulaciju aktivnosti serotoninskog i dopaminskog sistema primenom *in vitro* PAMPA testa. Svi proučavani ligandi su pokazali visok nivo permeabilnosti ($\log P_e > -5,33$), izuzev ziprazidona koji je grupisan u nisko permeabilne ($-6,14 < \log P_e (-5,88) < -5,66$). Dobijeni rezultati su u skladu sa eksperimentalno određenim vrednostima logBB parametra iz literature.

U cilju definisanja zavisnosti između strukturnih osobina jedinjenja i efektivne permeabilnosti, korišćene su različite matematičke metode linearne (MLR i PLS) i nelinearne (SVM) zavisnosti. Rezultati dobijeni opsežnom statističkom analizom internih i eksternih parametara validacije su ukazali na superiornost QSPR-SVM modela u odnosu na ostale formirane modele, usled veće tačnosti u predviđanju za eksterni test set. Molekulski deskriptori sa najznačajnijim uticajem na ispitivane logP_e vrednosti su omogućili analizu strukturnih osobina koje utiču na permeabilnost liganada kroz KMB. SolvEMt_3D i H_{0p} su najznačajniji selektovani deskriptori koji negativno korelišu sa proučavanim logP_e vrednostima. Oni ističu topološke i geometrijske osobine jedinjenja, ukazujući da modifikacije polarizabilnosti, zamenom atoma hlora sa atomom fluora ili sulfonamida sa amidom, mogu uticati na poboljšanje prolaska jedinjenja kroz KMB. Takođe, predložene strukturne modifikacije su u skladu sa prethodno definisanim smernicama za dizajn aktivnijih i bezbednijih liganada sa dualnim antagonističkim delovanjem na 5-HT_{2A}/D₂-R.

Strukturna i farmakološka različitost jedinjenja koja su korišćena u QSPR studiji pruža mogućnost primene formiranog QSPR-SVM modela za pouzdano predviđanje efektivne permeabilnosti novih analoga koji pripadaju definisanom domenu primenljivosti. Izabrani model je korišćen za predviđanje permeabilnosti kroz KMB dizajniranih dualnih antagonista 5-HT_{2A}/D₂-R i selektivnih liganada I₂-IR. Dobijeni rezultati su pokazali da većina jedinjenja pripada grupi visoko permeabilnih ($\log P_e > -5,33$).

Takođe, urađene su SMD simulacije radi vizuelizovanja procesa permeabilnosti ispitivanih liganada kroz proučavanu lipidnu membranu. Dobijeni rezultati su u skladu sa eksperimentalno izračunatim logP_e vrednostima iz PAMPA studije, ukazujući na mogućnost njihove potencijalne primene u skrining analizi strukturno različitih jedinjenja koja deluju na nivou CNS-a.

Proces istraživanja i razvoja novih lekova je veoma složen, dugotrajan i zahtevan. Danas postoji sve veća potreba za razvojem metoda koje će olakšati i ubrzati ispitivanja velikog broja jedinjenja u ranim fazama istraživanja, pružajući pouzdane rezultate za izbor najboljih kandidata za dalju sintezu i optimizaciju. U okviru ove doktorske disertacije, formiranjem integrativnog pristupa primenom komplementarnih *in silico* i *in vitro* metoda postavljena je osnova za racionalni dizajn efikasnijih i bezbednijih lekova za lečenje složenih neuroloških i mentalnih oboljenja. Rezultati ovog istraživanja su omogućili uvid u najvažnije kompjuterske metode, koje u kombinaciji sa *in*

in vitro tehnikama, mogu doprineti boljem razumevanju delovanja liganada koji utiču na modulaciju aktivnosti serotoninskog i dopaminskog sistema u mozgu. Farmakoforna analiza je pružila osnovu za optimizaciju dualnih antagonista 5-HT_{2A} i D₂ receptora sa smanjenim afinitetom za H₁ receptor, kao i selektivnih liganada imidazolinskih I₂ receptora, koji imaju važnu ulogu u terapiji glavnih i propratnih simptoma različitih neuropsihijatrijskih i neurodegenerativnih oboljenja. Formirani 3D-QSAR modeli se mogu koristiti za pouzdano predviđanje aktivnosti novih strukturnih analoga koji pripadaju definisanim domenima primenljivosti, dok QSPR model, koji je formiran na osnovu rezultata *in vitro* PAMPA studije, predstavlja brzu i efikasnu skrining metodu za procenu permeabilnosti jedinjenja kroz KMB. Proučavanje jedinjenja koja svoje delovanje ostvaruju na nivou receptorskih sistema u mozgu predstavlja veliki izazov u istraživanju zbog kompleksnosti patofizioloških mehanizama CNS oboljenja, kao i neophodnosti prolaska kroz KMB. Ekonomičnost i pouzdanost samo su neke od osobina formiranog protokola koji može imati značajnu ulogu u ranim fazama istraživanja, pružajući smernicu i osnovu za racionalni dizajn efikasnijih i bezbednijih terapeutika složenih neuroloških i mentalnih oboljenja.

6. LITERATURA

1. Collins PY, Patel V, Joestl SS, March D, Insel TR, Daar AS, et al. Grand challenges in global mental health. *Nature* [Internet]. 2011 Jul 6;475(7354):27–30. Available from: <http://www.nature.com/articles/475027a>
2. Ritchie H, Roser M. Mental Health. *Our World Data* [Internet]. 2018; Available from: <https://ourworldindata.org/mental-health>
3. Trautmann S, Rehm J, Wittchen H. The economic costs of mental disorders. *EMBO Rep* [Internet]. 2016 Sep 4;17(9):1245–9. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.15252/embr.201642951>
4. Wittchen HU, Jacobi F, Rehm J, Gustavsson A, Svensson M, Jönsson B, et al. The size and burden of mental disorders and other disorders of the brain in Europe 2010. *Eur Neuropsychopharmacol* [Internet]. 2011 Sep;21(9):655–79. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924977X11001726>
5. Taquet M, Geddes JR, Husain M, Luciano S, Harrison PJ. 6-month neurological and psychiatric outcomes in 236 379 survivors of COVID-19: a retrospective cohort study using electronic health records. *The Lancet Psychiatry* [Internet]. 2021 May;8(5):416–27. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2215036621000845>
6. OECD/European Union. Health at a Glance: Europe 2020: State of Health in the EU Cycle [Internet]. Paris: OECD; 2020 Nov. (Health at a Glance: Europe). Available from: https://www.oecd-ilibrary.org/social-issues-migration-health/health-at-a-glance-europe-2020_82129230-en
7. Jin H, Mosweu I. The Societal Cost of Schizophrenia: A Systematic Review. *Pharmacoeconomics* [Internet]. 2017 Jan 24;35(1):25–42. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s40273-016-0444-6>
8. Remington G, Agid O, Foussias G. Schizophrenia as a disorder of too little dopamine: implications for symptoms and treatment. *Expert Rev Neurother* [Internet]. 2011 Apr 9;11(4):589–607. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1586/ern.10.191>
9. Howes OD, Kapur S. The Dopamine Hypothesis of Schizophrenia: Version III--The Final Common Pathway. *Schizophr Bull* [Internet]. 2009 Mar 30;35(3):549–62. Available from: <https://academic.oup.com/schizophreniabulletin/article-lookup/doi/10.1093/schbul/sbp006>
10. Worrel JA, Marken PA, Beckman SE, Ruehter VL. Atypical antipsychotic agents: A critical review. *Am J Heal Pharm* [Internet]. 2000 Feb 1;57(3):238–55. Available from: <https://academic.oup.com/ajhp/article/57/3/238/5150830>
11. Oakley NR, Hayes AG, Sheehan MJ. Effect of typical and atypical neuroleptics on the behavioural consequences of activation by muscimol of mesolimbic and nigro-striatal dopaminergic pathways in the rat. *Psychopharmacology (Berl)* [Internet]. 1991 Oct;105(2):204–8. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/BF02244310>
12. Stroup TS, Gray N. Management of common adverse effects of antipsychotic medications. *World Psychiatry* [Internet]. 2018 Oct 7;17(3):341–56. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/wps.20567>
13. Natesan S, Reckless GE, Barlow KBL, Odontiadis J, Nobrega JN, Baker GB, et al. The antipsychotic potential of l-stepholidine—a naturally occurring dopamine receptor D1

- agonist and D2 antagonist. *Psychopharmacology (Berl)* [Internet]. 2008 Aug 3;199(2):275–89. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00213-008-1172-1>
14. Devoto P, Flore G, Pira L, Longu G, Gessa GL. Alpha2-adrenoceptor mediated co-release of dopamine and noradrenaline from noradrenergic neurons in the cerebral cortex. *J Neurochem* [Internet]. 2004 Jan 20;88(4):1003–9. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1471-4159.2003.02239.x>
 15. Huang L, Zhang W, Zhang X, Yin L, Chen B, Song J. Synthesis and pharmacological evaluation of piperidine (piperazine)-substituted benzoxazole derivatives as multi-target antipsychotics. *Bioorg Med Chem Lett* [Internet]. 2015 Nov;25(22):5299–305. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960894X15300792>
 16. Gross G, Wicke K, Drescher KU. Dopamine D₃ receptor antagonism--still a therapeutic option for the treatment of schizophrenia. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* [Internet]. 2013 Feb;386(2):155–66. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23128852>
 17. Woolley DW, Shaw E. Some Neurophysiological Aspects of Serotonin. *BMJ* [Internet]. 1954 Jul 17;2(4880):122–6. Available from: <https://www.bmj.com/lookup/doi/10.1136/bmj.2.4880.122>
 18. H. G, Hameed KA. DRUGS WHICH ANTAGONIZE 5-HYDROXYTRYPTAMINE. *Br J Pharmacol Chemother* [Internet]. 1954 Jun;9(2):240–8. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1476-5381.1954.tb00848.x>
 19. Serotonin-dopamine interaction and its relevance to schizophrenia. *Am J Psychiatry* [Internet]. 1996 Apr;153(4):466–76. Available from: <http://psychiatryonline.org/doi/abs/10.1176/ajp.153.4.466>
 20. Jacobs BL, Azmitia EC. Structure and function of the brain serotonin system. *Physiol Rev* [Internet]. 1992 Jan 1;72(1):165–229. Available from: <https://www.physiology.org/doi/10.1152/physrev.1992.72.1.165>
 21. PYTLIAK M, VARGOVÁ V, MECHÍROVÁ V, FELŠÖCI M. Serotonin Receptors – From Molecular Biology to Clinical Applications. *Physiol Res* [Internet]. 2011 Feb 28;15–25. Available from: http://www.biomed.cas.cz/physiolres/pdf/60/60_15.pdf
 22. Schmidt CJ, Sorensen SM, Kenne JH, Carr AA, Palfreyman MG. The role of 5-HT_{2A} receptors in antipsychotic activity. *Life Sci* [Internet]. 1995 May;56(25):2209–22. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/002432059500210W>
 23. Jafari S, Fernandez-Enright F, Huang X-F. Structural contributions of antipsychotic drugs to their therapeutic profiles and metabolic side effects. *J Neurochem* [Internet]. 2012 Feb;120(3):371–84. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1471-4159.2011.07590.x>
 24. Amargos-Bosch M. Co-expression and In Vivo Interaction of Serotonin1A and Serotonin2A Receptors in Pyramidal Neurons of Prefrontal Cortex. *Cereb Cortex* [Internet]. 2004 Mar 1;14(3):281–99. Available from: <https://academic.oup.com/cercor/article-lookup/doi/10.1093/cercor/bhg128>
 25. Aringhieri S, Carli M, Kolachalam S, Verdesca V, Cini E, Rossi M, et al. Molecular targets of atypical antipsychotics: From mechanism of action to clinical differences. *Pharmacol Ther*

- [Internet]. 2018 Dec;192:20–41. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0163725818301141>
26. De Deurwaerdere P. Constitutive Activity of the Serotonin_{2C} Receptor Inhibits In Vivo Dopamine Release in the Rat Striatum and Nucleus Accumbens. *J Neurosci* [Internet]. 2004 Mar 31;24(13):3235–41. Available from:
<https://www.jneurosci.org/lookup/doi/10.1523/JNEUROSCI.0112-04.2004>
 27. Stepnicki P, Kondej M, Kaczor AA. Current Concepts and Treatments of Schizophrenia. *Molecules* [Internet]. 2018 Aug 20;23(8):2087. Available from: <http://www.mdpi.com/1420-3049/23/8/2087>
 28. McCutcheon RA, Krystal JH, Howes OD. Dopamine and glutamate in schizophrenia: biology, symptoms and treatment. *World Psychiatry* [Internet]. 2020 Feb 10;19(1):15–33. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/wps.20693>
 29. Brisch R, Saniotis A, Wolf R, Biellau H, Bernstein H-G, Steiner J, et al. The Role of Dopamine in Schizophrenia from a Neurobiological and Evolutionary Perspective: Old Fashioned, but Still in Vogue. *Front Psychiatry* [Internet]. 2014 May 19;5. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpsy.2014.00047/abstract>
 30. Benes FM. The GABA System in Schizophrenia: Cells, Molecules and Microcircuitry. *Schizophr Res* [Internet]. 2015 Sep;167(1–3):1–3. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0920996415003618>
 31. de Jonge JC, Vinkers CH, Hulshoff Pol HE, Marsman A. GABAergic Mechanisms in Schizophrenia: Linking Postmortem and In Vivo Studies. *Front Psychiatry* [Internet]. 2017 Aug 11;8. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpsy.2017.00118/full>
 32. Wassef A, Baker J, Kochan LD. GABA and Schizophrenia: A Review of Basic Science and Clinical Studies. *J Clin Psychopharmacol* [Internet]. 2003 Dec;23(6):601–40. Available from: <https://journals.lww.com/00004714-200312000-00011>
 33. Henny P, Jones BE. Projections from basal forebrain to prefrontal cortex comprise cholinergic, GABAergic and glutamatergic inputs to pyramidal cells or interneurons. *Eur J Neurosci* [Internet]. 2008 Feb;27(3):654–70. Available from:
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1460-9568.2008.06029.x>
 34. Li P, Zhang Q, Robichaud AJ, Lee T, Tomesch J, Yao W, et al. Discovery of a Tetracyclic Quinoxaline Derivative as a Potent and Orally Active Multifunctional Drug Candidate for the Treatment of Neuropsychiatric and Neurological Disorders. *J Med Chem* [Internet]. 2014 Mar 27;57(6):2670–82. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jm401958n>
 35. Reynolds GP, Kirk SL. Metabolic side effects of antipsychotic drug treatment – pharmacological mechanisms. *Pharmacol Ther* [Internet]. 2010 Jan;125(1):169–79. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0163725809002149>
 36. Kirk SL, Glazebrook J, Grayson B, Neill JC, Reynolds GP. Olanzapine-induced weight gain in the rat: role of 5-HT_{2C} and histamine H₁ receptors. *Psychopharmacology (Berl)* [Internet]. 2009 Nov 18;207(1):119–25. Available from:
<http://link.springer.com/10.1007/s00213-009-1639-8>
 37. Kroeze WK, Hufeisen SJ, Popadak BA, Renock SM, Steinberg S, Ernsberger P, et al. H₁-

- Histamine Receptor Affinity Predicts Short-Term Weight Gain for Typical and Atypical Antipsychotic Drugs. *Neuropsychopharmacology* [Internet]. 2003 Mar 10;28(3):519–26. Available from: <http://www.nature.com/articles/1300027>
38. Delaville C, Deurwaerdère P De, Benazzouz A. Noradrenaline and Parkinson's Disease. *Front Syst Neurosci* [Internet]. 2011;5. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnsys.2011.00031/abstract>
 39. Maletic V, Eramo A, Gwin K, Offord SJ, Duffy RA. The Role of Norepinephrine and Its α -Adrenergic Receptors in the Pathophysiology and Treatment of Major Depressive Disorder and Schizophrenia: A Systematic Review. *Front Psychiatry* [Internet]. 2017 Mar 17;8. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpsyt.2017.00042/full>
 40. Unal G, Ates A, Aricioglu F. Agmatine-attenuated cognitive and social deficits in subchronic MK-801 model of schizophrenia in rats. *Psychiatry Clin Psychopharmacol* [Internet]. 2018 Jul 3;28(3):245–53. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/24750573.2018.1426696>
 41. Mititelu-Tartau L, Bogdan M, Gheorman V, Foia L, Goriuc A, Rusu G, et al. Current Therapeutic Approaches from Imidazoline and Opioid Receptors Modulators in Neuroprotection. In: *Neuroprotection* [Internet]. IntechOpen; 2019. Available from: <https://www.intechopen.com/books/neuroprotection/current-therapeutic-approaches-from-imidazoline-and-opioid-receptors-modulators-in-neuroprotection>
 42. Institute of Health Metrics and Evaluation. Global Health Data Exchange (GHDx) [Internet]. Available from: <http://ghdx.healthdata.org/gbd-results-tool?params=gbd-api-2019-permalink/d780dffbe8a381b25e1416884959e88b>
 43. Kanter JW, Busch AM, Weeks CE, Landes SJ. The nature of clinical depression: Symptoms, syndromes, and behavior analysis. *Behav Anal* [Internet]. 2008 Apr 1;31(1):1–21. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/BF03392158>
 44. Delgado PL. Depression: the case for a monoamine deficiency. *J Clin Psychiatry* [Internet]. 2000;61 Suppl 6:7–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10775018>
 45. Liu Y, Zhao J, Guo W. Emotional Roles of Mono-Aminergic Neurotransmitters in Major Depressive Disorder and Anxiety Disorders. *Front Psychol* [Internet]. 2018 Nov 21;9. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpsyg.2018.02201/full>
 46. Hamon M, Blier P. Monoamine neurocircuitry in depression and strategies for new treatments. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry* [Internet]. 2013 Aug;45:54–63. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278584613000754>
 47. Nautiyal KM, Hen R. Serotonin receptors in depression: from A to B. *F1000Research* [Internet]. 2017 Feb 9;6:123. Available from: <https://f1000research.com/articles/6-123/v1>
 48. Albert. Modifying 5-HT_{1A} receptor gene expression as a new target for antidepressant therapy. *Front Neurosci* [Internet]. 2010; Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnins.2010.00035/abstract>
 49. Zięba A, Stępnicki P, Matosiuk D, Kaczor AA. Overcoming Depression with 5-HT_{2A} Receptor Ligands. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2021 Dec 21;23(1):10. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/1/10>

50. Marek GJ, Carpenter LL, McDougle CJ, Price LH. Synergistic Action of 5-HT_{2A} Antagonists and Selective Serotonin Reuptake Inhibitors in Neuropsychiatric Disorders. *Neuropsychopharmacology* [Internet]. 2003 Feb 13;28(2):402–12. Available from: <http://www.nature.com/articles/1300057>
51. Briley M, Chantal M. The importance of norepinephrine in depression. *Neuropsychiatr Dis Treat* [Internet]. 2011 May;9. Available from: <http://www.dovepress.com/the-importance-of-norepinephrine-in-depression-peer-reviewed-article-NDT>
52. Tye KM, Mirzabekov JJ, Warden MR, Ferenczi EA, Tsai H-C, Finkelstein J, et al. Dopamine neurons modulate neural encoding and expression of depression-related behaviour. *Nature* [Internet]. 2013 Jan 12;493(7433):537–41. Available from: <http://www.nature.com/articles/nature11740>
53. Dunlop BW, Nemeroff CB. The Role of Dopamine in the Pathophysiology of Depression. *Arch Gen Psychiatry* [Internet]. 2007 Mar 1;64(3):327. Available from: <http://archpsyc.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/archpsyc.64.3.327>
54. Cowen PJ. Neuroendocrine and Neurochemical Processes in Depression. *Psychopathol Rev* [Internet]. 2016 May 21;a3(1):3–15. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.5127/pr.034513>
55. Bleakman D, Alt A, Witkin J. AMPA Receptors in the Therapeutic Management of Depression. *CNS Neurol Disord - Drug Targets* [Internet]. 2007 Apr 1;6(2):117–26. Available from: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1871-5273&volume=6&issue=2&spage=117>
56. Valverde AP, Camargo A, Rodrigues ALS. Agmatine as a novel candidate for rapid-onset antidepressant response. *World J Psychiatry* [Internet]. 2021 Nov 19;11(11):981–96. Available from: <https://www.wjgnet.com/2220-3206/full/v11/i11/981.htm>
57. Camargo A, Rodrigues ALS. Novel Targets for Fast Antidepressant Responses: Possible Role of Endogenous Neuromodulators. *Chronic Stress* [Internet]. 2019 Jan 26;3:247054701985808. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/2470547019858083>
58. Moretti M, Neis VB, Matheus FC, Cunha MP, Rosa PB, Ribeiro CM, et al. Effects of Agmatine on Depressive-Like Behavior Induced by Intracerebroventricular Administration of 1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺). *Neurotox Res* [Internet]. 2015 Oct 9;28(3):222–31. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s12640-015-9540-1>
59. Smith KL, Jessop DS, Finn DP. Modulation of stress by imidazoline binding sites: Implications for psychiatric disorders. *Stress* [Internet]. 2009 Jan 7;12(2):97–114. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10253890802302908>
60. Kumar RR, Sahu B, Pathania S, Singh PK, Akhtar MJ, Kumar B. Piperazine, a Key Substructure for Antidepressants: Its Role in Developments and Structure-Activity Relationships. *ChemMedChem* [Internet]. 2021 Jun 17;16(12):1878–901. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cmdc.202100045>
61. Moraczewski J, Aedma KK. Tricyclic Antidepressants [Internet]. *StatPearls*. 2022. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32491723>

