



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ Ι: ΧΗΜΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

Διπλωματική Εργασία

*Ανάπτυξη Μεθόδου Πρόβλεψης
Καρδιοτοξικότητας Φαρμάκων*



Κιούσης Κωνσταντίνος

Επιβλέπων Καθηγητής: Τσόπελας Φώτιος

ΑΘΗΝΑ 2021, Ε.Μ.Π.

Πρόλογος

Η διπλωματική εργασία με τίτλο «*Ανάπτυξη Μεθόδου Πρόβλεψης Καρδιοτοξικότητας Φαρμάκων*» εκπονήθηκε στη Σχολή Χημικών Μηχανικών Ε.Μ.Π κατά τη διάρκεια των ετών 2020-2021, υπό την επίβλεψη του καθηγητή Τσόπελα Φώτιου.

Καταρχάς, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Τσόπελα Φ. για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με το συγκεκριμένο θέμα και για τις αναγκαίες συμβουλές και γνώσεις τις οποίες μου έδωσε κατά τη διάρκεια της ερευνητικής και συγγραφικής περιόδου της διπλωματικής εργασίας.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά το υποψήφιο διδάκτορα Στεργιόπουλο Χρύσανθο για την καθοδήγηση και τη βοήθεια που μου παρείχε όταν οι συνθήκες έγιναν πιο απαιτητικές.

Κιούσης Κωνσταντίνος
Φεβρουάριος 2021

Περίληψη

Η καρδιοτοξικότητα που προκαλείται εξαιτίας της παρεμπόδισης των καναλιών hERG από φάρμακα είναι μία σοβαρή αιτία για την απόσυρση φαρμάκων που βρίσκονται ήδη στο εμπόριο και πλέον αποτελεί μία από τις μεγαλύτερες προκλήσεις που καλούνται να αντιμετωπίσουν οι φαρμακοβιομηχανίες διεθνώς. Στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας εξετάζεται η συσχέτιση της καρδιοτοξικότητας με βιοχρωματογραφικούς δείκτες και με συντελεστές λιποφιλίας και επιδιώκεται η ανάπτυξη μεθόδου πρόβλεψης δυνητικά καρδιοτοξικών φαρμάκων.

Αρχικά, πραγματοποιείται μία αναλυτική περιγραφή του θεωρητικού υποβάθρου των φαρμάκων, της διαδικασίας με την οποία διατίθενται στο εμπόριο και τους λόγους για τους οποίους αποσύρονται. Ακολούθως, παρουσιάζονται δύο σημαντικές αιτίες απόσυρσης, η ηπατοτοξικότητα και η καρδιοτοξικότητα, με περισσότερη έμφαση στη δεύτερη. Η καρδιοτοξικότητα λόγω παρεμπόδισης των καναλιών hERG είναι η κατηγορία τοξικότητας η οποία θα αποτελέσει το κύριο αντικείμενο της εργασίας για αυτό το λόγο γίνεται εκτεταμένη ανάλυση των μηχανισμών με τους οποίους λαμβάνει χώρα και τις συνέπειες τις οποίες προκαλεί. Εν συνεχεία, περιγράφονται κάποιες φυσικοχημικές και μοριακές παράμετροι οι οποίες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της μεθόδου. Επιπροσθέτως, γίνεται σύντομη περιγραφή η οποία πραγματεύεται τις αρχές που διέπουν τη χρωματογραφία και ορίζονται με τρόπο κατανοητό οι κατηγορίες της βιομημητικής χρωματογραφίας οι οποίες είναι η χρωματογραφία ακινητοποιημένων μεμβρανών (IAM), η χρωματογραφία ακινητοποιημένων πρωτεϊνών (HSA, AGP) και η μικκυλιακή χρωματογραφία. Το θεωρητικό μέρος της εργασίας ολοκληρώνεται εφόσον, αναλυθούν οι στατιστικές και χημειομετρικές μέθοδοι οι οποίες εφαρμόζονται για την επεξεργασία δεδομένων.

Το ερευνητικό μέρος ξεκινάει με μία διεξοδική αναζήτηση στη σχετική βιβλιογραφία με σκοπό τη συλλογή δεδομένων που αφορούν φάρμακα με γνωστή καρδιοτοξική συμπεριφορά και άλλα χωρίς. Κατόπιν, αναζητώνται βιοχρωματογραφικοί δείκτες, οι συντελεστές λιποφιλίας LogP-LogD, οι φυσικοχημικές και μοριακές παράμετροι και οι τιμές των συγκεντρώσεων IC₅₀ για τα επιλεγόμενα φάρμακα. Επιπρόσθετα, σχηματίζονται διαγράμματα βιοχρωματογραφικών δεικτών με την πιθανότητα να εκδηλώσουν καρδιοτοξική συμπεριφορά, με σκοπό τη εύρεση cut off values. Ακολουθούν επεξεργασίες των δεδομένων με στατιστικές μεθόδους ανάμεσα τους είναι, η μέθοδος των ελαχίστων τετραγώνων, η πολλαπλή γραμμική παλινδρόμηση, η μοντελοποίηση μίας κλάσης και η διακριτή ανάλυση μερικών ελαχίστων τετραγώνων. Τα αποτελέσματα τα οποία εξάγονται, υποδεικνύουν μια ικανοποιητική συσχέτιση του δείκτη logk IAM-DD2 με την καρδιοτοξικότητα με εξίσωση $\text{pIC}_{50} = -4.091(\pm 0.303) + 1.334(\pm 0.131) \cdot \log k(\text{IAM.DD2})$ και $R^2 = 0.839$. Επιπλέον, διαφαίνεται μία συσχέτιση με τους δείκτες ακινητοποιημένης α1 όξινης γλυκοπρωτεΐνης (AGP), τους υπόλοιπους δείκτες ακινητοποιημένων μεμβρανών και τους συντελεστές λιποφιλίας-LogP, LogD- δίχως όμως να μπορεί να ποσοτικοποιηθεί η εξάρτησή τους ικανοποιητικά. Για τους δείκτες ακινητοποιημένης αλβουμίνης (HSA) και μικκυλιακής χρωματογραφίας δεν προσδιορίζεται κάποια αξιόλογη εξάρτηση. Τέλος, παρατηρείται πως το θετικό φορτίο διαδραματίζει πρωταρχικό ρόλο στην καρδιοτοξικότητα και τη βελτίωση της συσχέτισης των παραπάνω δεικτών. Τα μοντέλα που εξήχθησαν από τα δεδομένα λιποφιλίας και φυσικοχημικών παραμέτρων παρείχαν αξιόλογες συσχετίσεις με $R^2 = 0.727$ για τη μοντελοποίηση κλάσης και $R^2 = 0.766$ για τη μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων.

Λέξεις-Κλειδιά: Φαρμακευτική Καρδιοτοξικότητα, Κανάλια hERG, Βιομημητική Χρωματογραφία, Στήλες Ακινητοποιημένων Τεχνητών Μεμβρανών, Αλβουμίνη Ανθρώπινου Ορού, α1 Όξινη Γλυκοπρωτεΐνη

Abstract

Drug-induced cardiotoxicity caused by hERG channels inhibition is a severe reason for drug withdrawal and is now one of the biggest challenges that the pharmaceutical industry has to face internationally. In the context of the present diploma thesis a correlation of cardiotoxicity with biomimetic chromatographic indicators and lipophilicity coefficients is investigated and the development of a method capable of predicting potentially cardiotoxic drugs is pursued.

First of all, thorough descriptions of the theoretical background of medicines, the process by which they are marketed and the reasons for their withdrawal, are provided. Furthermore, two important causes of withdrawal are presented, hepatotoxicity and cardiotoxicity, with more emphasis given on the second one. Drug-induced cardiotoxicity due to hERG blockade will be at the center of focus during this thesis for this reason extensive analyses, of the mechanism by which it takes place and the consequences it causes, are conducted. Subsequently, the essential- for model development- physicochemical and molecular parameters are defined. In addition, a brief description provides information about the principles of chromatography and comprehensively defines the categories of biomimetic chromatography which are immobilized membrane chromatography (IAM), immobilized protein chromatography (HSA, AGP) and micellar chromatography. The theoretical part of the work is completed once the statistical methods used for data processing have been demonstrated.

The research part initiates with a detailed search in the relevant scientific literature in order to collect data on drugs with known cardiotoxic behavior and others non cardiotoxic drugs. Then, bio-chromatographic indicators, physicochemical and molecular parameters and the values of IC_{50} concentrations for the selected drugs are sought. In addition, plots, which illustrate the correlation of bio-chromatographic indicators with the possibility of exhibiting cardiotoxic behavior, are formed in order to find cut off values. The data are, then, processed with statistical and chemometric methods such as the least squares regression and multiple linear regression, partial least square (PLS) and class modelling. The obtained results indicate a satisfactory correlation of $\log k$ IAM-DD2 index with cardiotoxicity, providing equation $pIC_{50} = -4.091 (\pm 0.303) + 1.334 (\pm 0.131) * \log k (IAM.DD2)$ and $R^2 = 0.839$. For immobilized albumin (HSA) and micellar chromatography indicators no significant dependence is identified. Finally, it is observed that the positive charge plays a primary role in cardiotoxicity and in the improvement of the correlation of the above indicators. The models extracted from the lipophilicity and physicochemical parameters data provided significant correlations with $R^2 = 0.727$ for the class modelling and $R^2 = 0.766$ for the partial least squares' method.

Keywords: Drug-induced Cardiotoxicity, hERG channels, Biomimetic Chromatography, Immobilized Artificial Membranes-IAM, Human Serum Albumin-HSA, Alpha-1 Acid Glycoprotein-AGP

Περιεχόμενα

Πρόλογος.....	1
Περίληψη	2
Abstract.....	3
Εισαγωγή και σκοπός	6
1. Θεωρητικό Υπόβαθρο Φαρμάκου	7
1.1. Ορισμός φαρμάκου	7
1.2. Ένωση-οδηγός	7
1.3. Σχεδιασμός Ένωσης-Οδηγού	8
1.4. Στρατηγικές για την ανάπτυξη νέων ενώσεων	8
1.5. Διαδικασία Ανακάλυψης Νέων Φαρμάκων	10
2. Απόσυρση Φαρμάκων	11
3. Τοξικότητες	12
3.1. Ηπατοτοξικότητα.....	12
3.2. Καρδιοτοξικότητα	14
3.2.1. Ιοντικοί διάλυοι.....	15
3.2.2. Ιστορική αναδρομή στους διαύλους hERG.....	16
3.2.3. Δομή καναλιών hERG.....	16
3.2.4. Καρδιοτοξικότητα λόγω παρεμπόδισης hERG καναλιών	18
3.2.5. Τρόποι πρόσδεση φαρμάκων στα κανάλια hERG.....	23
4. Καθοριστικές Φυσικοχημικές Παράμετροι για τη Δράση ενός Φαρμάκου.....	25
4.1. Λιποφιλία.....	25
4.2. Βαθμός Ιοντισμού και φορτίο	26
4.3. Δυνατότητα σχηματισμού δεσμών υδρογόνου	27
4.3.1. HBA, HBD και HAD	27
4.2.1. Εμβαδόν Πολικής επιφάνειας, Polar Surface Area- PSA (Topological Polar Surface Area- TPSA)	27
4.2.2. Παράμετροι Abraham.....	27
4.4. Μοριακό Βάρος MW.....	28
4.5. Άλλες παράμετροι.....	28
5. Εισαγωγή στη Χρωματογραφία και τη Βιομημητική Χρωματογραφία.....	29
5.1. Χρωματογραφία Ακίνητοποιημένων Τεχνητών Μembrανών IAM.....	31
5.2. Χρωματογραφία Ακίνητοποιημένων Πρωτεϊνών πλάσματος	33
5.3. Μικκυλιακή Χρωματογραφία Βιοκατανομής (Biopartitioning Micellar Chromatography- BMC)	34
6. Μέθοδοι Στατιστικής και Χημειομετρικής Επεξεργασίας Δεδομένων.....	37

6.1.	Πολλαπλή Γραμμική Ανάλυση Παλινδρόμησης	37
6.2.	Πολυμεταβλητή Ανάλυση Δεδομένων	38
6.2.1.	Ανάλυση κυρίων συνιστωσών (PCA).....	38
6.2.2.	Μοντελοποίηση Κλάσεων (Class Modelling).....	39
6.2.3.	Ανάλυση μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS).....	39
7.	Ερευνητικό-Πειραματικό Μέρος.....	41
7.1.	Συλλογή Δεδομένων	41
7.2.	Επεξεργασία Δεδομένων	56
7.2.1.	Ποιοτικά διαγράμματα Πιθανότητας	56
7.2.2.	Απλή Γραμμική Παλινδρόμηση	63
7.2.3.	Πολλαπλή Γραμμική Παλινδρόμηση.....	71
7.2.4.	Μοντελοποίηση μιας κλάσης- Μέθοδος SIMCA (ήπια ανεξάρτητη μοντελοποίηση αναλογίας κλάσεων).....	75
7.2.5.	Ανάλυση μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Square).....	76
8.	Συζήτηση Αποτελεσμάτων	78
9.	Συμπεράσματα.....	82
10.	Βιβλιογραφία	84
	Παράρτημα	91

Εισαγωγή και σκοπός

Στο λυκαυγές της δεκαετίας του 1990 γίνεται αντιληπτή η συσχέτιση του γονιδίου human Ether-à-go-go-Related Gene (hERG) με τους διαύλους καλίου και ακόμη, γίνεται γνωστό το γεγονός πως η παρεμπόδιση των καναλιών αυτών φέρει το ενδεχόμενο πρόκλησης επιμήκυνσης του διαστήματος QT και κατά συνέπεια, την εκδήλωση πολύμορφης κοιλιακής ταχυκαρδίας(TdP) ή στη χειρότερη των περιπτώσεων, αποτυχία της καρδιάς και θάνατο. Παράλληλα με αυτήν την πληροφορία, εξάγεται το συμπέρασμα πως ένα φάρμακο το οποίο δεν έχει σχεδιαστεί για να αλληλεπιδρά με την καρδιά είναι πολύ πιθανό να προκαλέσει καρδιοτοξικότητα μέσω παρεμπόδισης των καναλιών hERG, εξηγώντας με αυτόν τον τρόπο το θάνατο ή την επιδείνωση της υγείας ασθενών που φαινομενικά θα πρέπει να αναρρώνουν. Η εποχή αυτή σηματοδοτείται από την απόσυρση φαρμάκων από την αγορά όπως η αστεμιζόλη και η τερφεναδίνη λόγω αναστολής των διαύλων hERG, γεγονότα τα οποία επιβεβαιώνουν τα παραπάνω συμπεράσματα. Ακολούθησαν πολλές, ακόμα, αποσύρσεις με την ίδια αιτιολογία. Στη σύγχρονη εποχή η ανάπτυξη νέων φαρμάκων είναι μία ιδιαίτερα δαπανηρή διαδικασία και μία τέτοια απόσυρση θα ήταν οικονομικά καταστρεπτική για αυτό το λόγο γίνεται προσπάθεια για την ανάπτυξη μεθόδων πρόβλεψης αυτού του είδους καρδιοτοξικότητας ή τουλάχιστον την ανακάλυψη της αποτυχίας αυτών το συντομότερο δυνατόν (Fail Fast-Fail Cheap). Μερικοί συνηθισμένοι τρόποι είναι οι αναλύσεις σε κυτταρικές σειρές ζώων και άλλα μοντέλα τα οποία βασίζονται στις ιδιότητες των φαρμάκων δίχως, όμως, υψηλής ακρίβειας αποτελέσματα. Η πρόβλεψη της φαρμακευτικής καρδιοτοξικότητας είναι από τα πιο επίκαιρα προβλήματα για αυτό το λόγο επιδιώκεται η ανάπτυξη μεθόδου πρόβλεψης της καρδιοτοξικότητας με τη χρήση βιομιμητικών δεικτών και συντελεστών λιποφιλίας μία διαδικασία η οποία χαρακτηρίζεται από ταχύτητα και οικονομία πόρων.^{[1][2]}

1. Θεωρητικό Υπόβαθρο Φαρμάκου

1.1. Ορισμός φαρμάκου

Καταρχάς, σημαντικό κρίνεται να οριστεί η λέξη φάρμακο ούτως ώστε να είναι ξεκάθαρο όταν γίνεται χρήση της λέξης. Πιο συγκεκριμένα, το φάρμακο είναι εκείνο το αγαθό το οποίο θα χρησιμοποιηθεί με τέτοιο τρόπο ώστε να θεραπευτεί ή να προληφθεί μία ασθένεια η οποία ταλαιπωρεί την υγεία ενός οργανισμού. Ο ορισμός αυτός θα μπορούσε να χαρακτηριστεί ως πιο εκλαϊκευμένος και πιο κατανοητός από το γενικότερο σύνολο. Ωστόσο, από μια πιο επιστημονική οπτική ως φάρμακο ορίζεται η δραστική χημική ουσία η οποία θα επιφέρει κάποια βιολογική δράση στον οργανισμό με σκοπό τη διάγνωση, την πρόληψη, την αντιμετώπιση κάποιας ασθένειας ή την καταπράυνση συμπτωμάτων που θα πιθανώς προκύπτουν από μία ασθένεια.

1.2. Ένωση-οδηγός

Επί της ουσίας, το φάρμακο αποτελείται από μία ένωση-οδηγό (lead compound) της οποίας τα φυσικοχημικά, στερεικά και ηλεκτρονιακά χαρακτηριστικά την καθιστούν κατάλληλη για την επίτευξη μίας μεταβολής σε ένα βιολογικό στόχο. Το σύνολο αυτών των χαρακτηριστικών συναποτελούν τη φαρμακοφόρο δομή. Στόχος είναι η ένωση-οδηγός να διαθέτει τις κατάλληλες ιδιότητες ώστε να μπορεί να απορροφηθεί από τον οργανισμό, να προσεγγίσει τον επιθυμητό στόχο αλλά και να μπορεί να τροποποιηθεί χημικά ώστε να αλληλεπιδράσει με το βέλτιστο τρόπο με τον στόχο αυτό. Κάποιες χαρακτηριστικές ιδιότητες είναι το μοριακό του βάρος, το πλήθος δεσμών υδρογόνου, η λιποφιλία και άλλες φυσικοχημικές ιδιότητες που θα αναλυθούν εκτενέστερα σε ακόλουθες ενότητες.^[3]

Η ένωση-οδηγός είναι δυνατόν να βρεθεί σε υποστρώματα ενζύμων, σε υποστρώματα ήδη υπάρχοντων φαρμάκων, σε κλινικές δοκιμές, σε μελέτες μεταβολισμού και τέλος σε ελέγχους νέων ενώσεων είτε τυχαία είτε στοχευμένα. Ο σχεδιασμός της ένωσης-οδηγού έπεται συνήθως την ανακάλυψη μιας οδηγού-δομής (hit). Οι τελευταίες είναι ενώσεις οι οποίες υφίστανται ένα πολύ γρήγορο βιολογικό έλεγχο ο οποίος αντλεί πληροφορίες για το αν ένωση εμφανίζει κάποια αλληλεπίδραση με τον επιθυμητό στόχο. Ακολούθως, η ένωση δέχεται μια σειρά βελτιστοποιήσεων με σκοπό την καλύτερη αλληλεπίδραση με τον στόχο αυτό. Ένα παράδειγμα μια βελτιστοποίησης είναι βελτίωση συγγένειας ή εκλεκτικότητας ως προς τον στόχο.^[3]

Οι βιολογικοί στόχοι των ενώσεων είναι απαραίτητοι διότι δρουν συνεργατικά για να επιτευχθεί η βιολογική δράση του φαρμάκου. Χαρακτηριστικοί τέτοιοι στόχοι είναι πρωτεϊνικά μόρια όπως υποδοχείς, οι οποίοι χρησιμεύουν στη μεταφορά σημάτων και με την πρόσδεση σε αυτούς πραγματοποιούνται ή αδρανοποιούνται λειτουργίες, μεταφορείς οι οποίοι ενισχύουν τη μετακίνηση ουσιών μέσω των κυττάρων και ένζυμα τα οποία αποτελούν καταλύτες πολλών βιολογικών αντιδράσεων. Μία πολύ σημαντική κατηγορία βιολογικών στόχων η οποία θα εμφανίζεται τακτικά είναι οι διάλυτοι ιόντων. Οι τελευταίοι είναι πρωτεΐνες με πολύ λειτουργικό ρόλο οι οποίες βρίσκονται διαμεμβρανικά του κυττάρου και ελέγχουν την δίοδο των ιόντων επιτρέποντας εκλεκτικά κάθε φορά. Στην κατηγορία αυτή υπάγονται οι διάλυτοι κατιόντων (K^+ , Na^+ , Ca^{2+}) και ανιόντων Cl^- . Ένα ποσοστό φαρμάκων κοντά στο 13% στοχεύει διαύλους ιόντων.^[3]

Γίνεται, λοιπόν, αντιληπτό ότι ο σχεδιασμός των φαρμάκων οφείλει να πραγματοποιηθεί με τέτοιο τρόπο ώστε να υπάρχει η βέλτιστη αλληλεπίδραση με τον στόχο. Εντούτοις, πολλές φορές είναι εκείνες οι οποίες το φάρμακο δεν αλληλεπιδράει μόνο με τον επιθυμητό στόχο αλλά και με άλλους, προκαλώντας περιττές δράσεις στον οργανισμό τις λεγόμενες παρενέργειες. Να σημειωθεί ότι υπάρχουν κάποιοι στόχοι οι οποίοι δεν πρέπει να αλληλεπιδρούν με ξένες για τον οργανισμό ενώσεις και χαρακτηρίζονται ως αντι-στόχοι. Μία πολύ σημαντική κατηγορία τέτοιων αντι-στόχων είναι κάποιοι δίαυλοι ιόντων καλίου οι οποίοι ονομάζονται human Ether-à-go go-Related Gene, (hERG) και ελέγχονται από το γονίδιο hERG.^[3]

1.3. Σχεδιασμός Ένωσης-Οδηγού

Η ένωση-οδηγός, όπως περιγράφηκε παραπάνω, φέρει τη φαρμακοφόρο δομή η οποία είναι υπεύθυνη για τις υπερμοριακές αλληλεπιδράσεις της ένωσης με τον στόχο. Αξιοσημείωτο είναι πως η ύπαρξη της είναι αναγκαία συνθήκη για την εκδήλωση της επιθυμητής δράσης αλλά αυτό δε σημαίνει αυτομάτως πως θα πραγματοποιηθεί αυτή η δράση είναι δηλαδή μία μη ικανή συνθήκη. Μία συμφυής έννοια με τη φαρμακοφόρο δομή είναι αυτή του δομικού υποβάθρου (scaffold) το οποίο αποτελεί το κεντρικό τμήμα του μορίου και ουσιαστικά διαμορφώνει τη γεωμετρική του υπόσταση στο χώρο. Η γεωμετρία του μορίου καθορίζει την ευκαμψία ή τη δυσκαμψία του μορίου καθώς υποδεικνύει πως θα διαταχθούν οι υποκαταστάτες. Άλλες σημαντικές ιδιότητες οι οποίες καθορίζονται από το δομικό υπόβαθρο είναι λιποφιλία, η υδροφιλία και η πολικότητα.^[3]

Στην ανακάλυψη νέων ενώσεων διάφορες στρατηγικές είναι αυτές οι οποίες ακολουθούνται παρόλα ταύτα δεν είναι λίγες οι φορές στις οποίες πρωταγωνιστικό ρόλο διαδραμάτισε ο παράγοντας της τύχης (serendipity). Ένα πολύ χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι αυτό της πενικιλίνης η οποία ανακαλύφθηκε τυχαία το 1928 όταν ο Alexander Fleming παρατήρησε πως η ουσία αυτή που υπάρχει στη μούχλα αναστέλλει την ανάπτυξη των βακτηρίων. Μια ακόμα αντιπροσωπευτική περίπτωση τυχαίας ανακάλυψης είναι αυτή της σιλδεναφίλης, η ένωση αυτή μελετήθηκε στις αρχές της δεκαετίας του 1990 ως φάρμακο για την καρδιά για τη μείωση της υπέρτασης, ωστόσο οι ερευνητές παρατήρησαν πως μια ενδιαφέρουσα παρενέργεια ήταν η αύξηση της στυτικής λειτουργίας των ανδρών, κατ' ακολουθίαν ξεκίνησαν οι μελέτες για το γνωστό φάρμακο με την εμπορική ονομασία Viagra.^[4]

1.4. Στρατηγικές για την ανάπτυξη νέων ενώσεων

Οι στρατηγικές οι οποίες αναφέρθηκαν άνωθεν περιγράφονται ακολούθως:

- *Χημικές τροποποιήσεις φαρμάκων τα οποία έχουν ήδη ανακαλυφθεί ή εμφανίζουν ανεπιθύμητες παρενέργειες.* Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για τη βελτίωση της δράσης κάποιων φαρμάκων ούτως ώστε να παρουσιάσουν ενισχυμένη βιολογική δράση. Αυτό επιτυγχάνεται με πολλούς τρόπους όπως με την αντικατάσταση κάποιων υποκαταστατών στη φαρμακοφόρο δομή με άλλους οι οποίοι δε θα αλλάξουν δραματικά τη δράση του μορίου. Η υποκατάσταση αυτή ονομάζεται βιο-ιστοστερης. Άλλοι τρόποι είναι η αλλαγή των ατόμων της ανθρακικής αλυσίδας, το άνοιγμα ή το κλείσιμο του δακτυλίου ενός μορίου, η εισαγωγή των διπλών δεσμών ή η μετατροπή

των διπλών σε απλούς, η εισαγωγή διακλαδώσεων και άλλες πολλές. Οποιαδήποτε χημική μεταβολή της φαρμακοφόρου δομής είναι πολύ πιθανό να προσδώσει διαφορετικές ιδιότητες στην ένωση επομένως και διαφορετικές αλληλεπιδράσεις με τον κάθε στόχο και αυτό είναι αυτό που επιδιώκεται κάθε φορά.

- *Χρήση της γνώσης που αποκτάται από τη μελέτη της φύσης -μίμηση της φύσης.* Η βιομιμητική είναι μία επιστήμη που μελετά τους μηχανισμούς της φύσης και τους μιμείται. Στην ανακάλυψη φαρμάκων η συνεισφορά της είναι πολύ σημαντική διότι διάφορα φυσικά προϊόντα αποτελούν αξιοσημείωτη αφετηρία για την παραγωγή βιοδραστικών ενώσεων. Τα φυτά με την τεράστια ποικιλία τους είναι σημαντικές πηγές τέτοιου είδους ενώσεων. Ένα παράδειγμα η ταξόλη η οποία απομονώθηκε από το φλοιό του έλατου *Taxus brevifolia* και εμφανίζει αντικαρκινική δράση αναχαιτίζοντας την ανάπτυξη των ευκαρυωτικών κυττάρων.
- *Έρευνα πάνω στο μεταβολισμό υπάρχοντων φαρμάκων.* Ο τρόπος με τον οποίο ο οργανισμός μεταβολίζει τις ενώσεις που εισέρχονται είναι πληροφορία υψίστης σημασίας για το σχεδιασμό ενός φαρμάκου. Η γνώση των μετατροπών που υφίσταται, αξιοποιείται με τέτοιο τρόπο ώστε να βελτιστοποιηθούν οι ήδη υπάρχουσες ενώσεις ή να δημιουργηθούν καινούργιες.
- *Συστηματική διαλογή (Screening).* Με τη μέθοδο αυτή γίνονται ταχείς βιολογικοί έλεγχοι ενός πλήθους χημικών ενώσεων σε έναν ή και περισσότερους στόχους για να διαπιστωθεί αν εκδηλώνονται οι επιθυμητές δράσεις. Έτσι, δημιουργούνται τεράστιες βιβλιοθήκες ταυτοποιημένων χημικών ενώσεων οι οποίες μπορούν να αξιοποιηθούν μελλοντικά. Να σημειωθεί ότι με αυτόν τον τρόπο αναπτύσσονται κυρίως οδηγοί-δομή και όχι ενώσεις-οδηγοί.
- *Εικονική διαλογή (Virtual Screening).* Η διαλογή αυτή βασίζεται στο σκανάρισμα μεγάλων βιβλιοθηκών δομών πολλών ενώσεων για να αξιολογήσει και να φιλτράρει εκείνες οι οποίες είναι ικανές να χρησιμοποιηθούν σε βιολογικούς ελέγχους. Η εικονική διαλογή πραγματοποιείται με ειδικά λογισμικά τα οποία έχουν τη δυνατότητα να αξιολογήσουν ένα πλήθος εικονικών δομών ενώσεων άνω των 10⁶⁰.
- *Μελέτη των εμπλεκόμενων βιοχημικών σταδίων μιας ασθένειας και αντίστοιχος σχεδιασμός.* Σε αυτήν τη στρατηγική μελετάται ο τρόπος με τον οποίο επιδρά μία νόσος στον οργανισμό. Κατά πόσο, δηλαδή μεταβάλλονται οι λειτουργίες του οργανισμού σε μια παθοφυσιολογική κατάσταση. Ένα παράδειγμα είναι πως αν μια συγκεκριμένη πρωτεΐνη υπερεκφράζεται τότε ερευνάται κάποιος αναστολέας οποίος θα την παρεμποδίσει.
- *Χρήση ηλεκτρονικού υπολογιστή για μοριακή προσομοίωση.* Ο υπολογιστής είναι ένα εργαλείο το οποίο έχει εισχωρήσει σε όλες τις επιστήμες με σκοπό τη διευκόλυνση των διεργασιών, τη μείωση του κόστους και φυσικά τη μείωση του χρόνου. Στο σχεδιασμό φαρμάκων υπάρχουν τρεις τρόποι με τους οποίους συνεισφέρει ένας Η/Υ. Η πρώτη είναι η ανάπτυξη φαρμάκου έχοντας ως αφετηρία τη δομή του επιθυμητού στόχου και αξιοποιεί τη τρισδιάστατη δομή του συμπλόκου προσδέματος- πρωτεΐνη. Η δεύτερη χρησιμοποιεί γνώσεις των βιοδραστικών προσδεμάτων και η τρίτη σχεδιάζει

συνδυάζοντας δομικά θραύσματα τα οποία δεν έχουν πολύ ισχυρή δράση προς το σχηματισμό οδών-ενώσεων. [3]

1.5. Διαδικασία Ανακάλυψης Νέων Φαρμάκων

Η διαδικασία με την οποία ανακαλύπτεται ένα φάρμακο απαιτεί εμπειριστατωμένη γνώση σε αντίστοιχους επιστημονικούς κλάδους, εργασία πολλών ετών, τύχη, υπομονή και φυσικά έναν υπέρογκο προϋπολογισμό ο οποίος μπορεί να φτάσει μέχρι και την αξία των δισεκατομμυρίων ευρώ. Αναλυτικότερα, τα στάδια τα οποία λαμβάνουν χώρα κατά το σχεδιασμό ενός νέου φαρμακευτικού προϊόντος το οποίο θα εκτελεί μία συγκεκριμένη βιολογική δράση είναι τα ακόλουθα. Αρχικά, ανακαλύπτονται πολλές υποψήφιες ενώσεις που πιθανώς να μπορούν να εκτελούν αυτήν τη δράση, σε αριθμό κυμαίνονται μεταξύ 5000 και 10000. Αυτό το στάδιο αποτελεί και τη βασική έρευνα και μπορεί να διαρκέσει από 2 μέχρι 10 χρόνια. Εν συνεχεία, οι ενώσεις αυτές υποβάλλονται σε προκλινικό έλεγχο και από αυτές μόνο 5 οδηγούνται σε κλινικές μελέτες. Οι κλινικές μελέτες διαχωρίζονται σε 3 φάσεις στις οποίες τα φάρμακα χορηγούνται σε διαφορετικό αριθμό εθελοντών. Στη φάση I το φάρμακο λαμβάνεται από 20-100 υγιής εθελοντές και ελέγχεται η δράση του. Στη φάση II οι εθελοντές αυξάνονται στο ακόλουθο εύρος, 100-500 και πλέον το πλήθος των εθελοντών συνίσταται μόνο από ασθενείς. Στη φάση III αξιολογείται η αποτελεσματικότητα του φαρμάκου αλλά και οι πιθανές ανεπιθύμητες δράσεις που μπορεί να έχει σε ένα πλήθος ασθενών εθελοντών, περίπου 1000-5000. Τέλος, ένα μόνο φάρμακο είναι αυτό το οποίο εισέρχεται στη φάση έγκρισης όπου εγκρίνεται και παρόλα αυτά οι έλεγχοι δεν σταματούν καθώς υποβάλλεται σε μετεγκριτική έρευνα η οποία ονομάζεται φάση IV. Στην εικόνα που παρουσιάζεται κάτωθι διακρίνονται οι φάσεις ανάπτυξης ενός φαρμάκου και προσεγγιστικά ο αριθμός των εθελοντών που χρειάζεται κάθε φορά ενώ ακόμη γίνεται αντιληπτό πως ο αριθμός των υποψήφιων φαρμάκων μειώνεται και καταλήγει στο ένα και μοναδικό φάρμακο. [3][5]

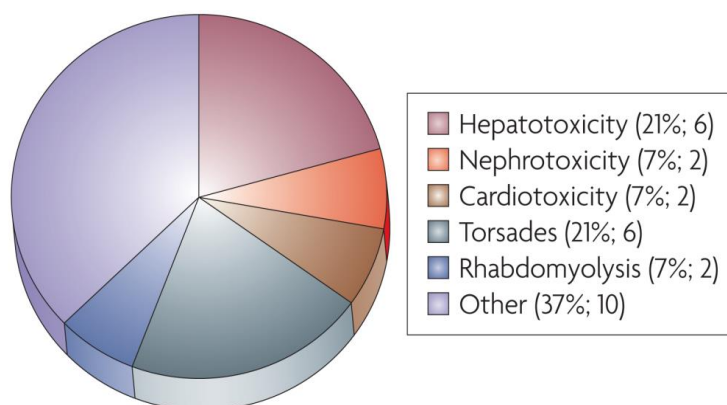


Εικόνα 1. 1 Φάσεις ανάπτυξης ενός νέου φαρμάκου από τη βασική έρευνα μέχρι να βγει στο εμπόριο [5]

2. Απόσυρση Φαρμάκων

Είναι πλέον κατανοητό πως η διαδικασία ανάπτυξης νέων φαρμάκων είναι μία πολύ δαπανηρή διεργασία. Καθώς απαρτίζεται από μελέτες και ελέγχους που μπορούν να διαρκέσουν μέχρι και 15 με 20 χρόνια. Αν και με τα χρόνια το συνολικό κόστος μειώνεται σε μεγάλο βαθμό, η διαδικασία παραμένει πανάκριβη. Σύμφωνα με νέα έρευνα η οποία δημοσιεύτηκε το 2020 το συνολικό κόστος παραγωγής ενός νέου φαρμακευτικού προϊόντος κατά μέσο όρο κυμαίνεται στα 1.3 δισεκατομμύρια \$ ^[6]. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει με έναν κατάφωρο τρόπο ότι η έγκριση ενός φαρμάκου και η μετεγκριτική του απόσυρση θα ήταν ένα οικονομικά ασύμφορο γεγονός. Συνεπώς, εύλογα συμπεραίνεται πως όσο πιο νωρίς στο χρονοδιάγραμμα της εικόνας (Εικόνα 1. 1) γίνεται αντιληπτή η αποτυχία του φαρμάκου τόσο μικρότερο πλήγμα δέχεται μία φαρμακευτική εταιρεία και τόσο πιο πολλά χρήματα εξοικονομούνται. (Fail Fast-Fail Cheap).

Οι πιο συνηθισμένοι λόγοι για τους οποίους αποσύρεται ένα φάρμακο μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε τρεις κατηγορίες σύμφωνα με τον οργανισμό ελέγχου φαρμάκων και τροφίμων (FDA). Η πρώτη είναι η πιθανότητα πρόκλησης προβλήματος υγείας μετά από την έγκριση. Υπάρχουν φορές που με περαιτέρω έρευνα εντοπίζονται ανεπιθύμητες ενέργειες. Πολύ χαρακτηριστικές είναι η ηπατοτοξικότητα, η καρδιοτοξικότητα, η νεφροτοξικότητα, ραβδομύωση – αποτέλεσμα τραυματισμού μυών λόγω χρήσης τοξικών φαρμάκων- και άλλα. Η δεύτερη κατηγορία είναι πιθανότητα επιπλοκές στην περίπτωση ανάμειξης με κάποιο άλλο φάρμακο. Τελευταία, κατηγορία είναι η απόσυρση λόγω κάποιου πιθανού σφάλματος στη βιομηχανία κατά την παραγωγή και το πακετάρισμα του φαρμάκου όπως για παράδειγμα κάποιου είδους μόλυνση η οποία θα καταστήσει το φάρμακο ακατάλληλο προς κατανάλωση. Στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 1. 2) εμφανίζεται ένα διάγραμμα πίτας το οποίο δείχνει τα ποσοστά των διάφορων τοξικοτήτων τα οποία οφείλονταν στην απόσυρση 28 φαρμάκων από την αγορά των Ηνωμένων Πολιτειών της Αμερικής. Ένα ποσοστό περίπου 21% οφείλεται σε ηπατοτοξικότητα, ένα 7% σε νεφροτοξικότητα, ένα 7% σε καρδιοτοξικότητα, ένα 21% σε πολύμορφη κοιλιακή ταχυκαρδία (Torsades), το οποίο θα μπορούσε να θεωρηθεί και αυτό ένα είδος καρδιοτοξικότητας άρα στο σύνολο είναι περίπου 28%, ένα 7% ραβδομύωση και το υπόλοιπο 37% άλλους διάφορους παράγοντες όπως αιμολυτική αναιμία, νόσοι του δέρματος και τοξικότητα στο ανοσοποιητικό, στο νευρικό και γαστρεντερικό σύστημα. Συνεπώς, η απόσυρση φαρμάκων σε ένα ποσοστό περίπου 50% οφείλεται σε τοξικότητα του ήπατος και της καρδιάς. ^{[7] [9] [46]}

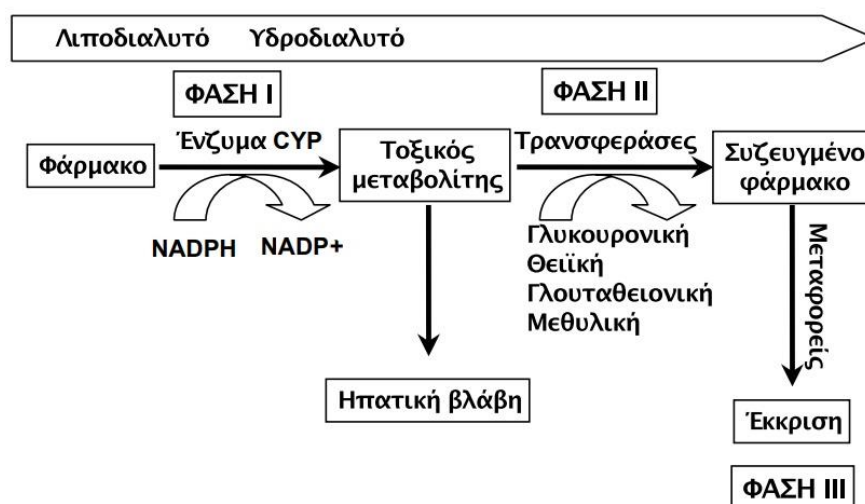


Εικόνα 1. 2. Τοξικότητες οι οποίες οφείλονται στην απόσυρση φάρμακα στην αγορά των ΗΠΑ ^[49]

3. Τοξικότητες

3.1. Ηπατοτοξικότητα

Η ηπατοτοξικότητα ορίζεται ως ο τραυματισμός του ήπατος ο οποίος συνεπάγεται μια εξασθενημένη λειτουργία του οργάνου και προκαλείται από την έκθεση σε κάποιο φάρμακο ή σε κάποιον κατ' επίφασιν μη μολυσματικό παράγοντα. Όταν η ηπατική λειτουργία επιδεινώνεται τότε προκύπτουν σοβαρά συμπτώματα τα οποία οδηγούν σε σημαντικές νόσους. Αν και φαινομενικά η ηπατοτοξικότητα δεν είναι πολύ συχνή καθώς σε αντίστοιχη έρευνα του 2012 εικάζεται ότι ο αριθμός ασθενών κυμαίνεται από 1 στους 10000 μέχρι στους 100000, στην πραγματικότητα πολλές περιπτώσεις ηπατοτοξικότητας δεν αναφέρονται από τους γιατρούς στις αρμόδιες αρχές και για αυτό η συχνότητα εμφάνισης ενδεχομένως να είναι αρκετά μεγαλύτερη. Εν έτει 2019 είναι γνωστό πως ο αριθμός των φαρμακευτικών προϊόντων τα οποία κατηγορούνται για τοξικότητα του ήπατος είναι μεγαλύτερος από 900 και πως περίπου το 20-40% των περιπτώσεων οδηγούνται σε πλήρη αποτυχία ήπατος. Προσεγγιστικά ένα τεράστιο ποσοστό κοντά στο 75% των ιδιοσυγκρασιακών αντιδράσεων λόγω φαρμάκων έχουν ως αποτέλεσμα τη μεταμόσχευση του ήπατος ή το θάνατο. Για ένα φαινόμενο το οποίο συμπερασματικά είναι πιο συχνό από αυτό που αναφέρεται και για το οποίο δεν υπάρχει κάποια φαρμακευτική αντιμετώπιση εκτός της διακοπής της χορήγησης του φαρμάκου το οποίο το προκαλεί, οι αριθμοί είναι δραματικά μεγάλοι. Το ήπαρ είναι το υπεύθυνο όργανο για τη μετατροπή λιποδιαλυτών ενώσεων σε υδατοδιαλυτές γιατί μόνο στη δεύτερη μορφή είναι δυνατόν να αποβληθεί ένα φάρμακο. Ο τρόπος με τον οποίο πραγματοποιείται αυτή η μετατροπή είναι με ενζυμικές αντιδράσεις όπως υδροξυλίωση, οξειδωση, αναγωγή και σύζευξη. Οι φάσεις στις οποίες κατηγοριοποιούνται οι αντιδράσεις είναι 2. Στις αντιδράσεις πρώτης φάσης πραγματοποιείται κατάλυση από το κυτόχρωμα P450 το οποίο καθιστά το φάρμακο μερικώς υδρόφιλο ωστόσο παραμένει ανίκανο να αποβληθεί. Στις αντιδράσεις δεύτερης φάσης το φάρμακο ή ο μεταβολίτης ενώνεται με μία γλυκουρονική ήθειϊκή ή γλουταθειονική ομάδα και καθίσταται υδατοδιαλυτό και έτοιμο για αποβολή. Πολλές φορές, όμως, ουσίες που χρησιμοποιούν το ίδιο κυτόχρωμα, ανταγωνίζονται μεταξύ τους με αποτέλεσμα να μην επιτυγχάνεται η σωστή μετατροπή του φαρμάκου συνεπώς και αποβολή και έτσι οι τοξικοί μεταβολίτες να προκαλούν ηπατική βλάβη. Χαρακτηριστικό είναι το παράδειγμα της παρακεταμόλης η οποία σε υπερδοσολογία σε κάποιον ασθενή που καταναλώνει χρόνια αιθανόλη μπορεί να προκαλέσει ηπατοτοξικότητα καθώς οι δύο αυτές ουσίες ανταγωνίζονται έχοντας ως επακόλουθο τη συσσώρευση του τοξικού μεταβολίτη NADPQI και την πρόκληση βλάβης. Στην εικόνα (Εικόνα 3. 1) παρουσιάζονται το διάγραμμα των σταδίων κατά τα οποία λαμβάνει χώρα ο μεταβολισμός των φαρμάκων στο ήπαρ δηλαδή η μετατροπή του από λιποδιαλυτό σε υδατοδιαλυτό και πως η συσσώρευση ενός τοξικού διαλύτη μπορεί να προκαλέσει ηπατική βλάβη. ^{[11][12][13]}



Εικόνα 3. 1 Στάδια μεταβολισμού φαρμάκων στο ήπαρ [13]

Οι βλάβες που προκαλούνται από ηπατοτοξικότητα φαρμάκων ποικίλουν, στον κάτωθι πίνακα παρουσιάζονται μερικά παραδείγματα βλαβών και τα αντίστοιχα φάρμακα που τις προξενούν.