62. Youdim MBH, Edmondson D, Tipton KF. The therapeutic potential of monoamine oxidase inhibitors. *Nat Rev Neurosci* [Internet]. 2006 Apr;7(4):295–309. Available from: <http://www.nature.com/articles/nrn1883>
63. Mathew B, Baek SC, Grace Thomas Parambi D, Pil Lee J, Joy M, Annie Rilda PR, et al. Selected aryl thiosemicarbazones as a new class of multi-targeted monoamine oxidase inhibitors. *Medchemcomm* [Internet]. 2018;9(11):1871–81. Available from: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C8MD00399H>
64. Blier P, Szabo ST. Potential mechanisms of action of atypical antipsychotic medications in treatment-resistant depression and anxiety. *J Clin Psychiatry* [Internet]. 2005;66 Suppl 8:30–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16336034>
65. Lin S-H, Lee L-T, Yang YK. Serotonin and Mental Disorders: A Concise Review on Molecular Neuroimaging Evidence. *Clin Psychopharmacol Neurosci* [Internet]. 2014 Dec 28;12(3):196–202. Available from: <http://www.cpn.or.kr/journal/view.html?doi=10.9758/cpn.2014.12.3.196>
66. Vos T, Lim SS, Abbafati C, Abbas KM, Abbasi M, Abbasifard M, et al. Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet* [Internet]. 2020 Oct;396(10258):1204–22. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673620309259>
67. Santomauro DF, Mantilla Herrera AM, Shadid J, Zheng P, Ashbaugh C, Pigott DM, et al. Global prevalence and burden of depressive and anxiety disorders in 204 countries and territories in 2020 due to the COVID-19 pandemic. *Lancet* [Internet]. 2021 Nov;398(10312):1700–12. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673621021437>
68. Kalin NH. Novel Insights Into Pathological Anxiety and Anxiety-Related Disorders. *Am J Psychiatry* [Internet]. 2020 Mar 1;177(3):187–9. Available from: <http://ajp.psychiatryonline.org/doi/10.1176/appi.ajp.2020.20010057>
69. Chand SP, Marwaha R. Anxiety [Internet]. *StatPearls*. 2022. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29262212>
70. Starcevic V. Anxiety states: a review of conceptual and treatment issues. *Curr Opin Psychiatry* [Internet]. 2006 Jan;19(1):79–83. Available from: <http://journals.lww.com/00001504-200601000-00015>
71. Bandelow B, Sher L, Bunevicius R, Hollander E, Kasper S, Zohar J, et al. Guidelines for the pharmacological treatment of anxiety disorders, obsessive–compulsive disorder and posttraumatic stress disorder in primary care. *Int J Psychiatry Clin Pract* [Internet]. 2012 Jun 30;16(2):77–84. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/13651501.2012.667114>
72. Gauthier I, Nuss P. Anxiety disorders and GABA neurotransmission: a disturbance of modulation. *Neuropsychiatr Dis Treat* [Internet]. 2015 Jan;165. Available from: <http://www.dovepress.com/anxiety-disorders-and-gaba-neurotransmission-a-disturbance-of-modulati-peer-reviewed-article-NDT>
73. Balon R, Starcevic V. Role of Benzodiazepines in Anxiety Disorders. In 2020. p. 367–88. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-981-32-9705-0_20

74. Neumeister A, Young T, Stastny J. Implications of genetic research on the role of the serotonin in depression: emphasis on the serotonin type 1A receptor and the serotonin transporter. *Psychopharmacology (Berl)* [Internet]. 2004 Aug 13;174(4). Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00213-004-1950-3>
75. Garcia-Garcia AL, Newman-Tancredi A, Leonardo ED. P5-HT1A receptors in mood and anxiety: recent insights into autoreceptor versus heteroreceptor function. *Psychopharmacology (Berl)* [Internet]. 2014 Feb 12;231(4):623–36. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00213-013-3389-x>
76. Goddard AW, Ball SG, Martinez J, Robinson MJ, Yang CR, Russell JM, et al. Current perspectives of the roles of the central norepinephrine system in anxiety and depression. *Depress Anxiety* [Internet]. 2010 Apr;27(4):339–50. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/da.20642>
77. Berry AS, White RL, Furman DJ, Naskolnakorn JR, Shah VD, D’Esposito M, et al. Dopaminergic Mechanisms Underlying Normal Variation in Trait Anxiety. *J Neurosci* [Internet]. 2019 Apr 3;39(14):2735–44. Available from: <https://www.jneurosci.org/lookup/doi/10.1523/JNEUROSCI.2382-18.2019>
78. Javaid SF, Giebel C, Khan MA, Hashim MJ. Epidemiology of Alzheimer’s disease and other dementias: rising global burden and forecasted trends. *F1000Research* [Internet]. 2021 May 27;10:425. Available from: <https://f1000research.com/articles/10-425/v1>
79. Oboudiyat C, Glazer H, Seifan A, Greer C, Isaacson R. Alzheimer’s Disease. *Semin Neurol* [Internet]. 2013 Nov 14;33(04):313–29. Available from: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0033-1359319>
80. Hardy JA, Higgins GA. Alzheimer’s Disease: The Amyloid Cascade Hypothesis. *Science (80-)* [Internet]. 1992 Apr 10;256(5054):184–5. Available from: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1566067>
81. Tracy TE, Madero-Pérez J, Swaney DL, Chang TS, Moritz M, Konrad C, et al. Tau interactome maps synaptic and mitochondrial processes associated with neurodegeneration. *Cell* [Internet]. 2022 Feb;185(4):712-728.e14. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867421015634>
82. Gendron TF, Petrucelli L. The role of tau in neurodegeneration. *Mol Neurodegener* [Internet]. 2009;4(1):13. Available from: <http://molecularneurodegeneration.biomedcentral.com/articles/10.1186/1750-1326-4-13>
83. Briggs R, Kennelly SP, O’Neill D. Drug treatments in Alzheimer’s disease. *Clin Med (Northfield Il)* [Internet]. 2016 Jun 1;16(3):247–53. Available from: <https://www.rcpjournals.org/lookup/doi/10.7861/clinmedicine.16-3-247>
84. Francis PT. The Interplay of Neurotransmitters in Alzheimer’s Disease. *CNS Spectr* [Internet]. 2005 Nov 7;10(S18):6–9. Available from: https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S1092852900014164/type/journal_article
85. H. Ferreira-Vieira T, M. Guimaraes I, R. Silva F, M. Ribeiro F. Alzheimer’s disease: Targeting the Cholinergic System. *Curr Neuropharmacol* [Internet]. 2016 Jan 22;14(1):101–15. Available from: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1570->

86. Liu J, Chang L, Song Y, Li H, Wu Y. The Role of NMDA Receptors in Alzheimer's Disease. *Front Neurosci* [Internet]. 2019 Feb 8;13. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fnins.2019.00043/full>
87. Kaur S, DasGupta G, Singh S. Altered Neurochemistry in Alzheimer's Disease: Targeting Neurotransmitter Receptor Mechanisms and Therapeutic Strategy. *Neurophysiology* [Internet]. 2019 Jul 4;51(4):293–309. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s11062-019-09823-7>
88. Xu Y, Yan J, Zhou P, Li J, Gao H, Xia Y, et al. Neurotransmitter receptors and cognitive dysfunction in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* [Internet]. 2012 Apr;97(1):1–13. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301008212000214>
89. Rosenberg PB, Nowrangi MA, Lyketsos CG. Neuropsychiatric symptoms in Alzheimer's disease: What might be associated brain circuits? *Mol Aspects Med* [Internet]. 2015 Jun;43–44:25–37. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0098299715000357>
90. Ismail Z, Creese B, Aarsland D, Kales HC, Lyketsos CG, Sweet RA, et al. Psychosis in Alzheimer disease — mechanisms, genetics and therapeutic opportunities. *Nat Rev Neurol* [Internet]. 2022 Mar 4;18(3):131–44. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41582-021-00597-3>
91. Tampi RR, Tampi DJ, Balachandran S, Srinivasan S. Antipsychotic use in dementia: a systematic review of benefits and risks from meta-analyses. *Ther Adv Chronic Dis* [Internet]. 2016 Sep;7(5):229–45. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/2040622316658463>
92. Sheline YI, Snider BJ, Beer JC, Seok D, Fagan AM, Suckow RF, et al. Effect of escitalopram dose and treatment duration on CSF A β levels in healthy older adults. *Neurology* [Internet]. 2020 Nov 10;95(19):e2658–65. Available from: <https://www.neurology.org/lookup/doi/10.1212/WNL.0000000000010725>
93. Griñán-Ferré C, Vasilopoulou F, Abás S, Rodríguez-Arévalo S, Bagán A, Sureda FX, et al. Behavioral and Cognitive Improvement Induced by Novel Imidazoline I2 Receptor Ligands in Female SAMP8 Mice. *Neurotherapeutics* [Internet]. 2019 Apr 20;16(2):416–31. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s13311-018-00681-5>
94. Mirzaei N, Mota BC, Birch AM, Davis N, Romero-Molina C, Katsouri L, et al. Imidazoline ligand BU224 reverses cognitive deficits, reduces microgliosis and enhances synaptic connectivity in a mouse model of Alzheimer's disease. *Br J Pharmacol* [Internet]. 2021 Feb 27;178(3):654–71. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/bph.15312>
95. Chatterjee P, Pedrini S, Stoops E, Goozee K, Villemagne VL, Asih PR, et al. Plasma glial fibrillary acidic protein is elevated in cognitively normal older adults at risk of Alzheimer's disease. *Transl Psychiatry* [Internet]. 2021 Jun 11;11(1):27. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41398-020-01137-1>
96. Ou Z, Pan J, Tang S, Duan D, Yu D, Nong H, et al. Global Trends in the Incidence, Prevalence, and Years Lived With Disability of Parkinson's Disease in 204 Countries/Territories From 1990 to 2019. *Front Public Heal* [Internet]. 2021 Dec 7;9.

Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpubh.2021.776847/full>

97. Institute of Health Metrics and Evaluation. Global Health Data Exchange (GHDx) [Internet]. Available from: https://www.healthdata.org/results/gbd_summaries/2019/parkinsons-disease-level-3-cause
98. Dickson DW. Parkinson's Disease and Parkinsonism: Neuropathology. Cold Spring Harb Perspect Med [Internet]. 2012 Aug 1;2(8):a009258–a009258. Available from: <http://perspectivesinmedicine.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/cshperspect.a009258>
99. Beitz JM. Parkinson s disease a review. Front Biosci [Internet]. 2014;S6(1):S415. Available from: <https://impress.com/journal/FBS/6/1/10.2741/S415>
100. Rizek P, Kumar N, Jog MS. An update on the diagnosis and treatment of Parkinson disease. Can Med Assoc J [Internet]. 2016 Nov 1;188(16):1157–65. Available from: <http://www.cmaj.ca/lookup/doi/10.1503/cmaj.151179>
101. Jain S. Multi-organ autonomic dysfunction in Parkinson disease. Parkinsonism Relat Disord [Internet]. 2011 Feb;17(2):77–83. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1353802010002208>
102. Fanciulli A, Wenning GK. Multiple-System Atrophy. Longo DL, editor. N Engl J Med [Internet]. 2015 Jan 15;372(3):249–63. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMra1311488>
103. Iarkov A, Mendoza C, Echeverria V. Cholinergic Receptor Modulation as a Target for Preventing Dementia in Parkinson's Disease. Front Neurosci [Internet]. 2021 Sep 20;15. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnins.2021.665820/full>
104. Jankovic J, Tan EK. Parkinson's disease: etiopathogenesis and treatment. J Neurol Neurosurg Psychiatry [Internet]. 2020 Aug;91(8):795–808. Available from: <https://jnnp.bmj.com/lookup/doi/10.1136/jnnp-2019-322338>
105. Hayes MT. Parkinson's Disease and Parkinsonism. Am J Med [Internet]. 2019 Jul;132(7):802–7. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002934319302359>
106. Connolly BS, Lang AE. Pharmacological Treatment of Parkinson Disease. JAMA [Internet]. 2014 Apr 23;311(16):1670. Available from: <http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jama.2014.3654>
107. Walter BL, Vitek JL. Parkinson's Disease. In: Current Therapy in Neurologic Disease [Internet]. Elsevier; 2006. p. 281–8. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780323034326500659>
108. Reich SG, Savitt JM. Parkinson's Disease. Med Clin North Am [Internet]. 2019 Mar;103(2):337–50. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002571251830138X>
109. Finberg JPM, Rabey JM. Inhibitors of MAO-A and MAO-B in Psychiatry and Neurology. Front Pharmacol [Internet]. 2016 Oct 18;7. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2016.00340/full>

110. Barone P. Neurotransmission in Parkinson's disease: beyond dopamine. *Eur J Neurol* [Internet]. 2010 Mar;17(3):364–76. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1468-1331.2009.02900.x>
111. Politis M, Niccolini F. Serotonin in Parkinson's disease. *Behav Brain Res* [Internet]. 2015 Jan;277:136–45. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166432814004860>
112. Ballanger B, Strafella AP, van Eimeren T, Zurowski M, Rusjan PM, Houle S, et al. Serotonin 2A Receptors and Visual Hallucinations in Parkinson Disease. *Arch Neurol* [Internet]. 2010 Apr 1;67(4). Available from: <http://archneur.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/archneurol.2010.35>
113. Zahodne LB, Fernandez HH. Pathophysiology and Treatment of Psychosis in Parkinson's Disease. *Drugs Aging* [Internet]. 2008;25(8):665–82. Available from: <http://link.springer.com/10.2165/00002512-200825080-00004>
114. McFarland K, Price DL, Bonhaus DW. Pimavanserin, a 5-HT_{2A} inverse agonist, reverses psychosis-like behaviors in a rodent model of Parkinson's disease. *Behav Pharmacol* [Internet]. 2011 Oct;22(7):681–92. Available from: <https://journals.lww.com/00008877-201110000-00008>
115. Paredes-Rodriguez E, Vegas-Suarez S, Morera-Herrerias T, De Deurwaerdere P, Miguelez C. The Noradrenergic System in Parkinson's Disease. *Front Pharmacol* [Internet]. 2020 Apr 8;11. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2020.00435/full>
116. Lange KW, Kornhuber J, Riederer P. Dopamine/glutamate interactions in Parkinson's disease. *Neurosci Biobehav Rev* [Internet]. 1997;21(4):393–400. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0149763496000437>
117. Wilson H, Dervenoulas G, Pagano G, Tyacke RJ, Polychronis S, Myers J, et al. Imidazoline 2 binding sites reflecting astroglia pathology in Parkinson's disease: an in vivo ¹¹C-BU99008 PET study. *Brain* [Internet]. 2019 Oct 1;142(10):3116–28. Available from: <https://academic.oup.com/brain/article/142/10/3116/5554562>
118. MacInnes N, Duty S. Locomotor effects of imidazoline I₂ -site-specific ligands and monoamine oxidase inhibitors in rats with a unilateral 6-hydroxydopamine lesion of the nigrostriatal pathway. *Br J Pharmacol* [Internet]. 2004 Dec;143(8):952–9. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1038/sj.bjp.0706019>
119. Fox SH, Katzenschlager R, Lim S-Y, Barton B, de Bie RMA, Seppi K, et al. International Parkinson and movement disorder society evidence-based medicine review: Update on treatments for the motor symptoms of Parkinson's disease. *Mov Disord* [Internet]. 2018 Aug;33(8):1248–66. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mds.27372>
120. Kondej M, Stępnicki P, Kaczor AA. Multi-Target Approach for Drug Discovery against Schizophrenia. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2018 Oct 10;19(10):3105. Available from: <http://www.mdpi.com/1422-0067/19/10/3105>
121. Nasrallah HA. Atypical antipsychotic-induced metabolic side effects: insights from receptor-binding profiles. *Mol Psychiatry* [Internet]. 2008 Jan 11;13(1):27–35. Available from: <https://www.nature.com/articles/4002066>

122. Pillinger T, McCutcheon RA, Vano L, Mizuno Y, Arumham A, Hindley G, et al. Comparative effects of 18 antipsychotics on metabolic function in patients with schizophrenia, predictors of metabolic dysregulation, and association with psychopathology: a systematic review and network meta-analysis. *The Lancet Psychiatry* [Internet]. 2020 Jan;7(1):64–77. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S221503661930416X>
123. Syed AB, Brašić JR. The role of lumateperone in the treatment of schizophrenia. *Ther Adv Psychopharmacol* [Internet]. 2021 Jan 31;11:204512532110340. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/20451253211034019>
124. Intra-Cellular Therapies. Intra-Cellular Therapies Announces US FDA Approval of Caplyta (lumateperone) for the Treatment of Bipolar Depression in Adults. 2021; Available from: <https://ir.intracellulatherapies.com/news-releases/news-release-details/intra-cellular-therapies-announces-us-fda-approval-caplytar>
125. Ballard C, Kales HC, Lyketsos C, Aarsland D, Creese B, Mills R, et al. Psychosis in Alzheimer's Disease. *Curr Neurol Neurosci Rep* [Internet]. 2020 Dec 13;20(12):57. Available from: <https://link.springer.com/10.1007/s11910-020-01074-y>
126. Dixit S. A Case of SSRI Induced Irreversible Parkinsonism. *J Clin DIAGNOSTIC Res* [Internet]. 2015; Available from: http://jcdr.net/article_fulltext.asp?issn=0973-709x&year=2015&volume=9&issue=2&page=VD01&issn=0973-709x&id=5583
127. Auguet M, Viossat I, Marin J-G, Chabrier P-E. Selective Inhibition of Inducible Nitric Oxide Synthase by Agmatine. *Jpn J Pharmacol* [Internet]. 1995;69(3):285–7. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021519819354216>
128. Kotagale NR, Taksande BG, Inamdar NN. Neuroprotective offerings by agmatine. *Neurotoxicology* [Internet]. 2019 Jul;73:228–45. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0161813X19300373>
129. Rosenbaum DM, Rasmussen SGF, Kobilka BK. The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature* [Internet]. 2009 May 20;459(7245):356–63. Available from: <http://www.nature.com/articles/nature08144>
130. Sriram K, Insel PA. G Protein-Coupled Receptors as Targets for Approved Drugs: How Many Targets and How Many Drugs? *Mol Pharmacol* [Internet]. 2018 Apr;93(4):251–8. Available from: <http://molpharm.aspetjournals.org/lookup/doi/10.1124/mol.117.111062>
131. Hauser AS, Attwood MM, Rask-Andersen M, Schiöth HB, Gloriam DE. Trends in GPCR drug discovery: new agents, targets and indications. *Nat Rev Drug Discov* [Internet]. 2017 Dec 27;16(12):829–42. Available from: <http://www.nature.com/articles/nrd.2017.178>
132. Basith S, Cui M, Macalino SJY, Park J, Clavio NAB, Kang S, et al. Exploring G Protein-Coupled Receptors (GPCRs) Ligand Space via Cheminformatics Approaches: Impact on Rational Drug Design. *Front Pharmacol* [Internet]. 2018 Mar 9;9. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2018.00128/full>
133. Hilger D, Masureel M, Kobilka BK. Structure and dynamics of GPCR signaling complexes. *Nat Struct Mol Biol* [Internet]. 2018 Jan 8;25(1):4–12. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41594-017-0011-7>

134. Smrcka A V. G protein $\beta\gamma$ subunits: Central mediators of G protein-coupled receptor signaling. *Cell Mol Life Sci* [Internet]. 2008 Jul 19;65(14):2191–214. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00018-008-8006-5>
135. Li J, Ning Y, Hedley W, Saunders B, Chen Y, Tindill N, et al. The Molecule Pages database. *Nature* [Internet]. 2002 Dec;420(6916):716–7. Available from: <http://www.nature.com/articles/nature01307>
136. Roth B. Multiple Serotonin Receptors: Clinical and Experimental Aspects. *Ann Clin Psychiatry* [Internet]. 1994 Jun 1;6(2):67–78. Available from: <http://www.informaworld.com/openurl?genre=article&doi=10.3109/10401239409148985&magic=crossref%7C%7CD404A21C5BB053405B1A640AFFD44AE3>
137. Carandini T, Cercignani M, Galimberti D, Scarpini E, Bozzali M. The distinct roles of monoamines in multiple sclerosis: A bridge between the immune and nervous systems? *Brain Behav Immun* [Internet]. 2021 May;94:381–91. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0889159121000957>
138. Berger M, Gray JA, Roth BL. The Expanded Biology of Serotonin. *Annu Rev Med* [Internet]. 2009 Feb 1;60(1):355–66. Available from: <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.med.60.042307.110802>
139. Kroeze W, Kristiansen K, Roth B. Molecular Biology of Serotonin Receptors - Structure and Function at the Molecular Level. *Curr Top Med Chem* [Internet]. 2002 Jun 1;2(6):507–28. Available from: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1568-0266&volume=2&issue=6&spage=507>
140. Dorszewska J, Florczak-Wyspianska J, Kowalska M, Stanski M, Kowalewska A, Kozubski W. Serotonin in Neurological Diseases. In: *Serotonin - A Chemical Messenger Between All Types of Living Cells* [Internet]. InTech; 2017. Available from: <http://www.intechopen.com/books/serotonin-a-chemical-messenger-between-all-types-of-living-cells/serotonin-in-neurological-diseases>
141. Pourhamzeh M, Moravej FG, Arabi M, Shahriari E, Mehrabi S, Ward R, et al. The Roles of Serotonin in Neuropsychiatric Disorders. *Cell Mol Neurobiol* [Internet]. 2021 Mar 2; Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10571-021-01064-9>
142. Zhang G, Stackman RW. The role of serotonin 5-HT_{2A} receptors in memory and cognition. *Front Pharmacol* [Internet]. 2015 Oct 6;6. Available from: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fphar.2015.00225/abstract>
143. Hoyer D, Hannon JP, Martin GR. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol Biochem Behav* [Internet]. 2002 Apr;71(4):533–54. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0091305701007468>
144. López-Giménez JF, González-Maeso J. Hallucinogens and Serotonin 5-HT_{2A} Receptor-Mediated Signaling Pathways. In 2017. p. 45–73. Available from: http://link.springer.com/10.1007/7854_2017_478
145. Bohn LM, Schmid CL. Serotonin receptor signaling and regulation via β -arrestins. *Crit Rev Biochem Mol Biol* [Internet]. 2010 Dec 7;45(6):555–66. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/10409238.2010.516741>

146. Höltje H-D, Jendretzki UK. Construction of a Detailed Serotonergic 5-HT_{2a} Receptor Model. *Arch Pharm (Weinheim)* [Internet]. 1995;328(7–8):577–84. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ardp.19953280704>
147. Chambers JJ, Nichols DE. A homology-based model of the human 5-HT_{2A} receptor derived from an in silico activated G-protein coupled receptor. *J Comput Aided Mol Des* [Internet]. 2002 Jul;16(7):511–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12510883>
148. Berman HM. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2000 Jan 1;28(1):235–42. Available from: <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/28.1.235>
149. Munk C, Isberg V, Mordalski S, Harpsøe K, Rataj K, Hauser AS, et al. GPCRdb: the G protein-coupled receptor database – an introduction. *Br J Pharmacol* [Internet]. 2016 Jul 3;173(14):2195–207. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/bph.13509>
150. Kimura KT, Asada H, Inoue A, Kadji FMN, Im D, Mori C, et al. Structures of the 5-HT_{2A} receptor in complex with the antipsychotics risperidone and zotepine. *Nat Struct Mol Biol* [Internet]. 2019 Feb 4;26(2):121–8. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41594-018-0180-z>
151. Kim K, Che T, Panova O, DiBerto JF, Lyu J, Krumm BE, et al. Structure of a Hallucinogen-Activated Gq-Coupled 5-HT_{2A} Serotonin Receptor. *Cell* [Internet]. 2020 Sep;182(6):1574–1588.e19. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867420310667>
152. Chen Z, Fan L, Wang H, Yu J, Lu D, Qi J, et al. Structure-based design of a novel third-generation antipsychotic drug lead with potential antidepressant properties. *Nat Neurosci* [Internet]. 2022 Jan 9;25(1):39–49. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41593-021-00971-w>
153. Cao D, Yu J, Wang H, Luo Z, Liu X, He L, et al. Structure-based discovery of nonhallucinogenic psychedelic analogs. *Science (80-)* [Internet]. 2022 Jan 28;375(6579):403–11. Available from: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.abl8615>
154. Vollenweider FX, Vollenweider-Scherpenhuyzen MFI, Bäbler A, Vogel H, Hell D. Psilocybin induces schizophrenia-like psychosis in humans via a serotonin-2 agonist action. *Neuroreport* [Internet]. 1998 Dec;9(17):3897–902. Available from: <http://journals.lww.com/00001756-199812010-00024>
155. Darmon M, Al Awabdh S, Emerit M-B, Masson J. Insights into Serotonin Receptor Trafficking. In 2015. p. 97–126. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1877117315000381>
156. Homberg JR. Serotonin and decision making processes. *Neurosci Biobehav Rev* [Internet]. 2012 Jan;36(1):218–36. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0149763411001114>
157. Shi L, Javitch JA. The binding site of aminergic G protein-coupled receptors: the transmembrane segments and second extracellular loop. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* [Internet]. 2002 Apr;42(1):437–67. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.pharmtox.42.091101.144224>
158. Addington DE, Labelle A, Kulkarni J, Johnson G, Loebel A, Mandel FS. A Comparison of Ziprasidone and Risperidone in the Long-Term Treatment of Schizophrenia: A 44-Week,

- Double-Blind, Continuation Study. *Can J Psychiatry* [Internet]. 2009 Jan 1;54(1):46–54. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/070674370905400108>
159. Cooper D, Gupta V. Lumateperone [Internet]. *StatPearls*. 2022. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32809679>
 160. Hoffman BJ, Mezey E, Brownstein MJ. Cloning of a Serotonin Transporter Affected by Antidepressants. *Science* (80-) [Internet]. 1991 Oct 25;254(5031):579–80. Available from: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1948036>
 161. Coleman JA, Green EM, Gouaux E. X-ray structures and mechanism of the human serotonin transporter. *Nature* [Internet]. 2016 Apr 21;532(7599):334–9. Available from: <http://www.nature.com/articles/nature17629>
 162. Coleman JA, Yang D, Zhao Z, Wen P-C, Yoshioka C, Tajkhorshid E, et al. Serotonin transporter–ibogaine complexes illuminate mechanisms of inhibition and transport. *Nature* [Internet]. 2019 May 24;569(7754):141–5. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41586-019-1135-1>
 163. Zhu R, Sandtner W, Ahiable JEA, Newman AH, Freissmuth M, Sitte HH, et al. Allosterically Linked Binding Sites in Serotonin Transporter Revealed by Single Molecule Force Spectroscopy. *Front Mol Biosci* [Internet]. 2020 Jun 3;7. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmolb.2020.00099/full>
 164. Kristensen AS, Andersen J, Jørgensen TN, Sørensen L, Eriksen J, Loland CJ, et al. SLC6 Neurotransmitter Transporters: Structure, Function, and Regulation. Simonsen U, editor. *Pharmacol Rev* [Internet]. 2011 Sep;63(3):585–640. Available from: <http://pharmrev.aspetjournals.org/lookup/doi/10.1124/pr.108.000869>
 165. Juárez Olguín H, Calderón Guzmán D, Hernández García E, Barragán Mejía G. The Role of Dopamine and Its Dysfunction as a Consequence of Oxidative Stress. *Oxid Med Cell Longev* [Internet]. 2016;2016:1–13. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/omcl/2016/9730467/>
 166. Ko JH, Strafella AP. Dopaminergic Neurotransmission in the Human Brain. *Neurosci* [Internet]. 2012 Apr 2;18(2):149–68. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1073858411401413>
 167. MISSALE C, NASH SR, ROBINSON SW, JABER M, CARON MG. Dopamine Receptors: From Structure to Function. *Physiol Rev* [Internet]. 1998 Jan 1;78(1):189–225. Available from: <https://www.physiology.org/doi/10.1152/physrev.1998.78.1.189>
 168. Beaulieu J-M, Gainetdinov RR. The Physiology, Signaling, and Pharmacology of Dopamine Receptors. Sibley DR, editor. *Pharmacol Rev* [Internet]. 2011 Mar;63(1):182–217. Available from: <http://pharmrev.aspetjournals.org/lookup/doi/10.1124/pr.110.002642>
 169. Baik J-H. Stress and the dopaminergic reward system. *Exp Mol Med* [Internet]. 2020 Dec 1;52(12):1879–90. Available from: <http://www.nature.com/articles/s12276-020-00532-4>
 170. Martel JC, Gatti McArthur S. Dopamine Receptor Subtypes, Physiology and Pharmacology: New Ligands and Concepts in Schizophrenia. *Front Pharmacol* [Internet]. 2020 Jul 14;11. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2020.01003/full>

171. Monsma FJ, McVittie LD, Gerfen CR, Mahan LC, Sibley DR. Multiple D2 dopamine receptors produced by alternative RNA splicing. *Nature* [Internet]. 1989 Dec;342(6252):926–9. Available from: <http://www.nature.com/articles/342926a0>
172. Platania CBM, Salomone S, Leggio GM, Drago F, Bucolo C. Homology Modeling of Dopamine D2 and D3 Receptors: Molecular Dynamics Refinement and Docking Evaluation. Zhang Y, editor. *PLoS One* [Internet]. 2012 Sep 6;7(9):e44316. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0044316>
173. Kalani MYS, Vaidehi N, Hall SE, Trabanino RJ, Freddolino PL, Kalani MA, et al. The predicted 3D structure of the human D2 dopamine receptor and the binding site and binding affinities for agonists and antagonists. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2004 Mar 16;101(11):3815–20. Available from: <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.0400100101>
174. Wang S, Che T, Levit A, Shoichet BK, Wacker D, Roth BL. Structure of the D2 dopamine receptor bound to the atypical antipsychotic drug risperidone. *Nature* [Internet]. 2018 Mar 24;555(7695):269–73. Available from: <http://www.nature.com/articles/nature25758>
175. Fan L, Tan L, Chen Z, Qi J, Nie F, Luo Z, et al. Haloperidol bound D2 dopamine receptor structure inspired the discovery of subtype selective ligands. *Nat Commun* [Internet]. 2020 Dec 26;11(1):1074. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41467-020-14884-y>
176. Yin J, Chen K-YM, Clark MJ, Hijazi M, Kumari P, Bai X, et al. Structure of a D2 dopamine receptor–G-protein complex in a lipid membrane. *Nature* [Internet]. 2020 Aug 6;584(7819):125–9. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41586-020-2379-5>
177. Im D, Inoue A, Fujiwara T, Nakane T, Yamanaka Y, Uemura T, et al. Structure of the dopamine D2 receptor in complex with the antipsychotic drug spiperone. *Nat Commun* [Internet]. 2020 Dec 22;11(1):6442. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41467-020-20221-0>
178. Zhuang Y, Xu P, Mao C, Wang L, Krumm B, Zhou XE, et al. Structural insights into the human D1 and D2 dopamine receptor signaling complexes. *Cell* [Internet]. 2021 Feb;184(4):931–942.e18. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867421000702>
179. Seeman P, Chau-Wong M, Tedesco J, Wong K. Brain receptors for antipsychotic drugs and dopamine: direct binding assays. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 1975 Nov;72(11):4376–80. Available from: <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.72.11.4376>
180. Leveque J-C, Macías W, Rajadhyaksha A, Carlson RR, Barczak A, Kang S, et al. Intracellular Modulation of NMDA Receptor Function by Antipsychotic Drugs. *J Neurosci* [Internet]. 2000 Jun 1;20(11):4011–20. Available from: <https://www.jneurosci.org/lookup/doi/10.1523/JNEUROSCI.20-11-04011.2000>
181. Cacabelos R. Parkinson’s Disease: From Pathogenesis to Pharmacogenomics. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2017 Mar 4;18(3). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28273839>
182. ÜÇOK A, GAEBEL W. Side effects of atypical antipsychotics: a brief overview. *World Psychiatry* [Internet]. 2008 Feb;7(1):58–62. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/j.2051-5545.2008.tb00154.x>

183. de Bartolomeis A, Tomasetti C, Iasevoli F. Update on the Mechanism of Action of Aripiprazole: Translational Insights into Antipsychotic Strategies Beyond Dopamine Receptor Antagonism. *CNS Drugs* [Internet]. 2015 Sep 7;29(9):773–99. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s40263-015-0278-3>
184. Cheng MH, Bahar I. Molecular Mechanism of Dopamine Transport by Human Dopamine Transporter. *Structure* [Internet]. 2015 Nov;23(11):2171–81. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0969212615003718>
185. GETHER U, ANDERSEN P, LARSSON O, SCHOUSBOE A. Neurotransmitter transporters: molecular function of important drug targets. *Trends Pharmacol Sci* [Internet]. 2006 Jul;27(7):375–83. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165614706001271>
186. McHugh PC, Buckley DA. The Structure and Function of the Dopamine Transporter and its Role in CNS Diseases. In 2015. p. 339–69. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0083672914000223>
187. Penmatsa A, Wang KH, Gouaux E. X-ray structure of dopamine transporter elucidates antidepressant mechanism. *Nature* [Internet]. 2013 Nov 7;503(7474):85–90. Available from: <http://www.nature.com/articles/nature12533>
188. Wang KH, Penmatsa A, Gouaux E. Neurotransmitter and psychostimulant recognition by the dopamine transporter. *Nature* [Internet]. 2015 May 11;521(7552):322–7. Available from: <http://www.nature.com/articles/nature14431>
189. Vaughan RA, Foster JD. Mechanisms of dopamine transporter regulation in normal and disease states. *Trends Pharmacol Sci* [Internet]. 2013 Sep;34(9):489–96. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016561471300134X>
190. Cheng MH, Block E, Hu F, Cobanoglu MC, Sorkin A, Bahar I. Insights into the Modulation of Dopamine Transporter Function by Amphetamine, Orphenadrine, and Cocaine Binding. *Front Neurol* [Internet]. 2015 Jun 9;6. Available from: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fneur.2015.00134/abstract>
191. Kitaichi Y, Inoue T, Nakagawa S, Boku S, Kakuta A, Izumi T, et al. Sertraline increases extracellular levels not only of serotonin, but also of dopamine in the nucleus accumbens and striatum of rats. *Eur J Pharmacol* [Internet]. 2010 Nov;647(1–3):90–6. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014299910008307>
192. Stahl SM, Pradko JF, Haight BR, Modell JG, Rockett CB, Learned-Coughlin S. A Review of the Neuropharmacology of Bupropion, a Dual Norepinephrine and Dopamine Reuptake Inhibitor. *Prim Care Companion J Clin Psychiatry* [Internet]. 2004 Aug 13;06(04):159–66. Available from: <http://article.psychiatrist.com/?ContentType=START&ID=10000989>
193. Sharma H, Santra S, Dutta A. Triple reuptake inhibitors as potential next-generation antidepressants: a new hope? *Future Med Chem* [Internet]. 2015 Nov;7(17):2385–406. Available from: <https://www.future-science.com/doi/10.4155/fmc.15.134>
194. Haas HL, Sergeeva OA, Selbach O. Histamine in the Nervous System. *Physiol Rev* [Internet]. 2008 Jul;88(3):1183–241. Available from: <https://www.physiology.org/doi/10.1152/physrev.00043.2007>

195. Kárpáti A, Yoshikawa T, Naganuma F, Matsuzawa T, Kitano H, Yamada Y, et al. Histamine H1 receptor on astrocytes and neurons controls distinct aspects of mouse behaviour. *Sci Rep* [Internet]. 2019 Dec 11;9(1):16451. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41598-019-52623-6>
196. Brown RE, Stevens DR, Haas HL. The physiology of brain histamine. *Prog Neurobiol* [Internet]. 2001 Apr;63(6):637–72. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301008200000393>
197. Nuutinen S, Panula P. Histamine in Neurotransmission and Brain Diseases. In 2010. p. 95–107. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4419-8056-4_10
198. Shimamura T, Shiroishi M, Weyand S, Tsujimoto H, Winter G, Katritch V, et al. Structure of the human histamine H1 receptor complex with doxepin. *Nature* [Internet]. 2011 Jul 22;475(7354):65–70. Available from: <http://www.nature.com/articles/nature10236>
199. Xia R, Wang N, Xu Z, Lu Y, Song J, Zhang A, et al. Cryo-EM structure of the human histamine H1 receptor/Gq complex. *Nat Commun* [Internet]. 2021 Dec 7;12(1):2086. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41467-021-22427-2>
200. Golightly LK, Greos LS. Second-Generation Antihistamines. *Drugs* [Internet]. 2005;65(3):341–84. Available from: <http://link.springer.com/10.2165/00003495-200565030-00004>
201. Mignot E, Taheri S, Nishino S. Sleeping with the hypothalamus: emerging therapeutic targets for sleep disorders. *Nat Neurosci* [Internet]. 2002 Nov 28;5(S11):1071–5. Available from: <http://www.nature.com/articles/nn944>
202. Passani MB, Blandina P. Histamine receptors in the CNS as targets for therapeutic intervention. *Trends Pharmacol Sci* [Internet]. 2011 Apr;32(4):242–9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165614711000046>
203. Kaar SJ, Natesan S, McCutcheon R, Howes OD. Antipsychotics: Mechanisms underlying clinical response and side-effects and novel treatment approaches based on pathophysiology. *Neuropharmacology* [Internet]. 2020 Aug;172:107704. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002839081930262X>
204. Masaki T, Yoshimatsu H. Neuronal Histamine and its Receptors: Implication of the Pharmacological Treatment of Obesity. *Curr Med Chem* [Internet]. 2010 Dec 1;17(36):4587–92. Available from: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=0929-8673&volume=17&issue=36&spage=4587>
205. Kim SF, Huang AS, Snowman AM, Teuscher C, Snyder SH. Antipsychotic drug-induced weight gain mediated by histamine H1 receptor-linked activation of hypothalamic AMP-kinase. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2007 Feb 27;104(9):3456–9. Available from: <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.0611417104>
206. RICHELSON E. Tricyclic antidepressants block histamine H1 receptors of mouse neuroblastoma cells. *Nature* [Internet]. 1978 Jul;274(5667):176–7. Available from: <http://www.nature.com/articles/274176a0>
207. Bousquet P, Feldman J, Schwartz J. Central cardiovascular effects of alpha adrenergic drugs:

- differences between catecholamines and imidazolines. *J Pharmacol Exp Ther* [Internet]. 1984 Jul;230(1):232–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6146707>
208. Chan CK, Burke SL, Head GA. Contribution of imidazoline receptors and α 2-adrenoceptors in the rostral ventrolateral medulla to sympathetic baroreflex inhibition by systemic rilmenidine. *J Hypertens* [Internet]. 2007 Jan;25(1):147–55. Available from: <https://journals.lww.com/00004872-200701000-00022>
 209. Crassous P-A, Denis C, Paris H, Senard JM. Interest of α 2-Adrenergic Agonists and Antagonists in Clinical Practice: Background, Facts and Perspectives. *Curr Top Med Chem* [Internet]. 2007 Jan 1;7(2):187–94. Available from: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1568-0266&volume=7&issue=2&spage=187>
 210. Giovannitti JA, Thoms SM, Crawford JJ. Alpha-2 Adrenergic Receptor Agonists: A Review of Current Clinical Applications. *Anesth Prog* [Internet]. 2015 Mar 1;62(1):31–8. Available from: <https://meridian.allenpress.com/anesthesia-progress/article/62/1/31/24911/Alpha2-Adrenergic-Receptor-Agonists-A-Review-of>
 211. Guyenet PG. Is the hypotensive effect of clonidine and related drugs due to imidazoline binding sites? *Am J Physiol Integr Comp Physiol* [Internet]. 1997 Nov 1;273(5):R1580–4. Available from: <https://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpregu.1997.273.5.R1580>
 212. Sarro GB, Ascoti C, Froio F, Libri V, Nisticò G. Evidence that locus coeruleus is the site where clonidine and drugs acting at α 1- and α 2-adrenoceptors affect sleep and arousal mechanisms. *Br J Pharmacol* [Internet]. 1987 Apr;90(4):675–85. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1476-5381.1987.tb11220.x>
 213. Baum SS, Hill R, Rommelspacher H. Harman-induced changes of extracellular concentrations of neurotransmitters in the nucleus accumbens of rats. *Eur J Pharmacol* [Internet]. 1996 Oct;314(1–2):75–82. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014299996005432>
 214. Ferraz CAA, de Oliveira Júnior RG, Picot L, da Silva Almeida JRG, Nunes XP. Pre-clinical investigations of β -carboline alkaloids as antidepressant agents: A systematic review. *Fitoterapia* [Internet]. 2019 Sep;137:104196. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0367326X19305775>
 215. Ernsberger P, Friedman JE, Koletsky RJ. The I1-imidazoline receptor. *J Hypertens* [Internet]. 1997;15:S9–23. Available from: <http://journals.lww.com/00004872-199715011-00002>
 216. Chan CKS, Head GA. Relative importance of central imidazoline receptors for the antihypertensive effects of moxonidine and rilmenidine. *J Hypertens* [Internet]. 1996 Jul;14(7):855–64. Available from: <http://journals.lww.com/00004872-199607000-00008>
 217. Bousquet P, Hudson A, García-Sevilla JA, Li J-X. Imidazoline Receptor System: The Past, the Present, and the Future. France CP, editor. *Pharmacol Rev* [Internet]. 2020 Jan 9;72(1):50–79. Available from: <http://pharmrev.aspetjournals.org/lookup/doi/10.1124/pr.118.016311>
 218. Abás S, Rodríguez-Arévalo S, Bagán A, Griñán-Ferré C, Vasilopoulou F, Brocos-Mosquera I, et al. Bicyclic α -Iminophosphonates as High Affinity Imidazoline I2 Receptor Ligands for Alzheimer's Disease. *J Med Chem* [Internet]. 2020 Apr 9;63(7):3610–33. Available from:

<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jmedchem.9b02080>

219. Ruiz J, Martín I, Callado LF, Meana JJ, Barturen F, García-Sevilla JA. Non-adrenoceptor [3H]idazoxan binding sites (I2-imidazoline sites) are increased in postmortem brain from patients with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* [Internet]. 1993 Sep;160(1):109–12. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/030439409390925B>
220. Gargalidis-Moudanos C, Pizzinat N, Javoy-Agid F, Remaury A, Parini A. I2-imidazoline binding sites and monoamine oxidase activity in human postmortem brain from patients with Parkinson's disease. *Neurochem Int* [Internet]. 1997 Jan;30(1):31–6. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0197018696000356>
221. Javier Meana J, Barturen F, Martín I, García-Sevilla JA. Evidence of increased non-adrenoceptor [3H]idazoxan binding sites in the frontal cortex of depressed suicide victims. *Biol Psychiatry* [Internet]. 1993 Oct;34(7):498–501. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0006322393902437>
222. Rodríguez-Arévalo S, Bagán A, Griñán-Ferré C, Vasilopoulou F, Pallàs M, Brocos-Mosquera I, et al. Benzofuranyl-2-imidazoles as imidazoline I2 receptor ligands for Alzheimer's disease. *Eur J Med Chem* [Internet]. 2021 Oct;222:113540. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0223523421003895>
223. Tesson F, Limon-Boulez I, Urban P, Puype M, Vandekerckhove J, Coupry I, et al. Localization of I2-Imidazoline Binding Sites on Monoamine Oxidases. *J Biol Chem* [Internet]. 1995 Apr;270(17):9856–61. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925817474990>
224. Raddatz R, Parini A, Lanier SM. Localization of the Imidazoline Binding Domain on Monoamine Oxidase B. *Mol Pharmacol* [Internet]. 1997 Oct 1;52(4):549–53. Available from: <http://molpharm.aspetjournals.org/lookup/doi/10.1124/mol.52.4.549>
225. LALIES MD, HIBELL A, HUDSON AL, NUTT DJ. Inhibition of Central Monoamine Oxidase by Imidazoline2 Site-Selective Ligands. *Ann N Y Acad Sci* [Internet]. 1999 Jun;881(1 IMIDAZOLINE R):114–7. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1749-6632.1999.tb09350.x>
226. Tonello R, Villarinho JG, da Silva Sant'Anna G, Tamiozzo L, Machado P, Trevisan G, et al. The potential antidepressant-like effect of imidazoline I2 ligand 2-BFI in mice. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry* [Internet]. 2012 Apr;37(1):15–21. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278584611003344>
227. Villarinho JG, Fachinetto R, Pinheiro F de V, Sant'Anna G da S, Machado P, Dombrowski PA, et al. Antidepressant-like effect of the novel MAO inhibitor 2-(3,4-dimethoxy-phenyl)-4,5-dihydro-1H-imidazole (2-DMPI) in mice. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry* [Internet]. 2012 Oct;39(1):31–9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278584612000796>
228. Dardonville C, Rozas I. Imidazoline binding sites and their ligands: An overview of the different chemical structures. *Med Res Rev* [Internet]. 2004 Sep;24(5):639–61. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/med.20007>
229. Bleck C, Wienbergen A, Rustenbeck I. Essential role of the imidazoline moiety in the insulinotropic effect but not the KATP channel-blocking effect of imidazolines; a

- comparison of the effects of efaroxan and its imidazole analogue, KU14R. *Diabetologia* [Internet]. 2005 Dec;48(12):2567–75. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16283242>
230. Muench J, Hamer AM. Adverse effects of antipsychotic medications. *Am Fam Physician* [Internet]. 2010 Mar 1;81(5):617–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20187598>
 231. Mauri MC, Paletta S, Maffini M, Colasanti A, Dragogna F, Di Pace C, et al. Clinical pharmacology of atypical antipsychotics: an update. *EXCLI J* [Internet]. 2014;13:1163–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26417330>
 232. Mannens G, Huang ML, Meuldermans W, Hendrickx J, Woestenborghs R, Heykants J. Absorption, metabolism, and excretion of risperidone in humans. *Drug Metab Dispos* [Internet]. 21(6):1134–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7507814>
 233. Caley CF, Cooper CK. Ziprasidone: The Fifth Atypical Antipsychotic. *Ann Pharmacother* [Internet]. 2002 May 28;36(5):839–51. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1345/aph.1A053>
 234. Kumar B, Kuhad A, Kuhad A. Lumateperone: a new treatment approach for neuropsychiatric disorders. *Drugs of Today* [Internet]. 2018;54(12):713. Available from: http://journals.prous.com/journals/servlet/xmlxsl/pk_journals.xml_summary_pr?p_JournalId=4&p_RefId=2899443&p_IsPs=N
 235. Vyas P, Hwang BJ, Brašić JR. An evaluation of lumateperone tosylate for the treatment of schizophrenia. *Expert Opin Pharmacother* [Internet]. 2020 Jan 22;21(2):139–45. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/14656566.2019.1695778>
 236. Immadisetty K, Geffert LM, Surratt CK, Madura JD. New design strategies for antidepressant drugs. *Expert Opin Drug Discov* [Internet]. 2013 Nov;8(11):1399–414. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/17460441.2013.830102>
 237. Fasipe OJ. The emergence of new antidepressants for clinical use: Agomelatine paradox versus other novel agents. *IBRO Reports* [Internet]. 2019 Jun;6:95–110. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2451830118300608>
 238. Vasilopoulou F, Rodríguez-Arévalo S, Bagán A, Escolano C, Griñán-Ferré C, Pallàs M. Disease-modifying treatment with I 2 imidazoline receptor ligand LSL60101 in an Alzheimer's disease mouse model: a comparative study with donepezil. *Br J Pharmacol* [Internet]. 2021 Aug 24;178(15):3017–33. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/bph.15478>
 239. Simoens S, Huys I. R&D Costs of New Medicines: A Landscape Analysis. *Front Med* [Internet]. 2021 Oct 26;8. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmed.2021.760762/full>
 240. Kiriiri GK, Njogu PM, Mwangi AN. Exploring different approaches to improve the success of drug discovery and development projects: a review. *Futur J Pharm Sci* [Internet]. 2020 Dec 23;6(1):27. Available from: <https://fjps.springeropen.com/articles/10.1186/s43094-020-00047-9>
 241. Lin X, Li X, Lin X. A Review on Applications of Computational Methods in Drug Screening

- and Design. *Molecules* [Internet]. 2020 Mar 18;25(6):1375. Available from: <https://www.mdpi.com/1420-3049/25/6/1375>
242. Radan M, Bošković J, Dobričić V, Čudina O, Nikolić K. Current computer-aided drug design methodologies in discovery of novel drug candidates for neuropsychiatric and inflammatory diseases. *Arh Farm (Belgr)* [Internet]. 2021;71(4):225–56. Available from: <https://scindeks.ceon.rs/Article.aspx?artid=0004-19632104225R>
 243. Baig MH, Ahmad K, Rabbani G, Danishuddin M, Choi I. Computer Aided Drug Design and its Application to the Development of Potential Drugs for Neurodegenerative Disorders. *Curr Neuropharmacol* [Internet]. 2018 Jun 8;16(6):740–8. Available from: <http://www.eurekaselect.com/156422/article>
 244. Verma J, Khedkar V, Coutinho E. 3D-QSAR in Drug Design - A Review. *Curr Top Med Chem* [Internet]. 2010 Jan 1;10(1):95–115. Available from: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1568-0266&volume=10&issue=1&spage=95>
 245. Cramer RD, Patterson DE, Bunce JD. Comparative molecular field analysis (CoMFA). 1. Effect of shape on binding of steroids to carrier proteins. *J Am Chem Soc* [Internet]. 1988 Aug 1;110(18):5959–67. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja00226a005>
 246. Hayakawa D, Sawada N, Watanabe Y, Gouda H. A molecular interaction field describing nonconventional intermolecular interactions and its application to protein–ligand interaction prediction. *J Mol Graph Model* [Internet]. 2020 May;96:107515. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1093326319306084>
 247. Wade RC. Calculation and Application of Molecular Interaction Fields. In 2005. p. 27–42. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/3527607676.ch2>
 248. Durán Á, Zamora I, Pastor M. Suitability of GRIND-Based Principal Properties for the Description of Molecular Similarity and Ligand-Based Virtual Screening. *J Chem Inf Model* [Internet]. 2009 Sep 28;49(9):2129–38. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ci900228x>
 249. Pastor M, Cruciani G, McLay I, Pickett S, Clementi S. GRid-INdependent Descriptors (GRIND): A Novel Class of Alignment-Independent Three-Dimensional Molecular Descriptors. *J Med Chem* [Internet]. 2000 Aug 1;43(17):3233–43. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jm000941m>
 250. Pentacle v 1.07 [Internet]. Perugia, Italy: Molecular Discovery Ltd.; 2009. Available from: <http://www.moldiscovery.com/software/pentacle/>
 251. Durán Á, Martínez GC, Pastor M. Development and Validation of AMANDA, a New Algorithm for Selecting Highly Relevant Regions in Molecular Interaction Fields. *J Chem Inf Model* [Internet]. 2008 Sep 22;48(9):1813–23. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ci800037t>
 252. Durán Á, Pastor M. An advanced tool for computing and handling grid-independent Descriptors. User Man Version 106. 2011;
 253. Baroni M, Costantino G, Cruciani G, Riganelli D, Valigi R, Clementi S. Generating Optimal Linear PLS Estimations (GOLPE): An Advanced Chemometric Tool for Handling 3D-QSAR

- Problems. Quant Struct Relationships [Internet]. 1993;12(1):9–20. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/qsar.19930120103>
254. Wold S, Sjöström M, Eriksson L. PLS-regression: a basic tool of chemometrics. *Chemom Intell Lab Syst* [Internet]. 2001 Oct;58(2):109–30. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169743901001551>
255. Roy K, Kar S, Das RN. Statistical Methods in QSAR/QSPR. In: *A Primer on QSAR/QSPR Modeling* [Internet]. Springer, Cham; 2015. p. 37–59. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-17281-1_2
256. Danishuddin, Khan AU. Descriptors and their selection methods in QSAR analysis: paradigm for drug design. *Drug Discov Today* [Internet]. 2016 Aug;21(8):1291–302. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359644616302318>
257. Roy K. Topological descriptors in drug design and modeling studies. *Mol Divers* [Internet]. 2004;8(4):321–3. Available from: <http://link.springer.com/10.1023/B:MODI.0000047519.35591.b7>
258. Chowdhury MZI, Turin TC. Variable selection strategies and its importance in clinical prediction modelling. *Fam Med Community Heal* [Internet]. 2020 Feb 16;8(1):e000262. Available from: <http://fmch.bmj.com/lookup/doi/10.1136/fmch-2019-000262>
259. Farrés M, Platikanov S, Tsakovski S, Tauler R. Comparison of the variable importance in projection (VIP) and of the selectivity ratio (SR) methods for variable selection and interpretation. *J Chemom* [Internet]. 2015 Oct;29(10):528–36. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cem.2736>
260. Eriksson, L, E Johansson, N Kettaneh-Wold, J Trygg, C Wikström and SW. *Multi- and Megavariate Data Analysis: Part I: Basic Principles and Applications*. Umeå, Umetrics; 2006.
261. GOLMOHAMMADI H, DASHTBOZORGI Z, KHOOSHECHIN S. Prediction of Blood-to-Brain Barrier Partitioning of Drugs and Organic Compounds Using a QSPR Approach. *Acta Physico-Chimica Sin* [Internet]. 2017;33(6):1160–70. Available from: <http://www.whxb.pku.edu.cn/EN/10.3866/PKU.WHXB201704051>
262. Dashtbozorgi Z, Golmohammadi H, Acree WE. Prediction of gas to water solvation enthalpy of organic compounds using support vector machine. *Thermochim Acta* [Internet]. 2012 Jul;539:7–15. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0040603112001438>
263. Krogh A. What are artificial neural networks? *Nat Biotechnol* [Internet]. 2008 Feb;26(2):195–7. Available from: <http://www.nature.com/articles/nbt1386>
264. Agatonovic-Kustrin S, Beresford R. Basic concepts of artificial neural network (ANN) modeling and its application in pharmaceutical research. *J Pharm Biomed Anal* [Internet]. 2000 Jun;22(5):717–27. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0731708599002721>
265. OECD. OECD principles for the validation, for regulatory purposes, of (quantitative) structure-activity relationship models [Internet]. 2004. Available from: <https://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/37849783.pdf>

266. Ojha PK, Roy K. Comparative QSARs for antimalarial endochins: Importance of descriptor-thinning and noise reduction prior to feature selection. *Chemom Intell Lab Syst* [Internet]. 2011 Dec;109(2):146–61. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169743911001730>
267. Tropsha A. Best Practices for QSAR Model Development, Validation, and Exploitation. *Mol Inform* [Internet]. 2010 Jul 12;29(6–7):476–88. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/minf.201000061>
268. Golbraikh A, Tropsha A. Beware of q^2 ! *J Mol Graph Model* [Internet]. 2002 Jan;20(4):269–76. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1093326301001231>
269. Ojha PK, Mitra I, Das RN, Roy K. Further exploring rm^2 metrics for validation of QSPR models. *Chemom Intell Lab Syst* [Internet]. 2011 May;107(1):194–205. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016974391100061X>
270. Roy PP, Roy K. On Some Aspects of Variable Selection for Partial Least Squares Regression Models. *QSAR Comb Sci* [Internet]. 2008 Mar;27(3):302–13. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/qsar.200710043>
271. Gramatica P, Sangion A. A Historical Excursus on the Statistical Validation Parameters for QSAR Models: A Clarification Concerning Metrics and Terminology. *J Chem Inf Model* [Internet]. 2016 Jun 27;56(6):1127–31. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jcim.6b00088>
272. Roy K, Kar S, Ambure P. On a simple approach for determining applicability domain of QSAR models. *Chemom Intell Lab Syst* [Internet]. 2015 Jul;145:22–9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169743915000969>
273. Gramatica P. Principles of QSAR models validation: internal and external. *QSAR Comb Sci* [Internet]. 2007 May;26(5):694–701. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/qsar.200610151>
274. Garg R, Smith CJ. Predicting the bioconcentration factor of highly hydrophobic organic chemicals. *Food Chem Toxicol* [Internet]. 2014 Jul;69:252–9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278691514001641>
275. Kurisu G. Fifty years of Protein Data Bank in the Journal of Biochemistry. *J Biochem* [Internet]. 2022 Jan 7;171(1):3–11. Available from: <https://academic.oup.com/jb/article/171/1/3/6448437>
276. Ferreira L, dos Santos R, Oliva G, Andricopulo A. Molecular Docking and Structure-Based Drug Design Strategies. *Molecules* [Internet]. 2015 Jul 22;20(7):13384–421. Available from: <http://www.mdpi.com/1420-3049/20/7/13384>
277. Batool M, Ahmad B, Choi S. A Structure-Based Drug Discovery Paradigm. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2019 Jun 6;20(11):2783. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/20/11/2783>
278. Salo-Ahen OMH, Alanko I, Bhadane R, Bonvin AMJJ, Honorato RV, Hossain S, et al. Molecular Dynamics Simulations in Drug Discovery and Pharmaceutical Development. *Processes* [Internet]. 2020 Dec 30;9(1):71. Available from: <https://www.mdpi.com/2227-9717/9/1/71>

279. Durrant JD, McCammon JA. Molecular dynamics simulations and drug discovery. *BMC Biol* [Internet]. 2011 Dec 28;9(1):71. Available from: <https://bmcbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1741-7007-9-71>
280. Hollingsworth SA, Dror RO. Molecular Dynamics Simulation for All. *Neuron* [Internet]. 2018 Sep;99(6):1129–43. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896627318306846>
281. Vanommeslaeghe K, Guvench O, MacKerell AD. Molecular Mechanics. *Curr Pharm Des* [Internet]. 2014 May 31;20(20):3281–92. Available from: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1381-6128&volume=20&issue=20&spage=3281>
282. Forli S, Huey R, Pique ME, Sanner MF, Goodsell DS, Olson AJ. Computational protein–ligand docking and virtual drug screening with the AutoDock suite. *Nat Protoc* [Internet]. 2016 May 14;11(5):905–19. Available from: <http://www.nature.com/articles/nprot.2016.051>
283. Morris GM, Lim-Wilby M. Molecular Docking. In 2008. p. 365–82. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-1-59745-177-2_19
284. Salmaso V, Moro S. Bridging Molecular Docking to Molecular Dynamics in Exploring Ligand-Protein Recognition Process: An Overview. *Front Pharmacol* [Internet]. 2018 Aug 22;9. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2018.00923/full>
285. Meng X-Y, Zhang H-X, Mezei M, Cui M. Molecular Docking: A Powerful Approach for Structure-Based Drug Discovery. *Curr Comput Aided-Drug Des* [Internet]. 2011 Jun 1;7(2):146–57. Available from: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1573-4099&volume=7&issue=2&spage=146>
286. Torres PHM, Sodero ACR, Jofily P, Silva-Jr FP. Key Topics in Molecular Docking for Drug Design. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2019 Sep 15;20(18):4574. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/20/18/4574>
287. Jain AN. Bias, reporting, and sharing: computational evaluations of docking methods. *J Comput Aided Mol Des* [Internet]. 2008 Mar 13;22(3–4):201–12. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10822-007-9151-x>
288. Alvarez JC. High-throughput docking as a source of novel drug leads. *Curr Opin Chem Biol* [Internet]. 2004 Aug;8(4):365–70. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1367593104000729>
289. Horvath D. Pharmacophore-Based Virtual Screening. In 2010. p. 261–98. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-1-60761-839-3_11
290. Lionta E, Spyrou G, Vassilatis D, Cournia Z. Structure-Based Virtual Screening for Drug Discovery: Principles, Applications and Recent Advances. *Curr Top Med Chem* [Internet]. 2014 Oct 15;14(16):1923–38. Available from: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1568-0266&volume=14&issue=16&spage=1923>
291. Alavijeh MS, Chishty M, Qaiser MZ, Palmer AM. Drug metabolism and pharmacokinetics, the blood-brain barrier, and central nervous system drug discovery. *NeuroRX* [Internet].