Πίνακας 1. Τύπος βλάβης από ηπατοτοξικότητα φαρμάκων και τα κάποια παραδείγματα φαρμάκων που τις προξενούν [13]

Τύπος βλάβης	Φάρμακα
Ηπατοκυτταρική νέκρωση	Ισονιαζίδη, δικλφοφενάκη, ροβαστατίνη, παρακεταμόλη, κετοκοναζόλη
Χολόσταση	Χλωροπρομαζίνη, οιστρογόνα, ερυθρομυκίνη, σιπροφλοξασίνη
Μικτή	Αμοξικιλίνη-κλαβουλανικό, καρβαμαζεπίνη, βότανα, κυκλοσπορίνη, μεθιμαζόλη
Ανοσο-αλλεργική	Αιθοθάνη, φαινυτοΐνη, σουλφαμεθοξαζόλη
Μικρο-φουσαλιδώδης	Διδανοσίνη, τετρακυκλίνη, ακετυλσαλικυλικό οξύ, βαλπροϊκό οξύ, αμιοδαρόνη
Κοκκιώματα	Ντιλτιαζέμη, κινιδίνη, σουλφα-ουσίες
Στεατοπατίτις	Αμιοδαρόνη, ταμοξιφένη
Αυτοάνοση	Νιτροφουραντοΐνη, μεθυλντόπα, ροβαστατίνη, μινοκυκλίνη
Ίνωση	Μεθοτρεξάτη, βιταμίνη Α
Αγγειακή	Νικοτινικό οξύ, κοκαΐνη, αμφεταμίνη
Ογκογένεση	Αντισυλληπτικά, ανδρογόνα

Συμπερασματικά, η τοξικότητα του ήπατος που προκαλείται από φαρμακευτική αγωγή είναι βαρύνουσας σημασίας και θα πρέπει να ληφθούν οι απαραίτητες δράσεις για την πρόβλεψη και την αντιμετώπιση της.

3.2. Καρδιοτοξικότητα

Σε αντιστοιχία με την ηπατοτοξικότητα βρίσκεται και η τοξικότητα της καρδιάς από φαρμακευτικά προϊόντα, η οποία εκδηλώνεται και αυτή σε ένα μεγάλο εύρος ασθενών και μάλιστα σε αυξημένη συχνότητα. Η τοξικότητα της καρδιάς από φάρμακα είναι ένας από τους πιο σοβαρούς λόγους για να αποσυρθεί ένα φάρμακο. Έχουν γίνει πολλές προσπάθειες και δημοσιεύσεις ούτως ώστε να οριστεί πλήρως η συγκεκριμένη τοξικότητα παρά όλα η ταξινόμηση των διάφορων ειδών καρδιοτοξικότητας εξακολουθεί να προκαλεί σύγχυση στην επιστημονική κοινότητα. Αρχικά, εξαιτίας του γεγονότος πως ο όρος καρδιοτοξικότητα εμπεριέχει και παθήσεις οι οποίες σχετίζονται με όλο το καρδιαγγειακό σύστημα λόγω των πολλαπλών δράσεων των φαρμάκων, έχει παρατηρηθεί ότι γίνεται εκτεταμένη χρήση της ευρύτερης έννοιας, καρδιαγγειακή τοξικότητα. Στην παρούσα ενότητα θα λάβει χώρα μία συνοπτική παρουσίαση των διάφορων κατηγοριών καρδιαγγειακής τοξικότητας και αντικείμενο μεγαλύτερης ανάλυσης θα καταστεί η τοξικότητα η οποία προκαλείται από την παρεμπόδιση των καναλιών hERG.

Τοξικότητα στην καρδιά

Πιθανές παθήσεις από τοξικότητα στην καρδιά

- Αρρυθμίες (ταχυκαρδία, βραδυαρρυθμία)
- Μυοκαρδιακή Ισχαιμία
- Δυσλειτουργία αριστερής κοιλίας/ Καρδιακή ανεπάρκεια (Μηχανισμοί που παρεμβάλουν στη φυσιολογία της αριστερής κοιλίας, δυσλειτουργία που οφείλεται σε αντικαρκινικά φάρμακα, μυοκαρδίτιδα)
- Βλάβη καρδιακών βαλβίδων
- Περικαρδιακή Νόσος ^[14]

Τοξικότητα στο αγγειακό σύστημα

- Επίδραση στην αρτηριακή πίεση του αίματος (Συστημική υπέρταση, συστημική υπόταση και πνευμονική υπόταση)
- Θρομβοεμβολικές επιπλοκές (αρτηριακή και φλεβική) ^[14]

Οι μηχανισμοί με τους οποίους λαμβάνουν χώρα και οι τρόποι με τους οποίους συνδράμουν τα φάρμακα είναι εξίσου πολλοί και κάτωθι παρουσιάζονται επιγραμματικά κάποιοι από αυτούς:

- Αναστολή καναλιών κατιόντων ασβεστίου Ca^{2+}
- Παρεμπόδιση καναλιών κατιόντων νατρίου Na^{+}
- Παρεμπόδιση καναλιών κατιόντων καλίου K^{+} (χαρακτηριστικά είναι τα κανάλια hERG)

- Ανταγωνιστική και αγωνιστική δράση φαρμάκων σε σημαντικούς υποδοχείς (όπως α1-υποδοχέας, α2-υποδοχέας, υποδοχέας 5-HT_{2B})
- Παρεμπόδιση σηματοδότησης VEGF και HER-2 (καρδιοτοξικότητα τύπου II)
- Άλλοι πολύπλοκοι μηχανισμοί αντικαρκινικών φαρμάκων (χαρακτηριστικό παράδειγμα αυτό της ανθρακυκλίνης η οποία είναι υπεύθυνη για την καρδιοτοξικότητα τύπου I)
- Παρεμπόδιση αντλίας ιόντων νατρίου καλίου Na⁺/ K⁺
- Αντίδραση του ανοσοποιητικού συστήματος στις ξενοβιοτικές ουσίες (ανοσολογική αντίδραση) ^[14]

3.2.1. Ιοντικοί δίαυλοι

Στις μεμβράνες όλων των ζωικών, φυτικών και μυκητιακών κυττάρων υπάρχει μία διαφορά δυναμικού ανάμεσα στον ενδοκυτταρικό-κυτταρόπλασμα- και εξωκυτταρικό χώρο. Η διαφορά ονομάζεται δυναμικό ηρεμίας της πλασματικής μεμβράνης και διατηρείται από την άνιση κατανομή ιόντων καλίου (K⁺), νατρίου (Na⁺), χλωρίου (Cl⁻) και οργανικών ανιόντων στις δύο πλευρές της μεμβράνης. Το κυτταρόπλασμα είναι αρνητικά φορτισμένο σε σχέση με τον εξωκυτταρικό χώρο για αυτό και η διαφορά δυναμικού έχει αρνητικό πρόσημο (-50 έως -90 mV). Η ύπαρξη ενός ερεθίσματος δημιουργεί αλλαγή στο δυναμικό ηρεμίας είτε με τη είσοδο θετικών ιόντων (Na⁺, Ca²⁺) στον ενδοκυτταρικό χώρο και την αύξηση του δυναμικού -το φαινόμενο αυτό λέγεται εκπόλωση- ή με την έξοδο θετικών ιόντων (K⁺) ή είσοδο αρνητικών (Cl⁻) και την αντίστοιχη μείωση του δυναμικού λαμβάνοντας αρνητικότερες τιμές -το οποίο ονομάζεται υπερπόλωση-. Τα δύο αυτά γεγονότα αποτελούν και το σήμα για να μεταφραστεί η πληροφορία.

Η ροή των ιόντων ελέγχεται από τα ιοντικά κανάλια/διαύλους. Τα τελευταία ανάλογα με το είδος των ιόντων που μεταφέρουν διακρίνονται στην οικογένεια καναλιών κατιόντων και στην οικογένεια καναλιών ανιόντων. Μια άλλη κατηγοριοποίηση που υφίστανται είναι βάσει του μηχανισμού με τον οποίο ελέγχεται το άνοιγμα του καναλιού και η διέλευση των ιόντων. Οι κατηγορίες αυτές είναι οι ακόλουθες:

- *Τασσο-εξαρτώμενα κανάλια:* Η ροή ρυθμίζεται από μεταβολές που πραγματοποιούνται στο δυναμικό ηρεμίας της μεμβράνης.
- *Προσδέτο-εξαρτώμενα κανάλια:* Η ροή ρυθμίζεται με την πρόσδεση ενός προσδέτη στη μεμβράνη και το άνοιγμα του διαύλου.
- *Κανάλια ρυθμιζόμενα από άλλους διάφορους μηχανισμούς:* Ένα παράδειγμα είναι ο συνδυασμός των μηχανισμών των παραπάνω καναλιών για την ρύθμιση της ροής του γλουταμινικού υποδοχέας κανάλι Na⁺/Ca²⁺ NMDAR.
- *Μηχανο-ευαίσθητα κανάλια :* Η ροή σε αυτήν την περίπτωση ρυθμίζεται με τη μηχανική παραμόρφωση που υφίσταται η μεμβράνη όπως ακριβώς συμβαίνει στο αυτί. ^[15]

Τα τασο-εξαρτώμενα κανάλια ιόντων καλίου είναι όμοια δομικά με αυτά των ιόντων νατρίου με μοναδική διαφοροποίηση την ύπαρξη 4 υπομονάδων αντί για μία πολυπεπτιδική αλυσίδα. Στα θηλαστικά οι έκφραση των α-υπομονάδων ελέγχεται από περίπου 50 γονίδια με αποτέλεσμα να δημιουργούνται ομο-τετραμερή ή ετερό-τετραμερη. ^[15]

3.2.2. Ιστορική αναδρομή στους διαύλους hERG

Αρχή γενομένης το 1969, ερευνητές μελέτησαν ηλεκτροφυσιολογικά χαρακτηριστικά κάποιων καναλιών καλίου της μύγας *Drosophila Melanogaster* και συγκεκριμένα εκείνα τα οποία υποδείκνυαν την ύπαρξη κάποιας μετάλλαξης. Μία από αυτές τις μεταλλάξεις ονομάστηκε *ether-a-go-go* (*eag*) διότι παρατηρήθηκε ένας φαινότυπος όπου τα πόδια της μύγας έτρεμαν θυμίζοντας *go-go* χορευτές κατά τη διάρκεια αναισθησίας με αιθέρα (*ether*) ^[17]. Το γονίδιο αυτό το οποίο αργότερα εξετάστηκε (1991-1993), βρέθηκε να κωδικοποιεί ένα πολυπεπτιδίο σε λειτουργικά κανάλια καλίου ενώ, λίγο αργότερα (1994) ανακαλύφθηκε η ύπαρξη του και σε θηλαστικά συμπεριλαμβανομένου του ανθρώπου. Στον άνθρωπο έλαβε την ονομασία *Human Ether-à-go-go-Related Gene* (*hERG*). Παράλληλα, με αυτές τις ανακαλύψεις είχε αρχίσει ήδη να γίνεται αντιληπτή η συσχέτιση της εκδήλωσης πολύμορφης κοιλιακής ταχυκαρδίας (*TdP*) και της επιμήκυνσης του διαστήματος *QT* με τη χρήση κάποιων μη αντιαρρυθμικών φαρμάκων. Χαρακτηριστικά τέτοιων φαρμάκων ήταν τα αντισταμινικά τερφεναδίνη και αστεμιζόλη, τα οποία αργότερα εξετάστηκαν πιο διεξοδικά και παρατηρήθηκε ότι παρεμποδίζουν άμεσα τα κανάλια *hERG* σε μικρές συγκεντρώσεις. Ύστερα από αυτά τα ευρήματα και την ακράδαντη απόδειξη ότι τα φάρμακα αυτά παρουσιάζουν τις προαναφερθείσες παθήσεις, οι δημιουργοί της αστεμιζόλης, την απέσυραν εθελοντικά από το εμπόριο, ενώ η τερφεναδίνη αποσύρθηκε ύστερα από εντολή του *FDA*. ^{[17][1]}

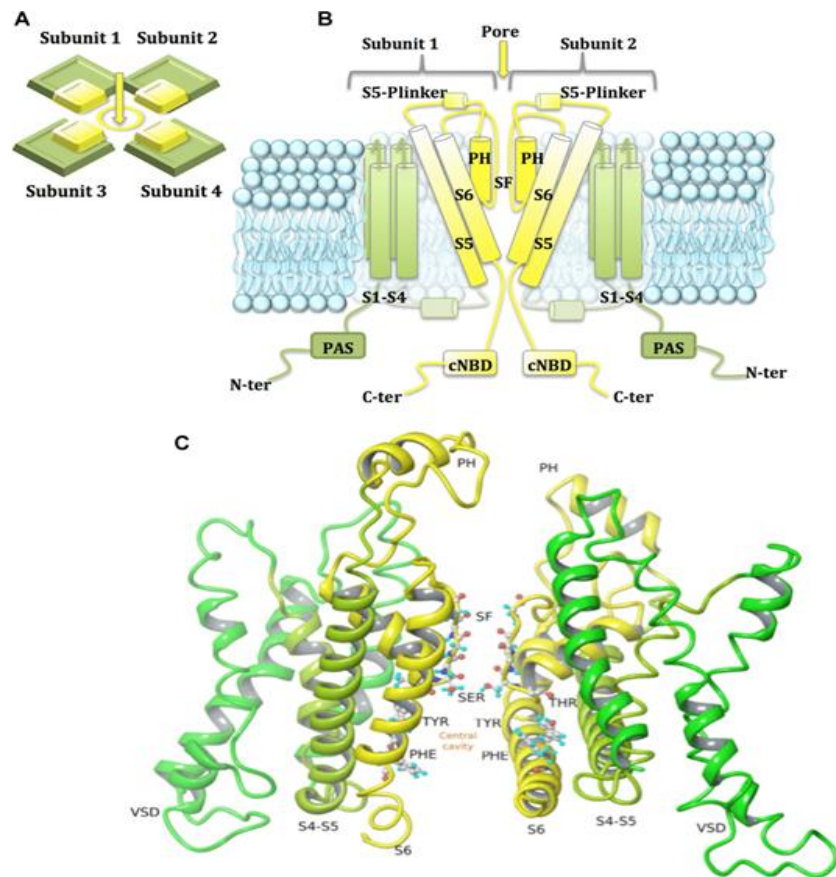
Πολλά είναι τα φάρμακα τα οποία έχουν αποσυρθεί από το εμπόριο εξαιτίας της παρεμπόδισης των καναλιών *hERG* και πλέον το γεγονός αυτό αποτελεί μία παράμετρο προς αποφυγή κατά το σχεδιασμό ενός φαρμάκου. Εντούτοις, υπάρχουν φάρμακα τα οποία κυκλοφορούν στο εμπόριο και φέρουν υψηλές πιθανότητες παρεμπόδισης καναλιών *hERG*. Τέτοια φάρμακα είναι κάποια αντικαρκινικά όπως ανθρακυκλίνη (*anthracyclines*) και 5-φθοριοουρακίλη (*5 fluouracil*) ωστόσο, γίνονται συνεχώς προσπάθειες να εκτιμήσουν το βαθμό καρδιοτοξικότητας και να τον περιορίσουν. ^[16]

3.2.3. Δομή καναλιών hERG

Οι δίαυλοι *hERG* συναντώνται στην καρδιά και είναι τασο-εξαρτώμενα κανάλια ιόντων καλίου K^+ τα οποία κωδικοποιούνται από το γονίδιο *hERG*, the *human Ether-à-go-go-Related Gene*, όπως ονομάζεται από πολλούς γενετιστές ή αλλιώς *KCNH2* όπως το ονομάζουν οι μοριακοί βιολόγοι. Το γονίδιο φέρει την πληροφορία η οποία κωδικοποιεί την έκφραση της πρωτεΐνης *K_v11.1* η οποία αποτελεί την α-υπομονάδα του πόρου του καναλιού ιόντων καλίου(κανάλι *hERG*). Το κανάλι αυτό είναι υπεύθυνο για το επανορθωτικό ρεύμα I_{Kr} το οποίο συμβάλλει σε τεράστιο βαθμό στην ηλεκτρική δραστηριότητα της καρδιάς καθώς ελέγχει την επαναπόλωση του δυναμικού ηρεμίας των μεμβρανών των καρδιακών κυττάρων. ^[18]

Η δομή του καναλιού δεν έχει προσδιοριστεί με ακρίβεια πειραματικά ακόμα, άλλα τα τμήματα τα οποία το συγκροτούν έχουν προσδιοριστεί ξεχωριστά. Ο τρόπος με τον οποίο γίνεται αντιληπτή η δομή είναι ως μια ομο-τετραμερή μορφή στην τεταρτοταγή αρχιτεκτονική της όπως ακριβώς και όλα τα κανάλια ιόντων καλίου. Οι 4 υπομονάδες απαρτίζονται από περίπου

1159 αμινοξέα η κάθε μία και εκτείνονται σε 4 τομείς οι οποίοι είναι ο τομέας PAS (N-terminal Per-Arnt-Sim), ο τομέας VSD (Voltage Sensing Domain) ο οποίος έχει το ρόλο του αισθητήρα και αντιλαμβάνεται τις αλλαγές στο δυναμικό, ο τομέας του πόρου (Pore Domain) ο οποίος ουσιαστικά πραγματοποιεί το άνοιγμα και δημιουργεί τον πόρο και τέλος ο τομέας cNBD (cyclic Nucleotide Binding Domain). Οι τομείς VSD και PD απαρτίζονται από 6 διαμεμβρανικές έλικες (S1-S6). Για την καλύτερη κατανόηση της δομής του καναλιού, προτείνεται να μελετηθεί η εικόνα (Εικόνα 3. 2). Στο σχήμα A παρουσιάζονται οι 4 υπομονάδες οι οποίες αναφέρθηκαν παραπάνω πως υπάρχουν σε όλα τα τασο-εξαρτώμενα κανάλια ιόντων καλίου. Στο σχήμα B εμφανίζεται η διπλοστιβάδα φωσφολιπιδίων η οποία συγκροτεί την πλάσματική μεμβράνη του κυττάρου και ο ιοντικός διάυλος καλίου ωστόσο εμφανίζονται μόνο οι δύο υπομονάδες για λόγους απλούστευσης και ευκολότερης κατανόησης. Οι έλικες S1 ως S4-πράσινο χρώμα- εκατέρωθεν του πόρου είναι ο τομέας VSD, ενώ οι έλικες S5 και S6-κίτρινο χρώμα- αποτελούν το τμήμα του πόρου. Το στενό SF όπως φαίνεται στην εικόνα αποτελείται από υπολείμματα αμινοξέων Ser-Val-Gly-Phe-Gly βρίσκεται στο εξωκυτταρικό τμήμα του πόρου και επιλεκτικά μεταφέρει τα κατιόντα καλίου στο εσωτερικό. Η παρουσία των ατόμων του οξυγόνου του καρβονυλίου των παραπάνω υπολειμμάτων εγκαθιστούν τις κατάλληλες ηλεκτροστατικές συνθήκες για την ομαλή διέλευση των θετικών ιόντων καλίου. Ακριβώς, από κάτω από το στενό SF απλώνεται η πολική κεντρική κοιλότητα η οποία περιστοιχίζεται από τις έλικες S6 η οποίες διασταυρώνονται στο εσωτερικό του κυττάρου ούτως ώστε να αποφευχθεί η επανάληψη της διέλευσης των κατιόντων καλίου. Στο σχήμα C παρουσιάζονται οι έλικες σε αναπαράσταση κορδέλας (Ribbon representation). [19] [25]



Εικόνα 3. 2. Αναπαράσταση της δομικής τοπολογίας του καναλιού hERG [25]

ωστόσο εμφανίζονται μόνο οι δύο υπομονάδες για λόγους απλούστευσης και ευκολότερης κατανόησης. Οι έλικες S1 ως S4-πράσινο χρώμα- εκατέρωθεν του πόρου είναι ο τομέας VSD, ενώ οι έλικες S5 και S6-κίτρινο χρώμα- αποτελούν το τμήμα του πόρου. Το στενό SF όπως φαίνεται στην εικόνα αποτελείται από υπολείμματα αμινοξέων Ser-Val-Gly-Phe-Gly βρίσκεται στο εξωκυτταρικό τμήμα του πόρου και επιλεκτικά μεταφέρει τα κατιόντα καλίου στο εσωτερικό. Η παρουσία των ατόμων του οξυγόνου του καρβονυλίου των παραπάνω υπολειμμάτων εγκαθιστούν τις κατάλληλες ηλεκτροστατικές συνθήκες για την ομαλή διέλευση των θετικών ιόντων καλίου. Ακριβώς, από κάτω από το στενό SF απλώνεται η πολική κεντρική κοιλότητα η οποία περιστοιχίζεται από τις έλικες S6 η οποίες διασταυρώνονται στο εσωτερικό του κυττάρου ούτως ώστε να αποφευχθεί η επανάληψη της διέλευσης των κατιόντων καλίου. Στο σχήμα C παρουσιάζονται οι έλικες σε αναπαράσταση κορδέλας (Ribbon representation). [19] [25]

Οι μεταβολές που υφίσταται το κανάλι το καθιστούν ικανό να διατηρεί μία από τις ακόλουθες καταστάσεις, κλειστή διαμόρφωση, ανοιχτή και ανοιχτή-αδρανοποιημένη. Οι καταστάσεις αυτές εξαρτώνται κάθε φορά από το δυναμικό της μεμβράνης. Πιο συγκεκριμένα, σε αρνητικό δυναμικό το κανάλι βρίσκεται σε κλειστή διαμόρφωση και η διέλευση των κατιόντων καλίου είναι περιορισμένη. Στη μετατροπή του δυναμικού σε θετικό το κανάλι ανοίγει αργά και η ροή των κατιόντων είναι ελεύθερη. Τέλος, η αποπόλωση που υφίσταται από έναν ειδικό μηχανισμό τύπου C το μετατρέπει στην αδρανοποιημένη του μορφή. Ο λόγος για τον οποίο περιγράφονται όλα αυτά είναι διότι έρευνες αναφέρουν ότι το άνοιγμα και η αδρανοποίηση του

καναλιού χαρακτηρίζεται από μία αξιοσημείωτη βραδύτητα συγκριτικά με τους υπόλοιπους διαύλους κατιόντων καλίου. [19] [25]

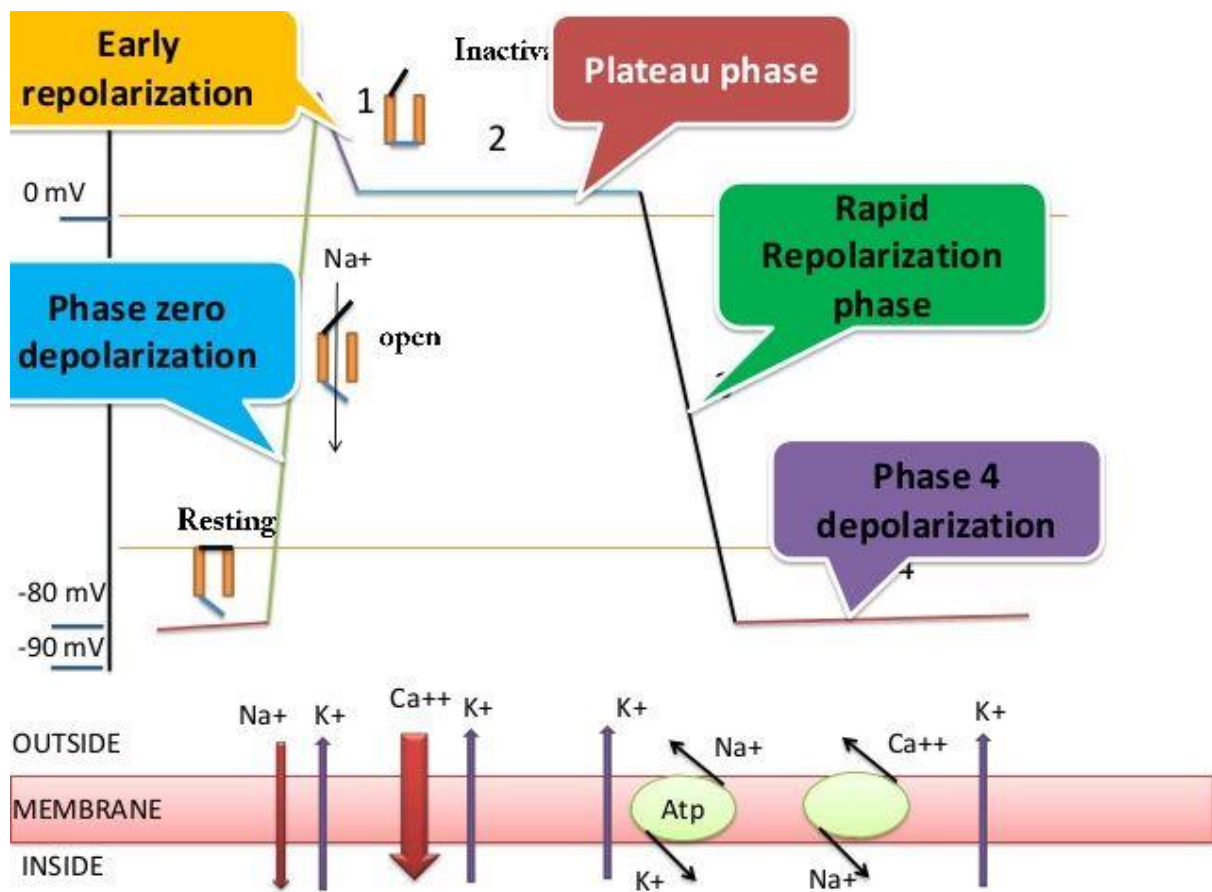
3.2.4. Καρδιοτοξικότητα λόγω παρεμπόδισης hERG καναλιών

Για να μπορέσει να μελετηθεί επισταμένως η καρδιοτοξικότητα θα πρέπει να γίνει αντιληπτός ο μηχανισμός ο οποίος την ενεργοποιεί. Στο παρόν πόννημα μελετάται η καρδιοτοξικότητα που προκαλείται από τον περιορισμό της δράσης των διαύλων hERG, συνεπώς, ο συγκεκριμένος μηχανισμός θα αναλυθεί εκτενέστερα.

Στην παραπάνω ενότητα περιγράφηκε αναλυτικά η δομή ενός καναλιού hERG και σημειώθηκε ότι τα συγκεκριμένα κανάλια συγκριτικά με τα υπόλοιπα κανάλια κατιόντων καλίου παρουσιάζουν μια καθυστέρηση στο συνολικό χρόνο ανοίγματος, ενεργοποίησης και απενεργοποίησης του καναλιού. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με την πληροφορία πως τα κανάλια hERG φέρουν το χαρακτηριστικό της μεγαλύτερης κεντρικής κοιλότητας στον τομέα του πόρου έναντι των υπόλοιπων καναλιών, καθιστούν τους hERG διαύλους ευάλωτους στην πρόσδεση φαρμάκων τα οποία παρεμποδίζουν την ομαλή δίοδο των κατιόντων καλίου. Το τελευταίο φαινόμενο συνεπάγεται τον αποκλεισμό του επαναπολωτικού ρεύματος I_{Kr} το οποίο προκαλεί δυσλειτουργία στην ηλεκτροφυσιολογία των μυϊκών κυττάρων της καρδιάς και κατά συνέπεια καρδιοτοξικότητα. Η παραπάνω παθολογία γίνεται αντιληπτή με την εμφάνιση επιμήκυνσης του διαστήματος QT (QT Prolongation) σε ένα ηλεκτροκαρδιογράφημα. Πολλές φορές μία τέτοια επιμήκυνση ελλοχεύει τον κίνδυνο της εκδήλωσης πολύμορφης κοιλιακής ταχυκαρδίας η οποία είναι γνωστή ως Torsade de Pointe (TdP) και χαρακτηρίζεται από θνητότητα σε ένα ποσοστό περίπου 15% [20]. Υπολογίζεται ότι το 40-70% των νέων ενώσεων που μελετώνται ως εν δυνάμει φάρμακα, όταν ελέγχονται ως προς την ικανότητα τους να παρεμποδίσουν τα κανάλια hERG εμφανίζονται θετικά. [70]

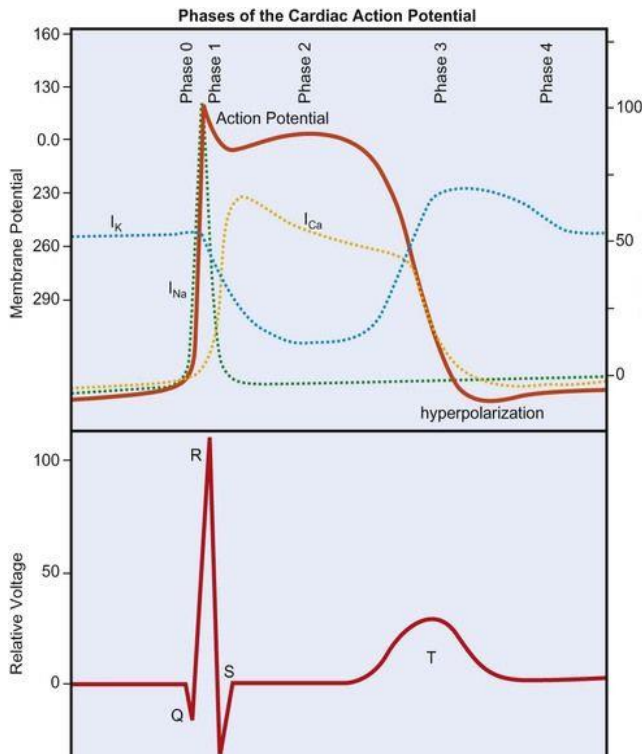
QT Επιμήκυνση και Ηλεκτροκαρδιογράφημα

Για να πραγματοποιηθεί η σύσπαση της καρδιάς πρέπει τα μυοκύτταρα να εκπολωθούν ενώ για τη χαλάρωση απαιτείται επαναπόλωση. Η εκπόλωση συμβαίνει με την είσοδο ιόντων νατρίου και ασβεστίου στο κύτταρο. Η επαναπόλωση συμβαίνει με την έξοδο των ιόντων καλίου. Στην ακόλουθη εικόνα φαίνονται οι μεταβολές που υφίσταται το κύτταρο ενδοκυτταρικά και εξωκυτταρικά για να την επίτευξη της σύσπασης και της χαλάρωσης. Στη φάση 0 εισέρχονται ιόντα νατρίου (Na^+) συνεπώς το δυναμικό από -90 mV αυξάνεται σε τιμή λίγο πάνω από το 0 όπως φαίνεται στο διάγραμμα της εικόνας (Εικόνα 3. 3.) Η τιμή του δυναμικού ξεκινάει να μειώνεται απότομα με την έξοδο ιόντων καλίου (K^+) στη φάση 1, ωστόσο αυτή η κλήση ανακάμπτει στην φάση 2 από την είσοδο ιόντων ασβεστίου (Ca^{2+}) από τα αντίστοιχα κανάλια με αποτέλεσμα η καμπύλη να πιάσει ένα πλατό το οποίο είναι προσωρινό καθώς στη φάση 3 τα κανάλια ασβεστίου κλείνουν ενώ συνεχίζει η έξοδος των ιόντων καλίου το οποίο οδηγεί στην επαναφορά του δυναμικού στην τιμή -90 mV. [21]

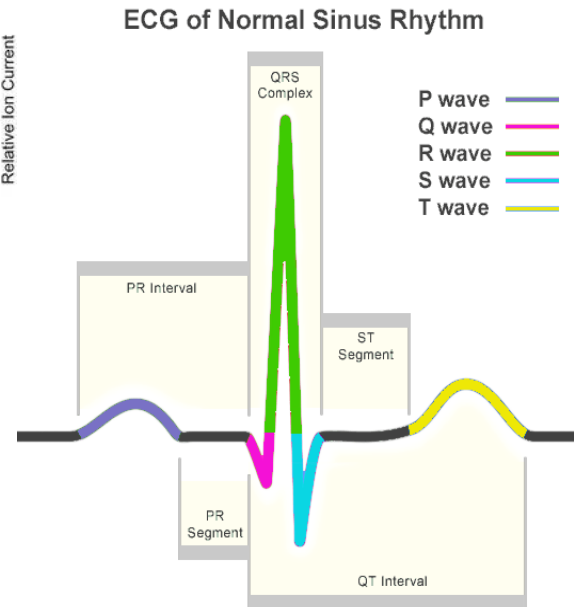


Εικόνα 3. 3. Οι φάσεις του κύκλου σύσπασης και χαλάρωσης των μυοκυττάρων της καρδιάς και η μεταβολή του δυναμικού. [21]

Ένα ηλεκτροκαρδιογράφημα έχει τη μορφή που εμφανίζεται στην κάτωθι εικόνα 3.4. και δείχνει την εξάπλωση του ηλεκτρικού ρεύματος στην καρδιά. Το διάγραμμα αποτελείται από τα κύματα P, Q, R, S, T τα οποία διαχωρίζουν την καμπύλη στο PR διάστημα, στο PR τμήμα, στο QRS complex, στο ST τμήμα και στο QT διάστημα. Καθένα από αυτά τα στάδια έχει την δική του σημασία. Το κύμα P περιγράφει την εκπόλωση των μυϊκών κυττάρων στους κόλπους και το QRS complex την εκπόλωση των κοιλιών, όπου δεν υπάρχει κάποιο κύμα υποδηλώνεται ότι το δυναμικό των κυττάρων είναι σταθερό στα -90 mV (η λεγόμενη ισοηλεκτρική γραμμή). Το κύμα Q δείχνει την αρχή της εκπόλωσης των κοιλιών. Το κύμα T δηλώνει την επαναπόλωση των ινών των κοιλιών. Από το τέλος του κύματος S ως την αρχή του T ορίζεται ως η φάση εκπόλωσης του μυοκαρδίου των κοιλιών. [20][21]

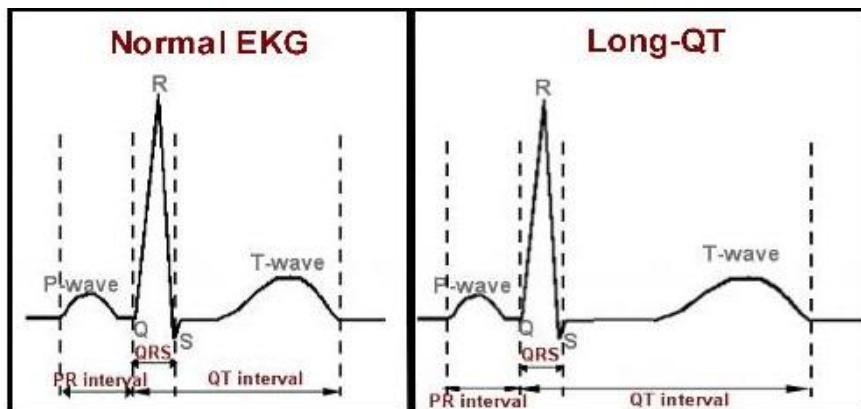


Εικόνα 3. 4. Η μορφή ενός ΗΚΓ συγχρονισμένο με τις φάσεις μεταβολής του δυναμικού [20]



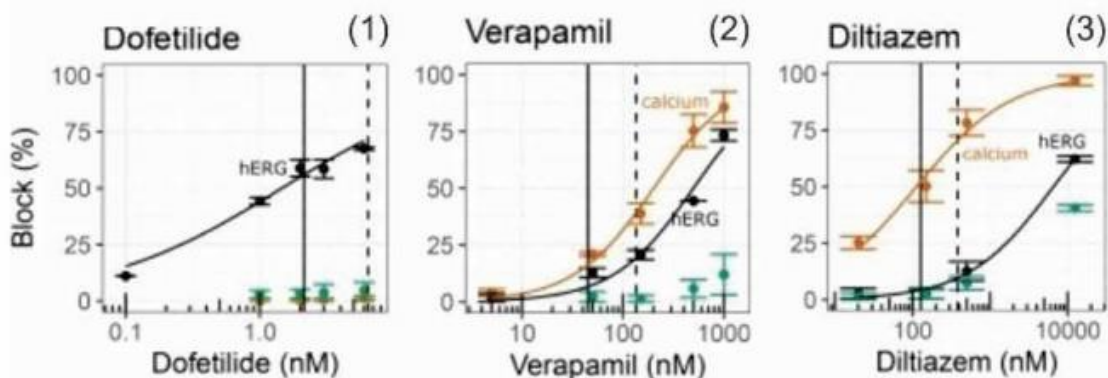
Εικόνα 3. 5. Τα κύματα και τα τμήματα στα οποία διακρίνεται ένα ΗΚΓ [20]

Ουσιαστικά το σύνδρομο της επιμήκυνσης του διαστήματος QT όπως προδίδει και το όνομα είναι αύξηση του χρόνου μεταξύ του Q και το T κύματος. Αν και ο χρόνος είναι διαφορετικός καθώς ο παλμός της καρδιάς διαφέρει από άτομο σε άτομο. Η κανονικοποίηση του συστήματος μέτρησης και η ένδειξη ενός διορθωμένου QTc δίνει προσεγγιστικά αλλά αρκετά ικανοποιητικά αποτελέσματα για το αν λαμβάνει χώρα μία τέτοια επιμήκυνση. Στην εικόνα (Εικόνα 3. 6) εμφανίζεται μία τέτοια επιμήκυνση στο ΗΚΓ. [21][22]



Εικόνα 3. 6. Επιμήκυνση διαστήματος QT [22]

Η εμφάνιση συνδρόμου επιμηκυμένου διαστήματος QT μπορεί να οφείλεται σε γονιδιακή αιτία όπως κάποια μετάλλαξη στα γονίδια που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες των ιοντικών διαύλων αλλά μπορεί να είναι και επίκτητη από κάποια φάρμακα. Οι παθήσεις αυτές ονομάζονται διαυλοπάθειες (Channelopathies). Τα φάρμακα που είναι πιθανότερο να προκαλέσουν σύνδρομο QT φράζουν τα ιοντικά κανάλια τα οποία ορίζουν τα ρεύματα καλίου ή ενεργοποιούν τα ρεύματα νατρίου. Μερικά χαρακτηριστικά φάρμακα τα οποία παρεμποδίζουν τα ιοντικά κανάλια και συνεπώς τα αντίστοιχα ρεύματα εμφανίζονται στην παρακάτω εικόνα και είναι η ντοφετιλίδη (Dofetilide), η βεραπαμίλη (Verapamil) και η διλτιαζέμη (Diltiazem). Το πρώτο διάγραμμα υποδεικνύει την προσεγγιστικά ανάλογη συσχέτιση του % ποσοστού αποκλεισμού του ρεύματος που ελέγχεται από το διάλυλο hERG (I_{kr}) με τη συγκέντρωση της ντοφετιλίδης. Στο δεύτερο διάγραμμα απεικονίζεται η παράλληλη παρεμπόδιση των ρευμάτων I_{kr} και I_{ca} . Τέλος, στο τρίτο διάγραμμα παρατηρείται ο ίδιος αποκλεισμός ρευμάτων με αυτό στο δεύτερο διάγραμμα με τη διαφορά πως σε αυτήν τη περίπτωση εμφανίζεται ενισχυμένος.



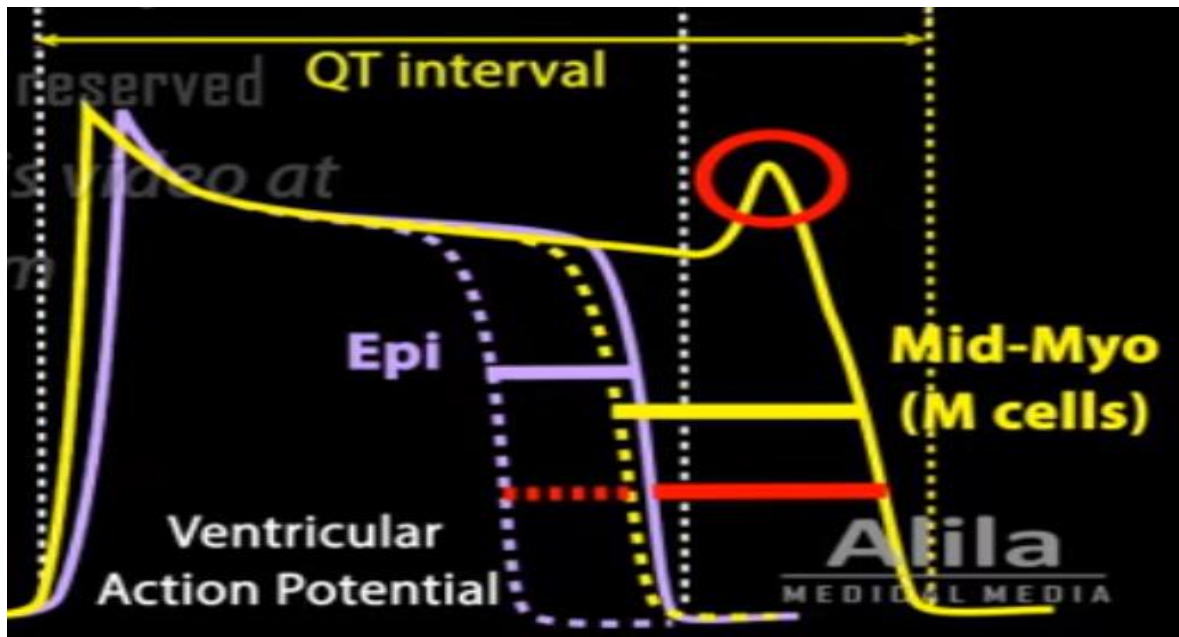
Εικόνα 3. 7. Διαγράμματα τα οποία απεικονίζουν τη συσχέτιση της ποσότητας κάποιων χαρακτηριστικών καρδιοτοξικών φαρμάκων με το ποσοστό παρεμπόδισης των ιοντικών καναλιών

Torsades de Pointes

Μία επιμήκυνση του διαστήματος QT, όπως αναφέρθηκε, μπορεί να οδηγήσει σε πολύμορφη κοιλιακή ταχυκαρδία (TdP), ωστόσο είναι ικανή αλλά όχι αναγκαία συνθήκη. Μπορεί κάποιος με χρόνιο QT σύνδρομο να μην εμφανίσει ποτέ τέτοιου είδους πάθηση. Εντούτοις, αν εκδηλωθεί η αντιμετώπιση θα πρέπει να είναι άμεση καθώς η πιθανότητα θανάτου αυξάνεται^[24].

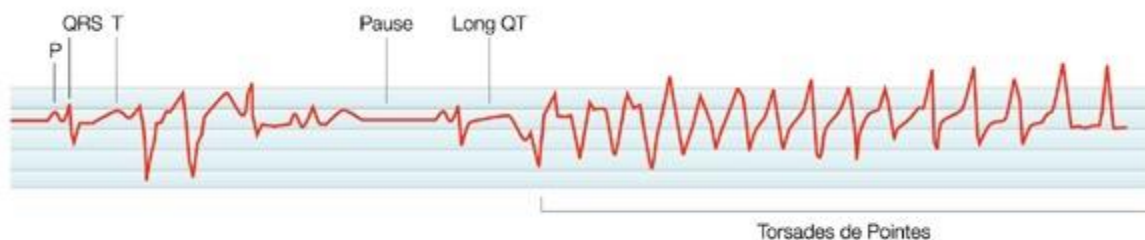
Η ταχυκαρδία αυτή χαρακτηρίζεται από μία ταχύτατη και ανώμαλη συστροφή των QRS complexes στο ηλεκτροκαρδιογράφημα εναλλάξ της ισοηλεκτρικής γραμμής. Το καρδιακό τοίχωμα αποτελείται από τρία στρώματα: το επικάρδιο, το μυοκάρδιο (M-cells) και το ενδοκάρδιο. Τα κύτταρα του κάθε στρώματος έχουν διαφορετικό ρυθμό επαναπόλωσης. Το μυοκάρδιο επαναπολώνεται πιο αργά και λόγος για τον οποίο συμβαίνει αυτό είναι διότι τα M-cells φέρουν λιγότερα κανάλια κατιόντων καλίου και περισσότερα κανάλια νατρίου. Η κορυφή στο κύμα T στο ΗΚΓ αντικατοπτρίζει την επαναπόλωση των κυττάρων του επικαρδίου ενώ το τέλος του κύματος αντιπροσωπεύει την επαναπόλωση του των M-cells. Συνεπώς, όταν παρεμποδίζονται τα ιοντικά κανάλια και λαμβάνει χώρα επιμήκυνση του διαστήματος QT, αν

κατά τη φάση 2 του πλατό τα ρεύματα που εισέρχονται στα κύτταρα ξεπεράσουν αυτά που εξέρχονται τότε είναι πιθανόν να δημιουργηθεί ένας επιπλέον χτύπος στην καρδιά όπως ακριβώς απεικονίζεται στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 3. 8.)^[26]



Εικόνα 3. 8. Δημιουργία ενός επιπλέον καρδιακού χτύπου. Οι διακεκομμένες καμπύλες συμβολίζουν ένα φυσιολογικό QT διάστημα ενώ οι συνεχείς ένα επιμηκυμένο. Η κίτρινη γραμμή απεικονίζει M-cells του μυοκαρδίου ενώ η άσπρη τα κύτταρα του επικαρδίου.

Η διαφορά στους ρυθμούς επαναπόλωσης αυξάνεται δυσανάλογα όταν επιμηκύνεται το διάστημα QT και αυτό συντελεί στη δημιουργία ενός ηλεκτρικού παλμού ο οποίος θα εισέλθει σε ένα διαρκή βρόγχο μεταξύ των στρωμάτων του τοιχώματος της καρδιάς δημιουργώντας το χαρακτηριστικό μοτίβο στο ηλεκτροκαρδιογράφημα το οποίο εμφανίζεται στην εικόνα (Εικόνα 3. 9.)



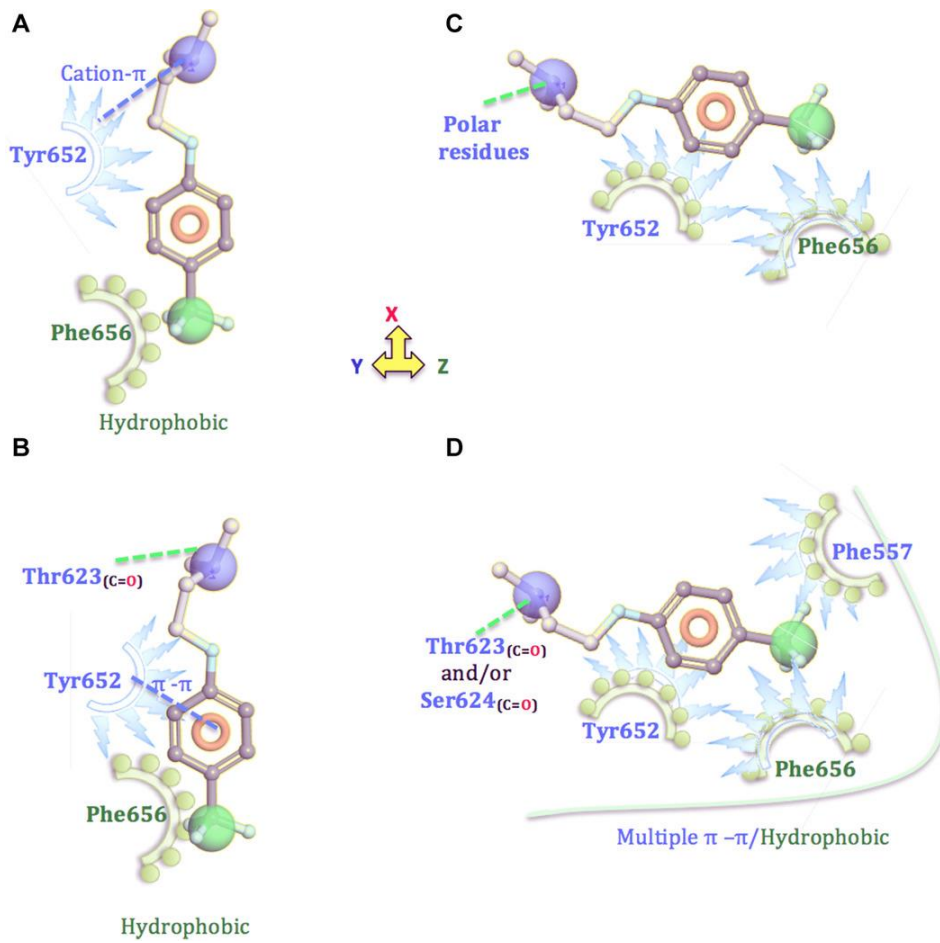
Εικόνα 3. 9. Ηλεκτροκαρδιογράφημα ενός επιμηκυμένου QT διαστήματος το οποίο ακολουθείται από ένα μοτίβο TdP^[23]

IC₅₀

Η καρδιοτοξικότητα η οποία λαμβάνει χώρα παρεμποδίζοντας τα κανάλια hERG μπορεί να ποσοτικοποιηθεί για το κάθε φάρμακο και αυτό γίνεται υπολογίζοντας την τιμή IC₅₀ (half maximal inhibitory concentration). Η τιμή αυτή εκφράζει τη συγκέντρωση του κάθε φαρμάκου η οποία είναι ικανή να παρεμποδίσει μία βιολογική διεργασία κατά 50%. Ο προσδιορισμός αυτού του δείκτη γίνεται με in vitro εργαστηριακές μετρήσεις. Αν η συγκέντρωση αυτή είναι πολύ μικρή της τάξης των nM (10⁻⁹ mol/L) αυτό σημαίνει ότι σε πολύ μικρές ποσότητες η ουσία παρουσιάζει 50% παρεμπόδιση συνεπώς, είναι πολύ τοξική. Αρκετά συχνά χρησιμοποιείται και ο αρνητικός λογάριθμος της τιμής αυτής δηλαδή -log(IC₅₀) ή pIC₅₀.^{[24][26]}

3.2.5. Τρόποι πρόσδεση φαρμάκων στα κανάλια hERG

Οι τρόποι με τους οποίους επιτυγχάνεται η πρόσδεση ενός φαρμάκου με τους διαύλους καλίου αλλά και τα χαρακτηριστικά που πρέπει να φέρει ένα φάρμακο για εξασφαλιστεί μία τέτοια είδους πρόσδεση είναι σκοτεινά σημεία τα οποία δεν έχουν γίνει ξεκάθαρα στην επιστημονική κοινότητα. Υπάρχουν κάποιες υποθέσεις οι οποίες παρουσιάζονται ακολούθως. Η κυριότερη υπόθεση είναι πως τα φάρμακα μέσω ενός θετικά φορτισμένου ατόμου αζώτου προσδένονται παράλληλα στον προσανατολισμό του καναλιού, στο δακτύλιο φαινόλης του υπολείμματος Tyr652 (μέσω κατιόν-π αλληλεπίδρασης), καταλαμβάνοντας ένα μεγάλο μέρος της κεντρικής κοιλότητας και εμποδίζοντας τα ιόντα να εξέλθουν από το στενό SF το οποίο περιγράφηκε στην ενότητα **3.2.3**. Μία άλλη υπόθεση προβλέπει την πρόσδεση κάθετα στο προσανατολισμό του καναλιού με αποτέλεσμα την παρεμπόδιση του πόρου του καναλιού. Υποθέσεις γίνονται και για την αλληλεπίδραση των αρωματικών υπολειμμάτων Tyr και Phe σχετικά με τους διαφορετικούς ρόλους που διαδραματίζουν. Σε κάποιες μελέτες αναφέρονται υδρόφοβες και π-π αλληλεπιδράσεις με τα δεσμευμένα φάρμακα ενώ, σε άλλες υποδεικνύονται κατιόν π-αλληλεπιδράσεις. Στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 3. 10) διακρίνονται οι διάφορες υποθέσεις για τον τρόπο πρόσδεσης των διάφορων φαρμάκων που λειτουργούν ως αναστολείς.^[25]



Εικόνα 3. 10. Αναπαράσταση των τρόπων πρόσδεσης βάσει του προσανατολισμού (κάθετος, οριζόντιος) και βάσει του τρόπου αλληλεπίδρασης(υδρόφοβη, π - π , κατιόν- π , πολλαπλή). [25]

4. Καθοριστικές Φυσικοχημικές Παράμετροι για τη Δράση ενός Φαρμάκου

Για να κατασκευαστεί ένα μοντέλο το οποίο θα περιγράφει αναλυτικά την πορεία ενός φαρμάκου στον οργανισμό ή θα προβλέπει την τοξικότητα που προκαλείται, θα πρέπει να ληφθούν υπόψη κάποιες συγκεκριμένες παράμετροι οι οποίες προσδίδουν στο φάρμακο τις χαρακτηριστικές ιδιότητες που είναι απαραίτητες για την επιτυχία της επιθυμητής βιολογικής δράσης. Οι παράμετροι αυτοί καθορίζουν και την τοξικότητα που μπορεί να εμφανίσει κάποιο φάρμακο αν δεν πληρούνται οι απαραίτητες προϋποθέσεις. Μερικές από αυτές τις ιδιότητες αναλύονται στη συγκεκριμένη ενότητα καθώς η σημασία τους είναι κομβική.

4.1. Λιποφιλία

Η λιποφιλία ορίζεται ως η συγγένεια που έχει ένα φάρμακο με ένα λιπόφιλο περιβάλλον. Η ιδιότητα αυτή είναι μία ιδιαίτερα χρήσιμη γνώση για το σχεδιασμό νέων φαρμάκων καθώς το μόριο όταν εισέρχεται στον οργανισμό διέρχεται από πολλές λιπαρές φάσης όπως για παράδειγμα οι κυτταρικές μεμβράνες οι οποίες αποτελούνται από φωσφολιπίδια. ^[3]

Μια ποσοτική έκφραση της λιποφιλίας είναι ο συντελεστής μερισμού P. Ο συντελεστής αυτός ορίζεται ως ο λόγος του φαρμάκου στη λιπιδική φάση προς τη συγκέντρωση του στην υδατική.

$$P = \frac{[\text{φαρμάκου}]_{\text{λιπ}}}{[\text{φαρμάκου}]_{\text{υδατ}}} \quad \text{Εξ. 1}$$

Όσο πιο μεγάλη τιμή λαμβάνει ο συντελεστής τόσο μεγαλύτερη η κατανομή του φαρμάκου στη λιπιδική φάση επομένως, το φάρμακο είναι πιο λιπόφιλο.

Μια άλλη έκφραση της λιποφιλίας είναι ο συντελεστής κατανομής D η αλλιώς ο φαινόμενος συντελεστής μερισμού P'. Ο συντελεστής D διαφέρει ως προς τον P καθώς συνυπολογίζει τα κέντρα ιοντισμού που φέρουν κάποιες ενώσεις. Συνεπώς, ορίζεται ως ο λόγος του αθροίσματος των συγκεντρώσεων της ιοντισμένης και αδιάστατης μορφής προς το άθροισμα των αντίστοιχων συγκεντρώσεων στην υδατική φάση. ^[3]

$$D = \frac{\sum[\text{φαρμάκου}]_{\text{λιπ}}}{\sum[\text{φαρμάκου}]_{\text{υδατ}}} \quad \text{Εξ. 2}$$

Να σημειωθεί ότι όταν οι ενώσεις δεν εμφανίζουν κάποιο κέντρο ιοντισμού, είναι δηλαδή ουδέτερες, τότε οι δύο αυτοί συντελεστές έχουν την ίδια τιμή. Επιπροσθέτως, να τονισθεί ότι η συνηθισμένη μορφή με την οποία συναντώνται στη βιβλιογραφία είναι η λογαριθμική με βάση το 10, δηλαδή logP και logD.

Η λιποφιλία ως ιδιότητα παρουσιάζει διττή φύση. Η διττή, αυτή, φύση βασίζεται στις δύο άλλες συνιστώσες που μαζί συντελούν την ιδιότητα της λιποφιλίας, την πολικότητα και την

υδροφοβία. Πολλές φορές συγχέεται η λιποφιλία με την υδροφοβία ωστόσο, υπάρχουν κάποια σημεία που τις διαφοροποιούν. Η δεύτερη ορίζεται ως η συσσωμάτωση μη πολικών ομάδων εξαιτίας της τάσης των μορίων του νερού να αποφεύγουν τα μη πολικά μόρια. [3]

Η σχέση που περιγράφει τη φύση της λιποφιλίας εμφανίζεται ακολούθως.

Λιποφιλία=Υδροφοβία-Πολικότητα

Εξ. 3

4.2. Βαθμός Ιοντισμού και φορτίο

Στην ανάπτυξη φαρμάκων αναγκαία συνθήκη είναι ο συνυπολογισμός των διάφορων κέντρων ιοντισμού που εντοπίζονται στη ένωση και φυσικά του βαθμού στον οποίο ιοντίζεται. Αυτό επιτυγχάνεται με τη χρήση της σταθερά ιοντισμού, pK_a . Είναι γνωστό ότι προϋπόθεση για τη δίοδο ενός φαρμάκου μέσω των βιολογικών μεμβρανών είναι να το φάρμακο να βρίσκεται σε μη ιοντισμένη μορφή. Πάνω από το 60% των φαρμάκων, ωστόσο, φέρουν ομάδες που ιοντίζονται. Υψηλή τιμή του βαθμού ιοντισμού δυσκολεύει την διέλευση μέσω των μεμβρανών, συνεπώς, το φάρμακο καθίσταται μη ικανό να εκτελέσει σωστά τη βιολογική του δράση. [27]

Όπως αναφέρθηκε άνωθεν τα φάρμακα φέρουν πολλά κέντρα ιοντισμού τα οποία θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη για αυτό το λόγο πολλές φορές χρησιμοποιούνται κάποιοι άλλοι παράγοντες οι οποίοι εκφράζουν ποσοτικά το βαθμό στον οποίο είναι ιοντισμένο ένα φάρμακο και είναι οι F^+ και F^- . Οι τελευταίοι είναι ποσοστά τα οποία υποδηλώνουν τα κλάσματα του θετικού και του αρνητικού φορτίου στην εκάστοτε τιμή pH που θα βρεθεί. Οι όροι αυτοί είναι ιδιαίτερα συνήθεις στη βιβλιογραφία καθώς βρίσκουν εφαρμογή στα διάφορα μοντέλα τα οποία κατασκευάζονται ώστε να περιγραφεί κάποια βιολογική διεργασία όπως για παράδειγμα η απορρόφηση ενός φαρμάκου από το στόμα. [3][27]

4.3. Δυνατότητα σχηματισμού δεσμών υδρογόνου

4.3.1. HBA, HBD και HAD

Η ικανότητα που έχουν κάποιες ενώσεις να δημιουργούν δεσμούς υδρογόνου καθορίζουν σε μεγάλο βαθμό τη βιολογική δράση τους. Οι δείκτες οι οποίοι χρησιμοποιούνται συνήθως για τον προσδιορισμό της ικανότητας αυτής είναι οι HA (Hydrogen Acceptors) ή HBA (Hydrogen Bond Acceptor) και HD (Hydrogen Donors) HBD (Hydrogen Bond Donor) οι οποίοι είναι οι αριθμοί των δεκτών και δοτών πρωτονίων αντίστοιχα. Ένας άλλος αριθμός που χρησιμοποιείται είναι το άθροισμα των συνολικών θέσεων δεκτών και δοτών HAD. Οι παραπάνω δείκτες αποτελούν μια απλοποιημένη μέθοδο προσδιορισμού της ικανότητας σχηματισμού δεσμών υδρογόνου και δε συνυπολογίζουν την ισχύ των δεσμών αυτών. ^[3]

4.2.1. Εμβαδόν Πολικής επιφάνειας, Polar Surface Area- PSA (Topological Polar Surface Area- TPSA)

Το εμβαδόν πολικής επιφάνειας είναι μία διαφορετική προσέγγιση για τον προσδιορισμό της ικανότητας δημιουργίας δεσμών υδρογόνου και ορίζεται ως το εμβαδόν στο οποίο εντοπίζονται πολικά άτομα, όπως άτομα αζώτου και οξυγόνου, συνδεδεμένα με υδρογόνα. Η παράμετρος αυτή χρησιμοποιείται ευρέως και μάλιστα έχει συσχετιστεί με την γαστρεντερική απορρόφηση φαρμάκων και την διαπερατότητα μέσω του αιματοεγκεφαλικού φραγμού. ^[3]

4.2.2. Παράμετροι Abraham

Άλλες παράμετροι που χρησιμοποιούνται αρκετά για την περιγραφή της ικανότητας δεσμών υδρογόνου είναι οι παράμετροι του Abraham ο οποίος προτείνει την ακόλουθη εμπειρική εξίσωση για την συσχέτιση των ιδιοτήτων των διαλυμένων ουσιών (Solute Properties-SP), όπως για παράδειγμα η διαλυτότητα, με πέντε παραμέτρους A,B, E, S και V

$$\log SP = c + e \cdot E + s \cdot S + a \cdot A + b \cdot B + u \cdot V \quad \text{Εξ. 4}$$

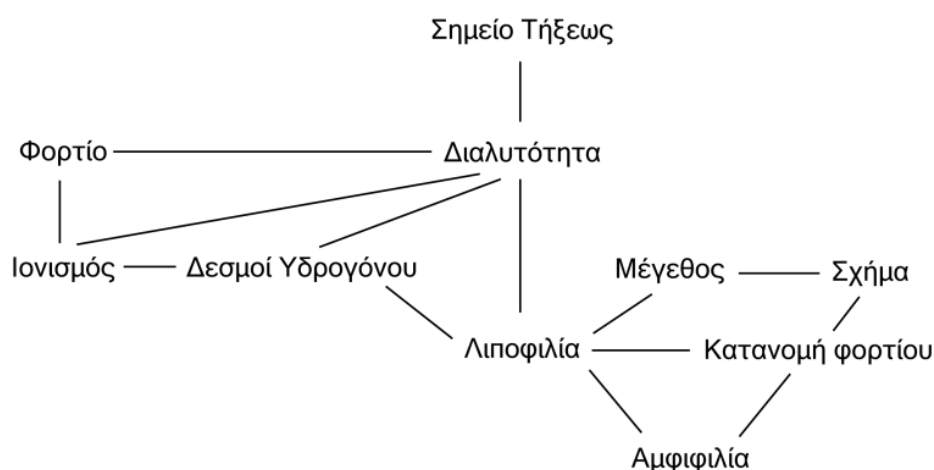
Οι παράμετροι A και B αντιπροσωπεύουν την οξύτητα και την βασικότητα σε δεσμούς υδρογόνου αντίστοιχα, ο παράγοντας E εκφράζει την περίσσεια μοριακής διαθλασιμότητας, πληροφορία η οποία αντλείται από το δείκτη διάθλασης. Η παράμετρος S είναι η πολωσιμότητα/ διπολικότητα η οποία μπορεί να υπολογιστεί πειραματικά από χρωματογραφικές μετρήσεις σε πολικές στατικές φάσεις. Τέλος, ο παράγοντας V υποδηλώνει το χαρακτηριστικό μοριακό όγκο κατά McGowan ο οποίος υπολογίζεται από τις συνεισφορές των δεσμών και των ατόμων. Οι συντελεστές αυτών των παραμέτρων υπολογίζονται ύστερα από πολλαπλή γραμμική παλινδρόμηση με το γνωστό $\log SP$, δηλαδή την τιμή της εκάστοτε ιδιότητας. ^{[3] [28]}

4.4. Μοριακό Βάρος MW

Το μοριακό βάρος (Molecular Weight-MW) διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στη διαμόρφωση των χαρακτηριστικών ενός φαρμάκου. Διάφορες έρευνες έχουν δείξει πως σχετίζεται σε μεγάλο βαθμό με τη διαπερατότητα του φαρμάκου μέσω των μεμβρανών. Επίσης, σύμφωνα με τον κανόνα του Lipinski αν το μοριακό βάρος του φαρμάκου ξεπερνάει την τιμή 500 τότε αυξάνεται η πιθανότητα προβληματικής δράσης.^[3]

4.5. Άλλες παράμετροι

Είναι πολλές οι παράμετροι οι οποίες επηρεάζουν τη δράση ενός φαρμάκου ωστόσο δεν αξιοποιούνται όλες στην παρούσα προσπάθεια ανάπτυξης μεθόδου πρόβλεψης καρδιοτοξικότητας φαρμάκων καθώς δεν έχουν καμία επίδραση. Ένα παράδειγμα τέτοιας παραμέτρου είναι η διαλυτότητα η οποία συνήθως λαμβάνεται υπόψη κατά τη χορήγηση φαρμάκων και στα πρώιμα στάδια ανάπτυξης τους. Γενικότερα, δεν γίνεται χρήση όλων των παραμέτρων εντούτοις, αυτό δεν αποκλείει το γεγονός ότι κάποια μπορεί να παίζει έμμεσο ρόλο στην καρδιοτοξικότητα, καθώς είναι γνωστό πως όλες οι παραπάνω ιδιότητες εξαρτώνται η μία από την άλλη σε μεγάλο βαθμό. Ακολούθως, παρουσιάζεται ένα διάγραμμα το οποίο απεικονίζει ποιες φυσικοχημικές παράμετροι από αυτές που αναφέρθηκαν εξαρτώνται άμεσα μεταξύ τους. Το συγκεκριμένο πλέγμα αφορά ιδιότητες που σχετίζονται με την απορρόφηση από το στόμα ωστόσο, δεν παύει να καταδεικνύεται με έναν κατάφωρο τρόπο η αλληλοσυσχέτιση των ιδιοτήτων.^[3]



Εικόνα 4. 1. Πλέγμα αλληλοεξαρτώμενων ιδιοτήτων που αφορούν την απορρόφηση από το στόμα^[3]

5. Εισαγωγή στη Χρωματογραφία και τη Βιομιμητική Χρωματογραφία

Χρωματογραφία

Χρωματογραφία ορίζεται η μέθοδος διαχωρισμού ουσιών η οποία βασίζεται στη διαφορετική φυσικοχημική συγγένεια των συστατικών ενός μίγματος μεταξύ μίας στατικής φάσης -συνήθως κάποιο στερεό στρώμα ή κάποια υγρό δεσμευμένο σε στερεό υπόστρωμα- και μία κινητή φάση-η οποία μπορεί να είναι υγρή ή αέρια.

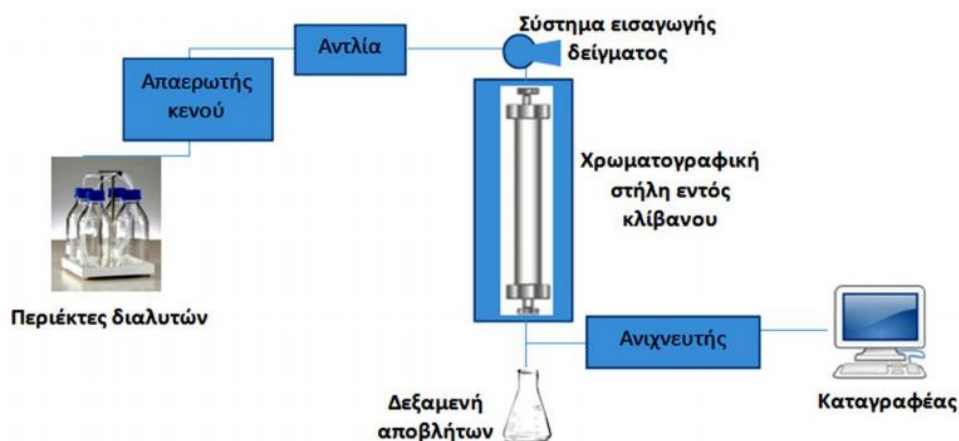
Η παραπάνω μέθοδος μπορεί να διακριθεί σε κατηγορίες ανάλογα με τον τρόπο που λαμβάνει χώρα ο διαχωρισμός. Στην πρώτη κατηγορία υπάγονται οι υγρή και αέρια χρωματογραφία των οποίων το όνομα προδίδει τη φύση της κινητής φάσης σε κάθε περίπτωση. Να συμπληρωθεί, επίσης, ότι αν η κινητή φάση είναι μη πολικός διαλύτης και η στατική είναι κάποιο πολικό υλικό τότε ονομάζεται χρωματογραφία κανονικής φάσης ενώ, στην περίπτωση που ο διαλύτης είναι πολικός συστατικό τότε ονομάζεται αντιστρόφου φάσης. Μια άλλη κατηγοριοποίηση απαρτίζεται από τις ακόλουθες χρωματογραφίες.

- *Χρωματογραφία προσρόφησης:* Ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται χάρις τη διαφορετική ικανότητα κάποιων συστατικών να προσροφώνται πιο ισχυρά από ένα πολικό υλικό με υψηλή προσροφητικότητα σε σχέση με κάποια άλλα. Ένα χαρακτηριστικό τέτοιο υλικό είναι η síλικά (SiO_2).
- *Χρωματογραφία κατανομής:* Ο διαχωρισμός σε αυτήν την περίπτωση πραγματοποιείται εξαιτίας της διαφορετικής κατανομής που εμφανίζουν τα συστατικά του δείγματος στη στατική φάση.
- *Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους:* Η κατηγορία αυτή συναντάται μόνο στην υγρή χρωματογραφία και οφείλεται στο διαχωρισμό των συστατικών λόγω του διαφορετικού μεγέθους τους καθώς η στατική φάση αποτελείται από πορώδη αδρανή υλικά στους πόρους των οποίων εισέρχονται τα μικρότερα σε μέγεθος μόρια και καθυστερούν να εξέλθουν από τη στήλη. Τα υλικά αυτά μπορεί να είναι διάφορων ειδών πηκτές όπως πολυμερικές η πυριτικές.
- *Χρωματογραφία Ιοεναλλαγής:* Τα συστατικά διαχωρίζονται βάσει του φορτίου των ιόντων τα οποία δεσμεύονται ή απωθούνται από την στατική φάση και εξέρχονται από το σύστημα σε διαφορετικούς χρόνους.
- *Χρωματογραφία Συγγένειας:* Αυτή η χρωματογραφία αφορά μόνο την υγρή χρωματογραφία και στηρίζεται στην εκλεκτικότητα που μπορεί να έχει η στατική φάση με κάποιο συστατικό. Ένα παράδειγμα εκλεκτικότητας είναι δράση κάποιων ενζύμων με συγκεκριμένα υποστρώματα.

Οι παραπάνω κατηγορίες αποτελούν τους βασικούς πυλώνες τις χρωματογραφίας εντούτοις η μέθοδος έχει δεχθεί πολλές μετατροπές ώστε να εξυπηρετούνται οι στόχοι της εκάστοτε χρήσης. Παραδείγματα μερικών ειδικών εφαρμογών είναι η αέρια χρωματογραφία αναστρεφόμενης ροής που χρησιμοποιείται κυρίως για την ανάλυση υλικών που έχουν φθαρεί από αέριους ρύπους, η παρασκευαστική χρωματογραφία η οποία χρησιμοποιείται για τον καθαρισμό δειγμάτων ή απομόνωση δειγμάτων υψηλής αξίας και τέλος η βιομιμητική χρωματογραφία ή βιοχρωματογραφία η οποία βρίσκει εφαρμογή σε βιολογικού περιεχομένου αναλύσεις.

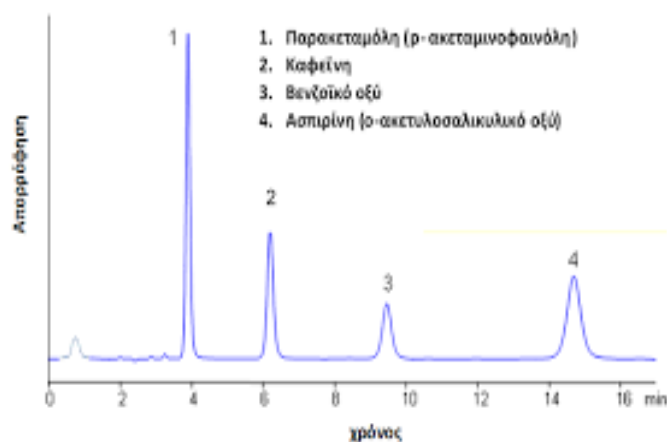
Για μία πιο ξεκάθαρη εικόνα όσον αφορά την δομή μιας χρωματογραφικής τεχνικής θα αναλυθεί η διάταξη μίας υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (High Throughput Liquid Chromatography-HPLC). Αν και υπάρχουν πάρα πολλές κατηγορίες χρωματογραφιών, η

παραπάνω αποτελεί μία πολύ συνήθης διάταξη και συνίσταται από ένα σύστημα εισαγωγής του δείγματος, από μία αντλία η οποία διοχετεύει την κινητή φάση στο χρωματογραφικό σύστημα, μία στήλη στην οποία βρίσκεται η στατική φάση και έναν ανιχνευτή ο οποίος αντιλαμβάνεται την έκλυση της κάθε ένωσης και μετατρέπει την πληροφορία σε σήμα την οποία αποθηκεύει και καταγράφει ένα καταγραφικό όπως για παράδειγμα ένας υπολογιστής. Στην εικόνα που παρουσιάζεται κάτωθι απεικονίζεται ένα διάγραμμα ροής των επιμέρους τμημάτων μίας HPLC μεθόδου. [29]



Εικόνα 5. 1. Διάταξη υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης [29]

Η πληροφορία που λαμβάνεται από μία χρωματογραφική μέθοδο είναι το χρωματογράφημα το οποίο είναι ένα διάγραμμα του σήματος που λαμβάνει ο ανιχνευτής συναρτήσεις του χρόνου. Ο χρόνος στον οποίο εξέρχονται οι ουσίες από το χρωματογραφικό σύστημα ονομάζεται χρόνος ανάσχεσης ή έκλυσης, t_R , (elution/retention time) και εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τις παραμέτρους (λόγου χάρη φορτίο, μέγεθος, συγγένεια κλπ) οι οποίες αναλύθηκαν παραπάνω κατά την ταξινόμηση των χρωματογραφιών. Η μορφή του διαγράμματος απεικονίζεται στην παρακάτω εικόνα. [29]



Εικόνα 5. 2. Διάγραμμα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης αντιστρόφου φάσεως 4 διαφορετικών ενώσεων (Παρακεταμόλη, Καφεΐνη, βενζοϊκό οξύ, ασπιρίνη) [29]

Ένα χαρακτηριστικό μέγεθος το οποίο αντλείται από το διάγραμμα είναι ο συντελεστής χωρητικότητας ή κατακράτησης k (retention factor) και ισούται με

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad \text{Εξ. 5}$$

Όπου t_0 : Ο νεκρός χρόνος δηλαδή το χρονικό διάστημα το οποίο χρειάζεται μία ουσία, η οποία δεν εκδηλώνει κάποια αλληλεπίδραση με το χρωματογραφικό σύστημα, να φτάσει στον ανιχνευτή. Ένας άλλος τρόπος γραφής του συντελεστή κατακράτησης είναι με τη μορφή λογάριθμου $\log k$ και συναντάται σε μεγάλο βαθμό στη βιβλιογραφία. [29]

Βιομηχανική Χρωματογραφία

Οι συνεχώς αυξανόμενες απαιτήσεις της επιστημονικής κοινότητας έχουν οδηγήσει στη μετατροπή ή στη βελτίωση των ήδη υπάρχουσών τεχνολογιών με σκοπό την πιο εξειδικευμένη τους δράση στις διάφορες εφαρμογές. Η πρόκληση την οποία αντιμετωπίζει η φαρμακοβιομηχανία είναι η χρήση γρήγορων και υψηλής απόδοσης τεχνικών κατά την ανάπτυξη ενός φαρμάκου με σκοπό την εξασφάλιση της ποιότητας των ενώσεων. Η βιομηχανική χρωματογραφία ή αλλιώς βιοχρωματογραφία είναι μία παραλλαγή της χρωματογραφίας η οποία υιοθετεί τα στοιχεία της συμβατικής χρωματογραφίας με κάποιο βιολογικό παράγοντα ούτως ώστε να προσομοιώσει βιολογικές διεργασίες και είναι μία πολλά υποσχόμενη μέθοδος για την επίτευξη του παραπάνω στόχου. Διακρίνεται σε τρεις κατηγορίες, στη χρωματογραφία ακινητοποιημένων τεχνητών μεμβρανών IAM, στη χρωματογραφία ακινητοποιημένων Πρωτεϊνών πλάσματος και στη μικκυλιακή Χρωματογραφία.

5.1. Χρωματογραφία Ακινητοποιημένων Τεχνητών Μεμβρανών IAM

Η χρωματογραφία ακινητοποιημένων τεχνητών μεμβρανών (Immobilized Artificial Membrane-IAM- Chromatography), είναι μία υποκατηγορία της HPLC η οποία επιτυγχάνει την προσομοίωση των κυτταρικών μεμβρανών και παράλληλα την ταχύτατη αναπαραγωγή μετρήσεων. Ο τρόπος με τον οποίο πραγματοποιείται η παραπάνω προσομοίωση είναι με τη χρήση ειδικά διαμορφωμένων στατικών φάσεων αποτελούμενες από φωσφολιπίδια (τεχνητές μεμβράνες). Είναι γνωστό ότι τα φωσφολιπίδια είναι το κύριο συστατικό μίας κυτταρικής μεμβράνης συνεπώς, μία τέτοια προσέγγιση προσομοιώνει σε ικανοποιητικό βαθμό τις λιπιδικές συνθήκες οι οποίες επικρατούν. [30] [31]

Η ανάγκη της επινόησης μίας τέτοιας τεχνικής δημιουργήθηκε από την επιφυλακτική και επικριτική στάση που υπήρχε απέναντι στο σύστημα οκτανόλης-νερού ως προς την ικανότητα του να περιγράψει με ακρίβεια τη λιποφιλία των βιολογικών μεμβρανών. [31]

Η στατική φάση αποτελείται από μία στιβάδα αμφιφιλικών (διαθέτουν και υδρόφιλα και υδρόφοβα τμήματα) φωσφολιπιδίων (όπως η εξωτερική πλευρά μιας μεμβράνης) τα οποία συνδέονται ομοιοπολικά με το σκελετό της πυριτίδας (οξειδίο του πυριτίου-SiO₂) μέσω των

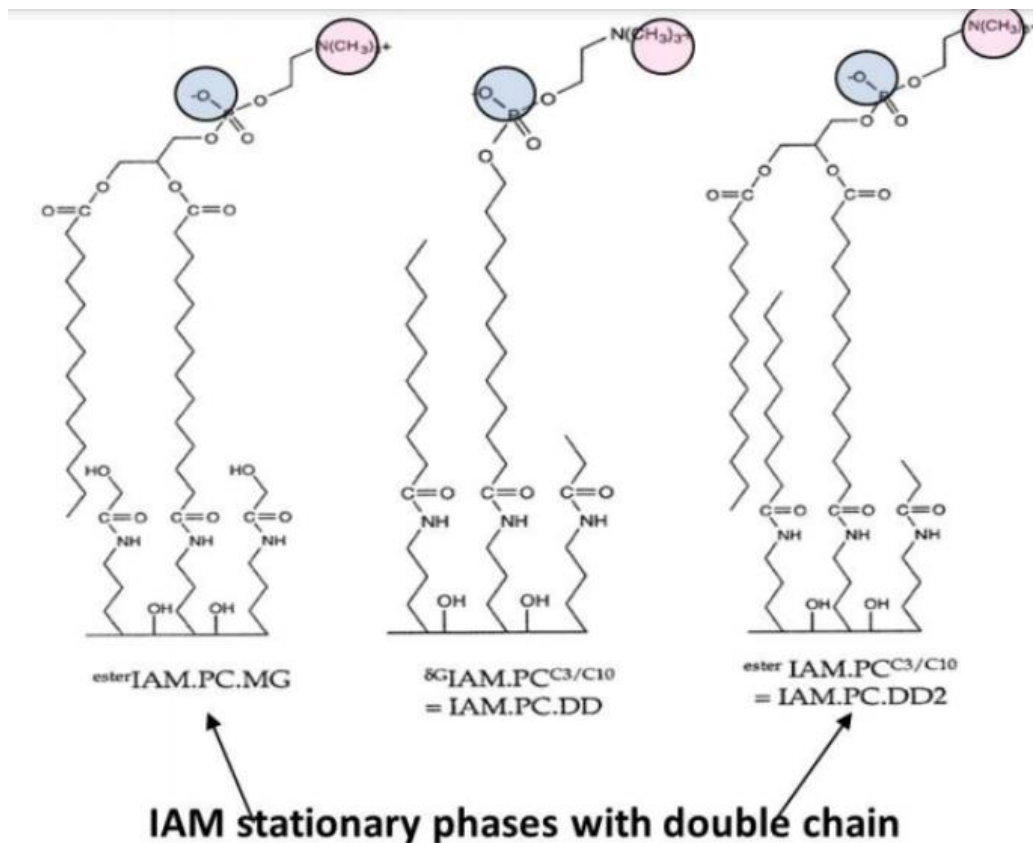
ομάδων προπυλαμίνης ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{NH}_2$). Το φωσφολιπίδιο το οποίο χρησιμοποιείται ονομάζεται φωσφατιδυλοχολίνη (PC) και είναι το μεμβρανικό λιπίδιο το οποίο επικρατεί στις μεμβράνες. Όπως αναφέρθηκε τα μόρια PC συνδέονται με την πυριτία, ωστόσο, λόγω στερεοχημικής παρεμπόδισης κάποιες ομάδες προπυλαμίνης παραμένουν ελεύθερες (περίπου 2mol προπυλαμίνης/mol PC) γεγονός το οποίο καθιστά μια περιοχή λίγο πιο χαμηλά από την επιφάνεια της στατικής φάσης ελαφρώς βασική. Η κατακράτηση των μεγάλων πρωτεϊνικών μορίων δεν επηρεάζεται λόγω του μεγέθους τους εντούτοις, ο χρόνος έκλυσης κάποιων μικρών όξινων ενώσεων αυξήθηκε και ο χρόνος κάποιων μικρών βασικών μειώθηκε.^{[30] [31]}

Το παραπάνω πρόβλημα αντιμετωπίστηκε καλύπτοντας τα υπολείμματα προπυλαμίνης με μία τεχνική η οποία ονομάζεται end-capping και χρησιμοποιεί μόρια γλυκιδόλης (glycidol) ή μεθυλογλυκολικά μόρια (Methylglycolate-MG). Η πρώτη κατηγορία δεν είναι διαθέσιμη εμπορικά ενώ η δεύτερη, IAM.PC.MG, χρησιμοποιείται ευρέως. Το end-capping με μόρια MG μετατρέπουν τα μόρια προπυλαμίνης σε ουδέτερες αμίνες παρ' όλα αυτά υπάρχει ένα αντίτιμο, κάποιες υδροξυλόμαδες (-OH) από το μεθυλογλυκολικό μόριο παραμένουν αδέσμευτες και στις βιολογικές μεμβράνες δε υπάρχουν αυτά τα υδροξύλια.^[31]

Μία διαφορετική στατική φάση αναπτύχθηκε για την αντιμετώπιση των ελεύθερων προπυλαμινών και αυτή περιλαμβάνει τη χρήση δεκανοϊκού ανυδρίτη (decanoic anhydrite). Ο ανυδρίτης χρησιμοποιείται για το end-capping των προπυλαμινών και επιτυγχάνει περίπου κάλυψη του 85% των αμινών. Η χρωματογραφία αυτή ονομάστηκε IAM.PC.DD όπου το DD προέρχεται από τα αρχικά του Drug Discovery καθώς βρίσκει εφαρμογή στην ανακάλυψη φαρμάκων. Οι στήλες με την παραπάνω στατική φάση εκδήλωναν υψηλή υδροφιλία που τις καθιστούσε κατάλληλες για ενώσεις με μικρούς χρόνους έκλυσης. Το μειονέκτημα το οποίο παρουσιάζει είναι η έλλειψη των εστερικών ομάδων της γλυκερόλης οι οποίες συνδέουν την πολική κεφαλή με το υπόλοιπο λιπόφιλο σώμα και αυτό συνεπάγεται διαφορετικές ιδιότητες της επιφάνειας.^[31]

Για την περαιτέρω βελτιστοποίηση της μεθόδου μία πιο εξελιγμένη παραλλαγή της συγκεκριμένης χρωματογραφίας αναπτύχθηκε ως συνδυασμός των δύο παραπάνω χρωματογραφιών. Η κεντρική ιδέα ήταν η δημιουργία μίας στατικής φάσης η οποία θα χαρακτηριζόταν από αυξημένη σταθερότητα και υδροφοβία συνεπώς, δημιουργήθηκε μία στατική φάση με δύο αλυσίδες ενώ, παράλληλα, εφαρμόστηκε η τεχνική end-capping με τη χρήση δεκανοϊκού ανυδρίτη και προπανικού ανυδρίτη (propionic). Η τελευταία χρωματογραφική στήλη είναι ιδιαίτερα διαδεδομένη στον τομέα της ανάπτυξης φαρμάκων και ονομάζεται IAM.PC.DD2 ενώ, η στήλη IAM.PC.DD έχει αποσυρθεί από το εμπόριο.^{[31] [32]}

Στην ακόλουθη εικόνα (Εικόνα 5. 3.) διακρίνονται οι διαφορές στη χημική δομή των τριών χρωματογραφιών. Στην πρώτη δομή, IAM.PC.MG, φαίνεται η τεχνική με μεθυλογλυκολικό end-capping και τα ελεύθερα υδροξύλια τα οποία δημιουργούνται. Στη δεύτερη δομή, IAM.PC.DD, απεικονίζεται η κάλυψη με το δεκανοϊκό ανυδρίτη αλλά και το κενό που δημιουργείται λόγω της έλλειψης των εστέρων. Τέλος, στην τρίτη δομή παρουσιάζεται η τελική μορφή της επιφάνειας η οποία περιλαμβάνει τα θετικά χαρακτηριστικά της κάθε στατικής φάσης όπως το ολοκληρωμένο end-capping των προπυλαμινών αλλά και το σύνδεση μέσω των εστερικών ομάδων.^{[31] [32]}



Εικόνα 5. 3. Απεικόνιση της χημικής δομής των 3 χρωματογραφικών ακινητοποιημένων μεμβρανών^[31]

Η χρωματογραφία IAM λόγω της γρήγορης εκτίμησης της μεμβρανικής διαπερατότητας από φάρμακα βρίσκει εφαρμογή στην προσομοίωση και τον υπολογισμό της διαπερατότητας φαρμάκων από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, την απορρόφηση από το στόμα, την κατανομή στο δέρμα και την εκτίμηση φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων όπως για παράδειγμα η πρόσδεση με διάφορες πρωτεΐνες και ιστούς.