- 2005 Oct;2(4):554–71. Available from: <http://link.springer.com/10.1602/neurorx.2.4.554>
292. Yamaguchi S, Kaneko M, Narukawa M. Approval success rates of drug candidates based on target, action, modality, application, and their combinations. *Clin Transl Sci* [Internet]. 2021 May 8;14(3):1113–22. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/cts.12980>
293. Bickel U. How to measure drug transport across the blood-brain barrier. *NeuroRX* [Internet]. 2005 Jan;2(1):15–26. Available from: <http://link.springer.com/10.1602/neurorx.2.1.15>
294. Kerns E, Di L. Multivariate Pharmaceutical Profiling for Drug Discovery. *Curr Top Med Chem* [Internet]. 2002 Jan 1;2(1):87–98. Available from: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1568-0266&volume=2&issue=1&spage=87>
295. Nielsen PA, Andersson O, Hansen SH, Simonsen KB, Andersson G. Models for predicting blood–brain barrier permeation. *Drug Discov Today* [Internet]. 2011 Jun;16(11–12):472–5. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359644611001103>
296. Daneman R, Prat A. The Blood–Brain Barrier. *Cold Spring Harb Perspect Biol* [Internet]. 2015 Jan 5;7(1):a020412. Available from: <http://cshperspectives.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/cshperspect.a020412>
297. Viscusi ER, Viscusi AR. Blood–brain barrier: mechanisms governing permeability and interaction with peripherally acting μ -opioid receptor antagonists. *Reg Anesth Pain Med* [Internet]. 2020 Sep;45(9):688–95. Available from: <http://rapm.bmj.com/lookup/doi/10.1136/rapm-2020-101403>
298. Banks WA. Characteristics of compounds that cross the blood-brain barrier. *BMC Neurol* [Internet]. 2009;9(Suppl 1):S3. Available from: <http://bmcneurol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2377-9-S1-S3>
299. Gupta M, Lee HJ, Barden CJ, Weaver DF. The Blood–Brain Barrier (BBB) Score. *J Med Chem* [Internet]. 2019 Nov 14;62(21):9824–36. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jmedchem.9b01220>
300. Waterhouse R. Determination of lipophilicity and its use as a predictor of blood–brain barrier penetration of molecular imaging agents. *Mol Imaging Biol* [Internet]. 2003 Dec;5(6):376–89. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1536163203001719>
301. Kadry H, Noorani B, Cucullo L. A blood–brain barrier overview on structure, function, impairment, and biomarkers of integrity. *Fluids Barriers CNS* [Internet]. 2020 Dec 18;17(1):69. Available from: <https://fluidsbarrierscns.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12987-020-00230-3>
302. Fischer H, Gottschlich R, Seelig A. Blood-Brain Barrier Permeation: Molecular Parameters Governing Passive Diffusion. *J Membr Biol* [Internet]. 1998 Oct 1;165(3):201–11. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s002329900434>
303. Pajouhesh H, Lenz GR. Medicinal chemical properties of successful central nervous system drugs. *NeuroRX* [Internet]. 2005 Oct;2(4):541–53. Available from: <http://link.springer.com/10.1602/neurorx.2.4.541>

304. Esteves F, Rueff J, Kranendonk M. The Central Role of Cytochrome P450 in Xenobiotic Metabolism—A Brief Review on a Fascinating Enzyme Family. *J Xenobiotics* [Internet]. 2021 Jun 22;11(3):94–114. Available from: <https://www.mdpi.com/2039-4713/11/3/7>
305. Wanat K. Biological barriers, and the influence of protein binding on the passage of drugs across them. *Mol Biol Rep* [Internet]. 2020 Apr 5;47(4):3221–31. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s11033-020-05361-2>
306. Abbott NJ, Patabendige AAK, Dolman DEM, Yusof SR, Begley DJ. Structure and function of the blood–brain barrier. *Neurobiol Dis* [Internet]. 2010 Jan;37(1):13–25. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0969996109002083>
307. Banks WA, Greig NH. Small molecules as central nervous system therapeutics: old challenges, new directions, and a philosophic divide. *Future Med Chem* [Internet]. 2019 Mar;11(6):489–93. Available from: <https://www.future-science.com/doi/10.4155/fmc-2018-0436>
308. Masimirembwa C, Thelingwani R. Application of In Silico, In Vitro and In Vivo ADMET/PK Platforms in Drug Discovery. In: *Drug Discovery in Africa* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2012. p. 151–91. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-28175-4_7
309. Abbott NJ. Prediction of blood–brain barrier permeation in drug discovery from in vivo, in vitro and in silico models. *Drug Discov Today Technol* [Internet]. 2004 Dec;1(4):407–16. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1740674904000629>
310. Bicker J, Alves G, Fortuna A, Falcão A. Blood–brain barrier models and their relevance for a successful development of CNS drug delivery systems: A review. *Eur J Pharm Biopharm* [Internet]. 2014 Aug;87(3):409–32. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0939641114001015>
311. Kansy M, Senner F, Gubernator K. Physicochemical High Throughput Screening: Parallel Artificial Membrane Permeation Assay in the Description of Passive Absorption Processes. *J Med Chem* [Internet]. 1998 Mar;41(7):1007–10. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jm970530e>
312. Yoon CH, Kim SJ, Shin BS, Lee KC, Yoo SD. Rapid Screening of Blood-Brain Barrier Penetration of Drugs Using the Immobilized Artificial Membrane Phosphatidylcholine Column Chromatography. *J Biomol Screen* [Internet]. 2006 Feb 18;11(1):13–20. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1087057105281656>
313. Garberg P, Ball M, Borg N, Cecchelli R, Fenart L, Hurst RD, et al. In vitro models for the blood–brain barrier. *Toxicol Vitr* [Internet]. 2005 Apr;19(3):299–334. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0887233304001122>
314. Muehlbacher M, Spitzer GM, Liedl KR, Kornhuber J. Qualitative prediction of blood–brain barrier permeability on a large and refined dataset. *J Comput Aided Mol Des* [Internet]. 2011 Dec 23;25(12):1095–106. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10822-011-9478-1>
315. Chen H, Winiwarter S, Engkvist O. In Silico Tools for Predicting Brain Exposure of Drugs. In: *Blood-Brain Barrier in Drug Discovery* [Internet]. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc; 2015. p. 167–87. Available from:

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781118788523.ch9>

316. Avdeef A. The rise of PAMPA. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* [Internet]. 2005 Aug 16;1(2):325–42. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/17425255.1.2.325>
317. Di L, Kerns EH, Fan K, McConnell OJ, Carter GT. High throughput artificial membrane permeability assay for blood–brain barrier. *Eur J Med Chem* [Internet]. 2003 Mar;38(3):223–32. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0223523403000126>
318. Sugano K. Artificial Membrane Technologies to Assess Transfer and Permeation of Drugs in Drug Discovery. In: *Comprehensive Medicinal Chemistry II* [Internet]. Elsevier; 2007. p. 453–87. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B008045044X00136X>
319. Sun H, Nguyen K, Kerns E, Yan Z, Yu KR, Shah P, et al. Highly predictive and interpretable models for PAMPA permeability. *Bioorg Med Chem* [Internet]. 2017 Feb;25(3):1266–76. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0968089616308215>
320. Zhang L, Zhu H, Oprea TI, Golbraikh A, Tropsha A. QSAR Modeling of the Blood–Brain Barrier Permeability for Diverse Organic Compounds. *Pharm Res* [Internet]. 2008 Aug 14;25(8):1902–14. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s11095-008-9609-0>
321. Subramanian G, Kitchen DB. Computational models to predict blood–brain barrier permeation and CNS activity. *J Comput Aided Mol Des* [Internet]. 2003 Oct;17(10):643–64. Available from: <http://link.springer.com/10.1023/B:JCAM.0000017372.32162.37>
322. Nikolic K, Filipic S, Smoliński A, Kaliszan R, Agbaba D. Partial Least Square and Hierarchical Clustering in ADMET Modeling: Prediction of Blood – Brain Barrier Permeation of α -Adrenergic and Imidazoline Receptor Ligands. *J Pharm Pharm Sci* [Internet]. 2013 Nov 5;16(4):622. Available from: <https://journals.library.ualberta.ca/jpps/index.php/JPPS/article/view/19907>
323. Abraham MH, Chadha HS, Mitchell RC. Hydrogen-bonding. Part 36. Determination of blood brain distribution using octanol-water partition coefficients. *Drug Des Discov* [Internet]. 1995 Nov;13(2):123–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8872456>
324. Vucicevic J, Nikolic K, Dobričić V, Agbaba D. Prediction of blood–brain barrier permeation of α -adrenergic and imidazoline receptor ligands using PAMPA technique and quantitative-structure permeability relationship analysis. *Eur J Pharm Sci* [Internet]. 2015 Feb;68:94–105. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928098714004710>
325. Carpenter TS, Kirshner DA, Lau EY, Wong SE, Nilmeier JP, Lightstone FC. A Method to Predict Blood-Brain Barrier Permeability of Drug-Like Compounds Using Molecular Dynamics Simulations. *Biophys J* [Internet]. 2014 Aug;107(3):630–41. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000634951400664X>
326. Thai NQ, Theodorakis PE, Li MS. Fast Estimation of the Blood–Brain Barrier Permeability by Pulling a Ligand through a Lipid Membrane. *J Chem Inf Model* [Internet]. 2020 Jun 22;60(6):3057–67. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jcim.9b00834>
327. Radan M, Djikic T, Nikolic K. Discovery of new chemotypes of dual 5-HT 2A /D 2 receptor antagonists with a strategy of drug design methodologies. *Future Med Chem* [Internet]. 2022

Jun 8; Available from: <https://www.future-science.com/doi/10.4155/fmc-2021-0340>

328. ChemAxon. Marvin Sketch v 16.10.24 [Internet]. Budapest, Hungary: ChemAxon; 2016. Available from: www.chemaxon.com/
329. Stewart JJP. Optimization of parameters for semiempirical methods I. Method. *J Comput Chem* [Internet]. 1989 Mar;10(2):209–20. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/jcc.540100208>
330. Stewart JJP. Optimization of parameters for semiempirical methods II. Applications. *J Comput Chem* [Internet]. 1989 Mar;10(2):221–64. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/jcc.540100209>
331. Roothaan CCJ. New Developments in Molecular Orbital Theory. *Rev Mod Phys* [Internet]. 1951 Apr 1;23(2):69–89. Available from: <https://link.aps.org/doi/10.1103/RevModPhys.23.69>
332. CambridgeSoft Corporation. Chem3D Ultra v7.0 [Internet]. Cambridge, MA, USA; 2001. Available from: www.cambridgesoft.com.
333. Fernández J, Alonso JM, Andrés JI, Cid JM, Díaz A, Iturrino L, et al. Discovery of New Tetracyclic Tetrahydrofuran Derivatives as Potential Broad-Spectrum Psychotropic Agents. *J Med Chem* [Internet]. 2005 Mar;48(6):1709–12. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jm049632c>
334. Phillips ST, de Paulis T, Neergaard JR, Baron BM, Siegel BW, Seeman P, et al. Binding of 5H-Dibenzo[a,d]cycloheptene and Dibenz[b,f]oxepin Analogs of Clozapine to Dopamine and Serotonin Receptors. *J Med Chem* [Internet]. 1995 Feb 1;38(4):708–14. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jm00004a016>
335. Graham JM, Coughenour LL, Barr BM, Rock DL, Nikam SS. 1-Aminoindanes as novel motif with potential atypical antipsychotic properties. *Bioorg Med Chem Lett* [Internet]. 2008 Jan;18(2):489–93. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960894X07014175>
336. Lange JHM, Reinders J-H, Tolboom JTBM, Glennon JC, Coolen HKAC, Kruse CG. Principal Component Analysis Differentiates the Receptor Binding Profiles of Three Antipsychotic Drug Candidates from Current Antipsychotic Drugs. *J Med Chem* [Internet]. 2007 Oct;50(21):5103–8. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jm070516u>
337. Gianotti M, Corti C, Fratte SD, Di Fabio R, Leslie CP, Pavone F, et al. Novel imidazobenzazepine derivatives as dual H1/5-HT2A antagonists for the treatment of sleep disorders. *Bioorg Med Chem Lett* [Internet]. 2010 Sep;20(17):5069–73. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960894X10009856>
338. Martínez-Rosell G, Giorgino T, De Fabritiis G. PlayMolecule ProteinPrepare: A Web Application for Protein Preparation for Molecular Dynamics Simulations. *J Chem Inf Model* [Internet]. 2017 Jul 24;57(7):1511–6. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jcim.7b00190>
339. Trott O, Olson AJ. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem* [Internet]. 2009;NA-NA. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcc.21334>

340. Humphrey W, Dalke A, Schulten K. VMD: Visual molecular dynamics. *J Mol Graph* [Internet]. 1996 Feb;14(1):33–8. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0263785596000185>
341. Phillips JC, Braun R, Wang W, Gumbart J, Tajkhorshid E, Villa E, et al. Scalable molecular dynamics with NAMD. *J Comput Chem* [Internet]. 2005 Dec;26(16):1781–802. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/jcc.20289>
342. Vanommeslaeghe K, Hatcher E, Acharya C, Kundu S, Zhong S, Shim J, et al. CHARMM general force field: A force field for drug-like molecules compatible with the CHARMM all-atom additive biological force fields. *J Comput Chem* [Internet]. 2009;NA-NA. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcc.21367>
343. Yu W, He X, Vanommeslaeghe K, MacKerell AD. Extension of the CHARMM general force field to sulfonyl-containing compounds and its utility in biomolecular simulations. *J Comput Chem* [Internet]. 2012 Dec 5;33(31):2451–68. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/jcc.23067>
344. Kaczor AA, Żuk J, Matosiuk D. Comparative molecular field analysis and molecular dynamics studies of the dopamine D2 receptor antagonists without a protonatable nitrogen atom. *Med Chem Res* [Internet]. 2018 Apr 13;27(4):1149–66. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00044-018-2137-5>
345. Ranjbar M, Ghafouri H, Salehi F, Emami L, Khonya N, Rezaei Z, et al. Homology Modeling, Molecular Dynamics Simulation and Cross-Docking Studies of Human Histamine-2 (H2) Receptor to Obtain a 3D Structure for Further SBDD Studies. *J Biol Sci* [Internet]. 2019 Dec 15;20(1):22–31. Available from: <https://www.scialert.net/abstract/?doi=jbs.2020.22.31>
346. Huang S-Y. Comprehensive assessment of flexible-ligand docking algorithms: current effectiveness and challenges. *Brief Bioinform* [Internet]. 2018 Sep 28;19(5):982–94. Available from: <https://academic.oup.com/bib/article/19/5/982/3071431>
347. Dassault Systèmes BIOVIA. Discovery Studio Visualizer v17.2.0.16349. Dassault Systèmes; San Diego, CA, USA; 2017.
348. SPSS Inc. PASW Statistics for Windows, Version 18.0. Chicago: SPSS Inc. Chicago: SPSS Inc.; 2009.
349. de Souza Neto LR, Moreira-Filho JT, Neves BJ, Maidana RLBR, Guimarães ACR, Furnham N, et al. In silico Strategies to Support Fragment-to-Lead Optimization in Drug Discovery. *Front Chem* [Internet]. 2020 Feb 18;8. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fchem.2020.00093/full>
350. Baroni M, Cruciani G, Sciabola S, Perruccio F, Mason JS. A Common Reference Framework for Analyzing/Comparing Proteins and Ligands. Fingerprints for Ligands And Proteins (FLAP): Theory and Application. *J Chem Inf Model* [Internet]. 2007 Mar 1;47(2):279–94. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ci600253e>
351. Cross S, Baroni M, Goracci L, Cruciani G. GRID-Based Three-Dimensional Pharmacophores I: FLAPpharm, a Novel Approach for Pharmacophore Elucidation. *J Chem Inf Model* [Internet]. 2012 Oct 22;52(10):2587–98. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ci300153d>

352. Cross S, Baroni M, Carosati E, Benedetti P, Clementi S. FLAP: GRID Molecular Interaction Fields in Virtual Screening. Validation using the DUD Data Set. *J Chem Inf Model* [Internet]. 2010 Aug 23;50(8):1442–50. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ci100221g>
353. Simulation Plus Inc. ADMET Predictor 9.5, Lancaster, CA, USA. Lancaster, CA, USA.: Simulation plus inc.; 2019.
354. Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Sci Rep* [Internet]. 2017 May 3;7(1):42717. Available from: <http://www.nature.com/articles/srep42717>
355. Radan M, Djikic T, Obradovic D, Nikolic K. Application of in vitro PAMPA technique and in silico computational methods for blood-brain barrier permeability prediction of novel CNS drug candidates. *Eur J Pharm Sci* [Internet]. 2022 Jan;168:106056. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928098721003584>
356. Djikic T, Martí Y, Spyraakis F, Lau T, Benedetti P, Davey G, et al. Human dopamine transporter: the first implementation of a combined in silico/in vitro approach revealing the substrate and inhibitor specificities. *J Biomol Struct Dyn* [Internet]. 2019 Jan 22;37(2):291–306. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/07391102.2018.1426044>
357. Szekely G, Amores de Sousa MC, Gil M, Castelo Ferreira F, Heggie W. Genotoxic Impurities in Pharmaceutical Manufacturing: Sources, Regulations, and Mitigation. *Chem Rev* [Internet]. 2015 Aug 26;115(16):8182–229. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/cr300095f>
358. KIRCHHERR H, KUHNVELTEN W. Quantitative determination of forty-eight antidepressants and antipsychotics in human serum by HPLC tandem mass spectrometry: A multi-level, single-sample approach. *J Chromatogr B* [Internet]. 2006 Oct 20;843(1):100–13. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1570023206004454>
359. TALETE Srl. Dragon. Milano, Italy.: TALETE srl.; 2010.
360. Umetrics AB. SIMCA P+ Program, Version 12.0.0.0. Umea, Sweden. Umea, Sweden.: Umetrics AB; 2008.
361. StatSoft Inc. “Statistica,” Data Analysis Software System, version 13.6. StatSoft Inc.; 2019.
362. Suan Li M, Khanh Mai B. Steered Molecular Dynamics-A Promising Tool for Drug Design. *Curr Bioinform* [Internet]. 2012 Nov 11;7(4):342–51. Available from: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1574-8936&volume=7&issue=4&spage=342>
363. Sotomayor M, Schulten K. Single-Molecule Experiments in Vitro and in Silico. *Science* (80-) [Internet]. 2007 May 25;316(5828):1144–8. Available from: <https://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.1137591>
364. Phillips JC, Braun R, Wang W, Gumbart J, Tajkhorshid E, Villa E, et al. Scalable molecular dynamics with NAMD. *J Comput Chem* [Internet]. 2005 Dec;26(16):1781–802. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcc.20289>
365. Jo S, Kim T, Iyer VG, Im W. CHARMM-GUI: A web-based graphical user interface for

CHARMM. *J Comput Chem* [Internet]. 2008 Aug;29(11):1859–65. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/jcc.20945>

366. Nikolic K, Mavridis L, Djikic T, Vucicevic J, Agbaba D, Yelekci K, et al. Drug Design for CNS Diseases: Polypharmacological Profiling of Compounds Using Cheminformatic, 3D-QSAR and Virtual Screening Methodologies. *Front Neurosci* [Internet]. 2016 Jun 10;10. Available from: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fnins.2016.00265/abstract>
367. Papa A, Pasquini S, Contri C, Gemma S, Campiani G, Butini S, et al. Polypharmacological Approaches for CNS Diseases: Focus on Endocannabinoid Degradation Inhibition. *Cells* [Internet]. 2022 Jan 29;11(3):471. Available from: <https://www.mdpi.com/2073-4409/11/3/471>
368. Aier I, Varadwaj PK, Raj U. Structural insights into conformational stability of both wild-type and mutant EZH2 receptor. *Sci Rep* [Internet]. 2016 Dec 7;6(1):34984. Available from: <http://www.nature.com/articles/srep34984>
369. Chikalov I, Yao P, Moshkov M, Latombe J-C. Learning probabilistic models of hydrogen bond stability from molecular dynamics simulation trajectories. *BMC Bioinformatics* [Internet]. 2011 Dec 15;12(S1):S34. Available from: <https://bmcbioinformatics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2105-12-S1-S34>
370. Zhang D, Lazim R. Application of conventional molecular dynamics simulation in evaluating the stability of apomyoglobin in urea solution. *Sci Rep* [Internet]. 2017 Apr 16;7(1):44651. Available from: <http://www.nature.com/articles/srep44651>
371. Biswal HS. Hydrogen Bonds Involving Sulfur: New Insights from ab Initio Calculations and Gas Phase Laser Spectroscopy. In 2015. p. 15–45. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-14163-3_2
372. Radan M, Ruzic D, Antonijevec M, Djikic T, Nikolic K. In silico identification of novel 5-HT 2A antagonists supported with ligand- and target-based drug design methodologies. *J Biomol Struct Dyn* [Internet]. 2021 Mar 24;39(5):1819–37. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/07391102.2020.1738961>
373. Wilson KJ, van Niel MB, Cooper L, Bloomfield D, O'Connor D, Fish LR, et al. 2,5-Disubstituted pyridines: The discovery of a novel series of 5-HT2A ligands. *Bioorg Med Chem Lett* [Internet]. 2007 May;17(9):2643–8. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960894X07001539>
374. Duan X, Zhang M, Zhang X, Wang F, Lei M. Molecular modeling and docking study on dopamine D2-like and serotonin 5-HT2A receptors. *J Mol Graph Model* [Internet]. 2015 Apr;57:143–55. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1093326315000339>
375. Jafari S, Bouillon ME, Huang X-F, Pyne SG, Fernandez-Enright F. Novel olanzapine analogues presenting a reduced H1 receptor affinity and retained 5HT2A/D2 binding affinity ratio. *BMC Pharmacol* [Internet]. 2012;12(1):8. Available from: <http://bmcpharma.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2210-12-8>
376. Snyder GL, Vanover KE, Zhu H, Miller DB, O'Callaghan JP, Tomesch J, et al. Functional profile of a novel modulator of serotonin, dopamine, and glutamate neurotransmission. *Psychopharmacology (Berl)* [Internet]. 2015 Feb 15;232(3):605–21. Available from:

<http://link.springer.com/10.1007/s00213-014-3704-1>

377. Ritzén A, David L. Physicochemical Parameters of Recently Approved Oral Drugs. In: Successful Drug Discovery [Internet]. Wiley; 2019. p. 35–53. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9783527814695.ch2>
378. Ertl P, Schuffenhauer A. Estimation of synthetic accessibility score of drug-like molecules based on molecular complexity and fragment contributions. *J Cheminform* [Internet]. 2009 Dec 10;1(1):8. Available from: <https://jcheminf.biomedcentral.com/articles/10.1186/1758-2946-1-8>
379. Head G, Mayorov D. Imidazoline Receptors, Novel Agents and Therapeutic Potential. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem* [Internet]. 2006 Jan 1;4(1):17–32. Available from: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1871-5257&volume=4&issue=1&spage=17>
380. Bennion BJ, Be NA, McNerney MW, Lao V, Carlson EM, Valdez CA, et al. Predicting a Drug's Membrane Permeability: A Computational Model Validated With in Vitro Permeability Assay Data. *J Phys Chem B* [Internet]. 2017 May 25;121(20):5228–37. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jpcc.7b02914>
381. Uhr M, Grauer MT. abcb1ab P-glycoprotein is involved in the uptake of citalopram and trimipramine into the brain of mice. *J Psychiatr Res* [Internet]. 2003 May;37(3):179–85. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022395603000220>
382. Garg P, Verma J. In Silico Prediction of Blood Brain Barrier Permeability: An Artificial Neural Network Model. *J Chem Inf Model* [Internet]. 2006 Jan;46(1):289–97. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ci050303i>
383. Kelder J, Grootenhuis PDJ, Bayada DM, Delbressine LPC, Ploemen J-P. Polar Molecular Surface as a Dominating Determinant for Oral Absorption and Brain Penetration of Drugs. *Pharm Res* [Internet]. 1999;16(10):1514–9. Available from: <https://doi.org/10.1023/A:1015040217741>
384. Wang J-S, Taylor R, Ruan Y, Donovan JL, Markowitz JS, Lindsay De Vane C. Olanzapine Penetration into Brain is Greater in Transgenic Abcb1a P-glycoprotein-Deficient Mice than FVB1 (Wild-Type) Animals. *Neuropsychopharmacology* [Internet]. 2004 Mar 31;29(3):551–7. Available from: <http://www.nature.com/articles/1300372>
385. Sunderland T, Cohen BM. Blood to brain distribution of neuroleptics. *Psychiatry Res* [Internet]. 1987 Apr;20(4):299–305. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0165178187900904>
386. Summerfield S, Jeffrey P, Sahi J, Chen L. Passive Diffusion Permeability of the BBB- Examples and SAR. In: Blood-Brain Barrier in Drug Discovery [Internet]. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc; 2015. p. 95–112. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781118788523.ch5>
387. Eriksson L, Kettaneh-Wold N, Trygg J, Wikström C, Wold S. Multi- and Megavariate Data Analysis : Part I: Basic Principles and Applications [Internet]. Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Umeå University: Umetrics Inc; 2006. 425 p. Available from: <http://urn.kb.se/resolve?urn=urn:nbn:se:umu:diva-12895>

388. Consonni V, Todeschini R, 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* [Internet]. 2002 May 1;42(3):682–92. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ci015504a>
389. Todeschini R, Consonni V. Molecular Descriptors for Chemoinformatics: A. In: *Methods and Principles in Medicinal Chemistry* [Internet]. Wiley; 2009. p. 1–38. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9783527628766.ch1>
390. Todeschini R, Consonni V. Molecular Descriptors for Chemoinformatics: G. In: *Methods and Principles in Medicinal Chemistry* [Internet]. 2009. p. 325–66. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9783527628766.ch7>

7. PRILOZI

Prilog A

Tabela A7.1. Set jedinjenja iz trening i test (*) seta korišćenih za formiranje 3D-QSAR modela za 5-HT_{2A} receptor.