5.2. Χρωματογραφία Ακινητοποιημένων Πρωτεϊνών πλάσματος

Η χρωματογραφία ακινητοποιημένων πρωτεϊνών υπάγεται στη χρωματογραφία συγγένειας και το κριτήριο με το οποίο πραγματοποιείται η διαφορετική ανάσχεση των ουσιών είναι ο βαθμός συγγένειας της κάθε ουσίας με την ακινητοποιημένη πρωτεΐνη στην στατική φάση. Η πρόσδεση των φαρμάκων στις πρωτεΐνες του πλάσματος είναι μια πολύ σημαντική διεργασία και είναι βαρύνουσας σημασίας η εκτίμηση του ποσοστού στον οποίο πραγματοποιείται. Πιο συγκεκριμένα, η πρόσδεση στις πρωτεΐνες του πλάσματος είναι μία παράμετρος η οποία επηρεάζει την απορρόφηση, την κατανομή, το μεταβολισμό και την απέκκριση των φαρμάκων. Αν και υπάρχουν πολλά συστατικά στο πλάσμα του αίματος υπάρχουν δύο πρωτεΐνες οι οποίες βρίσκονται σε πλειονότητα, συνδέονται με έναν μεγάλο αριθμό φαρμάκων και αυτές είναι η αλβουμίνη ανθρώπινου ορού (Human Serum Albumin-HSA) και η 1-όξινο-γλυκοπρωτεΐνη(1-Acid Glycoprotein-AGP).^[33]

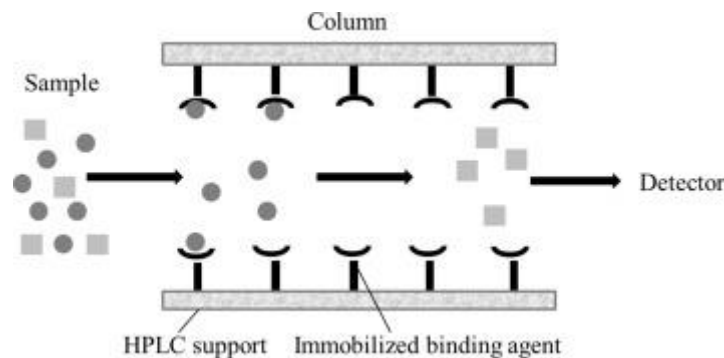
Η πρωτεΐνη HSA έχει βάρος 66 kDA, συντίθεται από 585 αμινοξέα και αποτελεί περίπου το 4.5% του βάρους του ανθρώπινου αίματος. Συνδέεται, κυρίως, με ενδογενείς προσδέτες όπως

λιπαρά οξέα και μεταλλικά ιόντα αλλά και με φάρμακα εκδηλώνοντας μία προτίμηση στην πρόσδεση με όξινα φάρμακα.

Η AGP είναι μία όξινη γλυκοζυλιωμένη πρωτεΐνη με βάρος που κυμαίνεται μεταξύ των τιμών 38-48 kDA και αποτελείται από μία αλυσίδα 204 αμινοξέων. Αξιοσημείωτο είναι ακόμα πως η AGP προσδένεται κυρίως με βασικά και ουδέτερα φάρμακα λόγω του χαμηλού ισοηλεκτρικού σημείου του. [33]

Για τον προσδιορισμό των φαρμάκων τα οποία εμφανίζουν συγγένεια με πρωτεΐνες του πλάσματος διάφορες χρωματογραφικές μετρήσεις λαμβάνουν χώρα, μία αρκετά διαδεδομένη είναι η ακινητοποίηση πρωτεϊνών σε στατικές φάσεις στις στήλες HPLC. Στη βάση της στατικής φάσης χρησιμοποιείται κάποιο συστατικό το οποίο χαρακτηρίζεται από μακράς διάρκειας σταθερότητα σε διάφορες τιμές pH και έχει υποστηρικτικό ρόλο. Το συστατικό αυτό συνήθως είναι διοξειδίο του πυριτίου ή πυριτία. Η ικανότητα των στηλών αυτών να χρησιμοποιούνται με μεγάλες ροές κινητής φάσης καθιστά αυτήν την κατηγορία κατάλληλη για ταχύ χαρακτηρισμό αλληλεπίδρασης φαρμάκων-πρωτεϊνών πλάσματος με μεγάλη αναπαραγωγικότητα. [33][34]

Στην παρακάτω εικόνα απεικονίζεται ποιοτικά μία στήλη HPLC στην οποία βρίσκεται ακινητοποιημένη κάποια πρωτεΐνη και φαίνεται πως τα συστατικά τα οποία παρουσιάζουν συγγένεια με την στήλη εξέρχονται αργότερα από αυτήν.

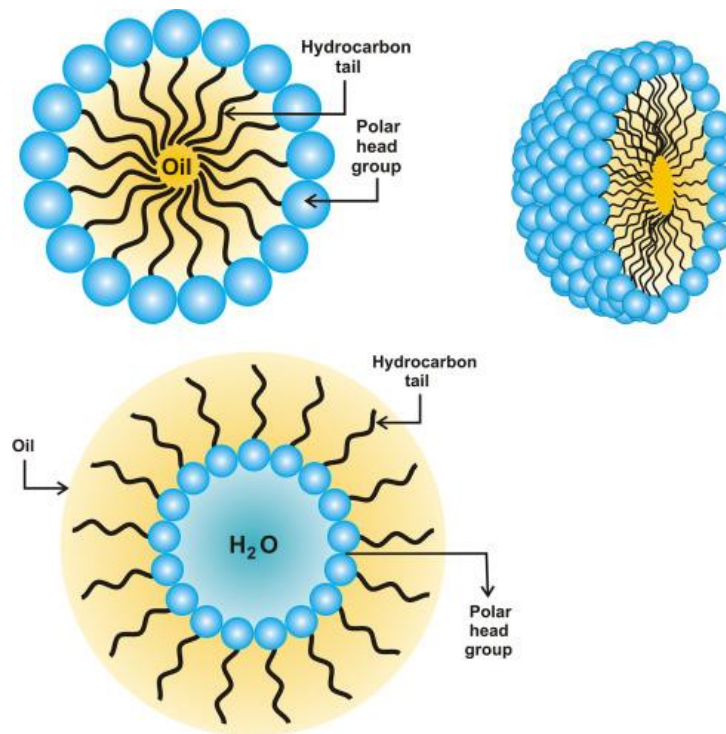


Εικόνα 5. 4. Ποιοτική αναπαράσταση στήλης με ακινητοποιημένες πρωτεΐνες [35]

5.3. Μικκυλιακή Χρωματογραφία Βιοκατανομής (Biopartitioning Micellar Chromatography-BMC)

Για την καλύτερη κατανόηση της συγκεκριμένης κατηγορίας χρωματογραφίας θα πρέπει οριστούν εν συντομία οι έννοιες του μικκυλίου και του τασιενεργού τα οποία διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο. Όταν συγκεκριμένα λιπιδικά σωματίδια τα οποία αποτελούνται από ένα υδρόφοβο και ένα υδρόφιλο τμήμα βρεθούν σε ένα υδατικό περιβάλλον τότε διαμορφώνονται με τέτοιο τρόπο στο χώρο ώστε το υδρόφοβο τμήμα να μη βρίσκεται σε επαφή με το νερό. Πιο συγκεκριμένα, δημιουργείται μία κλειστή σφαιρική δομή όπου στην εξωτερική της επιφάνεια βρίσκονται τα υδρόφιλα τμήματα ενώ στο εσωτερικό τα υδρόφοβα. Η διαμόρφωση αυτή ονομάζεται μικκύλιο. Το υδρόφοβο μέρος είναι συνήθως κάποια υδρογονανθρακική αλυσίδα (ουρά) ενώ, το υδρόφιλο αποτελείται από μία πολική ομάδα (κεφαλή). Να σημειωθεί, ακόμη, πως μικκύλιο σχηματίζεται και όταν το περιβάλλον είναι λιπαρό. Σε αυτήν την περίπτωση η διαμόρφωση η οποία λαμβάνει χώρα είναι με τις υδρόφιλες κεφαλές να βρίσκονται στο εσωτερικό ενώ, οι λιπόφιλες ουρές στο εξωτερικό. Στην εικόνα (Εικόνα 5. 5)

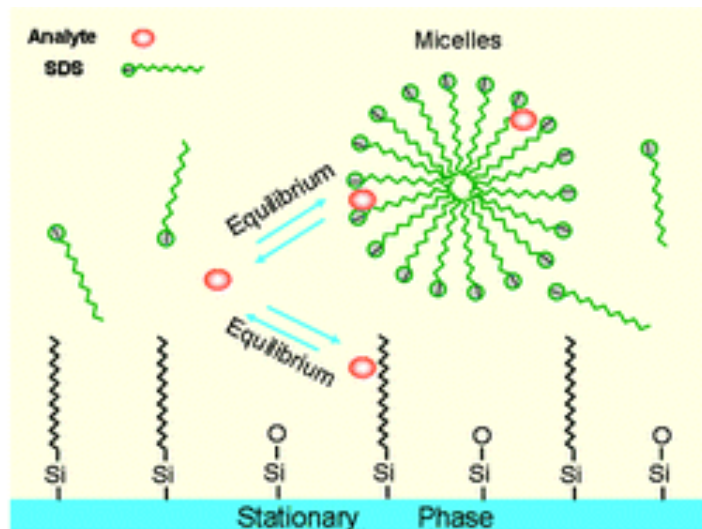
κάτωθι παρουσιάζονται οι δομές των μικκυλίων όταν αυτά βρίσκονται σε υδατικό ή λιπαρό περιβάλλον. Ακόμα, φαίνεται η κλειστή σφαιρική δομή των μικκυλίων.



Εικόνα 5. 5. Διαμόρφωση ενός μικκυλίου στο χώρο όταν το περιβάλλον είναι υδατικό(η πρώτη και η δεύτερη δομή) και όταν το περιβάλλον είναι λιπαρό (η τρίτη δομή) [36]

Οι ενώσεις οι οποίες φέρουν ένα υδρόφιλο μέρος το οποίο εμφανίζει μεγάλη συνάφεια με το νερό και ένα λιπόφιλο μέρος, ονομάζονται τασιενεργές ή επιφανειοδραστικές. Οι ενώσεις αυτές έχουν το χαρακτηριστική ιδιότητα να μειώνουν την επιφανειακή τάση του νερού (και αν οι συγκέντρωση του ξεπεράσει μία συγκεκριμένη τιμή τότε σχηματίζονται τα μικκύλια. Η συγκέντρωση αυτή ονομάζεται κρίσιμη μικκυλιακή συγκέντρωση (Critical Micelle Concentration -CMC).

Στη βιομηχανική μικκυλιακή χρωματογραφία χρησιμοποιούνται στήλες αντιστρόφου φάσεως για την στατική φάση και στην κινητή φάση γίνεται χρήση τασιενεργών προς σχηματισμό μικκυλίων. Συγκέντρωση τασιενεργού μεγαλύτερη από τη CMC συνεπάγεται το σχηματισμό μικκυλίων και τη συνύπαρξη αυτών και των μονομερών τασιενεργών στην κινητή φάση. Το γεγονός αυτό έχει ως συνέπεια τις διαφορετικές ιδιότητες της στατικής και της κινητής φάσης. Έτσι, σχηματίζονται δύο ισορροπίες, αυτή μεταξύ μονομερών τασιενεργών στην στατική φάση και ουσίας-προς ανάλυση- και εκείνη μεταξύ μικκυλίων και ουσίας-προς ανάλυση- της κινητής φάσης. Στη πρώτη ισορροπία τα μονομερή δεσμεύονται στην στατική φάση με υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις ή με ηλεκτροστατικές έλξεις που δημιουργούνται με την πυριτία. Αυτή η ισορροπία προσομοιώνει τις κυτταρικές μεμβράνες. Στην δεύτερη ισορροπία τα λιπόφιλα φάρμακα μπορούν να δεσμευτούν στο εσωτερικό των μικκυλίων και να αυξηθεί η κατανομή τους στην κινητή φάση. Αυτή η διεργασία είναι ικανή να προσομοιώσει τα διάφορα λιπίδια όπως φωσφολιπίδια, τριγλυκερίδια, χοληστερόλη και άλλα τα οποία σχηματίζουν μικκύλια με πρωτεΐνες (λιποπρωτεΐνες). Στην ακόλουθη εικόνα (Εικόνα 5. 6) παρουσιάζονται οι δύο ισορροπίες που προαναφέρθηκαν. Με πράσινο χρώμα είναι τα τασιενεργά τα οποία σχηματίζουν μικκύλια ενώ με κόκκινο χρώμα είναι η προς ανάλυση ουσία.



Εικόνα 5. 6. Ποιοτική αναπαράσταση των δύο ισορροπιών που λαμβάνουν χώρα κατά τη διάρκεια μίας μέτρησης BMC ^[37]

Όσον αφορά την κινητή φάση, χρησιμοποιούνται διαφορετικά τασιενεργά τα οποία προσδίδουν και διαφορετικές ιδιότητες. Ανάλογα με το φορτίο της πολικής κεφαλής διακρίνονται σε ανιοντικά, κατιοντικά, μη ιονικά και αμφοτεριονικά (άλλοτε κατιοντικά και άλλοτε ανιοντικά). Τα πιο διαδεδομένα τασιενεργά σε εφαρμογές μικκυλιακής χρωματογραφίας είναι τα παρακάτω:

- Δωδεκυλο-θειικό νάτριο (Sodium dodecyl sulfate- SDS): Είναι ένα ανιοντικό τασιενεργό το οποίο χρησιμοποιείται συνήθως με κάποιο οργανικό διαλύτη ώστε να εξασφαλίζεται η μείωση του χρόνου έκλουσης και η αύξηση της αποτελεσματικότητας.
- Πολυαιθυλενογλυκολικός δαφνικός αιθέρας (Polyoxyethylene (23) lauryl ether) Brij-35): Είναι ένα μη ιοντικό τασιενεργό το οποίο μειώνει την πολικότητα της στατικής φάσης με αποτέλεσμα να καθίσταται ουδέτερη.
- Tween 20: Ένα ακόμη μη ιοντικό τασιενεργό το οποίο εξαιτίας της ανικανότητας του να αναπτύξει ηλεκτροστατικές έλξεις διατηρεί τη στατική φάση ουδέτερη.
- Cetyl trimethylammonium bromide- CTAB: Κατιοντικό τασιενεργό το οποίο καθιστά την στατική φάση θετικά φορτισμένη γεγονός το οποίο συμβάλλει στην μεγαλύτερη διάρκεια κατακράτησης οξίνων φαρμάκων. ^{[37] [38] [39]}

6. Μέθοδοι Στατιστικής και Χημειομετρικής Επεξεργασίας Δεδομένων

Οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται σε μεγάλο βαθμό για την επεξεργασία μεγάλου όγκου δεδομένων είναι η Πολλαπλή Γραμμική Ανάλυση Παλινδρόμησης (Multiple Linear Regression Analysis, MLRA και η Πολυμεταβλητή Ανάλυση Δεδομένων (Multivariate Data Analysis)

6.1. Πολλαπλή Γραμμική Ανάλυση Παλινδρόμησης

Η πολλαπλή ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης συσχετίζει μία εξαρτημένη μεταβλητή με πολλές ανεξάρτητες με γραμμικό τρόπο. Εξάγοντας έναν τύπο της παρακάτω μορφής:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 \cdot X_1 + \beta_2 \cdot X_2 + \beta_3 \cdot X_3 + \dots + \beta_n \cdot X_n \quad \text{Εξ. 6}$$

Όπου Y είναι η εξαρτημένη μεταβλητή, οι $X_1, X_2, X_3, \dots, X_n$ είναι οι ανεξάρτητες μεταβλητές και $\beta_0, \beta_1, \beta_2, \beta_3, \dots, \beta_n$ οι συντελεστές των ανεξάρτητων μεταβλητών.

Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η συσχέτιση της βιολογικής δράσης ενός φαρμάκου με φυσικοχημικές παραμέτρους. Ο τρόπος με τον οποίο επιτυγχάνεται η διαδικασία αυτή είναι λαμβάνοντας τις τιμές των παραμέτρων ως ανεξάρτητες μεταβλητές X για ένα πλήθος φαρμάκων και ο παράγοντας ο οποίος ποσοτικοποιεί την προς συσχέτιση δράση λαμβάνεται ως εξαρτημένη μεταβλητή. Με την αποπεράτωση την μεθόδου αντλούνται οι συντελεστές β , οι οποίοι βοηθούν στο να κατασκευαστεί η εξίσωση δ που θα περιγράψει την επιθυμητή δράση.

Παρόλα αυτά, θα πρέπει με κάποιο να εξασφαλίζεται και η αξιοπιστία της μεθόδου. Ο τρόπος αυτός είναι η αξιολόγηση συγκεκριμένων δεικτών η οποίοι θα πρέπει να βρίσκονται σε ένα συγκεκριμένο εύρος τιμών ώστε να θεωρείται αξιόπιστη η μέθοδος. Οι δείκτες αυτοί παρουσιάζονται κάτωθι:

- Συντελεστής προσδιορισμού R^2 : Το επιθυμητό αποτέλεσμα είναι αυτός ο δείκτης να προσεγγίζει το 1 καθώς περιγράφει το % ποσοστό υποδεικνύει το ποσοστό των περιπτώσεων που περιγράφει.
- Τυπική απόκλιση s : Η τιμή αυτή πρέπει να τείνει στο 0 ώστε να υπάρχει όσο το δυνατόν μικρότερη απόκλιση του μοντέλου από την πραγματικότητα
- P-value: Η τιμή p θα πρέπει να είναι μικρότερη από 0.05 για ένα αξιόπιστο μοντέλο είναι
- t-value: Σύμφωνα με αυτό το κριτήριο θα πρέπει η απόλυτη τιμή t , $|t|$, να είναι μεγαλύτερη από 2.
- Ο αριθμός N του δείγματος θα πρέπει να είναι τέτοιος ώστε να υπάρχουν τουλάχιστον 5 δεδομένα ανά μεταβλητή

Μερικά σημεία που πρέπει να τονιστούν είναι πως η μέθοδος επιβάλλει την ύπαρξη μόνο μίας εξαρτημένης μεταβλητής και πως οι ανεξάρτητες μεταβλητές θα πρέπει να είναι γραμμικές

ανεξάρτητες μεταξύ τους. Αν υπάρχει οποιαδήποτε γνωστή συσχέτιση μεταξύ κάποιων μεταβλητών, θα πρέπει να επιλεγεί μόνο μία μεταβλητή. [3]

6.2. Πολυμεταβλητή Ανάλυση Δεδομένων

Η πολυμεταβλητή ανάλυση δεδομένων χρησιμοποιείται για την επεξεργασία δεδομένων μεγάλου όγκου, ιδιαίτερα όταν οι μεταβλητές που πρόκειται να εξεταστούν είναι περισσότερες από 5 και πολύ περισσότερο όταν ορισμένες από αυτές μπορεί να αλληλοσχετίζονται (colinearity). Στην πραγματικότητα επιτελείται μια σημαντική «μείωση διαστάσεων» του αρχικού πίνακα (παρατηρήσεις x μεταβλητές) κατά τέτοιο τρόπο ώστε να ερμηνεύονται ευκολότερα τα δεδομένα και να εξάγονται χρήσιμες πληροφορίες που μπορεί να βρίσκονται «κρυμμένες» στον μεγάλο όγκο δεδομένων του αρχικού πίνακα. Η πολυμεταβλητή ανάλυση δεδομένων βασίζεται στην μέθοδο των προβολών και περιλαμβάνει μεταξύ άλλων την ανάλυση κύριων συνιστωσών, την μοντελοποίηση μιας κλάσης και την ανάλυση μερικών ελαχίστων τετραγώνων.

6.2.1. Ανάλυση κυρίων συνιστωσών (PCA)

Η ανάλυση κυρίων συνιστωσών (PCA) αποτελεί μια μέθοδο ταξινόμησης δεδομένων. Ο αρχικός πίνακας δεδομένων αποτελείται από N- σειρές αντικείμενα (π.χ. φαρμακευτικές ενώσεις) και K- στήλες μεταβλητές (π.χ. φυσικοχημικές/ μοριακές ιδιότητες κάθε ένωσης). Από γεωμετρική άποψη, ο πίνακας αυτός αποτυπώνει παρατηρήσεις σε έναν πολυδιάστατο χώρο, όπου οι μεταβλητές προσδιορίζουν τους άξονες. Το μήκος των αξόνων προσδιορίζεται από την κλίμακα των μεταβλητών και επειδή ορισμένες ιδιότητες να βρίσκονται σε πολύ μικρή κλίμακα (π.χ. κλάσμα ιοντισμού από 0 έως 1) και άλλες σε πολύ μεγάλη κλίμακα (π.χ. μοριακή μάζα που μπορεί να ξεπερνά τα 1000 g/mol) χρειάζεται να γίνει μια κανονικοποίηση της κλίμακας (scaling) των μεταβλητών. Συνήθως επιλέγεται ως μήκος κάθε άξονα το 1 (scaling to unit variance). Έτσι, με τον τρόπο αυτό κάθε μεταβλητή θεωρείται ίσης σημασίας ως προς την άλλη.

Η PCA εξάγει από έναν αρχικό αριθμό μεταβλητών έναν περιορισμένο αριθμό νέων (λανθανουσών) μεταβλητών που ονομάζονται κύριες συνιστώσες και συνοψίζουν την πληροφορία που περιέχεται στις αρκετές μεταβλητές. Η πρώτη κύρια συνιστώσα είναι η ευθεία στο χώρο που προσαρμόζει καλύτερα στα δεδομένα. Η δεύτερη κύρια συνιστώσα είναι μια δεύτερη ευθεία στο χώρο, κάθετη στην πρώτη κύρια συνιστώσα (άρα ανεξάρτητη από την πρώτη κύρια συνιστώσα), η οποία βελτιώνει την προσαρμογή των πειραματικών δεδομένων. Οι δύο πρώτες κύριες συνιστώσες ορίζουν νέους άξονες και πάνω σε αυτούς προβάλλονται τα αρχικά σημεία. Η απεικόνιση των αντικειμένων στους νέους άξονες μπορεί να αποκαλύψει συσχετίσεις, ομαδοποιήσεις, αντικείμενα με ισχυρή αποκλίνουσα συμπεριφορά (outliers), κλπ. Ο τρόπος με τον οποίο οι αρχικές μεταβλητές «φορτώνονται» (προβάλλονται) στις κύριες συνιστώσες (διάγραμμα φορτίων) αποκαλύπτει ομοιότητες/ διαφορές μεταξύ των αρχικών μεταβλητών μεταξύ τους.

Στατιστικά στοιχεία της ανάλυσης κυρίων συνιστωσών αποτελούν το ποσοστό αθροισμάτων των τετραγώνων όλων των μεταβλητών που ερμηνεύεται από την κύρια συνιστώσα $R^2(x)$ και το ποσοστό των αθροισμάτων των τετραγώνων όλων των μεταβλητών που ερμηνεύονται από όλες τις κύριες συνιστώσες που εξήχθησαν $R^2(X)$ (cum). Ο έλεγχος της ανάλυσης γίνεται με διασταυρούμενη αξιολόγηση, δηλαδή αφαίρεση αντικειμένων και επανάληψη της στατιστικής

ανάλυσης κάθε φορά έτσι ώστε όλα τα αντικείμενα να έχουν αφαιρεθεί από μια φορά. Σημαντικό στατιστικό μέγεθος της διαδικασίας αυτής αποτελεί ο διασταυρούμενος συντελεστής συσχέτισης, Q^2 , που εκφράζει το ποσοστό της συνολικής διακύμανσης των X που προβλέπεται από την κύρια συνιστώσα και το συνολικό Q^2 , $Q^2(\text{cum})$ που αποτελεί το άθροισμα των Q^2 για όλες τις εξαγόμενες κύριες συνιστώσες ^[46].

6.2.2. Μοντελοποίηση Κλάσεων (Class Modelling)

Η μοντελοποίηση μιας κλάσης μπορεί να θεωρηθεί ως επέκταση της ανάλυσης κύριων συνιστωσών. Ωστόσο, στην περίπτωση αυτή δεν ενδιαφέρει η παρατήρηση συσχετίσεων και γενικότερων ομαδοποιήσεων μεταξύ των αντικειμένων αλλά ο χωρισμός των αντικειμένων σε δυο κατηγορίες ανάλογα με το εάν παρουσιάζουν ή όχι μια ιδιότητα/ προφίλ η έχουν ένα χαρακτηριστικό (π.χ. είναι καρδιοτοξικά ή όχι). Μια επιπλέον διαφορά είναι πως μαζί με τα αριθμητικά δεδομένα σε πίνακα δίνεται και η πληροφορία ως προς ποια από τα αντικείμενα ανήκουν σε αυτή την ειδική κατηγορία που επιθυμείται η μοντελοποίηση της (για τον λόγο αυτό η τεχνική αυτή ανήκει στις «επιβλεπόμενες» χημειομετρικές τεχνικές). Όλα τα υπόλοιπα αντικείμενα θεωρούνται ως άγνωστα.

Μια μέθοδος μοντελοποίησης μιας κλάσης είναι η ήπια ανεξάρτητη μοντελοποίηση αναλογίας κλάσεων (Soft independent modelling by class analogy, SIMCA) είναι μια μη προτυποποιητική μέθοδος αποτύπωσης με βάση την απόσταση που εισήγαγε ο Svante Wold (1977). Τα μοντέλα SIMCA βασίζονται στις κατευθύνσεις της μέγιστης διακύμανσης (και συνεπώς της μέγιστης πληροφορίας) σε έναν χώρο πολλαπλών δεδομένων. Για το σκοπό αυτό, τα δεδομένα αρχικά μετασχηματίζονται με βάση την ταξινόμηση της στήλης ή με τη μέση τιμή της στήλης, η μία από τις οποίες μετατοπίζει την προέλευση των αξόνων αναφοράς ώστε να συμπίπτει με την κεντροειδή τάξη. Στη συνέχεια, εκτελείται ανάλυση κυρίων συνιστωσών (PCA), με περιστροφή γύρω από το κέντρο της κατηγορίας, και ο αριθμός των σημαντικών κατευθύνσεων της μέγιστης διακύμανσης αξιολογείται, συνήθως μέσω μιας διπλής διαδικασίας διασταυρούμενης επικύρωσης. Οι κατευθύνσεις αυτές ορίζουν τον λεγόμενο εσωτερικό χώρο της SIMCA. Η κρίσιμη τιμή αυτής της απόστασης, που καθορίζει την αποδοχή / απόρριψη ενός νέου δείγματος από το μοντέλο, καθορίζεται από την κρίσιμη τιμή των στατιστικών Fisher σε ένα προκαθορισμένο επίπεδο εμπιστοσύνης, δεδομένου ότι τα υπόλοιπα υποτίθεται ότι ακολουθούν μια πολυμεταβλητή κανονική κατανομή. ^[47]

6.2.3. Ανάλυση μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS)

Η ανάλυση παλινδρόμησης μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Squares, PLS) είναι επίσης μια μέθοδος που αποσκοπεί στην συσχέτιση μεταξύ μεταβλητών X και μιας ποσοτικής μεταβλητής Y . Η ανάλυση PLS έχει την ικανότητα να ανιχνεύει ένα κατάλληλο μοντέλο γραμμικής παλινδρόμησης το οποίο προβάλλει τις μεταβλητές σε ένα καινούργιο διάστημα. ^[46]

Η μέθοδος PLS προβάλλει τις μεταβλητές X, Y στον ίδιο υποχώρο, έτσι ώστε να υπάρχει καλή σχέση της θέσης ενός αντικειμένου παρατήρησης X και της αντίστοιχης θέσης του στο επίπεδο Y . Η PLS ανάλυση χρησιμοποιείται για να βρει τη συσχέτιση μεταξύ των δύο μεταβλητών X και Y , δηλαδή μια λανθάνουσα μεταβλητή προσέγγιση για τη μοντελοποίηση των μεταβλητών συνδιακύμανσης σε αυτούς τους δύο υποχώρους. Ένα μοντέλο PLS θα προσπαθήσει να βρει την πολυδιάστατη κατεύθυνση στον χώρο X που εξηγεί τη μέγιστη κατεύθυνση πολυδιάστατης

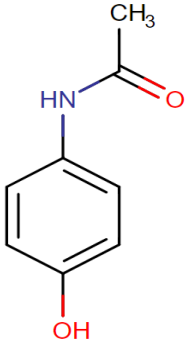
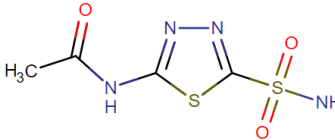
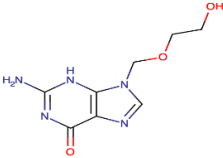
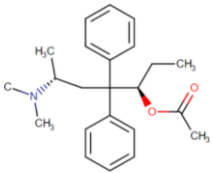
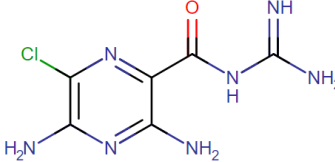
διακύμανσης στον χώρο Y . Η παλινδρόμηση PLS είναι ιδιαίτερα κατάλληλη όταν οι προβλέψεις έχουν περισσότερες μεταβλητές από τις παρατηρήσεις και όταν υπάρχει πολυγραμμικότητα μεταξύ των τιμών X . Αντίθετα, η τυπική παλινδρόμηση θα αποτύχει σε αυτές τις περιπτώσεις, εκτός εάν έχει γίνει κανονικοποίηση ^[46] ^[48]. Ιδιαίτερη σημασία στην ανάλυση PLS έχουν τα στατιστικά στοιχεία που χαρακτηρίζουν το μοντέλο, R^2 και Q^2 . Ο συντελεστής συσχέτισης Q^2 αποτελεί βασικό στατιστικό στοιχείο καθώς καθορίζει σε μεγάλο ποσοστό την βέλτιστη πολυπλοκότητα του μοντέλου. Αντίθετα με τον συντελεστή Q^2 , ο συμβατικός συντελεστής R^2 θα αυξάνεται πάντα με την αύξηση των διαστάσεων (συνιστωσών) του μοντέλου. Η τιμή θα τείνει να πλησιάζει το 1 (δηλαδή, 100%) καθώς οι περισσότερες συνιστώσες PLS ενσωματώνονται στο μοντέλο. ^[46] ^[48]

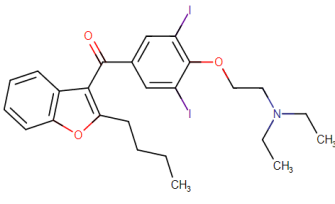
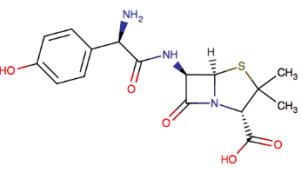
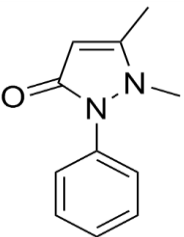
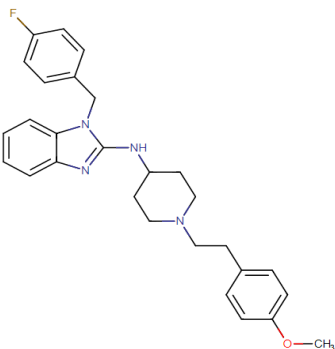
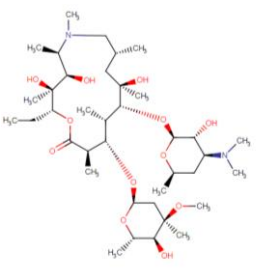
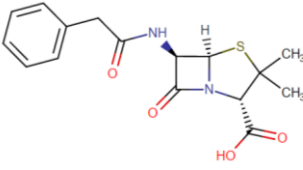
7. Ερευνητικό-Πειραματικό Μέρος

7.1. Συλλογή Δεδομένων

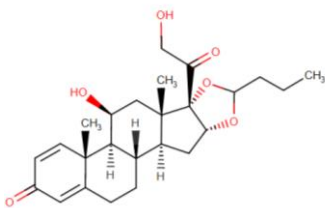
Για την επίτευξη της ανάπτυξης μεθόδου πρόβλεψης καρδιοτοξικότητας πρωταρχική ανάγκη είναι να συλλεχθούν κάποια δεδομένα τα οποία θα υποβληθούν σε μεθόδους στατιστικής και χημειομετρικής επεξεργασίας. Για αυτόν το λόγο αναζητήθηκαν φάρμακα τα οποία είχαν αποσυρθεί από την αγορά διότι προκαλούσαν καρδιοτοξικότητα λόγω αναστολής των καναλιών hERG ή ήταν γνωστό πως παρεμποδίζουν τα κανάλια hERG. Ακόμα, αναζητήθηκαν φάρμακα τα οποία δεν μπορούν να προκαλέσουν καρδιοτοξικότητα λόγω hERG. Μέσω αναζητήσεων σε βάσεις δεδομένων όπως οι ChEMBL (<https://www.ebi.ac.uk/chembl/>), Galinos.gr (<https://www.galinos.gr/>), AMED cardiotoxicity Database (<https://drugdesign.riken.jp/hERGdb/compound.php?HGID=HG-0308062>), Withdrawn Database (<http://cheminfo.charite.de/withdrawn/>), DrugBank (<https://go.drugbank.com/>) και Pubchem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>), σχηματίστηκε ο παρακάτω πίνακας. ^{[49]-[69]}

Πίνακας 7. 1. Παρουσίαση της φαρμακευτική ένωσης, της δομής της, της φαρμακολογική δράση της και την ικανότητα να προκαλέσει καρδιοτοξικότητα

	Φαρμακευτική Ένωση	Δομή	Φαρμακολογική Δράση	Καρδιοτοξικότητα- Παρεμπόδιση hERG καναλιών
1	Acetaminophen (Ακεταμινοφαίνη)		Αναλγητικό/ Αντιπυρετικό	ΟΧΙ
2	Acetazolamide (Ακεταζολαμίδη)		Οφθαλμολογικό	ΟΧΙ
3	Acyclovir (Ακικλοβίρη)		Αντι-ϊικό/ Αναστολέας DNA πολυμεράσης Ιού	ΟΧΙ
4	Levo-α-Acetylmethadol (Λεβακετυλομεθαδόλη)		Οπιοειδές Αναλγητικό	ΝΑΙ
5	Amiloride (Αμιλορίδη)		Διουρητικό (Αναστολέας επαναρρόφησης νατρίου)	ΟΧΙ

6	Amiodarone (Αμιωδαρόνη)		Αντιαρρυθμικό	NAI
7	Amoxicillin (Αμοξικιλίνη)		Αντιβιοτικό	OXI
8	Antipyrine (Αντιπυρίνη)		Αναλγητικό/ Αντιπυριτικό	OXI
9	Astemizole (Αστεμιζόλη)		Αντιισταμινικό	NAI
10	Azithromycin (Αζιθρομυκίνη)		Αντιβιοτικό	NAI
11	Benzylpenicillin (Βενζύλπενικιλίνη)		Αντιβιοτικό	OXI

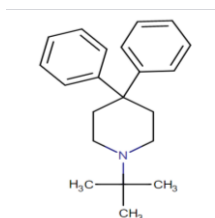
12 **Budesonide**
(Βουδεζονίδη)



Αντιφλεγμονώδες

ΝΑΙ

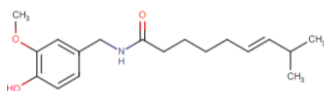
13 **Budipine**
(Βουδιπίνη)



Αντιπαρκινσονικό

ΝΑΙ

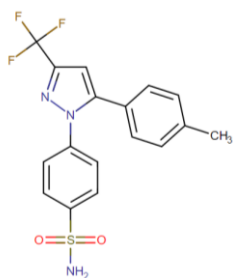
14 **Capsaicin**
(Καψαϊκίνη)



Αναλγητικό

ΝΑΙ

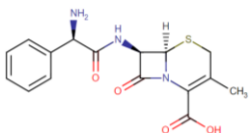
15 **Celecoxib**
(Σελεκοξίμητη)



Αντιφλεγμονώδες

ΝΑΙ

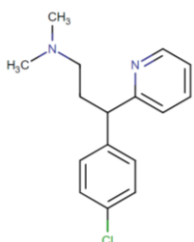
16 **Cephalexin**
(Κεφαλεξίνη)



Αντιβιοτικό

ΟΧΙ

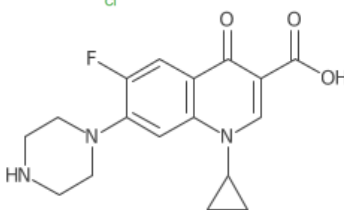
17 **Chlorpheniramine**
(Χλωροφαιουραμίνη)



Αντιισταμινικό

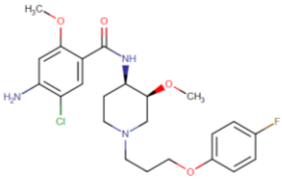
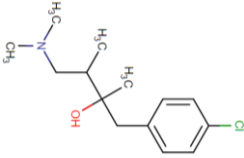
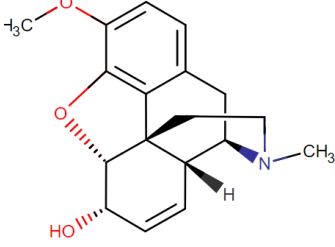
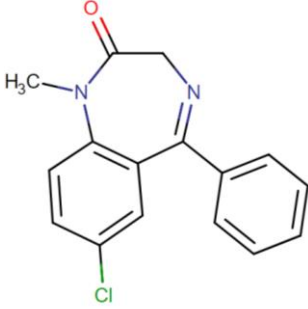
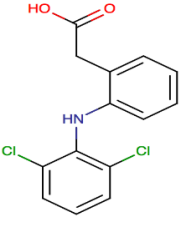
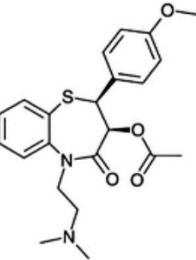
ΝΑΙ

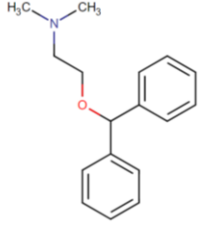
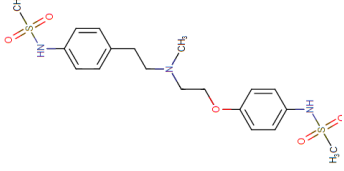
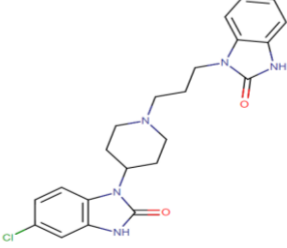
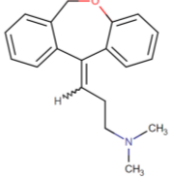
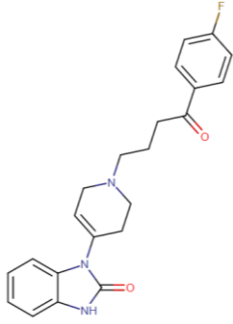
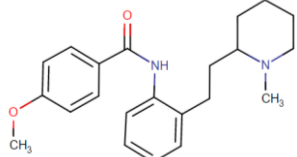
18 **Ciprofloxacin**
(Σιπροφλοξασίνη)

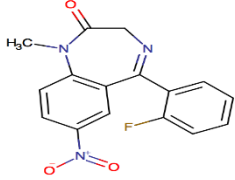
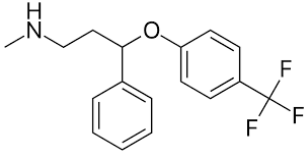
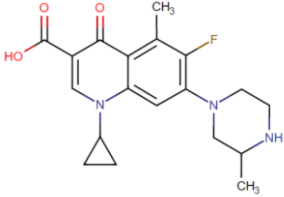
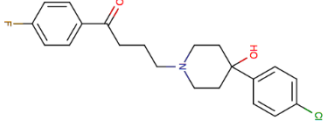
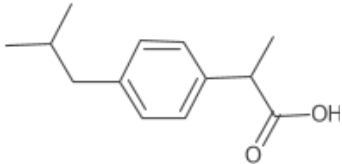
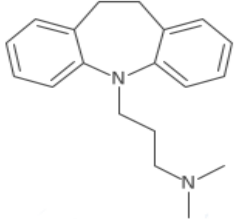
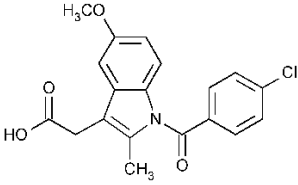
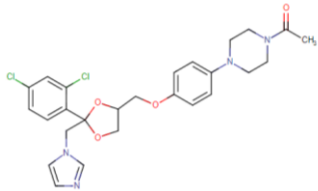


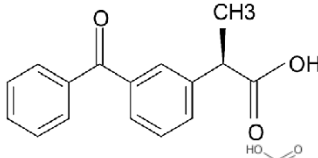
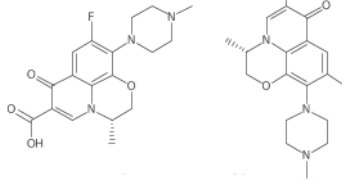
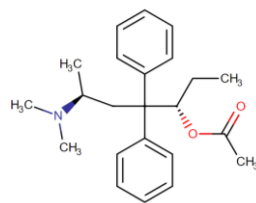
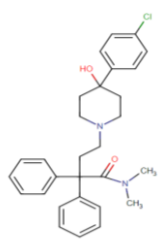
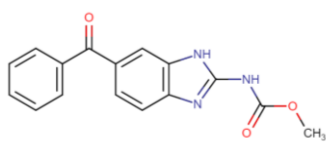
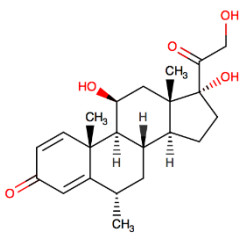
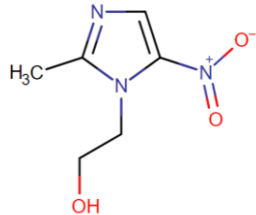
Αντιβιοτικό

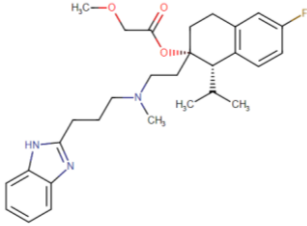
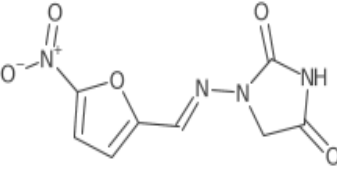
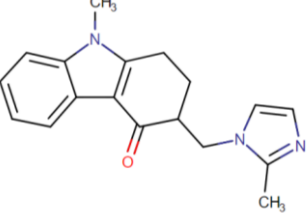
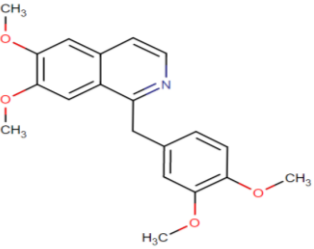
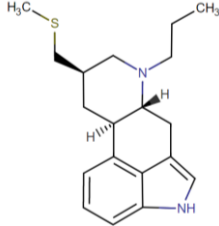
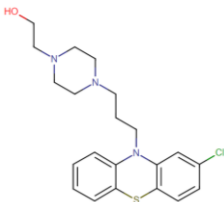
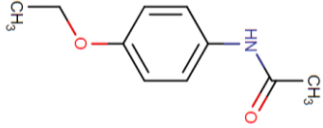
ΝΑΙ

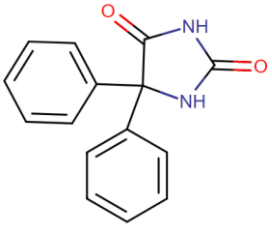
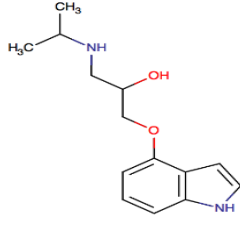
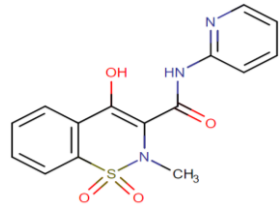
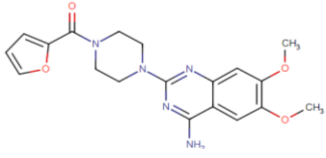
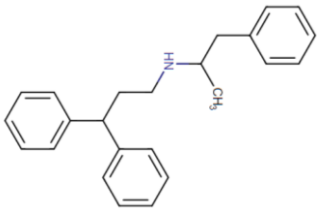
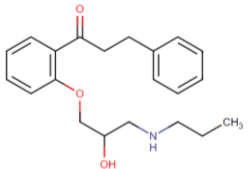
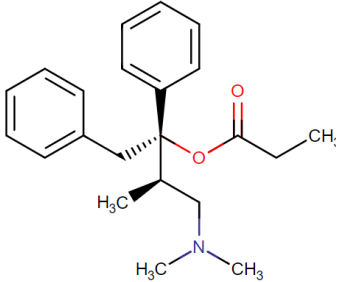
19	Cisapride (Σισαπρίδη)		Προάγον εντερική κινητικότητα	ΝΑΙ
20	Clobutinol (Κλοβουτινόλη)		Αντιβηχικό	ΝΑΙ
21	Codeine (Κωδεΐνη)		Αναλγητικό	ΟΧΙ
22	Diazepam (Διαζεπάμη)		Αγχολυτικό	ΝΑΙ
23	Diclofenac (Δικλοφαινάκη)		Αντιφλεγμονώδες	ΟΧΙ
24	Diltiazem (Διλτιαζέμη)		Αντιστηθαγγική/ Αντιυπερτασική δράση	ΝΑΙ

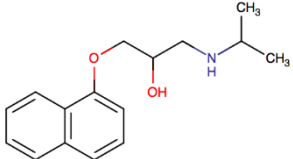
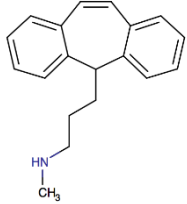
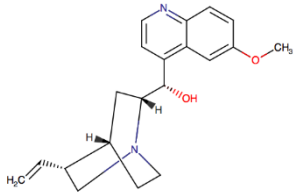
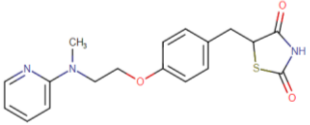
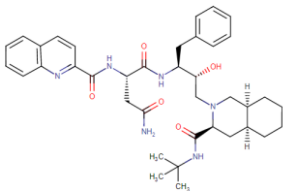
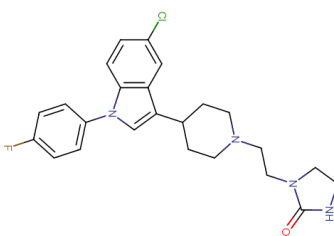
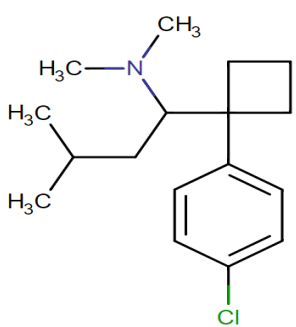
25	Diphenhydramine (Διφαινουδραμίνη)		Αντιισταμινικό	NAI
26	Dofetilide (Ντοφετιλίδη)		Αντιαρρυθμικό	NAI
27	Domperidone (Δομπεριδόνη)		Αναστολέας υποδοχέων ντοπαμίνης	NAI
28	Doxepin (Δοξεπίνη)		Αντικαταθληττικό / Αγχολυτικό	NAI
29	Droperidol (Δροπεριδόλη)		Αναισθητικό	NAI
30	Encainide (Ενκαϊνίδη)		Αντιαρρυθμικό	NAI

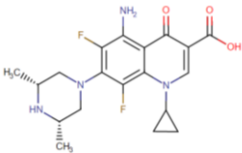
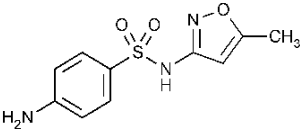
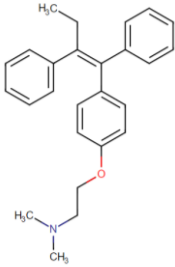
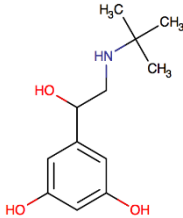
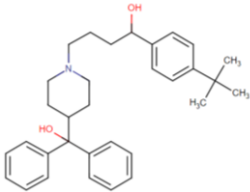
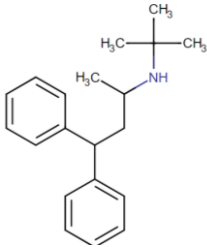
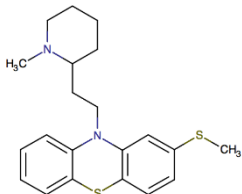
31	Flunitrazepam (Φλουνιτραζεπάμη)		Αγχολυτικό/ Υπνωτικό	ΟΧΙ
32	Fluoxetine (Φλουοξετίνη)		Αντικαταθληπτικό/ Εκλεκτικός αναστολέας επαναπρόσληψης σεροτονίνης	ΝΑΙ
33	Grepafloxacin		Αντιβιοτικό	ΝΑΙ
34	Haloperidol (Αλοπεριδόλη)		Ψυχοτρόπο/ Αντιψυχωσικό	ΝΑΙ
35	Ibuprofen (Ιβουπροφαίνη)		Αντιφλεγμονώδες	ΟΧΙ
36	Imipramine (Ιμιπραμίνη)		Αντικαταθληπτικό	ΝΑΙ
37	Indomethacin (Ινδομεθακίνη)		Αντιφλεγμονώδες	ΟΧΙ
38	Ketoconazole (Κετοκοναζόλη)		Αντιμυκητιασικό	ΝΑΙ

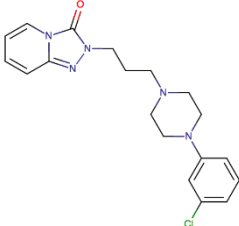
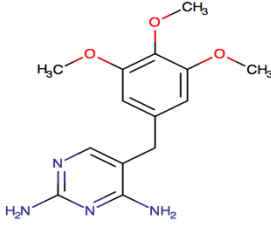
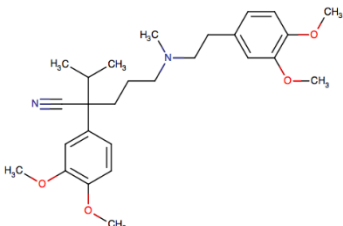
39	Ketoprofen (Κετοπροφαίνη)		Αντιφλεγμονώδες	OXI
40	Levofloxacin (Λεβοφλοξασίνη)		Αντιβιοτικό	NAI
41	Levomethadyl		Αναλγητικό	NAI
42	Loperamide (Λοπεραμίδη)		Αντιδιαρροϊκό	NAI
43	Mebendazole (Μεμπενδαζόλη)		Αναστολέας πολυμερισμού μικροσωληνίσκων κατά το μεταβολισμό υδατανθράκων	NAI
44	Methylprednisolone (Μεθυλπρεδνιζολόνη)		Κορτικοειδές	OXI
45	Metronidazole (Μετρονιδαζόλη)		Αντιβιοτικό	OXI

46	Mibefradil		Αντιυπερτασικό	ΝΑΙ
47	Nitrofurantoin (Νιτροφουραντοΐνη)		Αντιβιοτικό	ΟΧΙ
48	Ondansetron (Ονδασετρόνη)		Αντιεμετικό	ΝΑΙ
49	Papaverine (Παπαβερίνη)		Μυοχαλαρωτικό γαστρεντερικού συστήματος	ΝΑΙ
50	Pergolide		Αντιπαρκινσονικό	ΝΑΙ
51	Perphenazine (Περφαιναζίνη)		Αντιψυχωσικό	ΝΑΙ
52	Phenacetin (Φαινακετίνη)		Αναλγητικό	ΟΧΙ

53	Phenytoin (Φαινυτοΐνη)		Αντιεπιληπτικό	ΝΑΙ
54	Pindolol (Πινδολόλη)		Αποκλειστής των β αδρενεργικών υποδοχέων	ΟΧΙ
55	Piroxicam (Πιροξικάμη)		Αντιφλεγμονώδες	ΟΧΙ
56	Prazosin (Πραζοσίνη)		Αντιυπερτασικό	ΝΑΙ
57	Prenylamine		Αποκλειστής Καναλιών Ασβεστίου	ΝΑΙ
58	Propafenone (Προπαφαινόνη)		Αντιαρρυθμικό	ΝΑΙ
59	Propoxyphene (Προποξυφαΐνη)		Αναλγητικό	ΝΑΙ

60	Propranolol (Προπρανολόλη)		Αποκλειστής των β αδρενεργικών υποδοχέων	NAI
61	Protriptyline (Προτριπυλίνη)		Αντικαταθληπτικό	NAI
62	Quinidine (Κινιδίνη)		Αντιαρρυθμικό	NAI
63	Rosiglitazone (Ροσιγλιταζόνη)		Αντιδιαβητικό	NAI
64	Saquinavir (Σακουιναβίρη)		ΑΝΤΙ-ΙΙΚΟ	NAI
65	Sertindole (Σερτινδόλη)		Ψυχοτρόπο/ Αντιψυχωσικό	NAI
66	Sibutramine (Σιμπουτραμίνη)		Δρων κατά της παχυσαρκίας	NAI

67	Sparfloxacin		Αντιβιοτικό	ΝΑΙ
68	Sulfamethoxazole (Σουλφαμεθαξοζόλη)		Αντιβιοτικό	ΟΧΙ
69	Tamoxifen (Ταμοξιφαίνη)		Αντινεοπλασματικό/ Ανασκοκαταστατικό	ΝΑΙ
70	Terbutaline (Τερβουταλίνη)		Αδρενεργικό/ εισπνεόμενο	ΟΧΙ
71	Terfenadine (Τερφεναδίνη)		Αντιισταμινικό	ΝΑΙ
72	Terodiline (Τεροδιλίνη)		Σπασμολυτικό Ουροποιητικού συστήματος	ΝΑΙ
73	Thioridazine (Θειοριδαζίνη)		Ψυχοτρόπο/ Αντιψυχωσικό	ΝΑΙ

74	Trazodone (Τραζοδόνη)		Αντικαταθληπτικά	ΝΑΙ
75	Trimethoprim (Τριμεθοπρίμη)		Αντιβιοτικό	ΟΧΙ
76	Verapamil (Βεραπαμίλη)		Αντιαρρυθμικό	ΝΑΙ

Για όλα τα φάρμακα τα οποία παρουσιάζονται στον πίνακα άνωθεν αναζητώνται οι εξής φυσικοχημικές και μοριακές ιδιότητες:

- Λογάριθμος του συντελεστή μερισμού P, logP
- Λογάριθμος του συντελεστή κατανομής D, logD
- Παράμετροι Abraham (A, B, S, E, V)
- Εμβαδόν πολικής επιφάνειας, TPSA
- Μοριακό Βάρος, MW
- Αριθμός δεκτών υδρογόνου, HBA
- Αριθμός δοτών υδρογόνου, HBD
- Κλάσμα θετικού φορτίου σε pH 7.4, F⁺
- Κλάσμα αρνητικού φορτίου σε pH 7.4, F⁻
- Κλάσμα θετικού φορτίου όταν δρα ως επαμφοτερίζουσα ένωση (Zwitterion) σε pH 7.4, F_z⁺
- Κλάσμα αρνητικού φορτίου όταν δρα ως επαμφοτερίζουσα ένωση (Zwitterion) σε pH 7.4, F_z⁻

Η αναζήτηση αυτή πραγματοποιείται μέσω του λογισμικού ADME Boxes v. 3.0. Οι πίνακες με τις συμπληρωμένες ιδιότητες εμφανίζονται στο παράρτημα και είναι οι **Πίνακας Π. 1** και **Πίνακας Π. 2**. Ακολούθως, πραγματοποιείται αναζήτηση σε όλες τις γνωστές βιβλιογραφίες σχετικά με δείκτες βιοχρωματογραφίας και καταγράφονται οι τιμές των δεικτών για τα προς μελέτη φάρμακα. Τα δεδομένα παρουσιάζονται και αυτά στο παράρτημα (**Πίνακας Π. 3** και **Πίνακας Π. 4**.)

Οι δείκτες χρωματογραφίας οι οποίοι χρησιμοποιούνται περιγράφονται κάτωθι:

Δείκτες χρωματογραφίας ακινητοποιημένων μεμβρανών

- *logk(IAM)-DD2*: Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με στατική φάση τη στήλη PC.DD2 (αναλύθηκε στην ενότητα **5.1**) και κινητή φάση αλατούχο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, PBS (Phosphate Buffer Saline) σε pH 7.4. Η έκλουση που χρησιμοποιείται είναι ισοκρατική δηλαδή, η κινητή φάση έχει σταθερή σύσταση.^{[40][41]}
- *logk(IAM)-Valko*: Η στατική φάση είναι και σε αυτήν την περίπτωση στήλη PC.DD2. Η τεχνική που χρησιμοποιείται είναι βαθμιδωτή, δηλαδή η σύσταση της κινητής φάσης μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια της ανάλυσης. Η κινητή φάση είναι ακετονιτρίλιο με ρυθμιστικό διάλυμα οξικού αμμωνίου σε pH 7.4. Οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν από τη Klara Valko και τους συνεργάτες της.^[42]
- *CHI(IAM)*: Ο δείκτης CHI (Chromatographic Hydrophobicity Index) παρουσιάστηκε από την Klara Valko και τους συνεργάτες της. Η τιμή του προκύπτει από ταχεία βαθμιδωτή αντιστρόφου φάσεως έκλουση.^[42]

Δείκτες μικκυλιακής χρωματογραφίας

- *logk(SDS)*: Η στατική φάση που χρησιμοποιείται είναι στήλη αντιστρόφου φάσεως C18 και η κινητή φάση υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα KH_2PO_4 σε pH 7.4 με τασιενεργό SDS.
- *logk(Tween)*: Η στατική φάση που χρησιμοποιείται είναι στήλη αντιστρόφου φάσεως C18 και στην κινητή φάση υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα με τασιενεργό Tween
- *logk(Brij)*: Η στατική φάση που χρησιμοποιείται είναι στήλη αντιστρόφου φάσεως C18 και η κινητή φάση υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα με τασιενεργό Brij.

(Οι τιμές μικκυλιακής χρωματογραφίας των φαρμάκων λήφθηκαν από προηγούμενες διπλωματικές εργασίες)

Δείκτες χρωματογραφίας ακινητοποιημένων πρωτεϊνών

- *logk(AGPact)*: Η στατική φάση είναι στήλη με ακινητοποιημένη α1-όξινη γλυκοπρωτεΐνη AGP (ενότητα **5.2**) ενώ, η κινητή φάση αποτελείται από υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα PBS σε pH 7. Η ροή της κινητής φάσης είναι ισοκρατική.^[44]
- *logk(AGPacet)*: Η στατική φάση είναι στήλη με ακινητοποιημένη α1-όξινη γλυκοπρωτεΐνη AGP ενώ, η κινητή φάση αποτελείται οργανικό ρυθμιστικό διάλυμα με ακετονιτρίλιο. Η έκλουση είναι ισοκρατική.^[44]
- *logk(AGP-2-prop)*: Η στατική φάση είναι στήλη με ακινητοποιημένη α1-όξινη γλυκοπρωτεΐνη AGP ενώ, η κινητή φάση είναι οργανική και αποτελείται από ρυθμιστικό διάλυμα σε 2-προπανόλη. Η έκλουση είναι ισοκρατική.^[44]

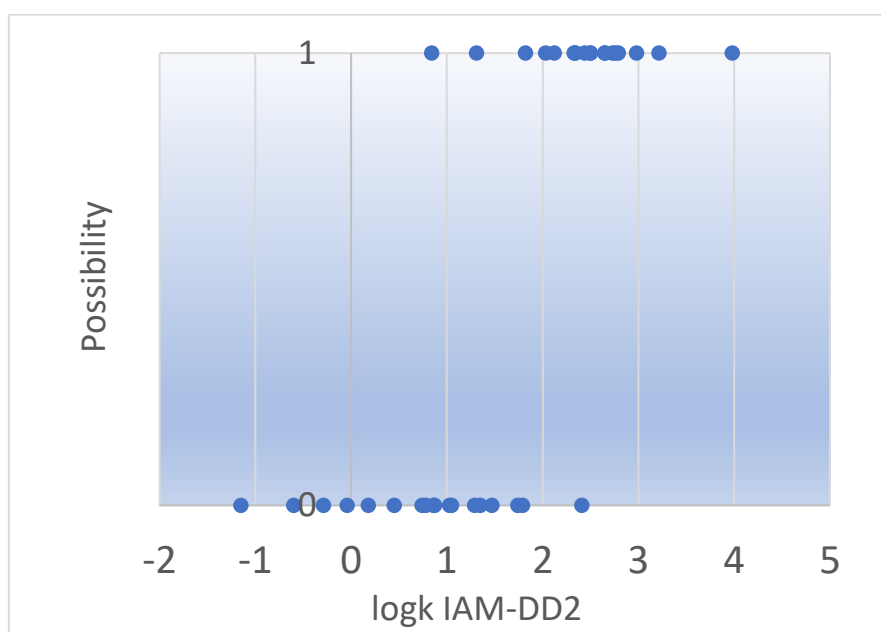
- *logk(HSAact)*: Η στατική φάση είναι στήλη με ακινητοποιημένη αλβουμίνη, HSA (ενότητα **5.2**) και η κινητή φάση είναι υδατική και το pH παραμένει σταθερό στο 7 με τη βοήθεια ρυθμιστικού διαλύματος. ^[45]
- *logk(HSA-acet)*: Η στατική φάση είναι στήλη με ακινητοποιημένη αλβουμίνη, HSA και η κινητή φάση αποτελείται οργανικό ρυθμιστικό διάλυμα με ακετονιτρίλιο. Η έκλουση είναι ισοκρατική. ^[45]
- *logk(HSA-2prop)*: Η στατική φάση είναι στήλη με ακινητοποιημένη αλβουμίνη, HSA και η κινητή φάση αποτελείται από οργανικό ρυθμιστικό διάλυμα με 2-προπανάλη. Η ροή είναι ισοκρατική. ^[45]
- *logk(HSA- Valko)*: Η στατική φάση στήλη αποτελείται από χημικά δεσμευμένη αλβουμίνη, HSA και η κινητή φάση είναι αρχικά οξικό αμμώνιο σε υδατικό διάλυμα στο οποίο προστίθεται ανά διαστήματα μεταβαλλόμενη ποσότητα 2-προπανάλης. Πρόκειται δηλαδή για μία βαθμιδωτή ροή. Το pH διατηρείται στην τιμή 7.4. ^[43]

Τέλος, από τις βάσεις δεδομένων που αναφέρθηκαν παραπάνω συλλέγονται οι τιμές της συγκέντρωσης των προς μελέτη φαρμάκων η οποία είναι ικανή να παρεμποδίσει κατά 50% τη λειτουργία των καναλιών hERG, δηλαδή οι τιμές IC₅₀ για τα κανάλια hERG. Για την ευκολότερη μεταχείριση των τιμών αυτών γίνεται αξιοποίηση του αρνητικού τους λογαρίθμου, -logIC₅₀ ή pIC₅₀. Να σημειωθεί ότι οι τιμές που λήφθηκαν για τα προς μελέτη φάρμακα ήταν πολλές και διαφοροποιούνταν μεταξύ τους για αυτόν το λόγο λαμβανόταν η μέση τιμή. Είναι λογικό πως δεν υπάρχουν τιμές IC₅₀ για όλα τα φάρμακα καθώς κάποια φάρμακα δεν παρουσιάζουν κάποιο είδος καρδιοτοξικότητα ή δεν αλληλεπιδρούν καθόλου με τους ιοντικούς διαύλους της καρδιάς. Συνεπώς, θα ήταν αχρείαστο να προσδιοριστούν οι τιμές για αυτά τα φάρμακα. Ο πίνακας ο οποίος συμπληρώνεται, παρουσιάζεται στο παράρτημα και είναι ο **Πίνακας Π. 5**.

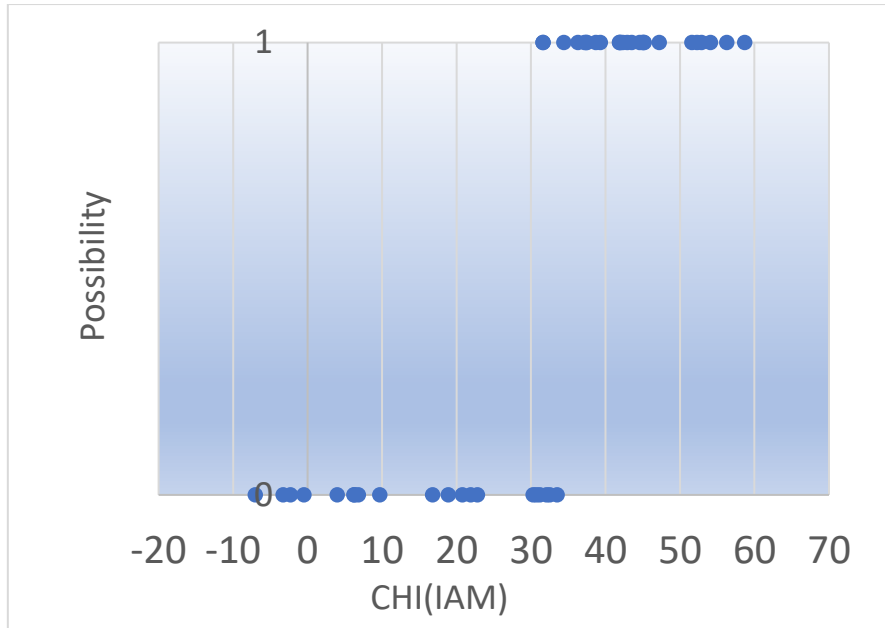
7.2. Επεξεργασία Δεδομένων

7.2.1. Ποιοτικά διαγράμματα Πιθανότητας

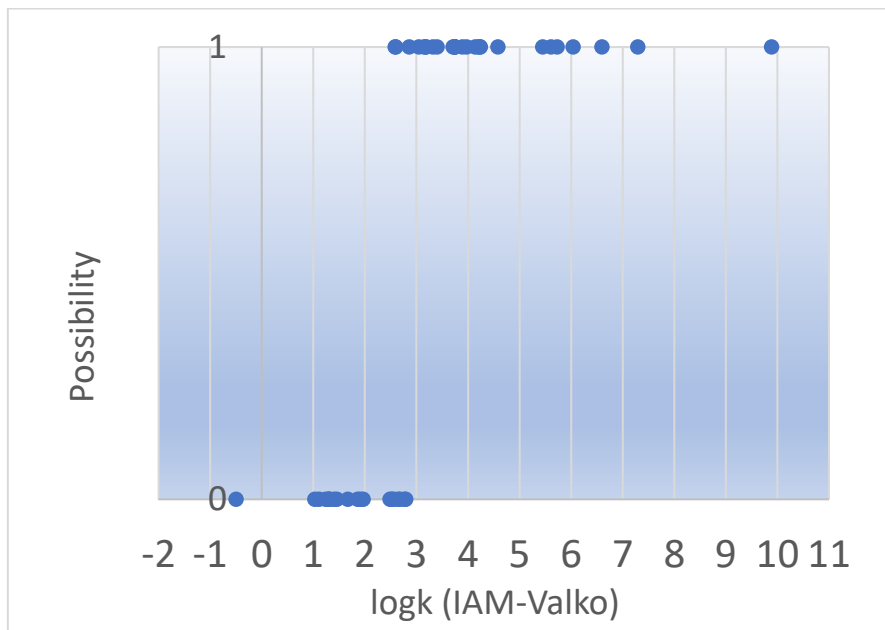
Αρχικά, η μελέτη της συσχέτισης καρδιοτοξικότητας με τους δείκτες βιοχρωματογραφιών έγινε καθώς υπήρχε η γνώση πως η καρδιοτοξικότητα σχετίζεται με τη λιποφιλία [25]. Δεδομένης της γνώσης αυτής δημιουργήθηκαν διαγράμματα στα οποία ο οριζόντιος άξονας αντιπροσωπεύει τις τιμές των δεικτών βιοχρωματογραφίας των φαρμάκων που μελετώνται ή τις τιμές των συντελεστών μερισμού (LogP) ή των φαινόμενων συντελεστών (LogD). Στον κατακόρυφο άξονα απαντάται η πληροφορία της πιθανότητας το φάρμακο αυτό να εκδηλώνει καρδιοτοξική συμπεριφορά παρεμποδίζοντας τα κανάλια hERG. Η πιθανότητα αυτή ορίζεται ως 0 για τα φάρμακα για τα οποία βρέθηκε βιβλιογραφικά πως δεν είναι καρδιοτοξικά και 1 για αυτά τα οποία είναι. Για αυτό το λόγο χαρακτηρίζονται και ως ποιοτικά καθώς δίνουν μια ποιοτική αντίληψη για τη σχέση των δύο παραπάνω εννοιών. Τα διαγράμματα παρουσιάζονται κάτωθι.



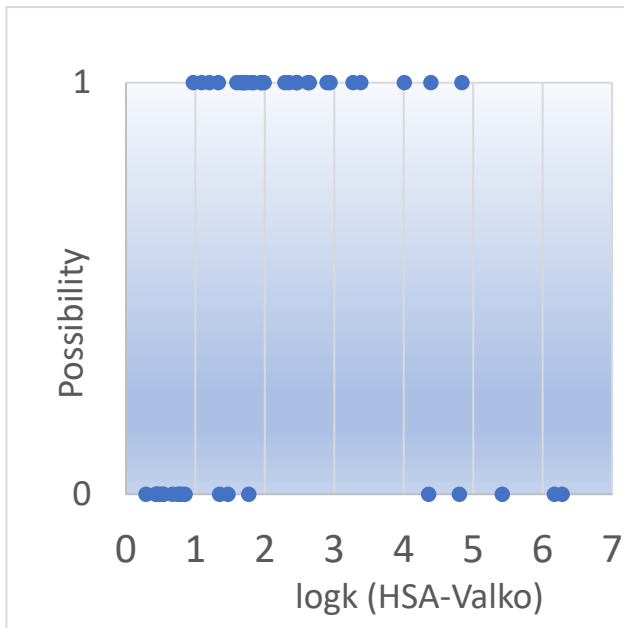
Διάγραμμα 7. 2. 1. Δείκτη $\log k$ IAM-DD2 των φαρμάκων και πιθανότητας



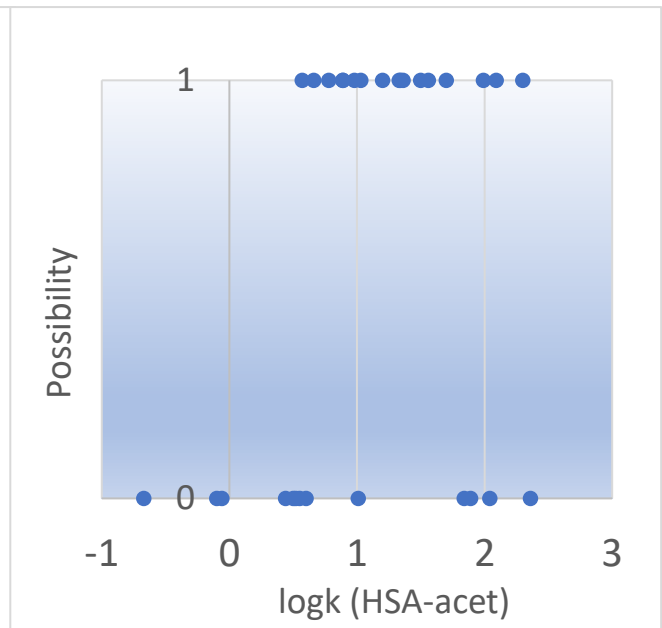
Διάγραμμα 7. 2. 2. Δείκτη $CHI(IAM)$ των φαρμάκων και πιθανότητας



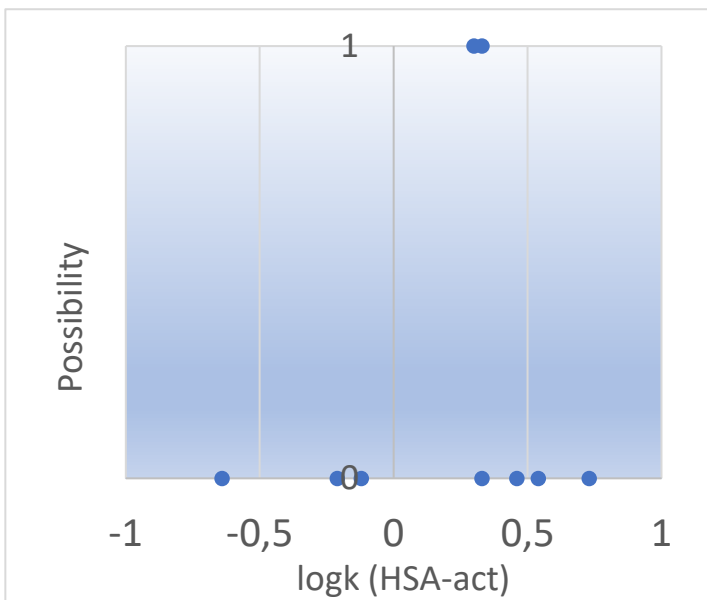
Διάγραμμα 7. 2. 3 Δείκτη $\log k(IAM-Valko)$ των φαρμάκων και πιθανότητας



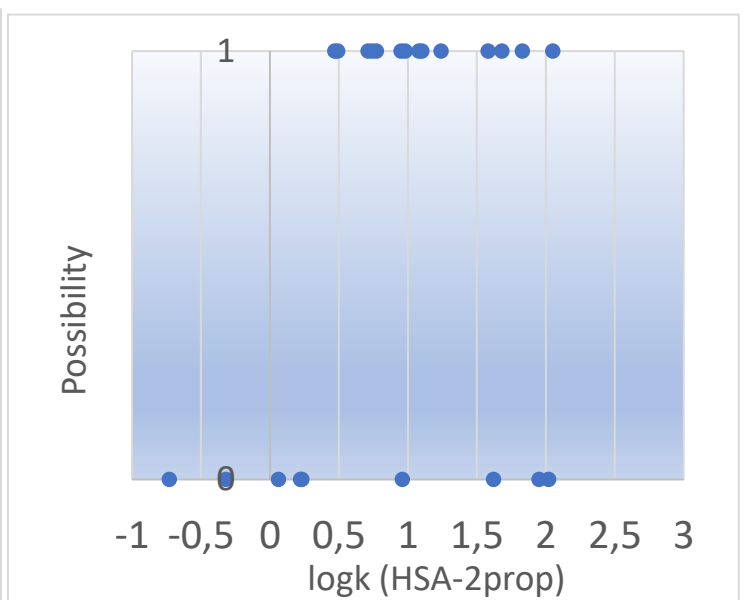
Διάγραμμα 7. 2. 4. . Δείκτη $\log k$ (HSA-Valko) των φαρμάκων και πιθανότητας



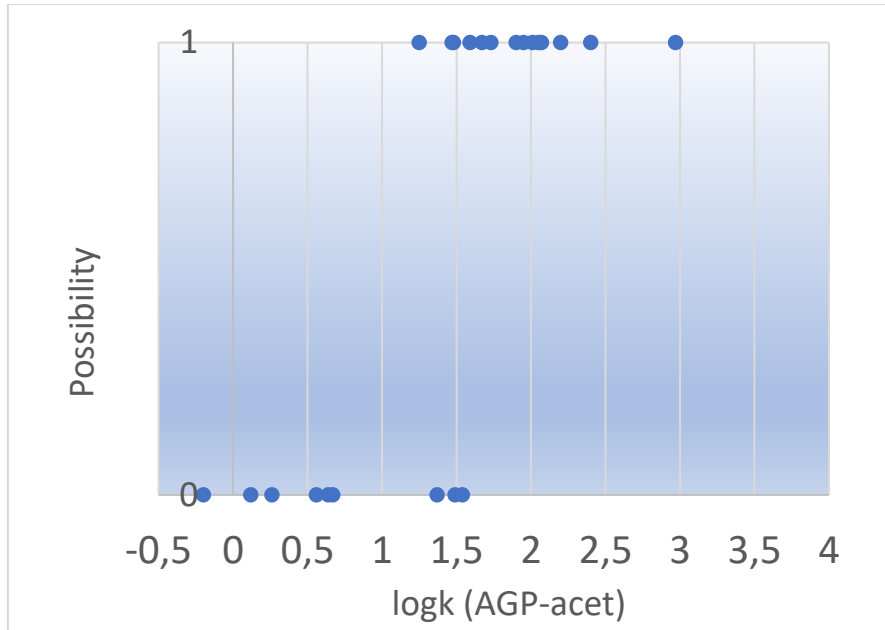
Διάγραμμα 7. 2. 5. Δείκτη $\log k$ HSA-acet των φαρμάκων και πιθανότητας



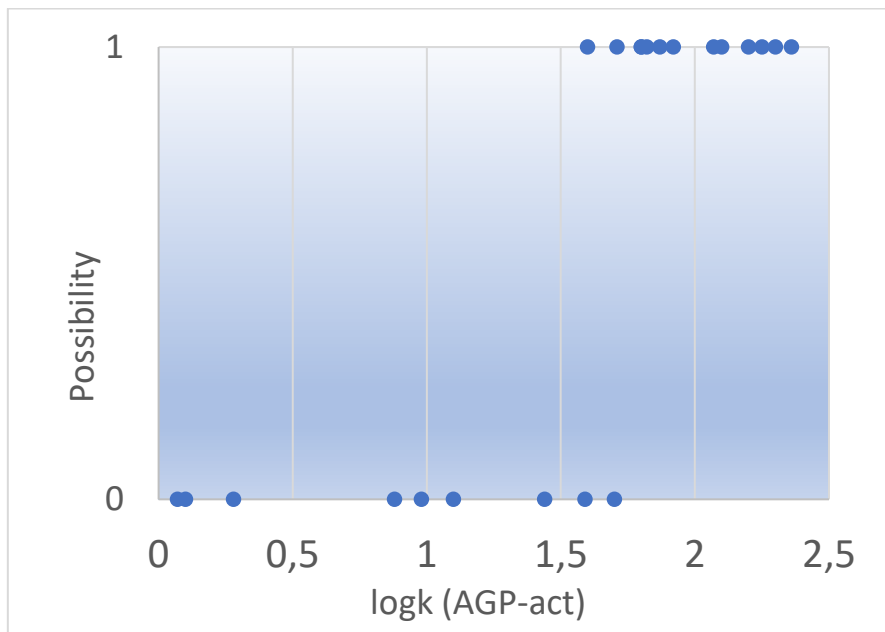
Διάγραμμα 7. 2. 7. . Δείκτη $\log k$ HSA-act των φαρμάκων και πιθανότητας



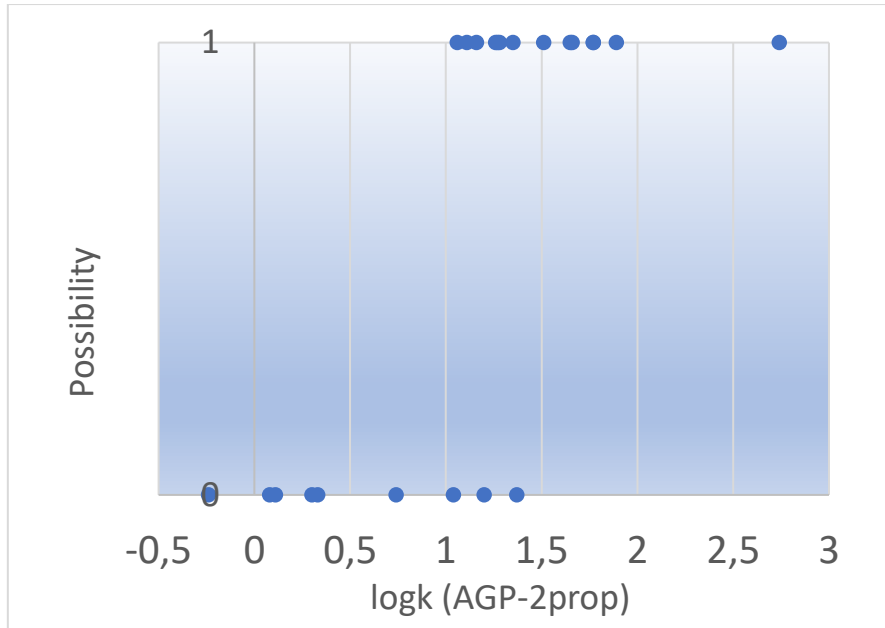
Διάγραμμα 7. 2. 6 Δείκτη $\log k$ HSA-2prop των φαρμάκων και πιθανότητας



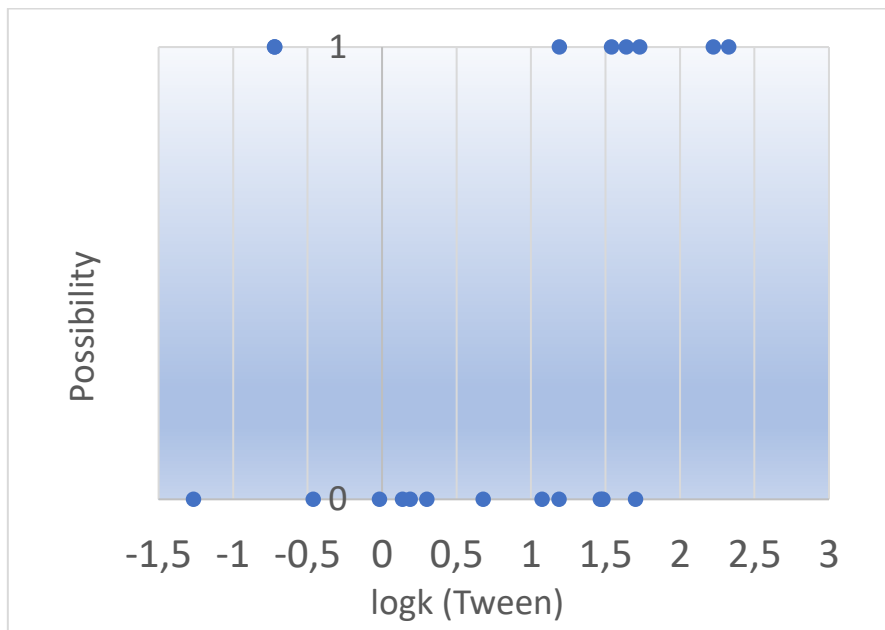
Διάγραμμα 7. 2. 8. Δείκτη $\log k$ AGP-acet των φαρμάκων και πιθανότητας



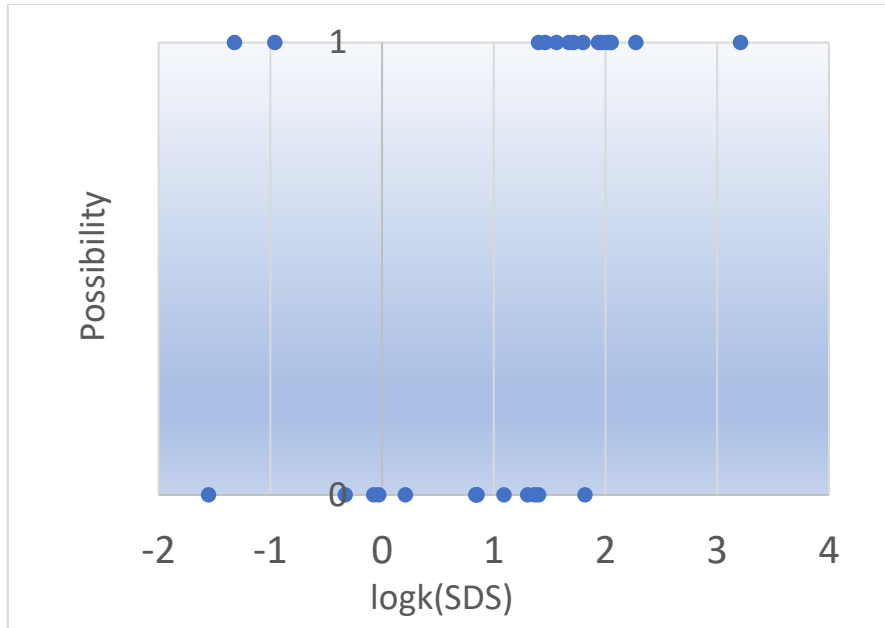
Διάγραμμα 7. 2. 9. Δείκτη $\log k$ AGP-act των φαρμάκων και πιθανότητας



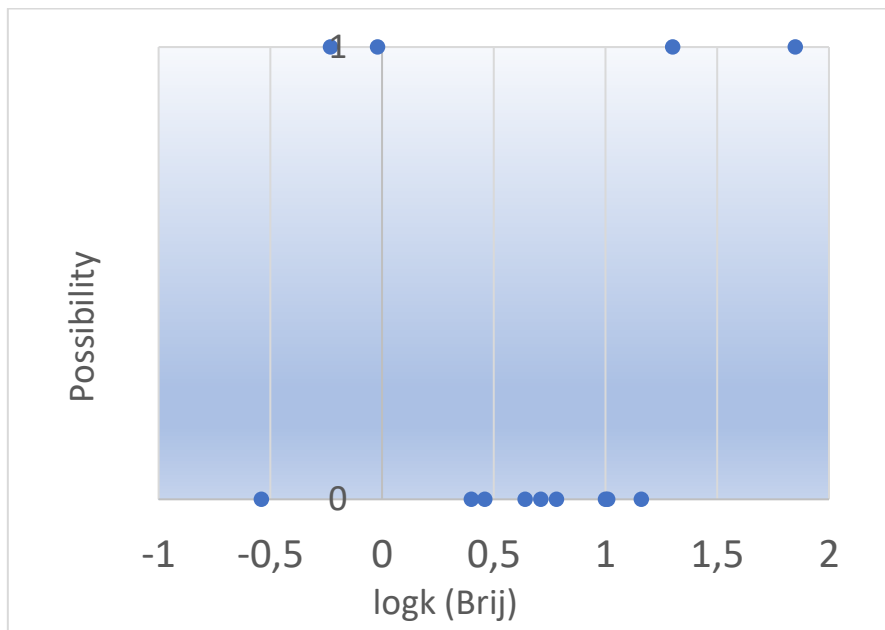
Διάγραμμα 7. 2. 10. Δείκτη logk AGP-2prop των φαρμάκων και πιθανότητας