Klaster 1		Klaster 2		Klaster 3	
Jedinjenja	pK _i _{exp}	Jedinjenja	pK _i _{exp}	Jedinjenja	pK _i _{exp}
<u>ChEMBL366164</u>	8,80	ChEMBL252818	11,00	ChEMBL3233142	9,27
<u>ChEMBL1113</u>	8,75	ChEMBL253022	11,00	ChEMBL3233432	9,05
<u>ChEMBL715*</u>	8,64	ChEMBL253878	10,40	ChEMBL3233143*	9,03
ChEMBL831	8,62	<u>ChEMBL708</u>	10,10	ChEMBL3233427	9,00
<u>ChEMBL329566*</u>	8,60	ChEMBL251834	10,10	ChEMBL3233431	8,89
ChEMBL90882	8,52	ChEMBL253439	10,00	ChEMBL3233423*	8,77
ChEMBL89970*	8,40	ChEMBL398711*	9,82	ChEMBL3233144	8,68
ChEMBL1222552	8,10	ChEMBL252031*	9,60	ChEMBL3233409*	8,62
<u>ChEMBL6437</u>	8,09	ChEMBL253024	9,52	ChEMBL3233412	8,60
<u>ChEMBL42</u>	8,04	ChEMBL252030*	9,48	ChEMBL3233429*	8,54
ChEMBL1278116	7,90	ChEMBL252230*	9,35	ChEMBL3233411*	8,48
<u>ChEMBL363581*</u>	7,89	ChEMBL400235	9,35	ChEMBL3233149	8,46
<u>ChEMBL193435*</u>	7,82	<u>ChEMBL85</u>	9,30	ChEMBL3233419*	8,34
ChEMBL1276948	7,80	ChEMBL252228	9,30	ChEMBL3233147	8,33
ChEMBL555362	7,70	ChEMBL398744	9,26	ChEMBL3233406	8,24
ChEMBL1278201*	7,70	ChEMBL398525	9,19	ChEMBL3233413	7,75
<u>ChEMBL364270</u>	7,66	ChEMBL252430	9,17	ChEMBL3233410	6,17
ChEMBL544418*	7,66	ChEMBL400236*	9,13	ChEMBL3233416	6,15
ChEMBL1277216	7,60	ChEMBL252201*	9,02		
ChEMBL1222694*	7,50	ChEMBL398619*	9,02		
ChEMBL1277312	7,50	ChEMBL252429	8,78		
ChEMBL195856	7,42	ChEMBL442290	8,61		
ChEMBL1222624*	7,40	ChEMBL398618	8,52		
ChEMBL1277035	7,30	ChEMBL253233	8,32		
ChEMBL544184*	7,14	<u>ChEMBL54</u>	7,00		
ChEMBL1278019*	7,10				
ChEMBL1222763	7,00				
ChEMBL1277935	6,90				
ChEMBL1278114	6,80				
ChEMBL1222625*	6,70				
ChEMBL1278113*	6,50				
ChEMBL1277491	6,40				
ChEMBL1222692	6,30				
ChEMBL1276860	6,20				
ChEMBL1277585	6,20				
ChEMBL163239	6,12				
ChEMBL94067	5,92				

Podvučena jedinjenja su korišćena za generisanje sva tri 3D-QSAR modela. Jedinjenja obeležena u crveno se nalaze u 5-HT_{2A}-R i D₂-R ispitivanim setovima. Jedinjenja obeležena u plavo se nalaze u 5-HT_{2A}-R i H₁-R ispitivanim setovima.

Tabela A7.2. Set jedinjenja iz trening i test (*) seta korišćenih za formiranje 3D-QSAR modela za D₂ receptor.

Klaster 1		Klaster 2		Klaster 3	
Jedinjenja	pK _{i,exp}	Jedinjenja	pK _{i,exp}	Jedinjenja	pK _{i,exp}
ChEMBL193639	8,64	ChEMBL219916	9,05	ChEMBL3233427	7,57
ChEMBL90882	8,60	ChEMBL85	8,85	ChEMBL3233413	7,57
ChEMBL435301	8,23	ChEMBL54	8,60	ChEMBL3233143*	7,52
ChEMBL366164*	7,92	ChEMBL251834	8,52	ChEMBL3233142	7,50
ChEMBL363581	7,92	ChEMBL221692	8,40	ChEMBL3233432*	7,39
ChEMBL89970*	7,68	ChEMBL398744*	8,30	ChEMBL3233406	7,37
ChEMBL831	7,68	ChEMBL253439	8,30	ChEMBL3233149	7,34
ChEMBL194659*	7,50	ChEMBL708	8,30	ChEMBL3233431	7,30
ChEMBL542029	7,36	ChEMBL252430*	8,30	ChEMBL3233421*	7,28
ChEMBL556969	7,21	ChEMBL398619*	8,22	ChEMBL3233144	7,18
ChEMBL329566*	7,21	ChEMBL442290	8,22	ChEMBL3233433	7,16
ChEMBL193435	7,18	ChEMBL398711	8,10	ChEMBL3233429*	7,15
ChEMBL1113	7,17	ChEMBL252429	8,00	ChEMBL3233147	7,07
ChEMBL364270*	7,17	ChEMBL252816*	8,00	ChEMBL3233419*	7,02
ChEMBL715*	7,11	ChEMBL252030	7,82	ChEMBL3233420	7,01
ChEMBL539057	7,09	ChEMBL398618	7,82	ChEMBL3233423	6,83
ChEMBL555362*	7,08	ChEMBL404000	7,68	ChEMBL3233411*	6,76
ChEMBL554670	7,05	ChEMBL253024*	7,68	ChEMBL3233412	6,72
ChEMBL544418	6,96	ChEMBL252818	7,66	ChEMBL3233409*	6,67
ChEMBL195706	6,72	ChEMBL253233*	7,66	ChEMBL3233410	6,12
ChEMBL42	6,66	ChEMBL253878*	7,58	ChEMBL3233416	5,52
ChEMBL163863*	6,64	ChEMBL400235	7,57		
ChEMBL195856	6,43	ChEMBL252201	7,48		
ChEMBL163239	6,36	ChEMBL253022*	7,47		
ChEMBL94067*	6,24	ChEMBL400236	7,17		
ChEMBL544184	6,17				
ChEMBL6437	5,66				

Podvučena jedinjenja su korišćena za generisanje sva tri 3D-QSAR modela. Jedinjenja obeležena u crveno se nalaze u 5-HT_{2A}-R i D₂-R ispitivanim setovima. Jedinjenja obeležena u zeleno se nalaze u D₂-R i H₁-R ispitivanim setovima.

Tabela A7.3. Set jedinjenja iz trening i test (*) seta korišćenih za formiranje 3D-QSAR modela za H₁ receptor.

Klaster 1		Klaster 2	
Jedinjenja	pK _{i,exp}	Jedinjenja	pK _{i,exp}
ChEMBL534	9,86	ChEMBL43064*	8,06
<u>ChEMBL329566</u>	9,37	ChEMBL30008	7,75
<u>ChEMBL1222552*</u>	9,20	<u>ChEMBL85</u>	7,48
<u>ChEMBL42</u>	8,96	<u>ChEMBL708</u>	7,33
<u>ChEMBL715*</u>	8,92	<u>ChEMBL219916</u>	6,81
<u>ChEMBL363581</u>	8,92	ChEMBL476935*	6,80
<u>ChEMBL366164*</u>	8,85	ChEMBL476108	6,72
<u>ChEMBL6437</u>	8,77	ChEMBL150161	6,59
<u>ChEMBL1278116</u>	8,40	ChEMBL1108	6,28
<u>ChEMBL435301</u>	8,37	ChEMBL478617*	6,20
ChEMBL1276947	8,27	ChEMBL140872*	6,04
<u>ChEMBL194659</u>	8,12	ChEMBL340816	6,01
<u>ChEMBL1278114</u>	8,00	ChEMBL476109	5,99
<u>ChEMBL1113</u>	7,96	<u>ChEMBL54</u>	5,68
<u>ChEMBL364270*</u>	7,85	ChEMBL210578	5,06
<u>ChEMBL1278201*</u>	7,80		
<u>ChEMBL1222624*</u>	7,70		
ChEMBL1222554	7,60		
<u>ChEMBL1277585</u>	7,60		
<u>ChEMBL195706*</u>	7,48		
ChEMBL1222693	7,40		
<u>ChEMBL1222763*</u>	7,40		
<u>ChEMBL1276860*</u>	7,40		
<u>ChEMBL193435</u>	7,38		
ChEMBL1222553	7,30		
<u>ChEMBL1222694*</u>	7,30		
ChEMBL1222695	7,10		
<u>ChEMBL1277216*</u>	7,10		
<u>ChEMBL1222692</u>	6,90		
ChEMBL1222764*	6,90		
<u>ChEMBL1277035</u>	6,70		
ChEMBL1277034	6,50		
<u>ChEMBL1278019</u>	6,10		

Podvučena jedinjenja su korišćena za generisanje sva tri 3D-QSAR modela. Jedinjenja obeležena u plavo se nalaze u 5-HT_{2A}-R i H₁-R ispitivanim setovima. Jedinjenja obeležena u zeleno se nalaze u D₂-R i H₁-R ispitivanim setovima.

Tabela A7.4. Rezultati molekuskog dokinga dobijeni AutoDock Vina programom za ispitivani set jedinjenja za 5-HT_{2A}-R.

Klaster 1		Klaster 2		Klaster 3	
Jedinjenja	AD Vina skor	Jedinjenja	AD Vina skor	Jedinjenja	AD Vina skor
ChEMBL715	-9,20	ChEMBL54	-9,40	ChEMBL3233143	-10,20
ChEMBL831	-9,20	ChEMBL85	-12,00	ChEMBL3233144	-9,20
ChEMBL1113	-9,20	ChEMBL708	-11,30	ChEMBL3233147	-7,50
ChEMBL6437	-8,80	ChEMBL251834	-11,40	ChEMBL3233149	-9,60
ChEMBL89970	-9,30	ChEMBL252030	-10,30	ChEMBL3233406	-9,50
ChEMBL90882	-10,00	ChEMBL252031	-10,40	ChEMBL3233409	-9,60
ChEMBL94067	-9,00	ChEMBL252201	-9,50	ChEMBL3233410	-9,50
ChEMBL163239	-5,10	ChEMBL252228	-10,30	ChEMBL3233411	-9,80
ChEMBL193435	-8,30	ChEMBL252230	-10,00	ChEMBL3233412	-9,80
ChEMBL195856	-8,20	ChEMBL252429	-10,80	ChEMBL3233413	-9,50
ChEMBL329566	-9,70	ChEMBL252430	-10,40	ChEMBL3233416	-8,90
ChEMBL363581	-8,80	ChEMBL252818	-11,60	ChEMBL3233419	-9,80
ChEMBL364270	-8,50	ChEMBL253022	-11,20	ChEMBL3233423	-10,30
ChEMBL366164	-9,70	ChEMBL253024	-10,90	ChEMBL3233427	-10,50
ChEMBL544184	-10,40	ChEMBL253233	-10,40	ChEMBL3233429	-10,10
ChEMBL544418	-10,70	ChEMBL253439	-10,30	ChEMBL3233431	-10,10
ChEMBL555362	-10,80	ChEMBL253878	-12,20	ChEMBL3233432	-10,10
ChEMBL1222552	-7,90	ChEMBL398525	-10,40	ChEMBL3233142	-10,80
ChEMBL1222624	-8,60	ChEMBL398618	-10,10		
ChEMBL1222625	-7,40	ChEMBL398619	-10,50		
ChEMBL1222692	-5,20	ChEMBL398711	-11,50		
ChEMBL1222694	-7,90	ChEMBL398744	-10,00		
ChEMBL1222763	-8,60	ChEMBL400235	-11,30		
ChEMBL1276860	-10,00	ChEMBL400236	-10,60		
ChEMBL1276948	-8,80	ChEMBL442290	-10,40		
ChEMBL1277035	-8,30				
ChEMBL1277216	-10,10				
ChEMBL1277312	-10,70				
ChEMBL1277491	-7,30				
ChEMBL1277585	-7,10				
ChEMBL1277935	-10,10				
ChEMBL1278019	-10,50				
ChEMBL1278113	-9,50				
ChEMBL1278114	-10,70				
ChEMBL1278116	-9,40				
ChEMBL1278201	-11,00				
ChEMBL42	-9,10				

Tabela A7.5. Rezultati molekuskog dokinga dobijeni AutoDock Vina programom za ispitivani set jedinjenja za D₂-R.

Klaster 1		Klaster 2		Klaster 3	
Jedinjenja	AD Vina skor	Jedinjenja	AD Vina skor	Jedinjenja	AD Vina skor
ChEMBL715	-7,00	ChEMBL251834	-9,20	ChEMBL3233143	-9,70
ChEMBL831	-7,40	ChEMBL252816	-10,10	ChEMBL3233149	-9,00
ChEMBL1113	-7,20	ChEMBL252030	-10,30	ChEMBL3233406	-9,20
ChEMBL6437	-7,30	ChEMBL253022	-10,20	ChEMBL3233409	-9,10
ChEMBL89970	-7,30	ChEMBL252818	-9,70	ChEMBL3233410	-9,20
ChEMBL90882	-7,40	ChEMBL252201	-10,40	ChEMBL3233411	-9,70
ChEMBL94067	-7,80	ChEMBL253878	-10,20	ChEMBL3233412	-9,80
ChEMBL163239	-7,80	ChEMBL400236	-10,10	ChEMBL3233413	-9,70
ChEMBL163863	-7,10	ChEMBL252430	-8,40	ChEMBL3233416	-9,80
ChEMBL193435	-6,60	ChEMBL219916	-10,10	ChEMBL3233419	-8,70
ChEMBL193639	-7,50	ChEMBL708	-10,40	ChEMBL3233420	-8,80
ChEMBL194659	-8,30	ChEMBL221692	-9,30	ChEMBL3233421	-8,90
ChEMBL195706	-7,80	ChEMBL253439	-6,80	ChEMBL3233423	-9,00
ChEMBL195856	-6,90	ChEMBL398618	-7,60	ChEMBL3233427	-10,10
ChEMBL329566	-7,40	ChEMBL253024	-10,10	ChEMBL3233429	-9,70
ChEMBL363581	-7,60	ChEMBL442290	-8,80	ChEMBL3233431	-9,40
ChEMBL364270	-6,90	ChEMBL398744	-9,10	ChEMBL3233432	-9,80
ChEMBL366164	-7,60	ChEMBL85	-10,80	ChEMBL3233433	-8,90
ChEMBL435301	-7,80	ChEMBL398619	-8,90	ChEMBL3233142	-10,50
ChEMBL539057	-7,10	ChEMBL400235	-9,40	ChEMBL3233144	-8,80
ChEMBL542029	-7,10	ChEMBL404000	-10,30	ChEMBL3233147	-7,20
ChEMBL544184	-7,40	ChEMBL54	-9,30		
ChEMBL544418	-7,40	ChEMBL253233	-8,50		
ChEMBL554670	-7,40	ChEMBL398711	-9,60		
ChEMBL555362	-7,60	ChEMBL252429	-7,30		
ChEMBL556969	-6,90				
ChEMBL42	-8,80				

Tabela A7.6. Rezultati molekuskog dokinga dobijeni AutoDock Vina programom za ispitivani set jedinjenja za H₁-R.

Klaster 1		Klaster 2	
Jedinjenja	AD Vina skor	Jedinjenja	AD Vina skor
ChEMBL42	-12,10	ChEMBL54	-9,80
ChEMBL715	-10,30	ChEMBL85	-10,60
ChEMBL1113	-11,60	ChEMBL708	-10,60
ChEMBL6437	-10,10	ChEMBL1108	-10,10
ChEMBL435301	-9,30	ChEMBL30008	-10,30
ChEMBL193435	-8,60	ChEMBL43064	-9,90
ChEMBL194659	-10,40	ChEMBL140872	-9,50
ChEMBL195706	-10,70	ChEMBL150161	-8,30
ChEMBL329566	-8,00	ChEMBL210578	-8,70
ChEMBL363581	-8,30	ChEMBL219916	-9,20
ChEMBL364270	-10,40	ChEMBL340816	-8,90
ChEMBL366164	-7,90	ChEMBL476108	-9,30
ChEMBL534	-4,70	ChEMBL476109	-9,10
ChEMBL1222552	-9,90	ChEMBL476935	-9,00
ChEMBL1222553	-8,80	ChEMBL478617	-8,50
ChEMBL1222554	-8,20		
ChEMBL1222624	-8,00		
ChEMBL1222692	-9,10		
ChEMBL1222693	-8,30		
ChEMBL1222694	-7,70		
ChEMBL1222695	-5,10		
ChEMBL1222763	-8,20		
ChEMBL1222764	-8,50		
ChEMBL1276860	-10,70		
ChEMBL1276947	-7,60		
ChEMBL1277034	-10,50		
ChEMBL1277035	-12,20		
ChEMBL1277216	-7,10		
ChEMBL1277585	-9,20		
ChEMBL1278019	-4,10		
ChEMBL1278114	-8,60		
ChEMBL1278116	-10,00		
ChEMBL1278201	-6,60		

Tabela A7.7. Rezultati 3D-QSAR studije za 5-HT_{2A}-R.