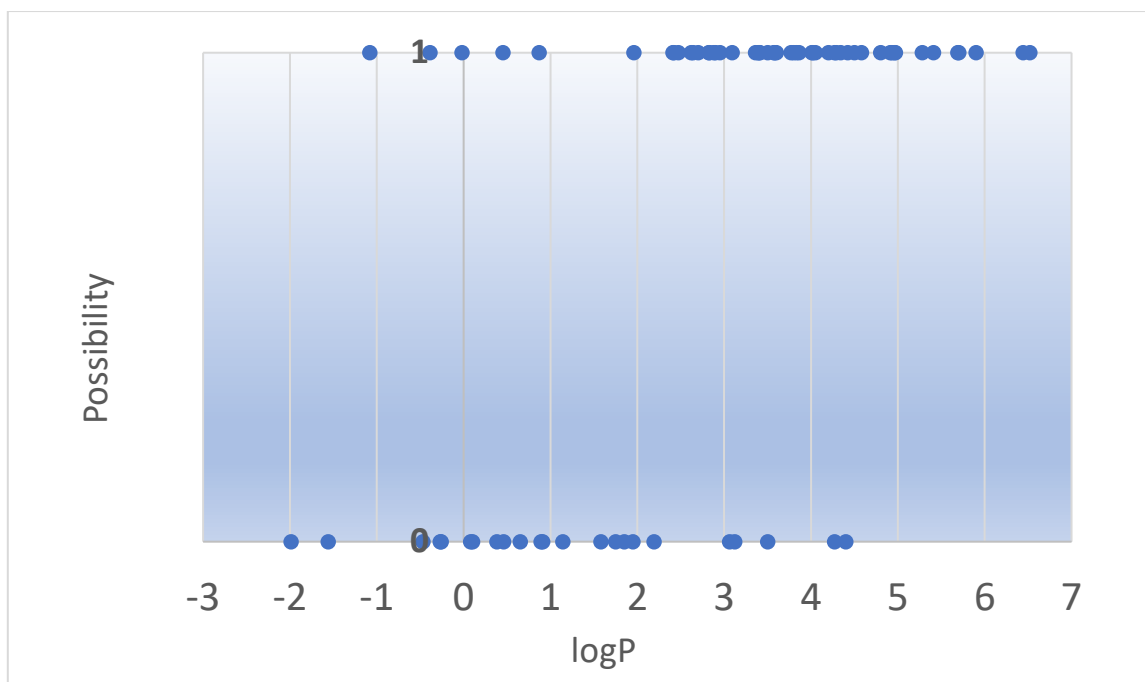
Διάγραμμα 7. 2. 11. Δείκτη logk Tween των φαρμάκων και πιθανότητας



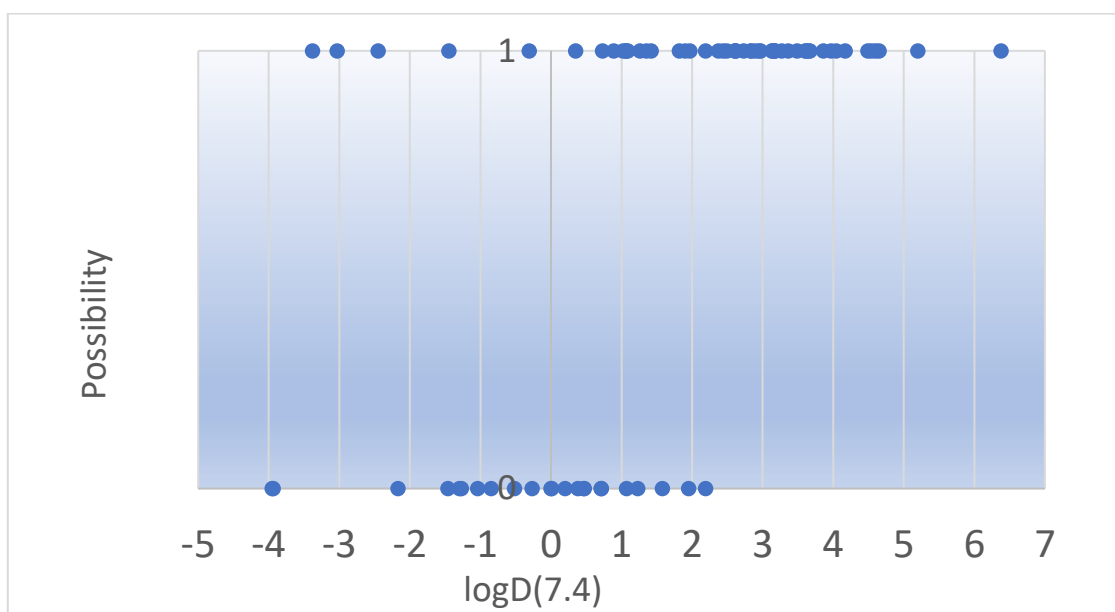
Διάγραμμα 7. 2. 12. Δείκτη $\log k$ SDS των φαρμάκων και πιθανότητας



Διάγραμμα 7. 2. 13. Δείκτη \log Brij των φαρμάκων και πιθανότητας



Διάγραμμα 7. 2. 14. Συντελεστή $\log P$ των φαρμάκων και πιθανότητας

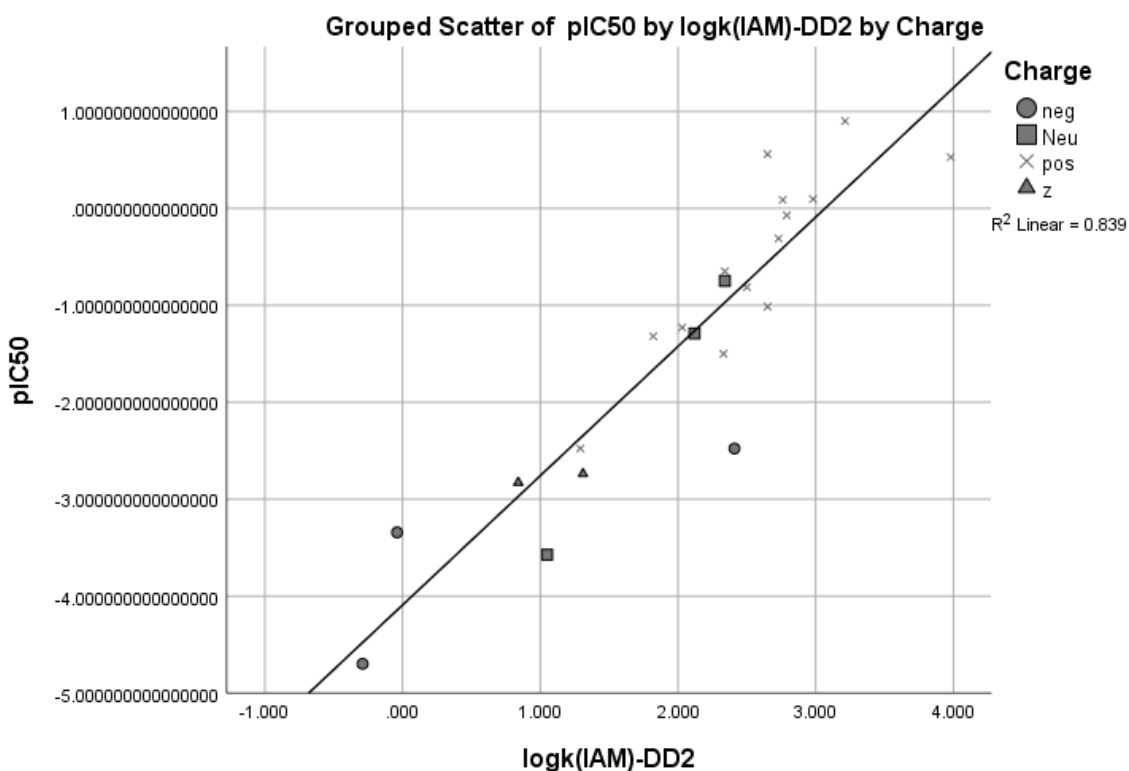


Διάγραμμα 7. 2. 15. Συντελεστή $\log D$ σε pH 7.4 των φαρμάκων και πιθανότητας

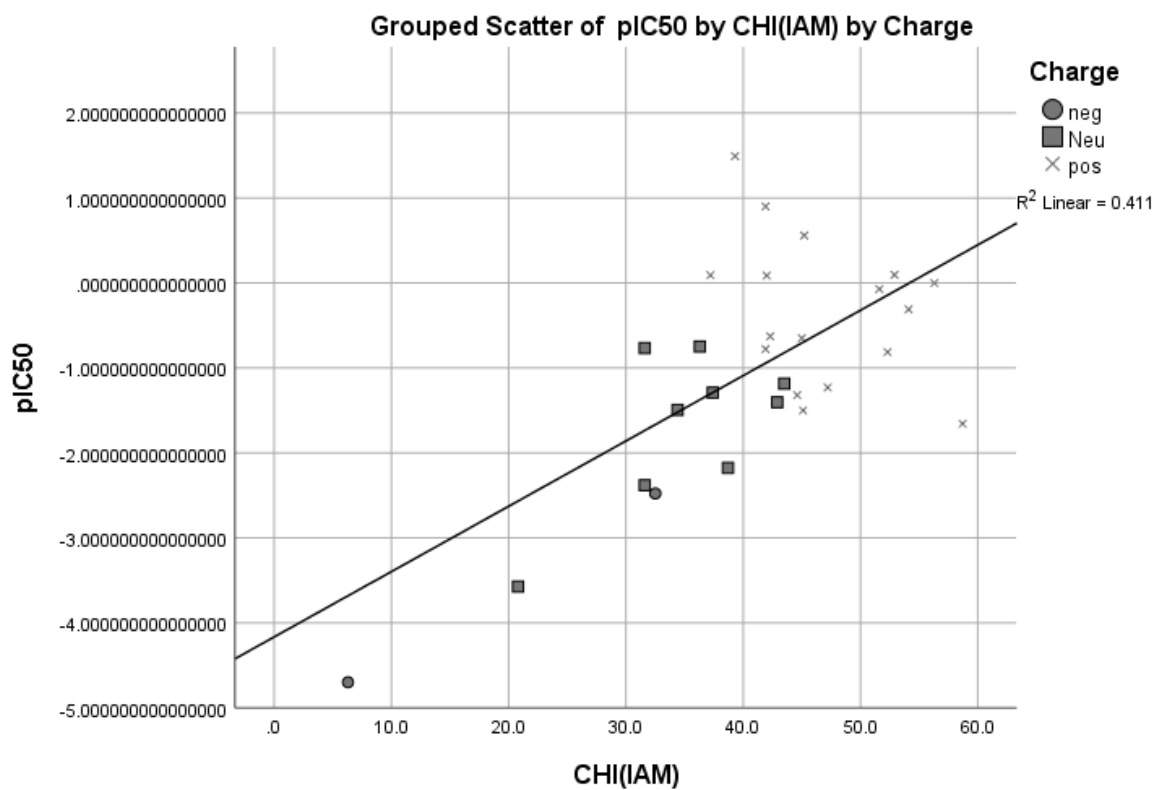
Αυτό που μπορεί να προστεθεί ως γενικό σχόλιο παρατηρώντας τα παραπάνω διαγράμματα (7.2.1 ως 7.2.15) είναι πως τα καρδιοτοξικά φάρμακα τείνουν να εμφανίσουν μεγαλύτερες τιμές βιομημητικών δεικτών και ειδικά στις περιπτώσεις των δεικτών CHI(IAM) και AGP (actual και παρουσία ακετονιτριλίου) είναι σαφές γίνεται ιδιαίτερα σαφές. Περαιτέρω ανάλυση θα πραγματοποιηθεί σε ακόλουθη ενότητα.

7.2.2. Απλή Γραμμική Παλινδρόμηση

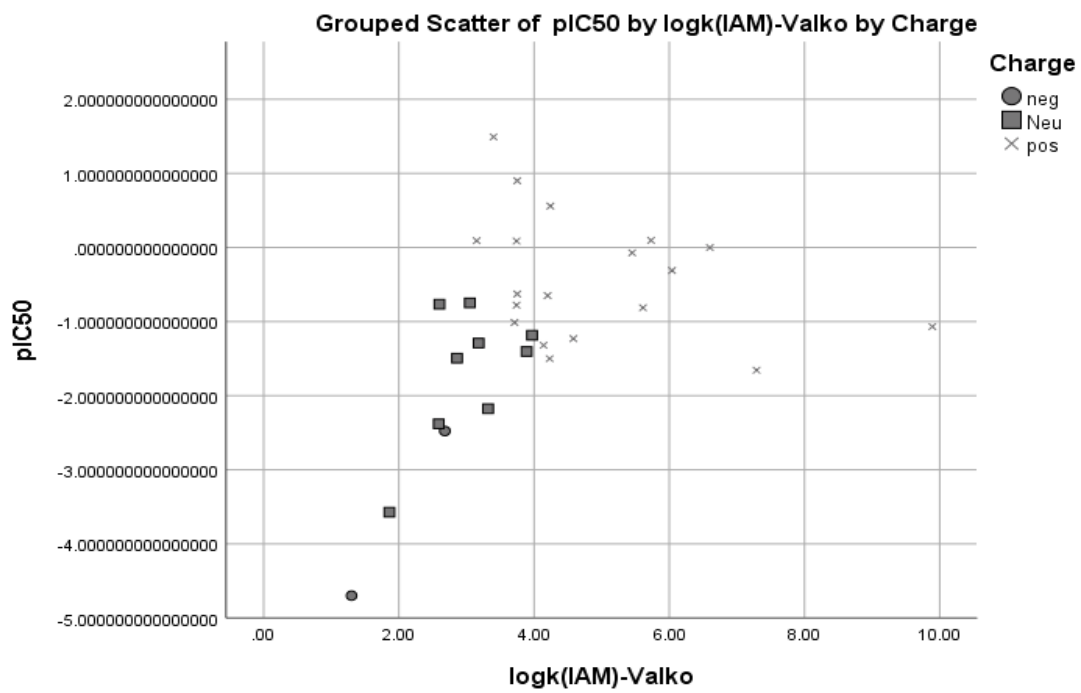
Τα δεδομένα που συλλέχθηκαν υποβλήθηκαν στη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων. Στη γραμμική παλινδρόμηση που εφαρμόστηκε, ορίστηκε ως εξαρτημένη μεταβλητή ο παράγοντας plC_{50} και ως ανεξάρτητη μεταβλητή η τιμή του κάθε δείκτη βιοχρωματογραφίας ή των συντελεστών $\log P$ και $\log D(7.4)$ για το κάθε φάρμακο. Η μέθοδος εκτελέστηκε σε λογισμικό SPSS. Στα διαγράμματα τα οποία σχηματίστηκαν λήφθηκαν υπόψη τα φορτία των ενώσεων ούτως ώστε να παρατηρηθεί η ύπαρξη συσχέτισης ή μη με την καρδιοτοξικότητα για αυτόν το λόγο τα φάρμακα με διαφορετικά φορτία αναπαρίστανται με διαφορετικά σχήματα. Η αντιστοίχιση σχήματος με το φορτίο εμφανίζεται στο υπόμνημα κάθε διαγράμματος. Το φάρμακο μπορεί να είναι αρνητικό (neg), θετικό (pos), ουδέτερο (Neu) ή αμφολύτης (Z). Τα διαγράμματα παρουσιάζονται ακολούθως μαζί με του συντελεστής προσδιορισμού R^2 . Στα διαγράμματα όπου η συσχέτιση δεν είναι αξιόλογη δεν εμφανίζονται γραμμή τάσης και συντελεστής προσδιορισμού.



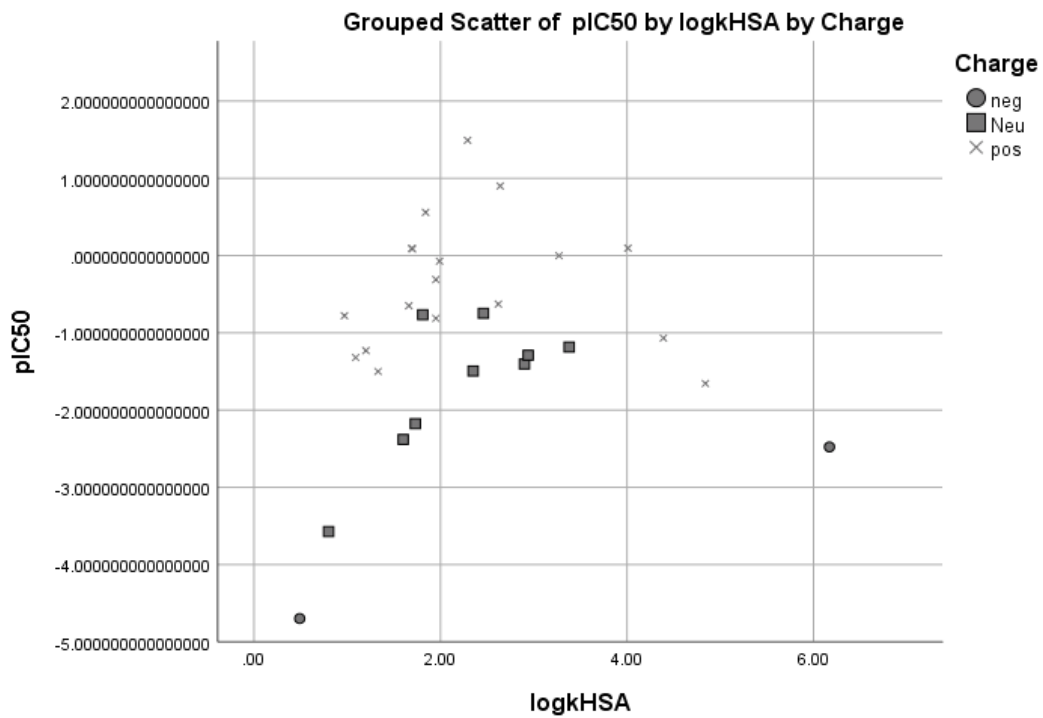
Διάγραμμα 7. 2. 16. plC_{50} συναρτήσει του δείκτη $\log k IAM-DD2$



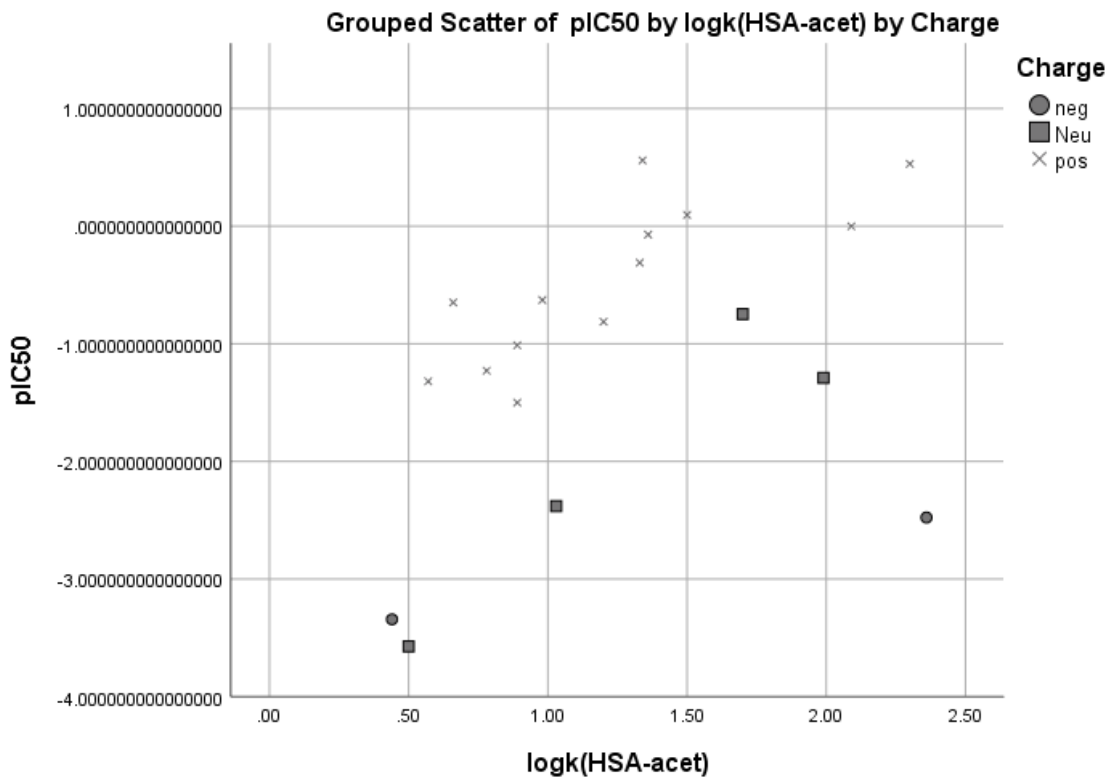
Διάγραμμα 7. 2. 17. pIC₅₀ συναρτήσει του δείκτη CHI(IAM)



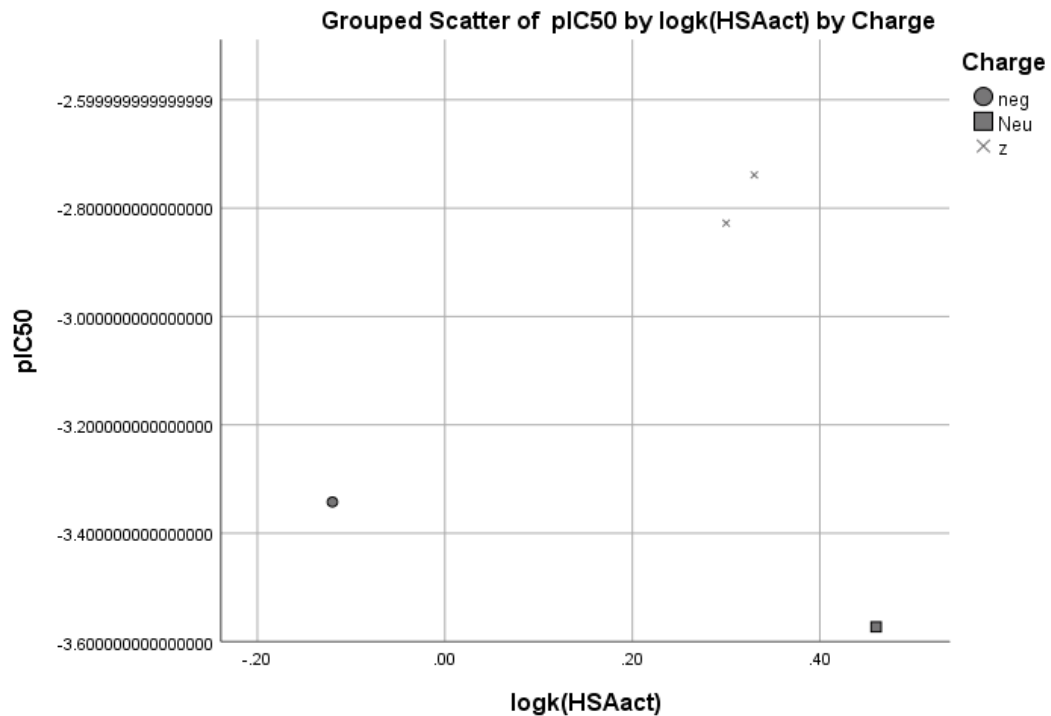
Διάγραμμα 7. 2. 18. pIC_{50} συναρτήσεσι του $logkIAM-Valko$



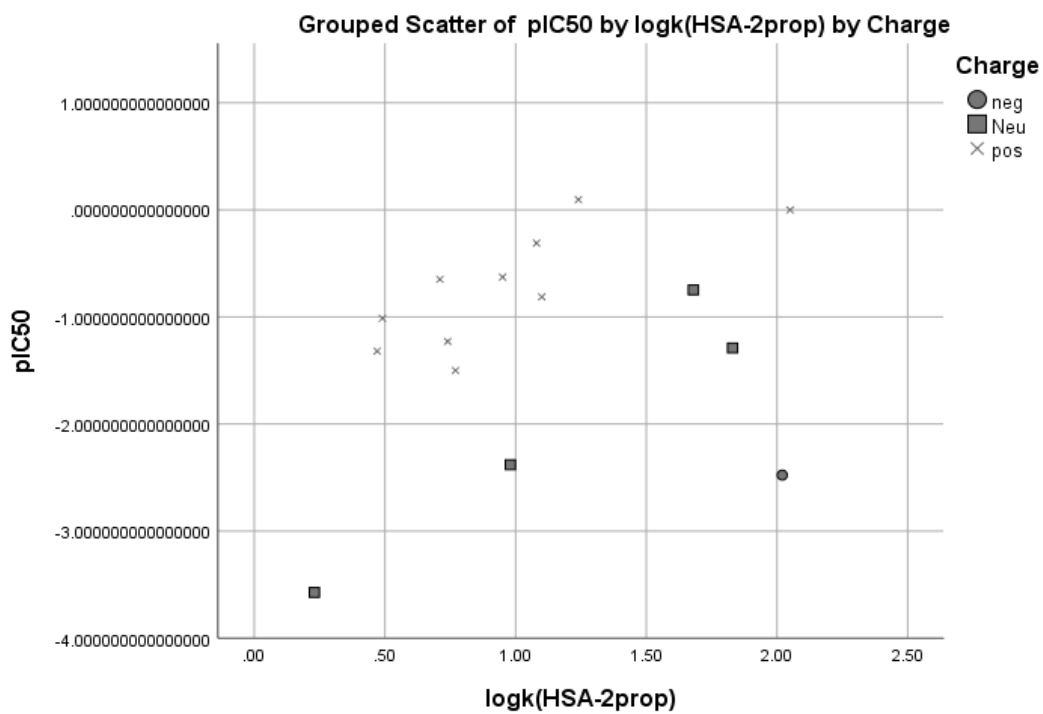
Διάγραμμα 7. 2. 19. pIC_{50} συναρτήσεσι του $logkHSA-Valko$



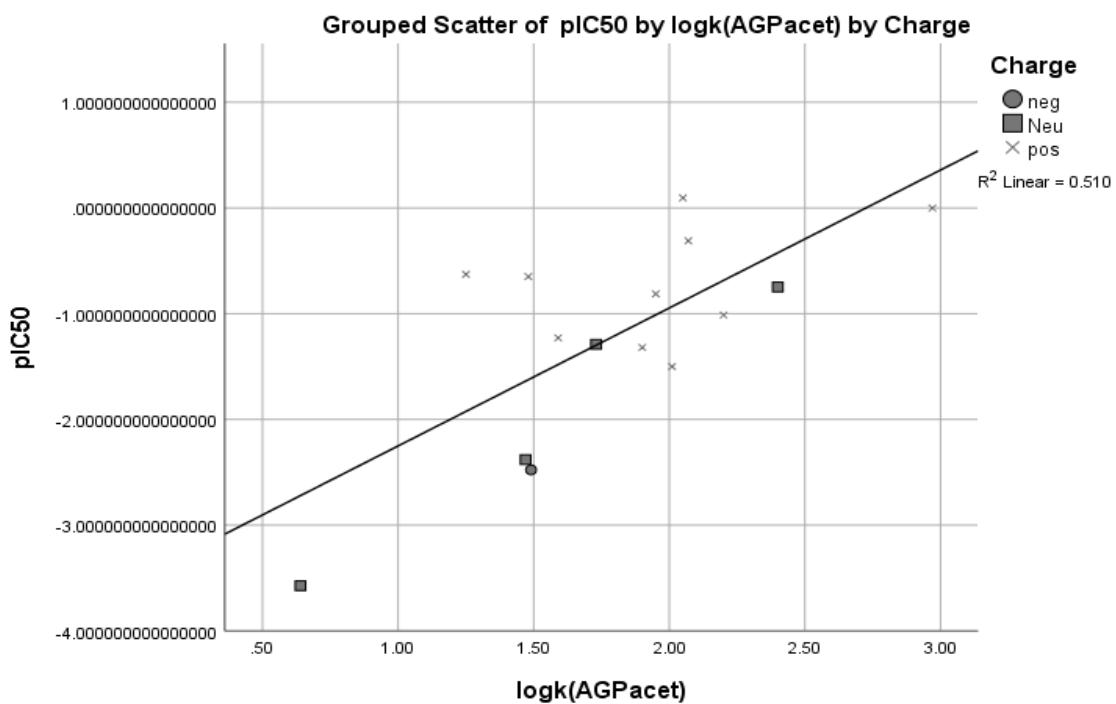
Διάγραμμα 7. 2. 20. pIC₅₀ συναρτήσεϊ του logkHSA-act



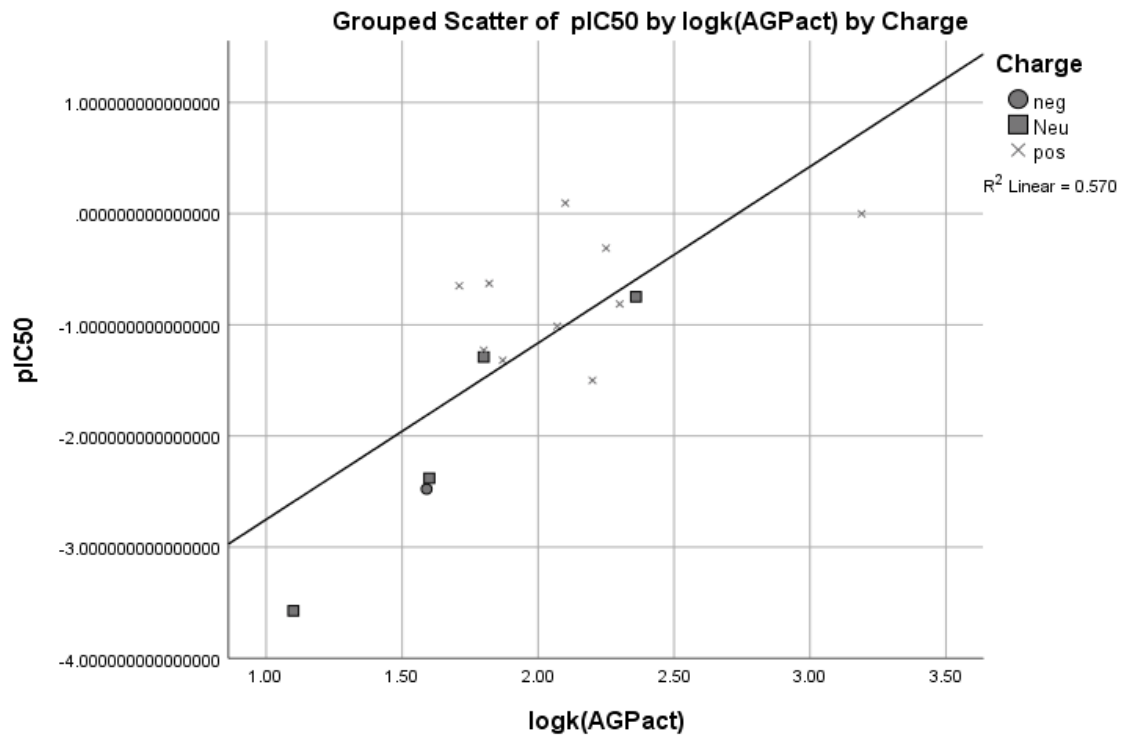
Διάγραμμα 7. 2. 21. pIC₅₀ συναρτήσεϊ του logkHSA-act



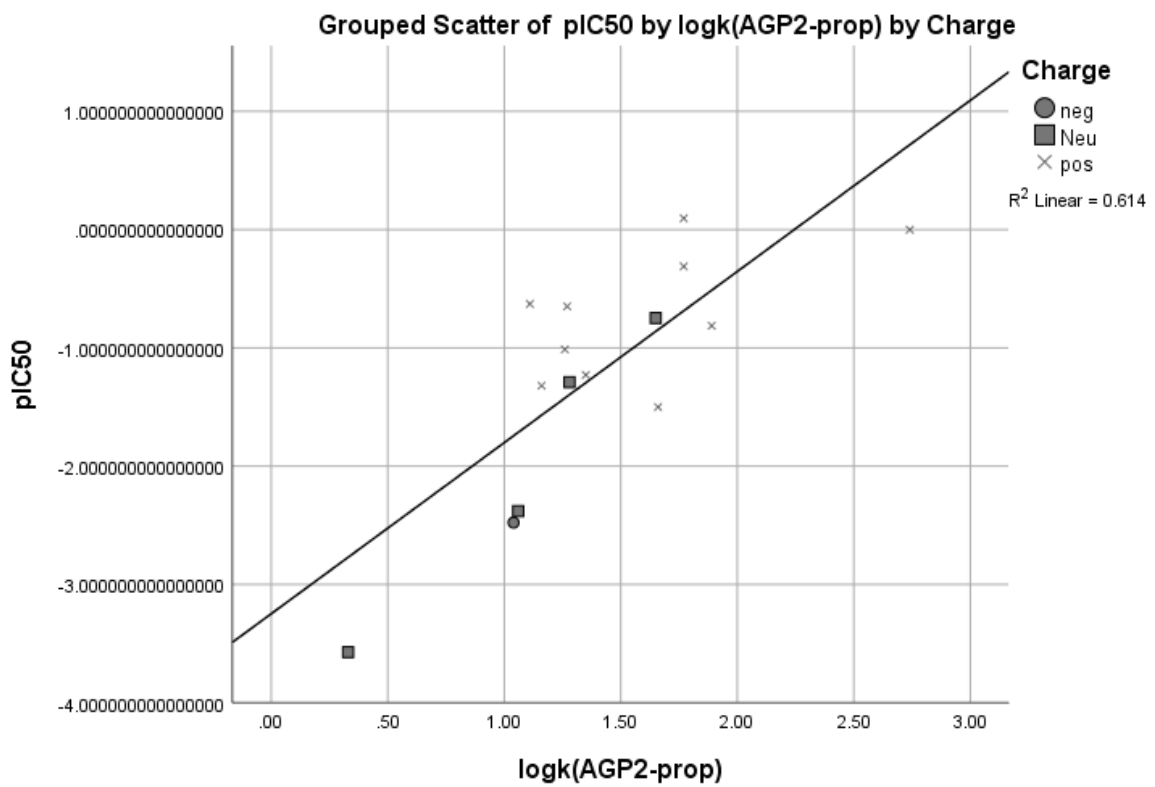
Διάγραμμα 7. 2. 22. pIC₅₀ συναρτήσεσι του logkHSA-2prop



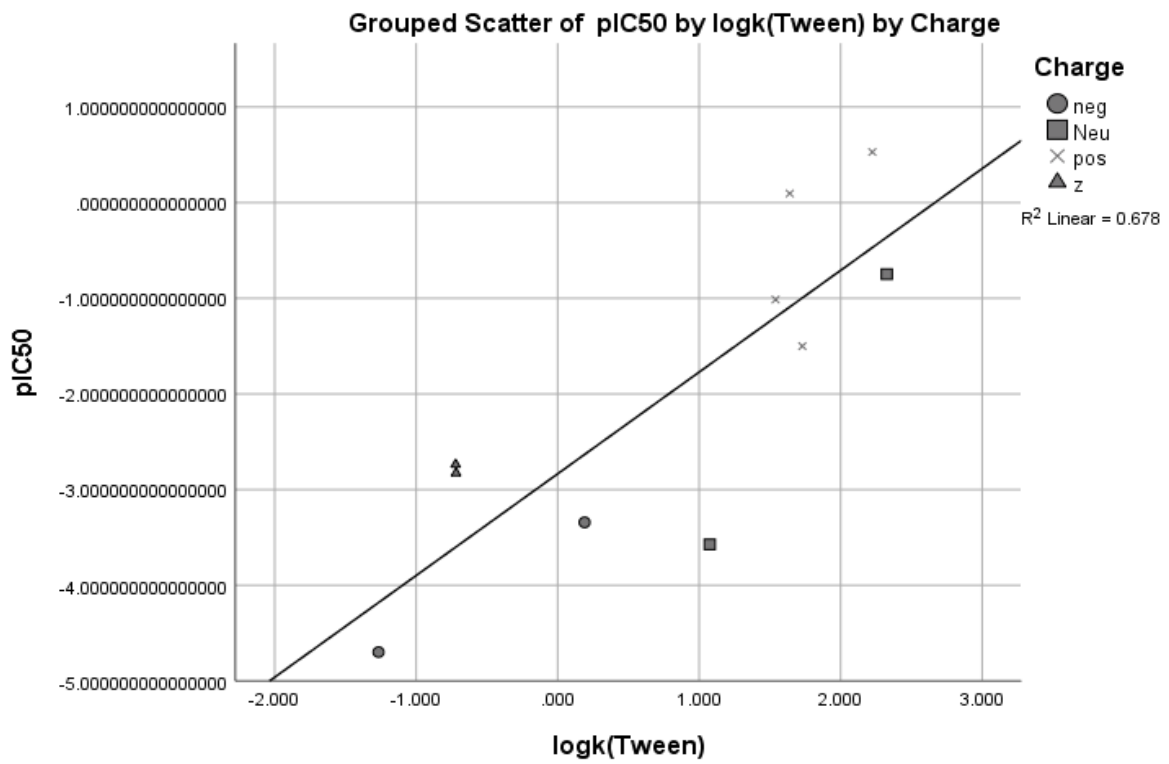
Διάγραμμα 7. 2. 23. pIC₅₀ συναρτήσεσι του logk AGP-acet



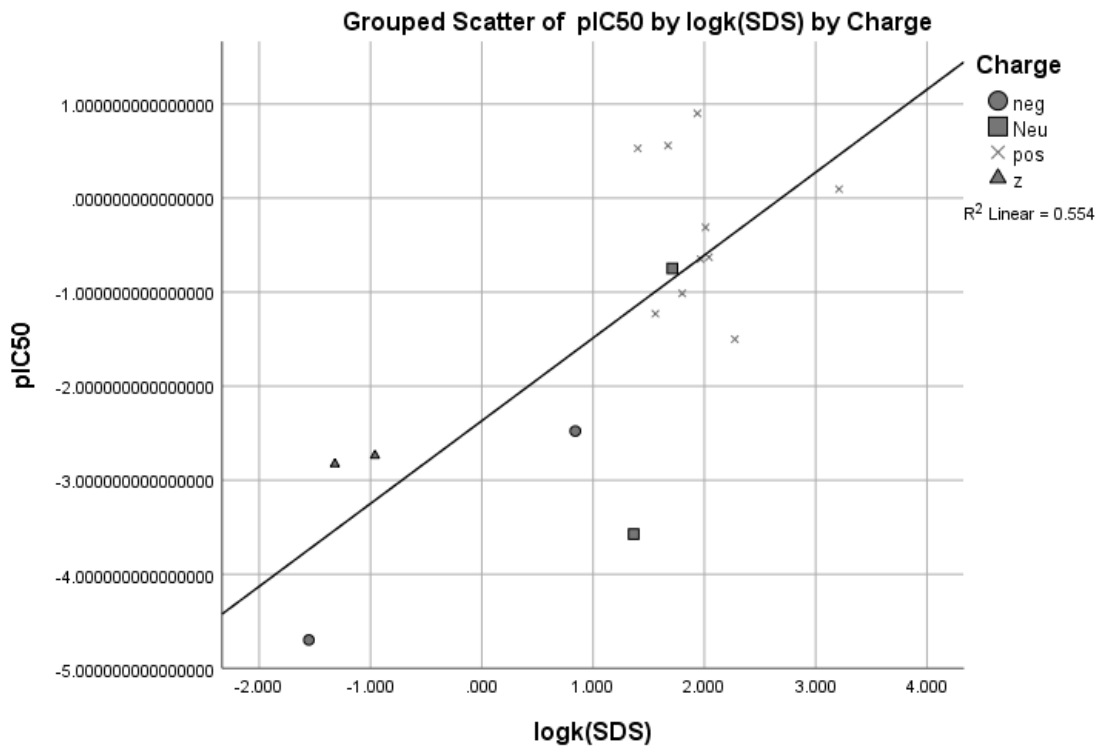
Διάγραμμα 7. 2. 24. pIC₅₀ συναρτήσεσι του logk AGP-act



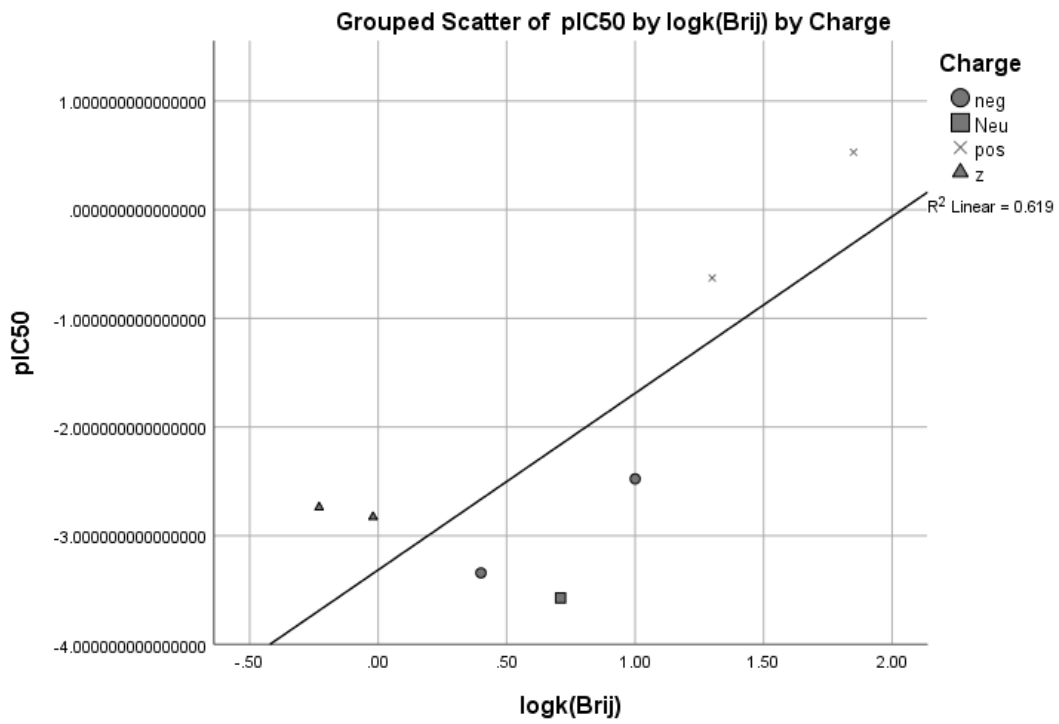
Διάγραμμα 7. 2. 25. pIC₅₀ συναρτήσεσι του logk AGP-2prop



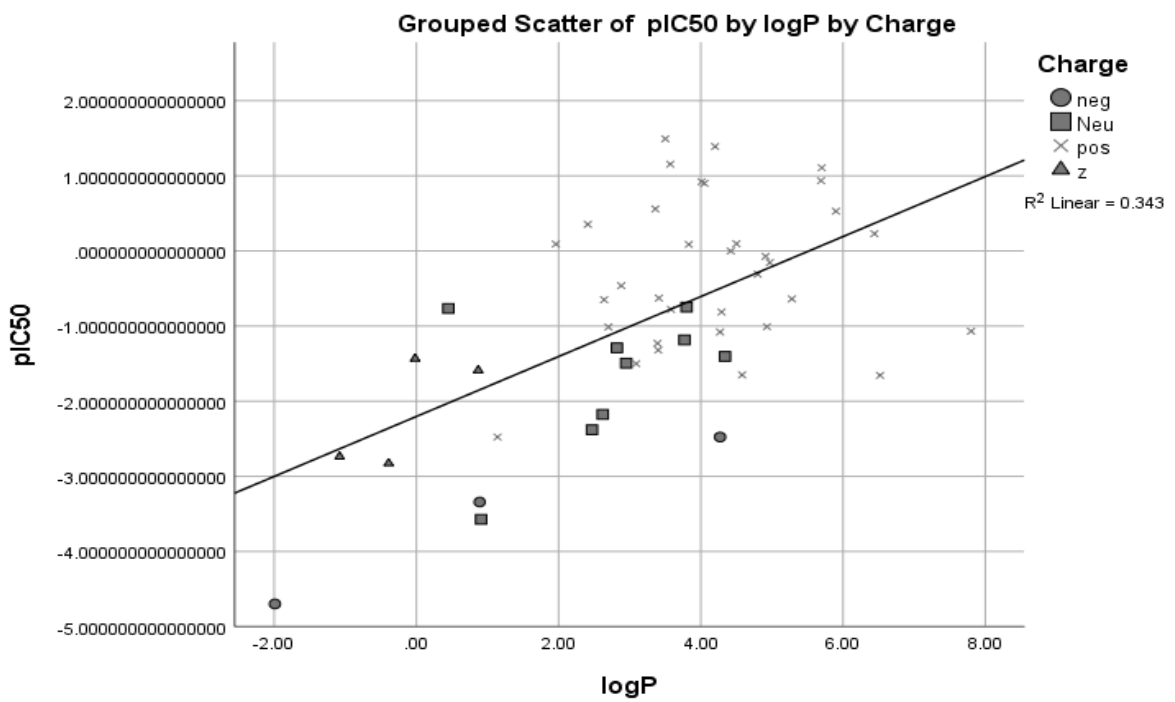
Διάγραμμα 7. 2. 26. pIC₅₀ συναρτήσεϊ του logkTween



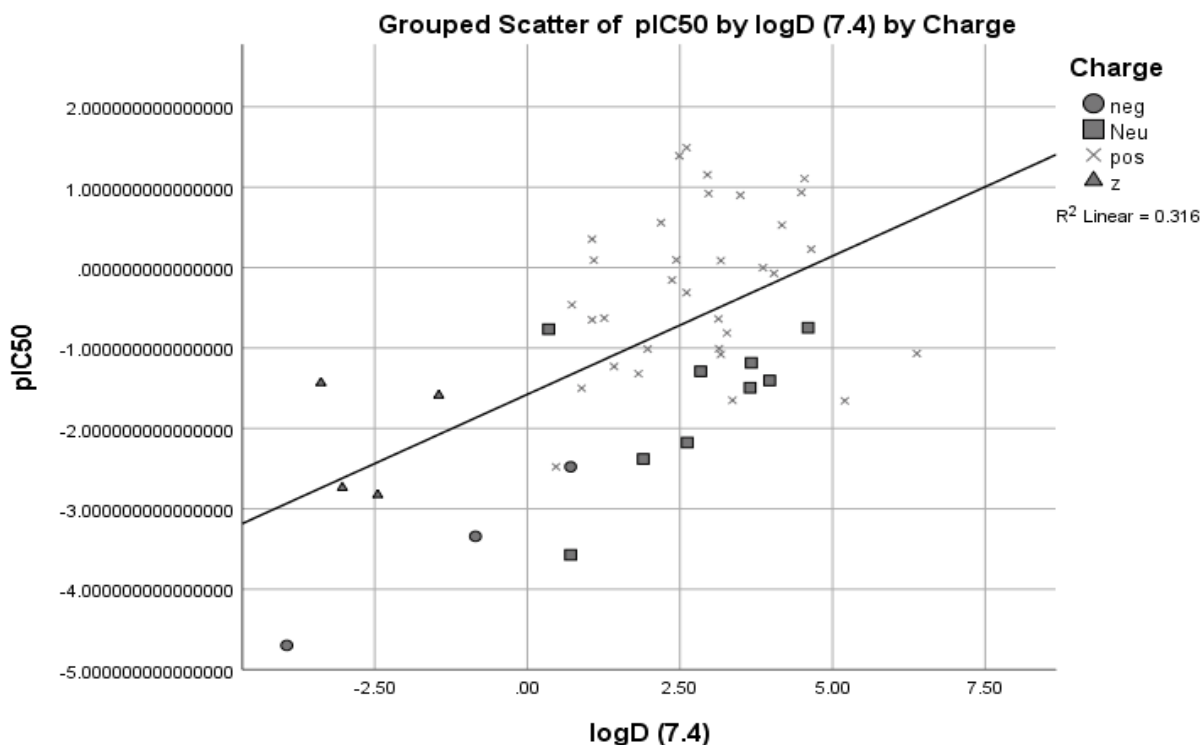
Διάγραμμα 7. 2. 27. pIC₅₀ συναρτήσεϊ του logkSDS



Διάγραμμα 7. 2. 28. pIC_{50} συναρτήσεϊ του $logk_{Brij}$



Διάγραμμα 7. 2. 29. pIC_{50} συναρτήσεϊ του $logP$



Διάγραμμα 7. 2. 30.pIC₅₀ συναρτήσεως του logD (7.4)

7.2.3. Πολλαπλή Γραμμική Παλινδρόμηση

Μία ακόμα επεξεργασία δεδομένων που έλαβε χώρα ήταν αυτή της πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης. Η τεχνική αυτή πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του SPSS. Ως εξαρτημένη μεταβλητή ορίστηκε η τιμή pIC₅₀ κάθε φαρμάκου ενώ, ως ανεξάρτητες μεταβλητές οι βιοχρωματογραφικοί δείκτες και οι συντελεστές logP και logD μαζί με τις υπόλοιπες φυσικοχημικές και μοριακές παραμέτρους όπως A, B, S, E, V, E, TPSA, MW, HBA, HBD, F⁺, F⁻, Fz^{w+}, Fz^{w-}. Η παλινδρόμηση πραγματοποιήθηκε με χρήση της εντολής stepwise το οποίο σημαίνει ότι κάθε μεταβλητή εξετάζοταν ανεξάρτητα μία προς μία και αποκλείονταν οι μεταβλητές οι οποίες δεν συσχετίζονταν με την εξαρτημένη μεταβλητή. Έτσι, αποφεύχθηκε να ληφθούν όλες οι μεταβλητές μαζί και να δοθεί μεγαλύτερη βαρύτητα σε κάποια από αυτές. Παρακάτω παρουσιάζονται οι πίνακες που περιέχουν στατιστικά στοιχεία για τις ανεξάρτητες μεταβλητές οι οποίες εμφάνισαν συσχέτιση και βελτίωσαν την απλή γραμμική παλινδρόμηση και ακόμα, διακρίνονται οι εξισώσεις που περιγράφουν το μοντέλο. Η εκτέλεση της μεθόδου δεν έδωσε αξιοσημείωτα αποτελέσματα για όλους τους δείκτες για αυτό το λόγο δεν εμφανίζονται, εκτενέστερη συζήτηση θα λάβει χώρα σε ακόλουθη ενότητα όπου θα γίνει ενδελεχής ανάλυση και συζήτηση των αποτελεσμάτων. Στους πίνακες που ακολουθούν η στήλη Model συμπληρώνεται με τον εκάστοτε βιοχρωματογραφικό δείκτη που μελετάται ή του συντελεστές LogP και LogD ενώ, η στήλη Parameter συμπληρώνεται με τις παραμέτρους (φυσικοχημικές ή μοριακές) οι οποίες βελτιώνουν την παλινδρόμηση. Τα στατιστικά στοιχεία που παρουσιάζονται είναι τα εξής:

N: Το πλήθος των σημείων που χρησιμοποιήθηκαν στην πολλαπλή γραμμική παλινδρόμηση

R: Συντελεστής συσχέτισης

R^2 : Συντελεστής προσδιορισμού

R^2_{adj} : Προσαρμοσμένος συντελεστής προσδιορισμού

s: τυπική απόκλιση

F: Στατιστικό μέτρο μέτρησης της καλής προσαρμογής ενός μοντέλου

Αποτελέσματα για pIC_{50} ως συνάρτηση με το βιοχρωματογραφικό δείκτη $\log k$ IAM-DD2

No	Model	Parameter	N	R	R^2	R^2_{adj}	s	F
1	$\log k$ IAM-DD2	-	22	0.916	0.839	0.831	0.62	103.9

Η εξίσωση η οποία εξάγεται είναι:

$$pIC_{50} = -4.091(\pm 0.303) + 1.334(\pm 0.131) * \log k(IAM.DD2)$$

Εξ. 7.1

Αποτελέσματα για pIC_{50} ως συνάρτηση με το βιοχρωματογραφικό δείκτη $CHI(IAM)$

No	Model	Parameter	N	R	R^2	R^2_{adj}	s	F
1	$CHI(IAM)$	-	28	0.641	0.411	0.388	1.02	18.1

Η εξίσωση που υπολογίζεται από το SPSS εμφανίζεται κάτωθι:

$$pIC_{50} = -4.165(\pm 0.469) + 0.077(\pm 0.018) * CHI(IAM)$$

Εξ. 7.2

Αποτελέσματα για pIC_{50} ως συνάρτηση του δείκτη $logk$ AGP-acet και της παραμέτρου F_{zw}^+

No	Model	Parameter	N	R	R ²	R ² _{adj}	s	F
1	logk(AGPacet)	-	15	0.714	0.510	0.472	0.72	13.5
2	logk(AGPacet)	F _{zw} pos	15	0.828	0.686	0.633	0.60	13.1

Η εξίσωση που προκύπτει από την πολλαπλή παλινδρόμηση είναι η εξής:

$$pIC_{50} = -3.983(\pm 0.582) + 1.162(\pm 0.301) * logk(AGP-acet) + 1.014(\pm 0.392) * F_{zw}pos$$

Εξ. 7.3

Αποτελέσματα για pIC_{50} ως συνάρτηση του δείκτη $logk$ AGP-act

No	Μοντέλο	Παράμετρος	N	R	R ²	R ² _{adj}	s	F
1	logk(AGP-act)	-	15	0.755	0.570	0.537	0.6726	17.3

Η εξίσωση που εξάγεται από το SPSS παρουσιάζεται παρακάτω:

$$pIC_{50} = -4.338(\pm 0.778) + 1.587(\pm 0.382) * logk(AGPact)$$

Εξ. 7.4

Αποτελέσματα για pIC_{50} ως συνάρτηση του δείκτη $\log k$ AGP-2prop

No	Μοντέλο	Παράμετρος	N	R	R^2	R^2_{adj}	s	F
1	Logk(AGP-2prop)	-	15	0.784	0.614	0.585	0.64	20.7

Η εξίσωση του μοντέλου αυτού παρουσιάζεται κάτωθι:

$$pIC_{50} = -3.248(\pm 0.481) + 1.447(\pm 0.318) * \log k(\text{AGP-2prop})$$

Εξ. 7.5

Αποτελέσματα για pIC_{50} ως συνάρτηση του συντελεστή $\log D(7.4)$ και των παραμέτρων

No	Model	Parameter	N	R	R^2	R^2_{adj}	s	F
1	$\log D(7.4)$	-	49	0.562	0.316	0.301	1.14	21.7
2	$\log D(7.4)$	F_pos	49	0.697	0.486	0.464	0.99	21.8
3	$\log D(7.4)$	F_pos, E	49	0.743	0.552	0.522	0.94	18.5

Η εξίσωση που εξάγεται από την πολλαπλή γραμμική παλινδρόμηση είναι η εξής:

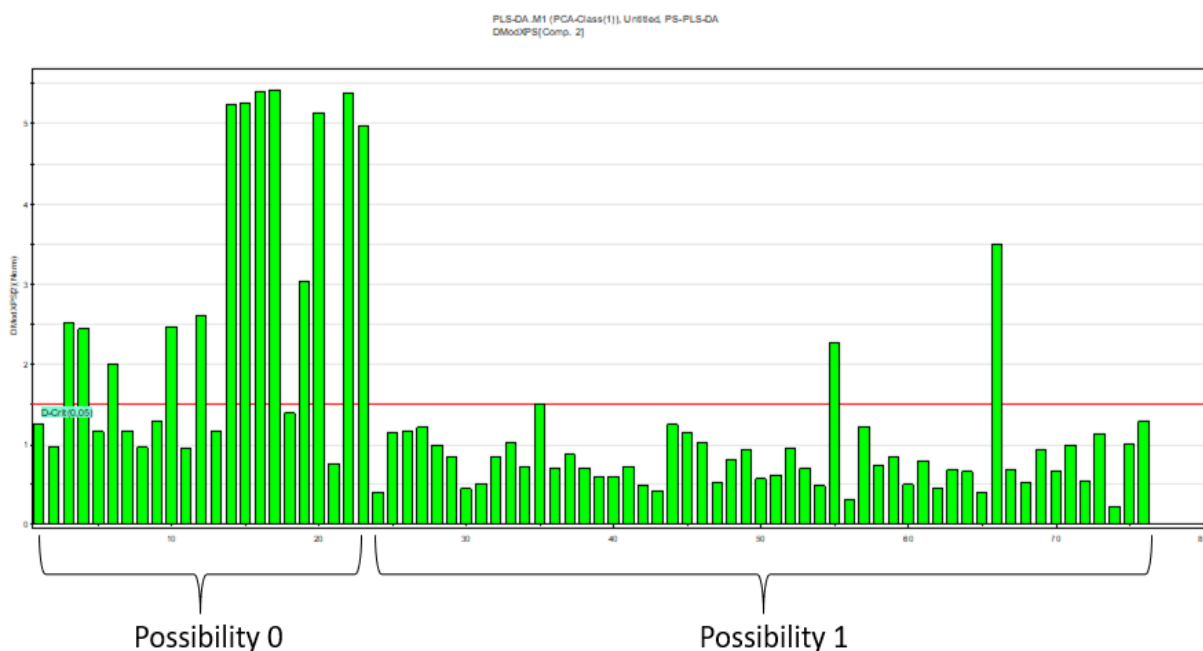
$$pIC_{50} = -3.769(\pm 0.616) + 0.166(\pm 0.072) * \log D(7.4) + 2.009(\pm 0.417) * F_pos + 0.562(\pm 0.218) * E \quad \text{Εξ. 7.6}$$

Οι παραπάνω συσχετίσεις είναι σε μεγάλο βαθμό ενδεικτικές γιατί δεν υπάρχουν πολλά δεδομένα ειδικότερα για τα αποτελέσματα που εξήχθησαν συναρτήσεως των βιομηχανικών δεικτών. Μία παρατήρηση είναι πως η στήλη IAM.DD2 δίνει καλύτερη συσχέτιση από τους υπόλοιπους, ενώ μελετώντας τα διαγράμματα της μεθόδου ελαχίστων τετραγώνων παρατηρείται ότι το θετικό φορτίο διαδραματίζει κομβικό ρόλο στην αναστολή των καναλιών hERG, το οποίο επιβεβαιώνεται και από τη βιβλιογραφία.^[71]

7.2.4. Μοντελοποίηση μιας κλάσης- Μέθοδος SIMCA (ήπια ανεξάρτητη μοντελοποίηση αναλογίας κλάσεων)

Για την εκτέλεση της μεθόδου μοντελοποίησης μίας κλάσης έγινε χρήση λογισμικού SIMCA. Στο πρόγραμμα δόθηκαν δεδομένα λιποφιλίας (LogP, LogD) και οι υπόλοιπες φυσικοχημικές και μοριακές παράμετροι που συλλέχθηκαν (A, B, S, E, V, TPSA, MW, HBA, HBD, F⁺, F⁻, Fz⁺, Fz⁻). Δε χρησιμοποιήθηκαν βιομιμητικοί δείκτες διότι ήταν δεδομένα δεν ήταν επαρκή. Ουσιαστικά, η μέθοδος λαμβάνει τις μεταβλητές και δημιουργεί νέες «λανθάνουσες» μεταβλητές και εξετάζει αν οι νέες μεταβλητές είναι ικανές να διακρίνουν τάξεις, στην προκειμένη περίπτωση είναι τα καρδιοτοξικά φάρμακα(possibility 1) και τα μη καρδιοτοξικά (possibility 0). Η πληροφορία που επιστρέφεται είναι ένα διάγραμμα με μία κόκκινη γραμμή η οποία αντιπροσωπεύει την κρίσιμη απόσταση κάτω από τη γραμμή είναι τα φάρμακα τα οποία παρουσιάζουν καρδιοτοξική συμπεριφορά ενώ, τα μη καρδιοτοξικά βρίσκονται πάνω από την κρίσιμη γραμμή. Τα αποτελέσματα της μεθόδου παρουσιάζονται στο ακόλουθο διάγραμμα.

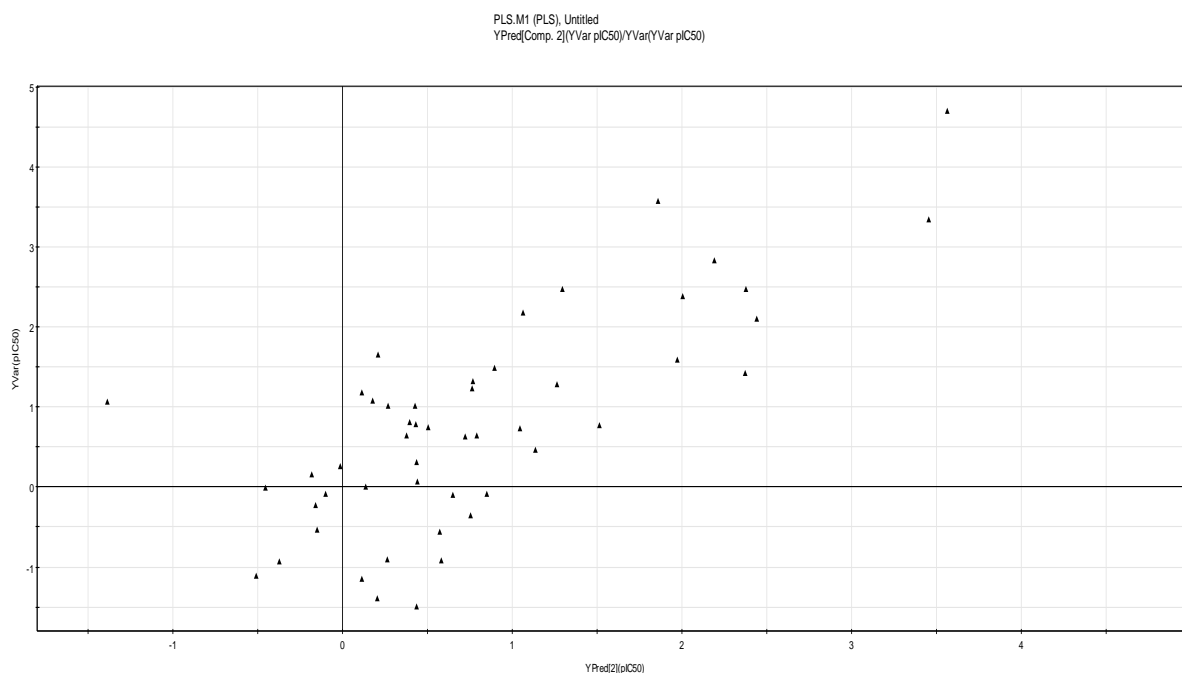
Μοντελοποίηση μιας κλάσης (Class modelling): Κλάση φαρμάκων με possibility 1.
Χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα λιποφιλίας και φυσικοχημικών ιδιοτήτων
2 κύριες συνιστώσες με $R^2= 0.727$ και $Q^2= 0.522$



Διάγραμμα 7. 2. 4. 1. Αποτελέσματα μεθόδου μοντελοποίησης μίας κλάσης

7.2.5. Ανάλυση μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Square)

Ένα μοντέλο PLS, όπως αναφέρθηκε στην ενότητα **6.2.3**, αναζητά τη πολυδιάστατη κατεύθυνση στον χώρο X η οποία θα ερμηνεύει τη μέγιστη κατεύθυνση πολυδιάστατης διακύμανσης στον χώρο Y. Σε αυτήν την περίπτωση η μεταβλητής Y είναι η τιμή plC_{50} και η μεταβλητή X προκύπτει από δεδομένα λιποφιλίας (LogP, LogD) και τις μεταβλητές A, B, S, E, V, TPSA, MW, HBA, HBD, F^+ , F^- , Fz^{w+} , Fz^{w-} . Η μέθοδος εκτελείται στο πρόγραμμα SIMCA. Τα αποτελέσματα που ακολουθούν είναι ένα διάγραμμα στο οποίο αποτυπώνεται η σχέση των εισαγόμενων στο λογισμικό τιμών plC_{50} ως συνάρτηση των προβλεπόμενων τιμών και ένας πίνακας στον οποίο παρουσιάζονται οι εισαγόμενες τιμές plC_{50} και οι προβλεπόμενες από το μοντέλο τιμές plC_{50} . Να σημειωθεί πως το μοντέλο προβλέπει και τιμές για φάρμακα για τα οποία δεν υπάρχει κάποια βιβλιογραφική τιμή plC_{50} .



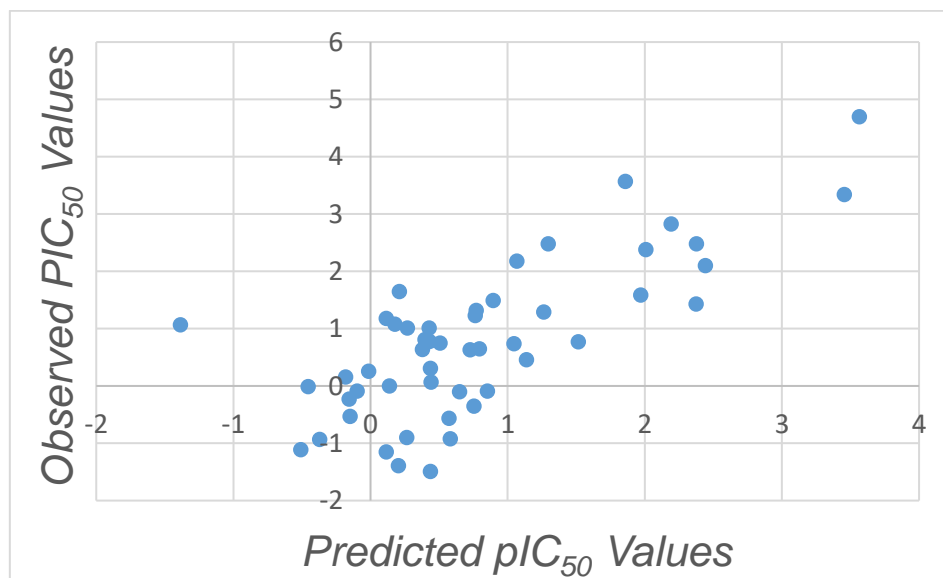
Διάγραμμα 7. 2. 5. 1. Παρατηρήσιμες plC_{50} ως συνάρτηση των προβλεπόμενων-από το μοντέλο- τιμών

Οι συνιστώσες που εξήχθησαν ήταν 2 και οι συντελεστές έλαβαν τις εξής τιμές $R^2= 0.766$, $Q^2= 0.495$. Περισσότερα σχόλια θα πραγματοποιηθούν στην ενότητα **Συζήτηση Αποτελεσμάτων**.

Πίνακας 7. 2. 31 Προβλέψεις pic_{50} με βάση το μοντέλο λιποφιλίας και φυσικοχημικών παραμέτρων

Obs ID (Primary)	M1.YVarP S(pic_{50})	M1.YPredPSJ 2](pic_{50})	ΠΡΟΒΛΕΨΕΙΣ pic_{50} με βάση το μοντέλο		
Acyclovir	--	2,99395	Propafenone	0,63	0,724832
Antipyrine	--	2,19572	Ketoconazole	0,26	-0,0145877
Cephalexin	--	3,11741	Quinidine	0,65	0,792542
Amoxicillin	4,7	3,56519	Propranolol	0,74	1,0449
Pindolol	--	1,41046	Haloperidol	-0,56	0,572152
Terbutaline	--	2,20679	Chlorpheniramine	1,23	0,762201
Metronidazole	--	2,75415	Protryptiline	0,07	0,440647
Phenacetin	--	2,20689	Fluoxetine	-0,1	0,648699
Trimethoprim	3,57	1,8573	Imipramine	0,31	0,437471
Nitrofurantoin	--	3,09905	Tamoxifen	-0,01	-0,454544
Methylprednisolone	--	1,50424	Amiodarone	1,07	-1,38728
Acetazolamide	--	3,54011	Mebendazole	--	1,57348
Flunitrazepam	--	1,48661	Diltiazem	1,01	0,426733
Piroxicam	--	2,73694	Astemizole	-1,11	-0,508193
Ketoprofen	--	2,8783	Cisapride	-1,39	0,203499
Indomethacin	2,48	2,37662	Dofetilide	-0,35	0,753828
Diclofenac	--	2,5312	Mibefradil	0,16	-0,182854
Acetaminophen	--	2,7349	Pergolide	-0,92	0,582124
Amiloride	--	2,70151	Terfenadine	-0,93	-0,371596
Benzylpenicillin	--	3,15063	Thioridazine	-0,53	-0,148719
codeine	2,48	1,29554	Alphacetylmethadol	1,08	0,178006
Ibuprofen	--	3,00102	Azithromycin	--	-0,0191942
Sulfamethoxazole	3,34	3,4546	Budipine	1,01	0,267491
Diphenhydramine	1,32	0,769695	Capsaicin	--	1,30373
Phenytoin	2,38	2,00676	Ciprofloxacin	2,1	2,44256
Papaverine	1,49	0,89475	Clobutanol	0,46	1,13604
Trazodone	0,75	0,506119	Grepafloxacin	1,59	1,97111
Ondansetron	-0,09	0,851411	Levofloxacin	2,83	2,19169
Budesonide	2,18	1,06553	Levomethadyl	--	0,10214
Droperidol	-1,49	0,437614	Loperamide	--	-0,178386
Encainide	0,78	0,430452			
Domperidone	-0,9	0,263411			
verapamil	-0,09	-0,0991275			
			Prenylamine	-0,23	-0,156635
			Propoxyphene	1,65	0,210285
			Rosiglitazone	--	2,04188
			Sertindole	-1,15	0,11383
			Sibutramine	0,64	0,37717
			Sparfloxacin	1,43	2,3729
			Terodiline	--	0,326805
			Celecoxib	--	1,27826
			Perphenazine	0	0,138692
			Prazosin	0,77	1,51516
			Doxepin	0,81	0,397211
			Diazepam	1,29	1,26222
			Saquinavir	1,18	0,114388

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα σχηματίζεται ένα καλύτερο διάγραμμα στο excel, όπου ο άξονας Y αντιπροσωπεύει τις τιμές pic_{50} που συλλέχθηκαν από τη βιβλιογραφία και ο άξονας X τις τιμές που προέβλεψε το μοντέλο.



Διάγραμμα 7. 2. 5. 2. Τιμές pic_{50} ως συνάρτηση των τιμών που προβλέφθηκαν από το μοντέλο

8. Συζήτηση Αποτελεσμάτων

Η επεξεργασία των μετρήσεων έρχεται εις πέρας με τον διάγραμμα 7. 2. 32 που παρουσιάζεται άνωθεν. Τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τις παραπάνω επεξεργασίες πρόκειται να συζητηθούν εκτενώς.

Διαγράμματα Πιθανότητας

Αρχής γενομένης από τα ποιοτικά διαγράμματα πιθανότητας-δεικτών (υποενότητα **7.2.1**), παρατηρείται ότι οι δείκτες της χρωματογραφίας ακινητοποιημένων μεμβρανών (IAM) και της χρωματογραφίας ακινητοποιημένης $\alpha 1$ όξινης γλυκοπρωτεΐνης (AGP) φαίνεται να εκδηλώνουν κάποια συσχέτιση με την πιθανότητα, εν αντιθέσει, με τους δείκτες ακινητοποιημένης αλβουμίνης (HSA) και εκείνους της μικκυλιακής χρωματογραφίας οι οποίοι, εκ πρώτης όψεως, δεν παρέχουν κάποια πληροφορία για την ύπαρξη συσχέτισης. Τέλος, τα διαγράμματα πιθανότητας των λογαρίθμων των συντελεστών μερισμού ($\log P$) και κατανομής ($\log D$) φαίνεται να προδίδουν και αυτά κάποια συσχέτιση.

Πιο αναλυτικά, στο διάγραμμα του δείκτη $\log k$ IAM-DD2 μπορεί να διακριθεί μία τιμή κατωφλίου (cut-off value) κοντά στην τιμή του 2. Αυτό υποδηλώνει ότι πάνω από αυτήν την τιμή η συμπεριφορά των φαρμάκων παύει να είναι μη καρδιοτοξική και αποκτά καρδιοτοξικό χαρακτήρα. Τιμές κατωφλίου μπορούν να παρατηρηθούν και για τους δείκτες CHI(IAM) και $\log k$ IAM-Valko, οι οποίοι είναι γύρω στο 30 και στο 3, αντιστοίχως. Η συσχέτιση είναι πιθανό να οφείλεται στην φωσφολιπιδική σύσταση που χαρακτηρίζει την στατική φάση της χρωματογραφίας ακινητοποιημένων μεμβρανών και είναι ικανή να προσομοιώσει τις μεμβράνες των κυττάρων του μυοκαρδίου.

Επιπροσθέτως, cut-off values διακρίνονται και στα διαγράμματα των δεικτών ακινητοποιημένης $\alpha 1$ όξινης γλυκοπρωτεΐνης οι οποίες για τους δείκτες $\log k$ AGP-acet, $\log k$ AGPact, $\log k$ AGP-2prop είναι γύρω στο 1.5, 1.70 και 1.35, αντίστοιχα. Για τους δείκτες των χρωματογραφιών ακινητοποιημένης αλβουμίνης ($\log k$ HSA-valko, $\log k$ HSA-acet, $\log k$ HSA-act, $\log k$ AGP-2prop) δεν παρατηρήθηκαν κάποιες cut off τιμές. Τα αποτελέσματα αυτά πιθανώς να οφείλονται στο φορτίο των φαρμακευτικών ενώσεων. Όπως θα συζητηθεί και ακολούθως στα διαγράμματα απλής παλινδρόμησης το θετικό φορτίο των ενώσεων διαδραματίζει κομβικό ρόλο στη σύνδεση του φαρμάκου με τα κανάλια hERG. Η πρωτεΐνη AGP λειτουργεί ως μεταφορέας κυρίως βασικών ενώσεων (δηλαδή θετικές) ενώ, η HSA είναι κατά το πλείστον μεταφορέας όξινων φαρμάκων εξού και η συσχέτιση με την AGP.

Η δείκτες $\log k$ Brij, $\log k$ Tween και $\log k$ SDS δεν παρουσίασαν κάποια cut off τιμή. Το γεγονός μπορεί να οφείλεται είτε στην ανυπαρξία κάποιας συσχέτισης είτε στην ελλιπή συλλογή πειραματικών μετρήσεων. Παρόλα αυτά εύλογο θα ήταν να μην εξαχθούν βεβαιωμένα συμπεράσματα δίχως περαιτέρω μελέτη. Όσον αφορά τους συντελεστές $\log P$ και $\log D$ (7.4), εμφανίζονται στα αντίστοιχα διαγράμματα cut-off values ίσες με 4 και 2.2, αντίστοιχα. Παρατηρήσεις οι οποίες επιβεβαιώνουν τη συσχέτιση καρδιοξικότητας και λιποφιλίας.

Διαγράμματα απλής γραμμικής παλινδρόμησης

Τα διαγράμματα δείκτη πιθανότητας παρείχαν κάποιες ποιοτικές πληροφορίες σχετικά με την ύπαρξη κάποιας εξάρτησης. Εν συνεχεία, επιδιώχθηκε να ποσοτικοποιηθεί η συσχέτιση αυτή με τη μέθοδο της απλής γραμμικής παλινδρόμησης και αυτό έγινε εισάγοντας τον όρο IC_{50} . Σε γενικές γραμμές οι απλές παλινδρομήσεις απείχαν παρασάγγας από την ποσοτικοποίηση της συσχέτισης. Αξιοσημείωτα αποτελέσματα, ωστόσο, παρατηρήθηκαν στην προσαρμογή του δείκτη $\log k$ IAM-DD2 όπου ο συντελεστής προσδιορισμού R^2 έλαβε την τιμή 0.839, προσαρμογή η οποία μπορεί να χαρακτηριστεί ως ικανοποιητική, κρίνοντας από το βιολογικό χαρακτήρα του μοντέλου (Σε βιολογικά πειράματα ο συντελεστής προσδιορισμού δύσκολα θα προσεγγίσει την τιμή του 1). Αρκετά, μέτριες προσαρμογές παρατηρήθηκαν και για τους δείκτες των χρωματογραφιών ακινητοποιημένης AGP, όπου οι συντελεστές έλαβαν τιμές 0.510, 0.570 και 0.614. Ενώ, οι προσαρμογές των δεικτών για τις χρωματογραφίες ακινητοποιημένης HSA, ήταν μη ικανοποιητικές καθώς οι συντελεστές έλαβαν τιμές από 0.011 ως 0.191 για αυτό το λόγο δεν εμφανίζεται στα διαγράμματα η γραμμή τάσης. Σχεδόν ασήμαντες μπορούν να χαρακτηριστούν και οι προσαρμογές των συντελεστών $\log P$ και $\log D$ με τιμές 0.343 και 0.316, αντιστοίχως. Τέλος, οι τιμές των συντελεστών προσδιορισμού των δεικτών της μικκυλιακής χρωματογραφίας κυμαίνονταν στο εύρος 0.554 με 0.678, οι προσαρμογές αυτές είναι μέτριες, εντούτοις δεν μπορεί να εξαχθεί κάποιο αξιόπιστο συμπέρασμα προς το παρόν.

Μία πάρα πολύ ενδιαφέρουσα παρατήρηση όσον αφορά τα φορτία είναι πως οι φαρμακευτικές ενώσεις που παρουσίαζαν υψηλότερες τιμές IC_{50} ήταν αυτές με θετικό φορτίο και ακολούθως οι ουδέτερες. Αυτό σημαίνει πως οι καρδιοτοξικές φαρμακευτικές ενώσεις που μελετήθηκαν ήταν στην πλειονότητα τους θετικές. Το γεγονός αυτό μπορεί να εξηγηθεί με μία πληροφορία που παρέχεται στην ενότητα **3.2.5**, πως η κυριότερη υπόθεση για τον τρόπο με τον οποίο προσδένονται τα φάρμακα στους διαύλους hERG είναι πως τα φάρμακα μέσω ενός θετικά φορτισμένου ατόμου αζώτου προσδένονται παράλληλα στον προσανατολισμό του καναλιού. Συνεπώς, η εξαγωγή ενός πορίσματος περί συσχέτισης θετικού φορτίου και παρεμπόδισης καναλιών hERG θα ήταν λογική.

Οι αιτίες για τις οποίες οι προσαρμογές δεν είναι τόσο ικανοποιητικές, ποικίλουν. Καταρχάς, θα αναφερθεί το αναμενόμενο το οποίο είναι πως πιθανώς η απλή γραμμική παλινδρόμηση δεν είναι η κατάλληλη μέθοδος για τη ποσοτικοποίηση κάποιας συσχέτισης, καθώς όπως φάνηκε οι περισσότεροι δείκτες δεν σχετίζονται γραμμικά με τον όρο IC_{50} . Μία άλλη αιτία είναι η ανυπαρξία κάποιας συσχέτισης καρδιοτοξικότητας και δεικτών τουλάχιστον για τους δείκτες οι οποίοι δεν έδωσαν αξιόπιστα αποτελέσματα ούτε στα διαγράμματα πιθανότητας ούτε στα διαγράμματα απλής γραμμικής παλινδρόμησης. Επιπλέον, σημαντική αιτία θα μπορούσε να χαρακτηριστεί και το γεγονός πως η προσπάθεια συσχέτισης IC_{50} με τους δείκτες μείωσε σε μεγάλο βαθμό τα σημεία καθώς υπήρχε μία έλλειψη βιοχρωματογραφικών δεικτών για τα καρδιοτοξικά φάρμακα (καθώς πολλά από αυτά έχουν αποσυρθεί από το εμπόριο) και συγχρόνως, υπήρχε μία ανεπάρκεια τιμών IC_{50} για τα μη καρδιοτοξικά φάρμακα (ο λόγος αναφέρθηκε σε προηγούμενη ενότητα). Τέλος, να σημειωθεί πως μπορεί να υπάρχει συσχέτιση, ωστόσο να χρειάζεται κάποιες επιπλέον παραμέτρους για να βελτιωθεί ή είναι πιθανό η εξάρτηση αυτή να είναι μη γραμμική. Το πρώτο σκέλος της τελευταίας πρότασης λαμβάνεται υπόψη και για αυτόν το λόγο πραγματοποιείται η μέθοδος της πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης για τον εντοπισμό αυτών των παραμέτρων.

Πολλαπλή Γραμμική Παλινδρόμηση

Θα πρέπει να επισημανθεί πως το πρόγραμμα SPSS κατά την εκτέλεση της πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης απέκλεισε κάποιους βιοχρωματογραφικούς δείκτες καθώς δεν παρουσίαζαν κάποια στατιστικά σημαντική συσχέτιση. Οι δείκτες αυτοί ήταν οι logk IAM-Valko, logkHSA-Valko, logkHSA-acet, logkHSA-act, logkHSA-2prop, logkTween, logkSDS, logkBrij και logP.

Ο πρώτος δείκτης που υποβλήθηκε στην τεχνική πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης και παρείχε κάποιες πληροφορίες, ήταν ο logk IAM-DD2 με μία ικανοποιητική εξίσωση παρόλα αυτά δεν υπήρξε κάποια παράμετρος η οποία να βελτιώνει περισσότερο το μοντέλο. Η τιμή F είναι ίση με 103.9, τιμή η οποία είναι μεγάλη και απορρίπτει την περίπτωση το R^2 να είναι 0. Έπειτα, $R^2_{adj}=0.831$, γεγονός που υποδηλώνει πως 83.1% των περιπτώσεων περιγράφονται από το μοντέλο. Ο συντελεστής R^2_{adj} εξάγεται από ένα διαφορετικό τύπο ο οποίος θα μπορούσε να χαρακτηριστεί ελαφρώς πιο «ειλικρινής» όσον αφορά τον αριθμό των περιπτώσεων που περιγράφει το μοντέλο. Η τυπική απόκλιση $s=0.62$ δεν είναι πολύ μεγάλη αλλά ούτε και μηδενική, το οποίο φανερώνει μία παρατηρήσιμη απόσταση των πειραματικών σημείων από τη γραμμή της παλινδρόμησης.

Ένας ακόμα δείκτης ο οποίος δεν βελτιώθηκε περαιτέρω με την προσθήκη κάποιων παραμέτρων ήταν ο CHI(IAM). Ο τελευταίος έδωσε ένα μία εξίσωση με ένα μη ικανοποιητικό $R^2_{adj}=0.388$ και κατά συνέπεια μία μεγάλη τυπική απόκλιση $s=1.018$ ωστόσο, απορρίπτεται η μηδενική υπόθεση του F-test, με την F να λαμβάνει την τιμή 18.1

Όσον αφορά τον δείκτη logkAGP-acet, η επεξεργασία των δεδομένων υπέδειξε πως ο συνυπολογισμός της παραμέτρου F^+_{zw} βελτίωσε τον συντελεστή προσδιορισμού R^2_{adj} από την τιμή 0.472 στην τιμή 0.633. Η προσαρμογή θεωρείται μέτρια όπως και η τιμή της τυπικής απόκλισης η οποία είναι 0.60.

Οι άλλοι δείκτες χρωματογραφίας ακινητοποιημένης AGP, logk AGP-act και logk AGP-2prop, δεν εμφάνισαν κάποια βελτίωση με τη μέθοδο της πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης καθώς δε βρέθηκε καμία παράμετρος να αυξήσει τους συντελεστές προσδιορισμού R^2_{adj} , διατηρώντας τιμές 0.537 και 0.585, αντίστοιχα.

Τέλος, ο λογάριθμος του συντελεστή κατανομής, logD, φανέρωσε μία βελτίωση με την προσθήκη των παραμέτρων F^+ και E. Ο συντελεστής προσδιορισμού R^2_{adj} , αυξήθηκε από την τιμή 0.301 που είχε στην απλή γραμμική παλινδρόμηση, σε 0.464 και στην συνέχεια σε 0.552, ενώ η τυπική απόκλιση σημείωσε μείωση στο 0.94, σχετικά μεγάλη τιμή η οποία δεν μπορεί να θεωρηθεί αμελητέα.

Σε γενικές γραμμές η προσπάθεια ποσοτικοποίησης της καρδιοτοξικότητας λόγω παρεμπόδισης των καναλιών hERG, χρησιμοποιώντας δείκτες βιοχρωματογραφίας και IC_{50} έδωσε μέτρια αποτελέσματα και σε ένα βαθμό μη ικανοποιητικά. Οι κύριοι λόγοι αναλύθηκαν και κατά τη συζήτηση των αποτελεσμάτων της απλής γραμμικής παλινδρόμησης και αφορούσαν κυρίως ελλιπή δεδομένα δεικτών βιοχρωματογραφίας. Να αναφερθεί ακόμα ότι σε πολλές ενώσεις υπήρξε μεγάλο εύρος τιμών στην βιβλιογραφία όσον αφορά την τιμή IC_{50} , αυτό μπορεί να οφείλεται στον υπολογισμό από διαφορετικές πειραματικές ομάδες ή στην εφαρμογή διαφορετικών πειραματικών μεθόδων. Είναι πολλοί οι λόγοι για τους οποίους υπήρχε αυτή η διακύμανση στις τιμές των όρων IC_{50} το οποίο δεν συνάδει με το θέμα της παρούσας εργασίας. Εντούτοις, η διακύμανση, αυτή, να οδήγησε στη λήψη της μέσης τιμής των τιμών αυτών το οποίο αυτόματα συνεπάγεται και την απομάκρυνση από την πραγματική τιμή και πιθανώς την εσφαλμένη περιγραφή του μοντέλου που εξάγεται. Παρόλα αυτά, τα δεδομένα παρείχαν κάποιες χρήσιμες πληροφορίες όπως τη συσχέτιση κάποιων δεικτών και

παραμέτρων με την καρδιοτοξικότητα και για αυτό χρήζουν πιο αναλυτικής μελέτης για την εξαγωγή ενός πιο αξιόπιστου μοντέλου.

Μοντελοποίηση μιας κλάσης

Το **Διάγραμμα 7. 2. 4. 1**. Αποτελέσματα μεθόδου μοντελοποίησης μιας κλάσης το οποίο εξήχθη από το λογισμικό SIMCA έδωσε σχετικά ικανοποιητικά αποτελέσματα. Το μοντέλο το οποίο παρουσιάζεται περιγράφει σωστά τα 50 από τα 53 φάρμακα τα οποία έχουν καταταχθεί στην κατηγορία των καρδιοτοξικών, αποκλείοντας μόνο 3 φάρμακα. Αυτό σημαίνει πως η ευαισθησία του μοντέλου στην κατηγοριοποίηση των καρδιοτοξικών φαρμάκων κάτω από την κρίσιμη γραμμή ήταν $50/53=0.943$ ή αλλιώς 94.3%, ποσοστό το οποίο θα μπορούσε να χαρακτηριστεί ως αρκετά ικανοποιητικό. Όσον αφορά την κατηγορία των μη καρδιοτοξικών φαρμάκων, 13 από τα 23 φάρμακα δεν μπορούν να ενταχθούν στην τάξη των καρδιοτοξικών φαρμάκων ενώ τα υπόλοιπα μπορεί να υπάρχει κάποια πιθανότητα εκδήλωσης καρδιοτοξικότητας. Σε αυτό το σημείο να ορίσουμε την ειδικότητα του μοντέλου δηλαδή το ποσοστό των μη καρδιοτοξικών τα οποία κατηγοριοποιούνται σωστά ως μη καρδιοτοξικά, το οποίο θα είναι $13/23=0.565$ ή αλλιώς 56.5%. Το λογισμικό παρείχε τις τιμές 0.727 και 0.522 για τους συντελεστές R^2 και Q^2 , αντίστοιχα. Οι συντελεστές ιδανικά θα πρέπει να προσεγγίζουν το 1 ωστόσο, αυτό θα σήμαινε την τέλεια ικανότητα πρόβλεψης από το μοντέλο γεγονός το οποίο είναι σπάνιο σε τέτοιο επιπέδου μελέτες. Μία άλλη προϋπόθεση, εάν δεν πληρείται η πρώτη, είναι οι δύο αυτοί συντελεστές να είναι όσο πιο κοντά στο 1 και πολύ κοντά μεταξύ τους. Στην προκειμένη περίπτωση το R^2 είναι ικανοποιητικό που σημαίνει ότι περιγράφει καλά ως έναν βαθμό τις ήδη υπάρχουσες ενώσεις (σε ποσοστό 72.7%) ενώ, το Q^2 είναι ελαφρώς μικρότερο γεγονός που υποδηλώνει ότι το μοντέλο πιθανώς να υστερεί στην πρόβλεψη άλλων φαρμάκων.