Trening set	pKi _{exp}	pKi _{pred}	pKi _{exp} - pKi _{pred}	Test set	pKi _{exp}	pKi _{pred}	pKi _{exp} - pKi _{pred}
ChEMBL831	8,62	8,41	0,21	ChEMB715	8,64	8,08	0,56
ChEMBL1113	8,75	8,72	0,03	ChEMB89970	8,40	8,21	0,19
ChEMBL6437	8,09	7,78	0,31	ChEMB193435	7,82	7,89	-0,07
ChEMBL90882	8,52	8,34	0,18	ChEMB329566	8,60	8,55	0,05
ChEMBL94067	5,92	6,78	-0,86	ChEMB363581	7,89	8,27	-0,38
ChEMBL163239	6,12	6,62	-0,50	ChEMB544184	7,14	7,21	-0,07
ChEMBL195856	7,42	7,57	-0,15	ChEMB544418	7,66	7,29	0,37
ChEMBL364270	7,66	7,60	0,06	ChEMBL1222624	7,40	6,86	0,54
ChEMBL366164	8,80	8,32	0,48	ChEMB1222625	6,70	6,43	0,27
ChEMBL555362	7,70	7,18	0,52	ChEMBL1222694	7,50	6,77	0,73
ChEMBL1222552	8,10	8,16	-0,06	ChEMBL1278019	7,10	6,90	0,20
ChEMBL1222692	6,30	6,33	-0,03	ChEMBL1278113	6,50	5,85	0,65
ChEMBL1222763	7,00	6,82	0,18	ChEMBL1278201	7,70	6,99	0,71
ChEMBL1276860	6,20	6,88	-0,68	ChEMBL252030	9,48	9,22	0,26
ChEMBL1276948	7,80	7,39	0,41	ChEMBL252031	9,60	9,47	0,13
ChEMBL1277035	7,30	6,87	0,43	ChEMBL252201	9,02	8,77	0,25
ChEMBL1277216	7,60	7,48	0,12	ChEMBL252230	9,35	9,29	0,06
ChEMBL1277312	7,50	7,43	0,07	ChEMBL398619	9,02	9,58	-0,56
ChEMBL1277491	6,40	6,18	0,22	ChEMBL398711	9,82	9,42	0,40
ChEMBL1277585	6,20	6,63	-0,43	ChEMBL400236	9,13	9,43	-0,30
ChEMBL1277935	6,90	6,90	0,00	ChEMBL3233143	9,03	8,86	0,17
ChEMBL1278114	6,80	7,29	-0,49	ChEMBL3233409	8,62	8,49	0,13
ChEMBL1278116	7,90	8,01	-0,11	ChEMBL3233411	8,48	8,12	0,36
ChEMBL42	8,04	7,89	0,15	ChEMBL3233419	8,34	7,87	0,47
ChEMBL54	7,00	7,09	-0,09	ChEMBL3233423	8,77	8,47	0,30
ChEMBL85	9,30	9,80	-0,50	ChEMBL3233429	8,54	8,24	0,30
ChEMBL708	10,10	10,48	-0,38				
ChEMBL251834	10,10	10,00	0,10				
ChEMBL252228	9,30	9,74	-0,44				
ChEMBL252429	8,78	8,87	-0,09				
ChEMBL252430	9,17	8,76	0,41				
ChEMBL252818	11,00	10,80	0,20				
ChEMBL253022	11,00	10,73	0,27				
ChEMBL253024	9,52	9,12	0,40				
ChEMBL253233	8,32	8,80	-0,48				
ChEMBL253439	10,00	9,70	0,30				
ChEMBL253878	10,40	10,68	-0,28				
ChEMBL398525	9,19	8,88	0,31				
ChEMBL398618	8,52	8,73	-0,21				
ChEMBL398744	9,26	9,03	0,23				
ChEMBL400235	9,35	9,52	-0,17				
ChEMBL442290	8,61	8,90	-0,29				
ChEMBL3233144	8,68	8,25	0,43				
ChEMBL3233147	8,33	8,41	-0,08				
ChEMBL3233149	8,46	8,90	-0,44				
ChEMBL3233406	8,24	8,30	-0,06				

ChEMBL3233410	6,17	6,63	-0,46
ChEMBL3233412	8,60	8,12	0,48
ChEMBL3233413	7,75	7,05	0,70
ChEMBL3233416	6,15	6,23	-0,08
ChEMBL3233427	9,00	8,37	0,63
ChEMBL3233431	8,89	8,82	0,07
ChEMBL3233432	9,05	9,40	-0,35
ChEMBL3233142	9,27	9,49	-0,22

Tabela A7.8. Rezultati 3D-QSAR studije za D₂-R.

Training set	pKi _{exp}	pKi _{pred}	pKi _{exp} - pKi _{pred}	Test set	pKi _{exp}	pKi _{pred}	pKi _{exp} - pKi _{pred}
ChEMBL42	6,66	7,05	-0,39	ChEMBL715	7,11	7,43	-0,32
ChEMBL831	7,68	7,38	0,30	ChEMBL89970	7,68	7,79	-0,11
ChEMBL1113	7,17	7,38	-0,21	ChEMBL94067	6,24	6,21	0,03
ChEMBL6437	5,66	5,90	-0,24	ChEMBL163863	6,64	6,93	-0,29
ChEMBL90882	8,60	8,15	0,45	ChEMBL194659	7,50	7,85	-0,35
ChEMBL163239	6,36	6,62	-0,26	ChEMBL329566	7,21	7,19	0,02
ChEMBL193435	7,18	7,43	-0,25	ChEMBL364270	7,17	7,38	-0,21
ChEMBL193639	8,64	8,40	0,24	ChEMBL366164	7,92	7,60	0,32
ChEMBL195706	6,72	7,21	-0,49	ChEMBL555362	7,08	6,78	0,30
ChEMBL195856	6,43	7,29	-0,86	ChEMBL252430	8,30	8,46	-0,16
ChEMBL363581	7,92	8,01	-0,09	ChEMBL252816	8,00	8,05	-0,05
ChEMBL435301	8,23	7,90	0,33	ChEMBL253022	7,47	7,18	0,29
ChEMBL539057	7,09	6,98	0,11	ChEMBL253024	7,68	7,98	-0,30
ChEMBL542029	7,36	6,76	0,60	ChEMBL253233	7,66	7,55	0,11
ChEMBL544184	6,17	6,36	-0,19	ChEMBL253878	7,58	7,83	-0,25
ChEMBL544418	6,96	7,17	-0,21	ChEMBL398619	8,22	8,76	-0,54
ChEMBL554670	7,05	6,63	0,42	ChEMBL398744	8,30	7,83	0,47
ChEMBL556969	7,21	7,09	0,12	ChEMBL3233143	7,52	7,63	-0,11
ChEMBL54	8,60	8,23	0,37	ChEMBL3233409	6,67	6,98	-0,31
ChEMBL85	8,85	8,57	0,28	ChEMBL3233411	6,76	6,93	-0,17
ChEMBL708	8,30	8,30	0,00	ChEMBL3233419	7,02	6,91	0,11
ChEMBL219916	9,05	9,32	-0,27	ChEMBL3233421	7,28	7,12	0,16
ChEMBL221692	8,40	8,16	0,24	ChEMBL3233429	7,15	7,24	-0,09
ChEMBL251834	8,52	8,32	0,20	ChEMBL3233432	7,39	7,43	-0,04
ChHEMBL252030	7,82	8,00	-0,18				
ChEMBL252201	7,48	8,07	-0,59				
ChEMBL252429	8,00	7,68	0,32				
ChEMBL252818	7,66	8,13	-0,47				
ChEMBL253439	8,30	7,99	0,31				
ChEMBL398618	7,82	7,30	0,52				
ChEMBL398711	8,10	8,26	-0,16				
ChEMBL400235	7,57	7,70	-0,13				
ChEMBL400236	7,17	7,34	-0,17				
ChEMBL404000	7,68	8,13	-0,45				
ChEMBL442290	8,22	8,54	-0,32				
ChEMBL3233142	7,50	7,04	0,46				

ChEMBL3233144	7,18	7,06	0,12
ChEMBL3233147	7,07	6,70	0,37
ChEMBL3233149	7,34	7,33	0,01
ChEMBL3233406	7,37	6,88	0,49
ChEMBL3233410	6,12	6,47	-0,35
ChEMBL3233412	6,72	7,07	-0,35
ChEMBL3233413	7,57	7,26	0,31
ChEMBL3233416	5,52	6,14	-0,62
ChEMBL3233420	7,01	6,91	0,10
ChEMBL3233423	6,83	6,46	0,37
ChEMBL3233427	7,57	7,15	0,42
ChEMBL3233431	7,30	7,37	-0,07
ChEMBL3233433	7,16	7,32	-0,16

Tabela A7.9. Rezultati 3D-QSAR studije za H₁-R.

Training set	pKi _{exp}	pKi _{pred}	pKi _{exp} - pKi _{pred}	Test set	pKi _{exp}	pKi _{pred}	pKi _{exp} - pKi _{pred}
ChEMBL42	8,96	9,21	-0,25	ChEMBL715	8,92	8,62	0,30
ChEMBL534	9,86	9,37	0,49	ChEMBL195706	7,48	7,85	-0,37
ChEMBL1113	7,96	8,18	-0,22	ChEMBL364270	7,85	8,30	-0,45
ChEMBL6437	8,77	8,69	0,08	ChEMBL366164	8,85	9,06	-0,21
ChEMBL193435	7,38	8,00	-0,62	ChEMBL1222552	9,20	8,74	0,46
ChEMBL194659	8,12	7,95	0,17	ChEMBL1222624	7,70	7,83	-0,13
ChEMBL329566	9,37	9,37	0,00	ChEMBL1222694	7,30	6,72	0,58
ChEMBL363581	8,92	8,76	0,16	ChEMBL1222763	7,40	7,67	-0,27
ChEMBL435301	8,37	7,99	0,38	ChEMBL1222764	6,90	6,97	-0,07
ChEMBL1222553	7,30	7,45	-0,15	ChEMBL1276860	7,40	7,69	-0,29
ChEMBL1222554	7,60	7,52	0,08	ChEMBL1277216	7,10	6,68	0,42
ChEMBL1222692	6,90	7,02	-0,12	ChEMBL1278201	7,80	7,21	0,59
ChEMBL1222693	7,40	7,01	0,39	ChEMBL43064	8,06	8,45	-0,39
ChEMBL1222695	7,10	7,44	-0,34	ChEMBL140872	6,04	6,53	-0,49
ChEMBL1276947	8,27	8,16	0,11	ChEMBL476935	6,80	7,16	-0,36
ChEMBL1277034	6,50	6,50	0,00	ChEMBL478617	6,20	6,86	-0,66
ChEMBL1277035	6,70	6,88	-0,18				
ChEMBL1277585	7,60	7,45	0,15				
ChEMBL1278019	6,10	6,77	-0,67				
ChEMBL1278114	8,00	7,80	0,20				
ChEMBL1278116	8,40	8,84	-0,44				
ChEMBL54	5,68	5,46	0,22				
ChEMBL85	7,48	6,98	0,50				
ChEMBL708	7,33	7,21	0,12				
ChEMBL1108	6,28	6,74	-0,46				
ChEMBL30008	7,75	7,47	0,28				
ChEMBL150161	6,59	5,89	0,70				
ChEMBL210578	5,06	5,34	-0,28				
ChEMBL219916	6,81	6,70	0,11				
ChEMBL340816	6,01	6,63	-0,62				
ChEMBL476108	6,72	6,45	0,27				
ChEMBL476109	5,99	6,07	-0,08				

Tabela A7.10. Predviđene pKi vrednosti za dizajnirani set jedinjenja i vrednosti AD Vina skora dobijene studijom molekuskog dokinga.

Jedinjenje	pKi _{5-HT_{2A}}	pKi _{D₂}	pKi _{H₁}	AD Vina skor 5-HT _{2A} -R	AD Vina skor D ₂ -R	AD Vina skor H ₁ -R
A1	9,85	8,96	7,02	-10,40	-9,20	-10,60
A2	9,71	8,82	6,18	-9,90	-10,00	-10,70
A3	9,65	8,73	7,18	-11,60	-10,60	-11,10
A4	9,18	8,22	6,45	-11,50	-8,20	-8,80
A5	9,17	8,40	6,47	-11,40	-10,40	-11,30
A6	9,14	8,61	6,55	-11,30	-10,40	-10,70
B1	9,96	9,03	6,71	-10,40	-9,80	-12,90
B2	9,93	8,00	7,16	-9,90	-10,20	-12,30
B3	9,85	8,06	6,89	-10,50	-10,00	-13,70
B4	9,62	8,02	6,82	-11,00	-10,20	-11,60
C1	10,87	9,08	6,18	-9,60	-8,50	-9,90
C2	10,83	10,21	6,30	-10,40	-7,90	-10,60
C3	10,81	8,16	6,49	-10,00	-7,80	-10,50
C4	10,48	8,17	6,14	-10,90	-8,00	-11,00
C5	10,47	8,80	6,73	-10,90	-8,00	-11,20
C6	10,23	9,71	6,53	-9,90	-7,80	-10,90
C7	10,17	8,53	6,34	-9,80	-8,30	-10,70
C8	10,06	9,21	6,69	-10,60	-7,60	-10,80
C9	9,92	8,50	6,85	-10,90	-8,50	-10,70
C10	9,84	8,36	6,77	-10,30	-7,90	-10,80
C11	9,66	9,22	6,85	-10,70	-7,70	-11,20
C12	9,66	8,27	6,50	-12,40	-10,40	-12,20
C13	9,58	9,23	7,12	-12,00	-8,70	-9,80
C14	9,53	8,45	6,99	-11,80	-11,50	-11,40
C15	9,51	9,88	6,69	-10,60	-8,90	-10,40
C16	9,49	8,43	6,46	-11,00	-9,60	-9,70
C17	9,49	9,13	5,56	-10,10	-8,50	-11,40
C18	9,49	9,04	6,33	-10,40	-9,40	-10,30
C19	9,47	9,33	6,62	-10,60	-8,30	-10,80
C20	9,34	8,10	5,96	-11,70	-8,80	-10,60

Tabela A7.11. Predviđene fizičko-hemijske osobine dizajniranih jedinjenja.

Jedinjenje	pKi _{5-HT_{2A}}	pKi _{D₂}	pKi _{H₁}	MWt	MlogP	S+logP	RuleOf5	T_PSA	SynthDiff
A1	9,85	8,96	7,02	378,44	1,72	2,56	0	107,18	2,82
A2	9,71	8,82	6,18	391,43	2,03	3,34	0	82,69	2,37
A3	9,65	8,73	7,18	458,61	2,94	3,26	0	79,42	3,83
A4	9,18	8,22	6,45	388,48	2,10	2,59	0	94,04	2,84
A5	9,17	8,40	6,47	388,48	2,10	2,62	0	94,04	2,82
A6	9,14	8,61	6,55	402,50	2,31	2,96	0	94,04	2,87
B1	9,96	9,03	6,81	389,46	2,87	2,85	0	69,55	3,77
B2	9,93	8,00	6,67	403,48	3,09	3,19	0	69,55	3,95
B3	9,85	8,06	6,70	427,55	3,46	2,62	0	52,65	4,50
B4	9,62	8,02	6,97	413,52	3,46	3,17	0	56,41	3,82
C1	10,87	9,08	6,18	508,41	4,01	6,01	1 (Mwt)	61,71	2,82
C2	10,83	10,21	6,30	462,62	2,46	3,21	0	83,18	3,14
C3	10,81	8,16	6,49	435,55	2,04	3,07	0	91,39	3,03
C4	10,48	8,17	6,14	470,00	2,52	3,72	0	91,39	3,21
C5	10,47	8,80	6,73	460,60	1,65	2,51	0	104,27	3,45
C6	10,23	9,71	6,53	449,94	2,66	2,66	0	70,47	3,32
C7	10,17	8,53	6,34	437,93	2,93	3,55	0	70,30	3,26
C8	10,06	9,21	6,69	460,97	2,68	2,85	0	65,54	2,93
C9	9,92	8,50	6,85	438,58	3,04	3,76	0	52,23	2,86
C10	9,84	8,36	6,77	448,96	2,95	3,73	0	65,37	2,87
C11	9,66	9,22	6,85	452,60	3,04	2,95	0	48,47	3,54
C12	9,66	8,27	6,50	441,58	3,03	2,80	0	53,40	3,92
C13	9,58	9,23	7,12	445,59	2,34	2,99	0	78,25	3,06
C14	9,53	8,45	6,99	459,62	2,54	3,40	0	78,25	3,11
C15	9,51	9,88	6,69	427,55	2,95	3,33	0	57,16	3,16
C16	9,49	8,43	6,46	484,00	4,16	5,73	1(logP)	48,57	2,67
C17	9,49	9,13	5,56	445,59	2,34	3,04	0	78,25	3,04
C18	9,49	9,04	6,33	459,62	2,54	3,40	0	78,25	3,09
C19	9,47	9,33	6,62	413,53	2,74	2,92	0	57,16	3,09
C20	9,34	8,10	5,96	424,55	2,84	3,47	0	52,23	2,71
ChEMBL90882	8,52	8,60	/	326,83	3,72	4,89	0	15,71	2,24
ChEMBL42*	8,04	6,66	8,96	326,83	3,10	3,67	0	30,87	2,24
ChEMBL708*	10,10	8,30	7,33	412,94	2,96	4,20	0	48,47	2,72
ChEMBL3233142*	9,27	7,50	/	393,51	3,89	3,86	0	26,79	3,37

Legenda: MWt – Molekulska masa <500 (g/mol); MlogP – Moriguchi predviđanje log P; S+logP - Simulations Plus modelovanje logP; RuleOf5 – pravilo Lipinskog; T_PSA – topološka polarna površina; SynthDiff – težina sinteze jedinjenja. Eksperimentalne pKi vrednosti su prikazane za jedinjenja označena *.

Tabela A7.12. Predvidene farmakokinetičke osobine dizajniranih jedinjenja.

Jedinjenje	BBB_Filter	Log_BB	hum_fup%	P-gp_Substr	CYP2D6_Inh	CYP3A4_Inh	CYP_Risk	hERG_Filter	TOX_Risk
A1	Visoka (74%)	-0,95	7,33	Da (97%)	Da (42%)	Da (65%)	0,00	Da (91%)	2,79
A2	Visoka (89%)	-0,82	4,97	Da (77%)	Ne (67%)	Da (59%)	0,00	Da (52%)	2,98
A3	Visoka (99%)	-0,71	6,00	Da (99%)	Da (70%)	Da (65%)	1,00	Ne (60%)	2,92
A4	Visoka (70%)	-0,66	6,87	Da (97%)	Da (42%)	Da (35%)	0,21	Ne (53%)	2,50
A5	Visoka (68%)	-0,74	7,05	Da (97%)	Da (42%)	Da (36%)	0,43	Ne (53%)	2,50
A6	Visoka (67%)	-0,72	6,20	Da (99%)	Da (49%)	Da (36%)	0,00	Da (52%)	2,50
B1	Visoka (99%)	-0,61	12,28	Da (93%)	Da (43%)	Da (34%)	0,00	Da (95%)	1,50
B2	Visoka (99%)	-0,62	10,30	Da (99%)	Da (49%)	Da (65%)	0,34	Da (99%)	1,50
B3	Visoka (99%)	-0,42	15,13	Da (99%)	Da (70%)	Ne (90%)	1,00	Ne (64%)	1,00
B4	Visoka (99%)	-0,32	10,54	Da (99%)	Da (51%)	Ne (90%)	0,18	Da (61%)	0,50
C1	Visoka (99%)	-0,09	2,43	Da (99%)	Da (44%)	Da (80%)	2,00	Da (67%)	3,50
C2	Visoka (94%)	-0,67	5,00	Da (97%)	Da (70%)	Da (80%)	1,00	Da (76%)	1,50
C3	Visoka (91%)	-0,88	5,64	Da (99%)	Da (70%)	Da (80%)	1,00	Da (88%)	2,50
C4	Visoka (89%)	-0,75	3,94	Da (99%)	Da (70%)	Da (80%)	0,16	Da (88%)	2,75
C5	Visoka (76%)	-0,96	6,65	Da (99%)	Da (70%)	Da (80%)	1,00	Da (76%)	0,73
C6	Visoka (84%)	-0,05	6,68	Da (79%)	Da (40%)	Da (35%)	1,00	Da (82%)	0,50
C7	Visoka (88%)	-0,46	4,84	Da (77%)	Da (40%)	Da (80%)	1,00	Da (95%)	1,86
C8	Visoka (96%)	-0,14	5,70	Da (84%)	Da (44%)	Da (65%)	2,00	Da (99%)	0,50
C9	Visoka (99%)	-0,30	4,55	Da (95%)	Da (55%)	Da (59%)	1,03	Da (99%)	0,50
C10	Visoka (96%)	-0,55	4,21	Da (88%)	Da (47%)	Da (80%)	2,00	Da (91%)	2,15
C11	Visoka (99%)	-0,51	7,22	Da (99%)	Da (55%)	Da (46%)	1,39	Ne (52%)	2,22
C12	Visoka (96%)	-0,40	8,86	Da (97%)	Da (70%)	Ne (65%)	1,00	Ne (57%)	0,98
C13	Visoka (89%)	-0,61	5,32	Da (99%)	Da (70%)	Da (80%)	1,00	Da (91%)	1,50
C14	Visoka (88%)	-0,64	4,77	Da (99%)	Da (70%)	Da (80%)	1,18	Da (91%)	1,50
C15	Visoka (79%)	-0,31	6,13	Da (84%)	Da (55%)	Da (42%)	1,00	Da (95%)	0,50
C16	Visoka (96%)	0,11	2,25	Da (99%)	Da (47%)	Da (59%)	2,00	Da (99%)	3,50

C17	Visoka (89%)	-0,68	5,51	Da (99%)	Da (70%)	Da (80%)	1,09	Da (85%)	1,50
C18	Visoka (88%)	-0,67	4,82	Da (99%)	Da (70%)	Da (80%)	1,28	Da (91%)	1,50
C19	Visoka (84%)	-0,37	7,87	Da (82%)	Da (47%)	Da (44%)	1,00	Da (85%)	0,50
C20	Visoka (94%)	-0,37	5,38	Da (95%)	Da (47%)	Da (65%)	1,00	Da (95%)	0,50
ChEMBL90882	Visoka (99%)	1,01	6,09	Da (79%)	Da (49%)	Ne (75%)	0,00	Da (99%)	2,07
ChEMBL42	Visoka (94%)	1,00	10,45	Ne (48%)	Da (46%)	Ne (71%)	1,00	Da (85%)	3,55
ChEMBL708	Visoka (99%)	0,19	3,77	Da (68%)	Da (70%)	Ne (71%)	0,00	Da (95%)	2,65
ChEMBL3233142	Visoka (99%)	0,63	10,81	Da (90%)	Da (70%)	Ne (90%)	1,00	Da (95%)	0,50

Legenda: BBB filter – kvalitativno predviđanje prolaska kroz KMB (visoka (High)/niska (Low)); LogBB - logaritam mozak/krv particionog koeficijenta; hum_fup% - procenat slobodnog leka u plazmi; P-gp_Substr – mogućnost delovanja kao supstrat za P-gp; CYP2D6_Inh – kvalitativno predviđanje inhibicije CYP2D6; CYP3A4_Inh - kvalitativno predviđanje inhibicije CYP3A4; CYP_Risk – ukupni rizik za vezivanje za CYP enzime; hERG_Filter – kvalitativno predviđanje inhibicije hERG kalijumovih kanala; Tox_Risk – ukupni skor predviđene toksičnosti jedinjenja.

Tabela A7.13. Predviđene fizičko-hemijske osobine proučavanih I₂-IR liganada.

Jedinjenje	pKi _{I₂-IR}	MWt	LogS	Solubility class	LogP _{o/w} (XLOGP3) < 5,00	LogP _{o/w} (MLOGP) < 4,15	LogP _{o/w} (WLOGP) < 5,60	T_PSA	RuleOf5
Idazoksan	7,41	204,23	-1,78	veoma rastvorni	0,70	0,99	0,07	42,85	0
Tracizolin	7,58	173,23	-1,95	veoma rastvorni	1,31	2,10	-1,09	26,00	0
BU99008	7,05	200,26	-2,27	rastvorni / veoma rastvorni	1,29	1,95	-1,15	30,93	0
LSL60101	8,13	214,22	-3,03	rastvorni	2,13	0,85	2,83	51,05	0
8c	7,73	350,31	-1,97	veoma rastvorni	0,27	0,98	1,71	95,08	0
9d	8,56	478,84	-4,19	umereno rastvorni	2,48	2,99	4,34	95,08	0
9b	9,74	432,45	-3,47	rastvorni	2,00	2,09	3,25	95,08	0
9c	10,28	426,40	-3,42	rastvorni	1,75	2,13	3,13	95,08	0
9a	7,97	364,33	-2,00	rastvorni	0,19	0,95	1,55	95,08	0
9z	7,90	502,50	-4,93	umereno rastvorni	3,38	3,16	4,79	95,08	1 (MWt)
9f	8,37	378,36	-2,25	rastvorni	0,56	1,19	1,94	95,08	0
9h	7,35	406,41	-2,80	rastvorni	1,18	1,65	2,72	95,08	0
9i	7,01	498,55	-4,48	umereno rastvorni	3,10	3,13	4,14	95,08	0
12d	7,55	496,83	-4,35	umereno rastvorni	2,58	3,36	4,90	95,08	0
9ad	7,96	461,84	-3,56	rastvorni	1,64	1,61	3,17	107,97	0
13d	7,87	508,86	-4,27	umereno rastvorni	2,45	2,68	4,35	104,31	1 (MWt)

Legenda: MWt – Molekulska masa <500 (g/mol); Log S – rastvorljivost u vodi; Solubility Class – klasifikacija solubilnosti prema logS vrednostima: nerastvorljivi < -10 < slabo rastvorni < -6 < umereno rastvorni < -4 < rastvorni < -2 < veoma rastvorni < 0 < visoko rastvorni; XLOGP3 – LogP vrednosti izračunate XLOGP programom; MLOGP – LogP vrednosti izračunate prema Moriguchi I. et al. 1992 Chem. Pharm. Bull.; WLOGP – LogP vrednosti izračunate prema Wildman SA and Crippen GM. 1999 J. Chem. Inf. Model.; TPSA – topološka polarna površina; RuleOf5 - pravilo Lipinskog.

Tabela A7.14. Predviđene farmakokinetičke osobine proučavanih I₂-IR liganada.

Jedinjenje	pK _i _{I₂-IR}	BBB Filter	hum_fup%	P-gp_Substr	P-gp_Inh	CYP_Risk	TOX_Risk
Idazoksan	7,41	Visoka (98%)	60,07	Ne (93%)	Ne (96%)	2,00	1,00
Tracizolin	7,58	Visoka (98%)	57,80	Ne (93%)	Ne (96%)	1,45	3,37
BU99008	7,05	Visoka (98%)	57,69	Ne (93%)	Ne (96%)	1,22	2,93
LSL60101	8,13	Visoka (98%)	9,98	Ne (93%)	Ne (96%)	0,44	0,00
8c	7,73	Visoka (77%)	23,11	Ne (93%)	Ne (96%)	0,00	1,00
B06, 9d	8,56	Visoka (75%)	6,51	Ne (93%)	Ne (58%)	1,21	0,23
9b	9,74	Visoka (74%)	10,27	Ne (93%)	Ne (63%)	1,54	0,39
9c	10,28	Visoka (77%)	7,89	Ne (93%)	Ne (63%)	1,25	1,00
9a	7,97	Visoka (76%)	27,81	Ne (93%)	Ne (96%)	0,77	0,68
9z	7,90	Visoka (70%)	3,62	Ne (93%)	Da (97%)	1,26	1,09
9f	8,37	Visoka (76%)	22,09	Ne (93%)	Ne (96%)	0,99	0,66
9h	7,35	Visoka (75%)	18,20	Ne (93%)	Ne (96%)	2,13	1,01
9i	7,01	Visoka (74%)	6,64	Ne (93%)	Ne (46%)	2,20	1,00
12d	7,55	Visoka (74%)	6,451	Ne (93%)	Da (43%)	1,21	0,28
9ad	7,96	Visoka (74%)	11,41	Ne (93%)	Ne (66%)	1,08	1,00
13d	7,87	Visoka (74%)	6,60	Ne (93%)	Da (43%)	1,19	0,00

Legenda: BBB filter – kvalitativno predviđanje prolaska kroz KMB; hum_fup% - procenat slobodnog leka u plazmi; P-gp_Substr – mogućnost delovanja kao supstrat za P-gp; P-gp_inh - mogućnost delovanja kao inhibitor P-gp; CYP_Risk – ukupni rizik za vezivanje za CYP enzime; Tox_Risk – ukupni skor predviđene toksičnosti jedinjenja.

Prilog B

Lista skraćenica

3D-QSAR - *3D- Quantitative Structure-Activity Relationship*
5-HT - *5-hydroxytryptamine* (5-hidroksitriptamin, serotonin)
5-HT_{1A}-R - Serotoninski 5-HT_{1A} receptor
5-HT_{2A}-R - Serotoninski 5-HT_{2A} receptor
5-HT_{2C}-R - Serotoninski 5-HT_{2C} receptor
AADC - *Aromatic Amino Acid Decarboxylase*
AB - Alchajmerova bolest
ABC - *ATP-Binding Cassette*
AC - *Adenylate Cyclase* (Adenilat ciklaza)
AD - *Applicability domain* (Domen primenljivosti)
AD - AutoDock
ADMET - Apsorpcija, distribucija, metabolizam, ekskrecija i toksičnost
AGP - *α_1 -Acid Glycoprotein* (α_1 -kiseli glikoprotein)
ALDH - *Aldehyde Dehydrogenase* (Aldehid-dehidrogenaza)
ALOGP2 - *Squared Ghose-Crippen octanol-water partition coefficient*
AMPA - α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
ANN - *Artificial Neural Network* (Veštačke neuronske mreže)
APP - *Amyloid Precursor Protein* (Amiloid prekursor protein)
A β - *Amyloid-Beta* (Amiloid-beta)
BBMEC - *Bovine Brain Microvessel Endothelial Cells* (Endotelne ćelije mikrosudova goveđeg mozga)
Caco-2 - Ćelije humanog epitela kolorektalnog adenokarcinoma
CADD - *Computer-Aided Drug Design* (Kompjuterske metode u dizajniranju lekova)
cAMP - *Cyclic Adenosine Monophosphate* (Ciklični adenzin monofosfat)
CCC - *Concordance Correlation Coefficient*
CGenFF - *CHARMM General Force Field*
cGMP - *Cyclic Guanosine Monophosphate* (Ciklični guanozin monofosfat)
ChAT - *Choline Acetyltransferase* (Holin acetiltransferaza)
CLACC - *Consistently Large Auto and Cross Correlation*
CNS - *Central Nervous System* (Centralni nervni sistem)
CoMFA - *Comparative Molecular Field Analysis*
COMT - *Catechol-O-methyltransferase* (Katehol-O-metiltransferaza)
Cryo-EM - *Cryogenic Electron Microscopy* (Kriogena elektronska mikroskopija)
CV - *Cross-Validation* (Unakrsna validacija)
CYP - *Cytochrome P450*
D₁-R - Dopaminski D₁ receptor
D₂-R - Dopaminski D₂ receptor
D₃-R - Dopaminski D₃ receptor
DAG - *Diacylglycerol* (Diacilglicerol)
DALYs - *Disability-Adjusted Life Years* (Godine života prilagođene invaliditetu)
DAT - *Dopamine Transporter* (Dopaminski transporter)
DMSO - *Dimethyl Sulfoxide* (Dimetilsulfoksid)
DOPAC - *3,4-Dihydroxyphenylacetic acid* (Dihidroksifenilsirćetna kiselina)
DOPC - *1, 2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine*
DR - *Dorsal raphe*
EPS - *Extrapyramidal Symptoms* (Ekstrapiramidalni neželjeni simptomi)
FBDD - *Fragment-Based Drug Design* (Metoda zasnovana na strukturi fragmenta)
FFD - *Fractional Factorial Design*

GA - *Genetic Algorithm* (Genetički algoritam)
 GABA - *Gamma-aminobutyric acid* (Gama-aminobuterna kiselina)
 GDP - *Guanosine Diphosphate* (Guanozin-difosfat)
 GETAWAY - *GEometry, Topology, and Atom-Weights Assembly*
 GFAP - *Glial Fibrillary Scidic Protein* (Glijalni fibrilarni kiseli protein)
 GIRK - *G Protein Gated Inward Rectifier Potassium*
 GPCR - *G-Protein Coupled Receptors* (G-protein-spregnuti receptori)
 GPCRdb - *GPCR database*
 GRIND - *GRID Independent Descriptors*
 GTP - *Guanosine Triphosphate* (Guanozin-trifosfat)
 H0p - *H autocorrelation of lag 0 / weighted by polarizability*
 H₁-R - Histaminski H₁ receptor
 H₃-R - Histaminski H₃ receptor
 HPLC - *High-Performance Liquid Chromatography* (Visokoefikasna tečna hromatografija)
 HSA - *Human Serum Albumin* (Humani serumski albumin)
 HVA - *Homovanillic acid* (Homovalinska kiselina)
 I₁-IR - I₁-imidazolinski receptor
 I₂-IR - I₂-imidazolinski receptor
 I₃-IR - I₃-imidazolinski receptor
 IAM - *Immobilized Artificial Membrane* (Tehnika imobilizovane veštačke membrane),
 IP₃ - *Inositol Trisphosphate* (Inozitol trifosfat)
 K_{ATP} - *ATP-sensitive potassium channel* (ATP-osetljivi kalijumov kanal)
 KM – Kičmena moždina
 KMB - Krvno-moždana barijera
 LBDD - *Ligand-Based Drug Design* (Metode zasnovane na strukturi liganda)
 LBVS - *Ligand-based virtual screening* (VS zasnovan na strukturi liganda)
 LSD - *Lysergic acid diethylamide* (Dietilamid lizerginska kiselina)
 LV - *Latent Variable* (Latentne varijable)
 MAO - *Monoamine Oxidase* (Monoaminooksidaza)
 MAOI - *Monoamine Oxidase Inhibitors* (Inhibitori monoaminooksidaze)
 MD - Molekulska dinamika
 MDCK - *Madin-Darby Canine Kidney* (Madin-Darby ćelije psećeg bubrega)
 MIF - *Molecular Interaction Fields* (Polja molekulskih interakcija)
 MIM - *Molecular Influence Matrix*
 MLR - *Multiple Linear Regression* (Multilinearna regresija)
 MR - *Median raphe*
 MW - *Molecular Weight* (Molekulska masa)
 N_{acc} - *Nucleus accumbens*
 NAMD - *Nano Scale Molecular Dynamics*
 NET - *Norepinephrine transporter* (Transporter noradrenalina)
 NMDA - *N-methyl-D-aspartate* (N-metil-D-aspartat)
 NMR - *Nuclear Magnetic Resonance* (Nuklearna magnetna rezonanca)
 NO - *Nitric Oxide* (Azotni oksid)
 NOS - *Nitric Oxide Synthases* (Azot oksid sintetaza)
 NRL - *Nucleus reticularis lateralis*
 OECD - *Organisation for Economic Co-operation and Development*
 PAMPA - *Parallel Artificial Membrane Permeability Assay* (Paralelni test permeabilnosti na veštačkim membranama)
 PB - Parkinsonova bolest
 PBL - *Porcine Polar Brain Lipid* (Lipidi mozga svinje)
 PBVS - *Pharmacophore-based virtual screening* (VS zasnovan na farmakofori)
 PCA - *Principal Component Analysis* (Analiza glavnih komponenti)

PDB - *Protein Data Bank*
 P-gp - P-glikoprotein
 PKA - *Protein kinase A* (Protein kinaza A)
 PKC - *Protein Kinase C* (Protein kinaza C)
 PLC - *Phospholipase C* (Fosfolipaza C)
 PLS - *Partial Least Square Regression* (Metoda parcijalnih najmanjih kvadrata)
 PM3 - *Parameterized Model revision 3*
 POPC - *1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine* (1,2-palmitoil-oleoil-sn-glicero-3-fosfoholinom)
 PRESS - *Predicted Residual Sum of Squares* (Predviđena suma kvadrata)
 PSA - *Polar Surface Area* (Polarna površina)
 Q^2 - *Cross-Validated Squared Correlation Coefficient*
 QSAR - *Quantitative Structure-Activity Relationship* (Metoda kvantitativnog odnosa strukture i aktivnosti)
 QSPR - *Quantitative Structure-Property Relationship* (Metoda kvantitativnog odnosa strukture i osobina jedinjenja)
 R&D - *Research and Development* (Istraživanje i razvoj lekova)
 R^2 - Koeficijent determinacije za trening set
 R^2_{pred} - Koeficijent determinacije za test set
 RBF - *Radial Basis Function* (Radijalna bazna funkcija)
 RhoGEF - *Rho Guanine Nucleotide Exchange Factors* (Faktor razmene guanin nukleotida)
 RMSD - *Root-Mean Square Deviation* (Srednja kvadratna devijacija)
 RMSEE - *Root Mean Square Error of Estimation* (Srednja kvadratna greška procene)
 RMSEP - *Root Mean Square Error of Prediction* (Srednja kvadratna greška predviđanja)
 RVLM - *Rostral ventrolateral medulla*
 SA - *Synthetic Accessibility*
 SASA - *Solvent Accessible Surface Area*
 SBDD - *Structure-Based Drug Design* (Metode zasnovane na strukturi ciljnog mesta dejstva)
 SBVS - *Structure-based virtual screening* (VS zasnovan na strukturi ciljnog mesta delovanja)
 SMD - *Steered Molecular Dynamics* (Usmerena molekulska dinamika)
 SN - *Substantia nigra*
 SNRI - *Serotonin and Norepinephrine Reuptake Inhibitors* (Inhibitora preuzimanja serotonina i noradrenalina)
 SolvEMt_3D - *Length of the solvation energy moment vector*
 SSRI - *Selective Serotonin Reuptake Inhibitors* (Selektivni inhibitori preuzimanja serotonina)
 SVM - *Support-Vector Machine* (Metoda podržavajućih vektora)
 TCA - *Tricyclic Antidepressants* (Triciklični antidepresivi)
 TM – Transmembranski
 TPH - *Tryptophan Hydroxylase* (Triptofan hidroksilaza)
 TPSA - *Topological Polar Surface Area* (Topološka polarna površina)
 VD - Virtuelni doking
 VdW - *Van der Waals*
 VIP - *Variable Importance in the Projection*
 VMD - *Visual Molecular Dynamics*
 VS - *Ventral striatum*
 VS - *Virtual screening*
 VTA - *Ventral Tegmental Area* (Ventralno tegmentalna regija)
 WHO - *World Health Organization* (Svetska zdravstvena organizacija)
 α_2 -AR - α_2 adrenoreceptor

Biografija

Milica M. Radan rođena je 21.02.1994. godine u Nevesinju, Republika Srpska/Bosna i Hercegovina, gde je završila osnovnu i srednju školu sa dodeljenom diplomom „Vuk Karadžić“. Farmaceutski fakultet – Univerzitet u Beogradu, smer farmacija, upisala je školske 2012/2013. godine, a diplomirala je 2017. godine sa opštim uspehom 9,20. Diplomski rad odbranila je na Katedri za farmaceutsku hemiju Farmaceutskog fakulteta – Univerzitet u Beogradu (pod mentorstvom prof. dr Katarine Nikolić) i stekla zvanje magistra farmacije. Tokom studija je bila na studijskom boravku u Poljskoj. Nakon završetka diplomskih studija obavila je pripravnički staž i položila stručni ispit za magistra farmacije u novembru 2018. godine. Doktorske akademske studije, modul Farmaceutska hemija, upisala je školske 2017/2018. godine na Farmaceutskom fakultetu – Univerzitet u Beogradu. Od aprila 2018. godine bila je angažovana kao istraživač-pripravnik na Katedri za farmaceutsku hemiju Farmaceutskog fakulteta – Univerzitet u Beogradu, gde je učestvovala i u izvođenju praktične nastave iz predmeta Farmaceutska hemija 3. Mentor je jednog studentskog naučnoistraživačkog rada. U zvanje istraživač saradnik izabrana je maja 2021. godine. Od oktobra 2021. godine zaposlena je u Institutu za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić“, u Odseku za farmaceutska istraživanja i razvoj. Koautor i autor je jednog rada objavljenog u međunarodnom časopisu od izuzetne vrednosti (M21a), tri rada u vrhunskim međunarodnim časopisima (M21), dva rada u istaknutim međunarodnim časopisima (M22), dva rada u vrhunskom nacionalnom časopisu (M51), tri predavanja po pozivu sa međunarodnih skupova štampana u izvodu (M32), jednog saopštenje sa međunarodnog skupa štampano u celini (M33) i 16 saopštenja sa međunarodnih skupova štampana u izvodu (M34) .

Izjava o autorstvu

Ime i prezime autora Milica Radan

Broj indeksa 20/2017

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

Određivanje strukture farmakofore, dizajn i *in vitro* ispitivanje liganada sa višestrukim dejstvom kao potencijalno efikasnijih terapeutika složenih neuroloških i mentalnih oboljenja

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada;
- da disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za sticanje druge diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova;
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršila autorska prava i koristila intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis autora

U Beogradu, _____

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora	<u>Milica Radan</u>
Broj indeksa	<u>20/2017</u>
Studijski program	<u>Doktorske akademske studije – farmaceutska hemija</u>
Naslov rada	<u>Određivanje strukture farmakofore, dizajn i <i>in vitro</i> ispitivanje liganada sa višestrukim dejstvom kao potencijalno efikasnijih terapeutika</u>
Mentor	<u>Prof. dr Katarina Nikolić, vanredni profesor na Katedri za farmaceutsku hemiju, Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet</u>

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predala radi pohranjivanja u **Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci u vezi sa dobijanjem akademskog naziva doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis autora

U Beogradu, _____

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

Određivanje strukture farmakofore, dizajn i *in vitro* ispitivanje liganada sa višestrukim dejstvom kao potencijalno efikasnijih terapeutika složenih neuroloških i mentalnih oboljenja

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim prilogima predala sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu i dostupnu u otvorenom pristupu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučila.

1. Autorstvo (CC BY)
2. Autorstvo – nekomercijalno (CC BY-NC)
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada (CC BY-NC-ND)
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima (CC BY-NC-SA)
5. Autorstvo – bez prerada (CC BY-ND)
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima (CC BY-SA)

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci.
Kratak opis licenci je sastavni deo ove izjave).

Potpis autora

U Beogradu, _____

1. **Autorstvo.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.
2. **Autorstvo – nekomercijalno.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
3. **Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.
4. **Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.
5. **Autorstvo – bez prerada.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
6. **Autorstvo – deliti pod istim uslovima.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.