Μοντέλο PLS

Το σε αυτήν τη μέθοδο ήταν οι τιμές του plC_{50} οι οποίες συλλέχθηκαν βιβλιογραφικά συναρτήσει των τιμών που προέβλεπε το μοντέλο PLS. Ιδανικά θα έπρεπε οι τιμές να ταυτίζονται για την κάθε ένωση και η καμπύλη που θα σχηματιζόταν να ήταν η $Y=X$ το οποίο κατά συνέπεια, θα σήμαινε πως οι τιμές R^2 και Q^2 θα λάμβαναν την τιμή 1. Εντούτοις, ένα τέτοιο γεγονός, όπως προαναφέρθηκε είναι πολύ σπάνιο σε ανάπτυξη μεθόδων πρόβλεψης καρδιοτοξικότητας φαρμάκων. Παρόλα αυτά υπάρχει μία γραμμική τάση στα διαγράμματα (**Διάγραμμα 7. 2. 5. 1** και **Διάγραμμα 7. 2. 5. 2**) που προσεγγίζει την επιθυμητή καμπύλη $Y=X$. Η μέθοδος στην παρούσα μελέτη έδωσε τιμές 0.766 και 0.495 για τους συντελεστές R^2 και Q^2 , αντίστοιχα. Ένα ποσοστό 76.6% επιτυχίας στην περιγραφή βιολογικών φαινομένων είναι αρκετά ικανοποιητικό. Επιπροσθέτως, να σημειωθεί πως στον πίνακα 7.2.31 κάποιες από τις προβλέψεις είναι καλές.

Τα αποτελέσματα σε γενικότερο πλαίσιο είναι ελπιδοφόρα και με περαιτέρω μελέτη είναι πιθανό να υπάρχουν πολύ ικανοποιητικές προβλέψεις.

9. Συμπεράσματα

Εν κατακλείδι, η καρδιοτοξικότητα που προκαλείται λόγω παρεμπόδισης των ιοντικών διαύλων hERG από φαρμακευτικές ενώσεις αποτελεί συχνό αίτιο για την πολυδάπανη απόσυρση φαρμάκων από το εμπόριο. Η μελέτη της χαρακτηρίζεται ως βαρύνουσας σημασίας και ως επιτακτική κρίνεται η ανάγκη να ενσωματώνεται στις δοκιμές κάθε φαρμάκου πριν αυτό διατεθεί εμπορικά.

Η προσπάθεια συσχέτισης της καρδιοτοξικής συμπεριφοράς με λιποφιλικούς συντελεστές και δείκτες βιοχρωματογραφίας δεν ήταν διόλου ατελέσφορη. Οι δείκτες χρωματογραφικών ακινητοποιημένων μεμβρανών (logk IAM-DD2, CHI(IAM) και logk IAM-Valko) φανέρωσαν σε ποιοτικά διαγράμματα πιθανότητας πως υπήρχαν τιμές κατωφλίου οι οποίες αν ξεπεραστούν εμφανίζεται καρδιοτοξική συμπεριφορά. Cut off values φάνηκε πως έχουν και οι δείκτες ακινητοποιημένης α1 όξινης γλυκοπρωτεΐνης (logk AGP-acet, log AGPact, logk AGP-2pror) και οι συντελεστές λιποφιλίας LogP και LogD (7.4). Εντούτοις, δε μπορεί να προταθεί κάποια τιμή κατωφλίου (cut-off value) για τους δείκτες ακινητοποιημένης αλβουμίνης HSA (logkHSA-valko, logkHSA-acet, logkHSA-act, logk AGP-2pror) και για τους δείκτες μικκυλιακής χρωματογραφίας (logkTween, logkSDS, logkBrij)

Στην διαγράμματα απλής γραμμικής παλινδρόμησης αρκετά καλή προσαρμογή έδειξε ο δείκτης logk IAM-DD2 και αρκετά μέτριες προσαρμογές οι δείκτες ακινητοποιημένης AGP και της μικκυλιακής χρωματογραφίας. Οι συντελεστές λιποφιλίας έδωσαν μη ικανοποιητικές προσαρμογές ενώ, οι δείκτες ακινητοποιημένης HSA δεν εκδήλωσαν κάποια συσχέτιση. Μολαταύτα, μία αξιοσημείωτη παρατήρηση που έγινε μελετώντας τα διαγράμματα είναι ότι το φορτίο μίας φαρμακευτικής ένωσης διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην καρδιοτοξικότητα και μάλιστα το θετικό φορτίο είναι αυτό που παρατηρήθηκε να έχουν οι περισσότερες με επικίνδυνες τιμές pIC₅₀.

Ακολούθως, στην πολλαπλή γραμμική παλινδρόμηση λίγοι ήταν οι δείκτες οι οποίοι βελτιώθηκαν, εισάγοντας στο μοντέλο και συνυπολογίζοντας φυσικοχημικές και μοριακές παραμέτρους. Ανάμεσα σε αυτούς τους δείκτες ήταν ο logD(7.4). Οι δείκτες logk IAM-DD2, CHI(IAM), logk AGP-act και logkAGP-2pror δε σημείωσαν κάποια περαιτέρω βελτίωση στην προσαρμογή τους με την προσθήκη παραμέτρων, ενώ οι υπόλοιποι δείκτες απορρίφθηκαν από το λογισμικό το οποίο έφερε εις πέρας τη μέθοδο πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης.

Οι παραπάνω μετρήσεις υποδεικνύουν ότι υπάρχει μία συσχέτιση λιποφιλίας και θετικού φορτίου με την καρδιοτοξικότητα και πως με επιπλέον μελέτη κάποιοι από τους βιοχρωματογραφικούς δείκτες μπορούν να την προβλέψουν ικανοποιητικά.

Τέλος, οι συντελεστές λιποφιλίας σε συνδυασμό με τις φυσικοχημικές παραμέτρους και την εκτέλεση των μεθόδων class modelling και PLS έδωσαν αξιόλογα αποτελέσματα με ποσοστά περιγραφής των δεδομένων 72.7% και 76.6%, αντιστοίχως, ενώ το μοντέλο class modelling έδωσε ακόμα ποσοστό 94.3% στην ταξινόμηση των καρδιοτοξικών φαρμάκων. Οι μέθοδοι αυτές παρείχαν πολύ φερέλπιδα αποτελέσματα και με μία βελτιωμένη προσέγγιση θα μπορούσαν να εξελιχθούν σε ικανά για χρήση μοντέλα.

Προτάσεις για περαιτέρω μελέτη

Όλα τα αποτελέσματα τα οποία παρουσιάστηκαν, εξήχθησαν με μία εκ των ενόντων συλλογή δεδομένων. Η συλλογή, ωστόσο, ήταν ως ένα βαθμό περιορισμένη και αυτό είναι απόρροια ελλιπούς βιβλιογραφίας όσον αφορά τον αριθμό πειραματικών μετρήσεων σε φάρμακα που να παρέχουν τιμές βιοχρωματογραφικών δεικτών. Μία πρόταση είναι να εξαχθούν περισσότερες βιοχρωματογραφικές αναλύσεις σε φάρμακα τα οποία έχουν αποσυρθεί λόγω καρδιοτοξικότητας. Έτσι, θα υπάρχει μεγαλύτερος αριθμός δεδομένων προς με μελέτη.

Μία ακόμα, υπόδειξη για καλύτερη εκτέλεση της παρούσας έρευνας είναι η συγκέντρωση τιμών IC_{50} που να μην παρουσιάζουν τεράστιο εύρος για το ίδιο φάρμακο. Ένας τρόπος για να επιτευχθεί κάτι τέτοιο είναι με το να ληφθούν τιμές από μία μόνο πειραματική ομάδα η οποία ακολούθησε μία συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία χρησιμοποιώντας την ίδια κυτταρική σειρά. Έτσι, εξαλείφεται η έλλειψη accuracy μεταξύ των τιμών των συγκεντρώσεων IC_{50} και δεν υπάρχει μεγάλη διαφοροποίηση.

10. Βιβλιογραφία

1. David Rampe, Arthur M. Brown, *A history of the role of the hERG channel in cardiac risk assessment*, Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, Volume 68, Issue 1, 2013, Pages 13-22, ISSN 1056-8719, (<https://doi.org/10.1016/j.vascn.2013.03.005>)
2. Sato T, Yuki H, Ogura K, Honma T (2018) *Construction of an integrated database for hERG blocking small molecules*. PLOS ONE 13(7): e0199348. (<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199348>)
3. Δημόπουλος Β. , Τσαντίλη-Κακουλίδου Ά., 2015. « Βασικές Αρχές Σχεδιασμού και Ανάπτυξης Φαρμάκων», (ηλεκτρονικό βιβλίο), Ζωγράφου: Σύνδεσμος Ελληνικών Ακαδημαϊκών Βιβλιοθηκών, Διαθέσιμο στο: https://repository.kallipos.gr/pdfviewer/web/viewer.html?file=/bitstream/11419/5881/5/00_master_document_Nov.pdf
4. Irwin Goldstein, Arthur L. Burnett, Raymond C. Rosen, Peter W. Park, Vera J. Stecher, *The Serendipitous Story of Sildenafil: An Unexpected Oral Therapy for Erectile Dysfunction*, Sexual Medicine Reviews, Volume 7, Issue 1, 2019, Pages 115-128, ISSN 2050-0521 (<https://doi.org/10.1016/j.sxmr.2018.06.005>)
5. Διαδικασία Ανάπτυξης, 2016, Ανακτήθηκε Ιανουάριο 11, 2021 από το Pfizer.gr, Διαθέσιμο στο: <https://www.pfizer.gr/el/%CE%B4%CE%B9%CE%B1%CE%B4%CE%B9%CE%BA%CE%B1%CF%83%CE%B9%CE%B1-%CE%B1%CE%BD%CE%B1%CF%80%CF%84%CF%85%CE%BE%CE%B7%CF%83-0>
6. Wouters OJ, McKee M, Luyten J. *Estimated Research and Development Investment Needed to Bring a New Medicine to Market, 2009-2018*. JAMA. 2020; 323(9):844–853. doi:10.1001/jama.2020.1166 (<https://jamanetwork.com/journals/jama/fullarticle/2762311>)
7. *Why Drugs Get Pulled from the Market*, June 20, 2016, Retrieved January 11, 2021 from FindLaw.com (<https://www.findlaw.com/injury/product-liability/why-drugs-get-pulled-from-the-market.html>)
8. Kocadal, K., Saygi, S., Alkas, F. B., & Sardas, S. (2018). *Drug-associated cardiovascular risks: A retrospective evaluation of withdrawn drugs. Northern clinics of Istanbul*, 6(2), 196–202. (<https://doi.org/10.14744/nci.2018.44977>)
9. Siramshetty, V. B., Nickel, J., Omieczynski, C., Gohlke, B. O., Drwal, M. N., & Preissner, R. (2016). *WITHDRAWN-a resource for withdrawn and discontinued drugs*. Nucleic acids research, 44(D1), D1080–D1086. (<https://doi.org/10.1093/nar/gkv1192>)

10. Wilke, R., Lin, D., Roden, D. et al. *Identifying genetic risk factors for serious adverse drug reactions: current progress and challenges*. Nat Rev Drug Discov 6, 904–916 (2007). (<https://doi.org/10.1038/nrd2423>)

11. Navarro VJ, Senior JR. *Drug-related hepatotoxicity*. N Engl J Med. 2006 Feb 16;354(7):731-9. doi: 10.1056/NEJMra052270. PMID: 16481640

12. Nilesh Mehta, *Drug-Induced Hepatotoxicity*, updated: May 03, 2019, Ανακτήθηκε Ιανουάριο 11, 2021 από το Medscape, Διαθέσιμο στο: <https://emedicine.medscape.com/article/169814-overview>

13. Αλεξοπούλου Αλεξάνδρα, *Ηπατοτοξικότητα από φάρμακα*, Ανακτήθηκε Ιανουάριο 11, 2021 από iatrikionline.gr. Διαθέσιμο στο: https://www.iatrikionline.gr/Gastro_37/1.pdf

14. Mladěnka, P, Applová, L, Patočka, J, et al. *Comprehensive review of cardiovascular toxicity of drugs and related agents*. Med Res Rev. 2018; 38: 1332– 1403. <https://doi.org/10.1002/med.21476>

15. Διακυτταρική Επικοινωνία – Μεταγωγή Σήματος, Αιμιλία Ζίφα, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Θεσσαλίας, 2009, Κεφ. 4^ο. (Διαθέσιμο στο https://eclass.uth.gr/modules/document/file.php/BIO_U_143/PDF%20%CE%92%CE%B9%CE%B2%CE%BB%CE%AF%CE%BF%CF%85%20%CE%94%CE%B9%CE%B1%CE%BA%CF%85%CF%84%CF%84%CE%B1%CF%81%CE%B9%CE%BA%CE%AE%20%CE%95%CF%80%CE%B9%CE%BA%CE%BF%CE%B9%CE%BD%CF%89%CE%BD%CE%AF%CE%B1%20-%20%CE%9C%CE%B5%CF%84%CE%B1%CE%B3%CF%89%CE%B3%CE%AE%20%CE%A3%CE%AE%CE%BC%CE%B1%CF%84%CE%BF%CF%82/kefalaio4-2019.pdf)

16. Mina T. Kelleni, Mahrous Abdelbasse, November 2018, *Drug Induced Cardiotoxicity: Mechanism, Prevention and Management*, Wenyong Tan (Eds.), Cardiotoxicity DOI: (<https://doi.org/10.5772/intechopen.79611>)

17. Kaplan, W. D., & Trout, W. E., 3rd (1969). *The behavior of four neurological mutants of Drosophila*. Genetics, 61(2), 399–409.

18. Lamothe, S. M., Guo, J., Li, W., Yang, T., & Zhang, S. (2016). *The Human Ether-a-go-go-related Gene (hERG) Potassium Channel Represents an Unusual Target for Protease-mediated Damage*. The Journal of biological chemistry, 291(39), 20387–20401. (<https://doi.org/10.1074/jbc.M116.743138>)

19. Goodchild SJ, Macdonald LC, Fedida D. *Sequence of gating charge movement and pore gating in HERG activation and deactivation pathways*. Biophys J. 2015 Mar 24;108(6):1435-1447. doi: 10.1016/j.bpj.2015.02.014. PMID: 25809256; PMCID: PMC4375626

20. Mallios CD. Drug induced prologation of the QT interval. Iatrika Analekta 2011, 3:412-415. Διαθέσιμο στο (<https://www.hygeia.gr/epimikynsi-toy-diastimatos-qtc-apo-mi-kardiologika-farmaka/>)
21. ΤΟ ΗΛΕΚΤΡΟΚΑΡΔΙΟΓΡΑΦΗΜΑ (ΗΚΓ) ΚΑΙ Ο ΗΛΕΚΤΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΚΑΡΔΙΑΣ, Πισσαρίδης Κώστας, Φεβρουάριο 12, 2017, ενημερώθηκε Ιούνιο 26, 2020, ανακτήθηκε Ιανουάριο 11, 2021 από καρδιολογοσπισσαριδησκ.gr, διαθέσιμο στο: <https://www.xn--mxaafdcskbbdjf5cbbqjk8acaf.gr/2017/02/12/%CE%BF-%CE%B7%CE%BB%CE%B5%CE%BA%CF%84%CF%81%CE%B9%CF%83%CE%BC%CE%BF%CF%83-%CF%84%CE%B7%CF%83-%CE%BA%CE%B1%CF%81%CE%B4%CE%B9%CE%B1%CF%83/>
22. Long QT Syndrome, August 2020, Retrieved January 11, 2021 from washingtonhra.com, Available at <https://www.washingtonhra.com/arrhythmias/long-qt-syndrome.php>
23. Fermini, B., Fossa, A. *The impact of drug-induced QT interval prolongation on drug discovery and development.* Nat Rev Drug Discov 2, 439–447 (2003). (<https://doi.org/10.1038/nrd1108>)
24. Lehmann DF, Eggleston WD, Wang D. *Validation and Clinical Utility of the hERG IC50: Cmax Ratio to Determine the Risk of Drug-Induced Torsades de Pointes: A Meta-Analysis.* Pharmacotherapy. 2018 Mar;38(3):341-348. doi: 10.1002/phar.2087. Epub 2018 Feb 19. PMID: 29380488.
25. Subha Kalyaanamoorthy, Khaled H. Barakat, *Development of Safe Drugs: The hERG Challenge,* Medicinal Research Reviews, May 2017, DOI: 10.1002/med.21445, PMID:28467598
26. Pollard CE, Abi Gerges N, Bridgland-Taylor MH, Easter A, Hammond TG, Valentin JP. *An introduction to QT interval prolongation and non-clinical approaches to assessing and reducing risk.* Br J Pharmacol. 2010 Jan;159(1):12-21. doi: 10.1111/j.1476-5381.2009.00207.x. PMID: 20141516; PMCID: PMC2823347.
27. Yue, Z., Li, C., Voth, G. A., & Swanson, J. (2019). Dynamic Protonation Dramatically Affects the Membrane Permeability of Drug-like Molecules. Journal of the American Chemical Society, 141(34), 13421–13433. (<https://doi.org/10.1021/jacs.9b04387>)
28. Jover, J., Bosque, R., & Sales, J. (2004). Determination of Abraham Solute Parameters from Molecular Structure. Journal of Chemical Information and Computer Sciences, 44(3), 1098–1106. (<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ci049943w>)
29. Καρκαλούσος, Π., Γεωργίου, Ζ., Κρούπης, Χ., Παπαϊωάννου, Α., Πλαγεράς, Π., Σπυρόπουλος, Β., Τσότσου, Γ., Φούντζουλα, Χ. 2015. Εργαστηριακές ασκήσεις κλινικής χημείας. [ηλεκτρ. βιβλ.] Αθήνα:Σύνδεσμος Ελληνικών Ακαδημαϊκών Βιβλιοθηκών. Διαθέσιμο στο: <http://hdl.handle.net/11419/5382>

30. Ermondi G, Vallaro M, Caron G. Learning how to use IAM chromatography for predicting permeability. *Eur J Pharm Sci.* 2018 Mar 1;114:385-390. doi: 10.1016/j.ejps.2018.01.001. Epub 2018 Jan 3. PMID: 29305983.
31. Fotios Tsopelas, Theodosia Vallianatou & Anna Tsantili-Kakoulidou (2016): *Advances in immobilized artificial membrane (IAM) chromatography for novel drug discovery*, Expert Opinion on Drug Discovery, DOI: 10.1517/17460441.2016.1160886
32. Regis Technologies, INC., 8210 Austin Avenue, IL 60053, USA. Retrieved at January 11, 2021. Available at <https://www.registech.com/immobilized-artificial-membrane-iam-chromatography/>
33. Vuignier K, Guillarme D, Veuthey JL, Carrupt PA, Schappler J. *High performance affinity chromatography (HPAC) as a high-throughput screening tool in drug discovery to study drug-plasma protein interactions.* *J Pharm Biomed Anal.* 2013 Feb 23;74:205-12. doi: 10.1016/j.jpba.2012.10.030. Epub 2012 Nov 5. PMID: 23245252
34. George L Trainor (2007) The importance of plasma protein binding in drug discovery, *Expert Opinion on Drug Discovery*, 2:1, 51-64, DOI: 10.1517/17460441.2.1.51
35. Zhao Li, Sandya R. Beeram, Cong Bi, D. Suresh, Xiwei Zheng, David S. Hage, Chapter One: High-Performance Affinity Chromatography: Applications in Drug–Protein Binding Studies and Personalized Medicine, Editor(s): Rossen Donev, *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, Academic Press, Volume 102, 2016, Pages 1-39, ISSN 1876-1623, ISBN 9780128047958, (<https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2015.09.007>)
36. Ignác Capek, 3 - *Preparation of polymer-based nanomaterials*, Editor(s): Ignác Capek, *Nanocomposite Structures and Dispersions (Second Edition)*, Elsevier, 2019, Pages 175-265, ISBN 9780444637482, (<https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63748-2.00003-1>)
37. Li Zhu, Li Ding, Qianli Zhang, Lin Wang, Fei Tang, Qian Liu and Shouzhuo Yao, *Direct analysis of cryptotanshinone and tanshinone IIA in biological samples and herbal medicinal preparations by a green technique of micellar liquid chromatography*, *Journal Green Chemistry*, 2009, (<https://doi.org/10.1039/B815182B>)
38. Stępnik KE, Malinowska I. *The use of biopartitioning micellar chromatography and immobilized artificial membrane column for in silico and in vitro determination of blood-brain barrier penetration of phenols.* *J Chromatogr A.* 2013 Apr 19;1286:127-36. doi: 10.1016/j.chroma.2013.02.071. Epub 2013 Feb 27. PMID: 23506703.
39. M. J. Ruiz-Angel, E. Peris-García and M. C. García-Alvarez-Coque, *Reversed-phase liquid chromatography with mixed micellar mobile phases of Brij-35 and sodium dodecyl sulphate: a method for the analysis of basic compounds*, *Journal Green Chemistry*, Issue 6, 2015, (<https://doi.org/10.1039/C5GC00338E>)
40. Fotios Tsopelas, Niki Malaki, Theodosia Vallianatou, Marios Chrysanthakopoulos, Demetris Vrakas, Maria Ochsenkühn-Petropoulou, Anna Tsantili-Kakoulidou, *Insight into the retention mechanism on immobilized artificial membrane chromatography using*

two stationary phases, *Journal of Chromatography A*, Volume 1396, 2015, Pages 25-33, ISSN 0021-9673, (<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.03.060>)

41. Vrakas D, Giaginis C, Tsantili-Kakoulidou A. *Electrostatic interactions and ionization effect in immobilized artificial membrane retention. A comparative study with octanol-water partitioning.* *Journal of chromatography. A.* 2008 Apr;1187(1-2):67-78. DOI: 10.1016/j.chroma.2008.01.079.
42. Hollósy F, Valkó K, Hersey A, Nunhuck S, Kéri G, Bevan C. *Estimation of volume of distribution in humans from high throughput HPLC-based measurements of human serum albumin binding and immobilized artificial membrane partitioning.* *J Med Chem.* 2006 Nov 30;49(24):6958-71. doi: 10.1021/jm050957i. PMID: 17125249.
43. Valko K, Du CM, Bevan CD, Reynolds DP, Abraham MH. *Rapid-gradient HPLC method for measuring drug interactions with immobilized artificial membrane: comparison with other lipophilicity measures.* *J Pharm Sci.* 2000 Aug;89(8):1085-96. doi: 10.1002/1520-6017(200008)89:8<1085::aid-jps13>3.0.co;2-n. PMID: 10906732.
44. Chrysanthakopoulos M, Vallianatou T, Giaginis C, Tsantili-Kakoulidou A. *Investigation of the retention behavior of structurally diverse drugs on alpha(1) acid glycoprotein column: insight on the molecular factors involved and correlation with protein binding data.* *Eur J Pharm Sci.* 2014 Aug 18;60:24-31. doi: 10.1016/j.ejps.2014.04.015. Epub 2014 May 4. PMID: 24800938.
45. Chrysanthakopoulos M, Giaginis C, Tsantili-Kakoulidou A. *Retention of structurally diverse drugs in human serum albumin chromatography and its potential to simulate plasma protein binding.* *J Chromatogr A.* 2010 Sep 10;1217(37):5761-8. doi: 10.1016/j.chroma.2010.07.023. Epub 2010 Jul 16. PMID: 20691448.
46. Α. Τσαντίλη- Κακουλίδου, Σημειώσεις Στατιστικής- Χημειομετρίας, Σημειώσεις ΜΠΣ «Παραγωγή και Έλεγχος Φαρμακευτικών Ενώσεων», Έκδοση ΕΚΠΑ, Αθήνα, 2002.
47. Oliveri, P. (2017). Class-modelling in food analytical chemistry: Development, sampling, optimisation and validation issues – A tutorial. *Analytica Chimica Acta*, 982, 9–19. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.05.013>.
48. Wold, S., Sjöström, M., & Eriksson, L. (2001). PLS-regression: A basic tool of chemometrics. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 58(2), 109–130. [https://doi.org/10.1016/S0169-7439\(01\)00155-1](https://doi.org/10.1016/S0169-7439(01)00155-1).
49. Wilke, R., Lin, D., Roden, D. et al. *Identifying genetic risk factors for serious adverse drug reactions: current progress and challenges.* *Nat Rev Drug Discov* 6, 904–916 (2007). <https://doi.org/10.1038/nrd2423>

50. Windisch, A., Timin, E., Schwarz, T., Stork-Riedler, D., Erker, T., Ecker, G., & Hering, S. (2011). Trapping and dissociation of propafenone derivatives in HERG channels. *British journal of pharmacology*, 162(7), 1542–1552. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.01159.x>
51. Yao X, McIntyre MS, Lang DG, Song IH, Becherer JD, Hashim MA. *Propranolol inhibits the human ether-a-go-go-related gene potassium channels*. Eur J Pharmacol. 2005 Sep 20;519(3):208-11. doi: 10.1016/j.ejphar.2005.05.010. PMID: 16150441.
52. Jo SH, Hong HK, Chong SH, Choe H. *Protriptyline block of the human ether-à-go-go-related gene (HERG) K⁺ channel*. Life Sci. 2008 Jan 30;82(5-6):331-40. doi: 10.1016/j.lfs.2007.12.004. Epub 2008 Jan 11. PMID: 18191158.
53. van Noord C, Sturkenboom MC, Straus SM, Witteman JC, Stricker BH. *Non-cardiovascular drugs that inhibit hERG-encoded potassium channels and risk of sudden cardiac death*. Heart. 2011 Feb;97(3):215-20. doi: 10.1136/hrt.2009.188367. Epub 2010 Apr 20. PMID: 20406763.
54. Brihoum, M., Rollin, F., Desmecht, D., Detilleux, J., & Amory, H. (2011). *Clinical evaluation of cardiac effects of experimental doxycycline overdosing in healthy calves*. BMC veterinary research, 7, 40. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-7-40>
55. Kang J, Compton DR, Vaz RJ, Rampe D. *Proarrhythmic mechanisms of the common anti-diarrheal medication loperamide: revelations from the opioid abuse epidemic*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2016 Oct;389(10):1133-7. doi: 10.1007/s00210-016-1286-7. Epub 2016 Aug 16. PMID: 27530870.
56. Scholz EP, Zitron E, Kiesecker C, Lueck S, Kathöfer S, Thomas D, Weretka S, Peth S, Kreye VA, Schoels W, Katus HA, Kiehn J, Karle CA. *Drug binding to aromatic residues in the HERG channel pore cavity as possible explanation for acquired Long QT syndrome by antiparkinsonian drug budipine*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2003 Nov;368(5):404-14. doi: 10.1007/s00210-003-0805-5. Epub 2003 Oct 14. PMID: 14557918.
57. Legras A, Piquemal R, Furet Y, Dequin PF, Perrotin D. *Buflomedil poisoning: five cases with cardiotoxicity*. Intensive Care Med. 1996 Jan;22(1):57-61. doi: 10.1007/BF01728332. PMID: 8857439.
58. Drolet B, Zhang S, Deschênes D, Rail J, Nadeau S, Zhou Z, January CT, Turgeon J. Droperidol lengthens cardiac repolarization due to block of the rapid component of the delayed rectifier potassium current. J Cardiovasc Electrophysiol. 1999 Dec;10(12):1597-604. doi: 10.1111/j.1540-8167.1999.tb00224.x. PMID: 10636190.
59. Shah RR. *The significance of QT interval in drug development*. British Journal of Clinical Pharmacology. 2002 Aug;54(2):188-202. DOI: 10.1046/j.1365-2125.2002.01627.x.
60. T. Meinertz, *Mibefradil — a drug which may enhance the propensity for the development of abnormal QT prolongation*, European Heart Journal Supplements, Volume 3, Issue suppl_K, September 2001, Pages K89–K92, [https://doi.org/10.1016/S1520-765X\(01\)90011-2](https://doi.org/10.1016/S1520-765X(01)90011-2)

61. Shah SK (2018) *QT interval prolongation: Life-threatening consequences of life saving drugs*. Pharm Drug Dev Ther 3: DOI: 10.15761/PDDT.1000109
62. Raymond S. Hurst, Nicole R. Higdon, Judy A. Lawson, Michael A. Clark, Karen L. Rutherford-Root, William G. McDonald, Joseph V. Haas, James P. McGrath, Martin D. Meglasson, *Dopamine receptor agonists differ in their actions on cardiac ion channels*, European Journal of Pharmacology, Volume 482, Issues 1–3, 2003, Pages 31-37, ISSN 0014-2999, <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2003.09.054>.
63. Cubeddu L. X. (2009). *Iatrogenic QT Abnormalities and Fatal Arrhythmias: Mechanisms and Clinical Significance*. Current cardiology reviews, 5(3), 166–176. <https://doi.org/10.2174/157340309788970397>
64. Talhari C, Lauceviciute I, Enderlein E, Ruzicka T, Homey B. *COX-2-selective inhibitor valdecoxib induces severe allergic skin reactions*. J Allergy Clin Immunol. 2005 May;115(5):1089-90. doi: 10.1016/j.jaci.2004.12.1135. PMID: 15867872.
65. Hong, H. K., & Jo, S. H. (2009). *Block of HERG k channel by classic histamine h(1) receptor antagonist chlorpheniramine*. The Korean journal of physiology & pharmacology : official journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology, 13(3), 215–220. <https://doi.org/10.4196/kjpp.2009.13.3.215>
66. Zhang S, Zhou Z, Gong Q, Makielski JC, January CT. Mechanism of block and identification of the verapamil binding domain to HERG potassium channels. Circ Res. 1999 May 14;84(9):989-98. doi: 10.1161/01.res.84.9.989. PMID: 10325236.
67. Joel Morganroth, Peter C. Rüegg, Cornelia Dunger-Baldauf, Silke Appel-Dingemanse, Harald Bliesath, Martin Lefkowitz, Tegaserod, a 5-hydroxytryptamine type 4 receptor partial agonist, is devoid of electrocardiographic effects, The American Journal of Gastroenterology, Volume 97, Issue 9, 2002, Pages 2321-2327, ISSN 0002-9270, [https://doi.org/10.1016/S0002-9270\(02\)04343-5](https://doi.org/10.1016/S0002-9270(02)04343-5).
68. Tarantino P, Appleton N, Lansdell K. Effect of trazodone on hERG channel current and QT-interval. Eur J Pharmacol. 2005 Mar 7;510(1-2):75-85. doi: 10.1016/j.ejphar.2005.01.009. PMID: 15740727.
69. Floreani M, Luciani S. Amiloride: relationship between cardiac effects and inhibition of Na⁺/Ca²⁺ exchange. Eur J Pharmacol. 1984 Oct 15;105(3-4):317-22. doi: 10.1016/0014-2999(84)90624-1. PMID: 6510473.
70. Raschi E, Ceccarini L, De Ponti F, Recanatini M. *hERG-related drug toxicity and models for predicting hERG liability and QT prolongation*. Expert Opin Drug Metab Toxicol. 2009 Sep;5(9):1005-21. doi: 10.1517/17425250903055070. PMID: 19572824.
71. Yu, Z., IJzerman, A.P. and Heitman, L.H. (2015), *Molecular insights into K_v11.1 (hERG) cardiotoxicity*. Br J Pharmacol, 172: 940-955. <https://doi.org/10.1111/bph.12967>

Παράρτημα

Πίνακας Π. 1. Επιλεγμένα φάρμακα με τις αντίστοιχες φυσικοχημικές και μοριακές ιδιότητες τους

Φάρμακο	logP	logD (7.4)	A	B	S	E	V	TPSA	MW	HBA	HBD
Acetaminophen	0.46	0.46	1.0	0.9	1.63	1.06	1.1724	49.33	151.2	3	2
Acetazolamide	-0.30	-1.04	0.9	1.5	2.55	1.64	1.3369	151.7	225.3	7	3
Acyclovir	-1.60	-1.46	0.4	1.9	2.10	2.04	1.5222	114.8	225.2	8	4
Alphacetylmethadol	4.27	3.17	0.0	1.2	1.37	1.62	3.0483	29.54	353.5	3	0
Amiloride	0.10	-1.30	1.0	1.2	1.60	1.8	1.5101	156.8	229.6	8	8
Amiodarone	7.80	6.38	0.0	1.3	2.49	3.33	3.7536	42.68	645.3	4	0
Amoxicillin	-2.00	-3.94	1.6	2.9	3.22	2.70	2.5356	158.3	365.4	8	5
Antipyrine	0.38	0.38	0.0	1.5	1.15	1.32	1.4846	23.55	188.2	3	0
Astemizole	5.70	4.54	0.1	1.6	3.1	2.70	3.5563	42.32	458.6	5	1
Azithromycin	4.02	-0.31	1.0	4.9	2.5	2.67	5.9980	180.1	749.0	14	5
Benzylpenicillin	1.85	-2.17	0.8	2.1	2.71	2.27	2.3771	112	334.4	6	2
Budesonide	2.62	2.62	0.5	2.2	3.23	2.33	3.2683	93.06	430.5	6	2
Budipine	4.93	3.14	0.0	0.8	1.49	1.27	2.5835	3.240	293.4	1	0
Capsaicin	3.60	3.60	0.5	1.2	1.25	1.9	2.5971	58.56	305.4	4	2
Celecoxib	2.90	2.90	0.4	1.2	2.43	2.51	2.4672	85.84	381.4	5	2
Cephalexin	0.65	-3.95	1.1	2.5	3.27	2.53	2.4339	138.0	347.4	7	4
Chlorpheniramine	3.39	1.42	0.0	1.4	1.34	1.47	2.2098	16.13	274.8	2	0
Ciprofloxacin	-1.10	-3.03	0.7	1.9	2.20	2.50	2.3046	72.88	331.3	6	2
Cisapride	4.20	2.49	0.5	2.2	2.30	3.15	3.3967	86.05	465.9	7	3
Clobutinol	2.88	0.73	0.3	1.0	1.08	1.11	2.1245	23.47	255.8	2	1
Codeine	1.14	0.47	0.3	1.8	1.95	1.78	2.2057	41.93	299.4	4	1
Diazepam	2.82	2.84	0.0	1.0	1.72	2.11	2.0739	32.67	284.7	3	0
Diclofenac	4.40	1.23	0.6	1.0	1.22	2.28	2.025	49.33	296.2	3	2
Diltiazem	2.70	1.97	0.0	2.1	2.55	2.42	3.1365	84.38	414.5	6	0
Diphenhydramine	3.40	1.82	0.0	1.0	1.43	1.36	2.1872	12.47	255.4	2	0
Dofetilide	2.41	1.06	0.7	2.2	2.43	3.30	3.2304	121.6	441.6	8	2
Domperidone	4.05	3.49	0.7	1.8	3.13	3.11	3.0602	67.92	425.9	7	2
Doxepin	4.29	3.27	0.0	1.0	1.46	1.75	2.3174	12.47	279.4	2	0
Droperidol	3.50	2.61	0.3	1.7	2.73	2.51	2.8214	52.65	379.4	5	1
Encainide	3.58	1.02	0.4	1.5	2.2	1.93	2.8986	41.57	352.5	4	1
Flunitrazepam	2.19	2.19	0.0	1.5	2.15	2.10	2.1433	81.50	313.3	6	0
Fluoxetine	4.50	2.44	0.1	0.8	1.19	1.01	2.24	21.26	309.3	2	1
Grepafloxacin	0.87	-1.45	0.7	1.9	2.33	2.43	2.5688	72.88	359.4	6	2
Haloperidol	3.36	2.19	0.4	1.8	1.39	1.90	2.7979	40.54	375.9	3	1
Ibuprofen	3.50	1.07	0.6	0.8	0.59	0.73	1.7771	37.30	206.3	2	1
Imipramine	4.80	2.61	0.0	1.2	1.6	1.15	2.4015	6.480	280.4	2	0
Indomethacin	4.27	0.71	0.6	1.6	1.35	2.24	2.5299	68.53	357.8	5	1

Ketoconazole	4.34	3.97	0.0	2.2	3.76	3.14	3.7208	69.06	531.4	8	0
Ketoprofen	3.12	-0.52	0.6	0.9	2.26	1.65	1.9779	54.37	254.3	3	1
Levofloxacin	-0.40	-2.45	0.6	2.1	2.26	2.58	2.5042	73.32	361.4	7	1
Levomethadyl	4.96	3.17	0.0	1.2	1.37	1.62	3.0483	29.54	353.5	3	0
Loperamide	3.86	2.73	0.3	1.9	2.76	2.9	3.7697	43.78	477.0	4	1
Mebendazole	2.83	2.83	0.7	1.4	2.76	2.45	2.1257	84.08	295.3	6	2
Methylprednisolone	1.95	1.95	0.7	2	3.23	2.18	2.8955	94.83	374.5	5	3
Metronidazole	-0.30	-0.27	0.2	1.0	1.6	1.05	1.1919	86.88	171.2	6	1
Mibefradil	4.97	2.37	0.4	1.8	2.34	2.47	3.9094	67.45	495.6	6	1
Nitrofurantoin	-0.50	0.01	0.2	1.3	2.03	1.65	1.4533	123.7	238.2	9	1
Ondansetron	1.96	1.09	0.0	1.5	2.09	2.64	2.2675	39.82	293.4	4	0
Papaverine	2.95	3.65	0.0	1.5	2.76	2.19	2.5914	49.81	339.4	5	0
Pergolide	4.01	2.97	0.3	1.0	2.22	1.48	2.5424	44.33	314.5	2	1
Perphenazine	4.42	3.86	0.2	1.8	2.33	2.87	3.0191	55.25	404	4	1
Phenacetin	1.58	1.58	0.5	0.9	1.48	0.94	1.4542	38.33	179.2	3	1
Phenytoin	2.47	1.90	0.9	1.0	2.19	1.71	1.8693	58.20	252.3	4	2
Pindolol	1.75	0.00	0.3	1.5	1.65	1.70	2.0090	57.28	298.4	4	3
Piroxicam	3.06	0.20	0.6	1.8	1.91	2.84	2.2500	108.0	331.4	7	2
Prazosin	0.45	0.35	0.2	2.2	3.59	2.94	2.7411	107.0	383.4	9	2
Prenylamine	6.44	4.65	0.1	0.8	1.89	1.73	2.8772	12.03	329.5	1	1
Propafenone	3.41	1.26	0.3	1.7	2.04	1.83	2.8252	58.56	341.4	4	2
Propoxyphene	4.58	3.36	0.0	1.1	1.36	1.63	2.9074	29.54	339.5	3	0
Propranolol	3.09	0.89	0.2	1.4	1.43	1.88	2.148	41.49	259.3	3	2
Protryptiline	4.91	4.04	0.1	0.7	1.34	1.72	2.2587	12.03	263.4	1	1
Quinidine	2.64	1.06	0.2	1.8	1.71	2.4	2.5512	45.59	324.4	4	1
Rosiglitazone	2.42	1.35	0.3	1.9	2.55	2.64	2.614	96.83	357.4	6	1
Saquinavir	3.77	3.67	1.5	3.9	5.55	4.09	5.2961	166.8	670.8	11	6
Sertindole	3.57	2.95	0.2	1.6	3.01	2.82	3.2011	39.99	440.9	5	1
Sibutramine	5.28	3.13	0.0	0.7	1.09	0.92	2.3799	3.240	279.9	1	0
Sparfloxacin	-0.02	-3.38	1.0	2.1	2.41	2.64	2.7038	98.90	392.4	7	4
Sulfamethoxazole	0.89	-0.85	0.6	1.2	2.43	1.99	1.7244	106.6	253.3	6	3
Tamoxifen	6.52	5.20	0.0	1.1	1.85	2.06	3.1747	12.47	371.5	2	0
Terbutaline	0.08	-1.27	1.3	1.8	1.76	1.57	1.8377	72.72	225.3	4	4
Terfenadine	5.69	4.49	0.6	1.8	2.55	2.04	4.0132	43.70	471.7	3	2
Terodiline	5.41	3.62	0.1	0.8	1.30	1.20	2.5512	12.03	281.4	1	1
Thioridazine	5.90	4.17	0.0	1.1	2.70	1.93	2.9017	57.08	370.6	2	0
Trazodone	3.80	4.60	0.0	1.9	2.47	2.64	2.7304	42.39	371.9	6	0
Trimethoprim	0.91	0.71	0.3	1.7	2.8	1.89	2.1813	105.5	290.3	7	4
Verapamil	3.83	3.17	0.0	1.9	3.0	1.76	3.7861	63.95	454.6	6	0

Πίνακας Π. 2 Φορτίο φαρμάκων σε pH 7.4. F^+ το θετικό κλάσμα, F^- το αρνητικό κλάσμα, F_{zw}^+ , το θετικό κλάσμα του αμφολύτη, F_{zw}^- , το αρνητικό κλάσμα του αμφολύτη.

Φάρμακο	F^+	F^-	F_{zw}^+	F_{zw}^-	Φορτίο
Acetaminophen	0	0	0	0.001	Neutral
Acetazolamide	0	0.53	0	0.531	negative
Acyclovir	0	0.01	0	0.009	Neutral
Alphacetylmethadol	0.99	0	0.986	0	positive
Amiloride	0.98	0	0.978	0	positive
Amiodarone	0.96	0	0.957	0	positive
Amoxicillin	0	0.53	0.469	1	negative
Antipyrine	0	0	0	0	Neutral
Astemizole	0.98	0	0.982	0	positive
Azithromycin	1	0	0.996	0	positive
Benzylpenicillin	0	1	0	1	negative
Budesonide	0	0	0	0	Neutral
Budipine	0.99	0	0.986	0	positive
Capsaicin	0	0	0	0.002	Neutral
Celecoxib	0	0	0	0.004	Neutral
Cephalexin	0	0.53	0.469	1	negative
Chlorpheniramine	0.99	0	0.986	0	positive
Ciprofloxacin	0.05	0.03	0.965	0.947	Zwitterion
Cisapride	0.98	0	0.982	0	positive
Clobutinol	0.99	0	0.994	0	positive
Codeine	0.85	0	0.848	0	positive
Diazepam	0	0	0	0	Neutral
Diclofenac	0	1	0	0.999	negative
Diltiazem	0.88	0	0.875	0	positive
Diphenhydramine	0.97	0	0.965	0	positive
Dofetilide	0.88	0	0.957	0.083	positive
Domperidone	0.85	0	0.848	0	positive
Doxepin	0.98	0	0.982	0	positive
Droperidol	0.85	0	0.848	0	positive
Encainide	1	0	0.998	0	positive
Flunitrazepam	0	0	0	0	Neutral
Fluoxetine	1	0	0.997	0	positive
Grepafloxacin	0.05	0.03	0.965	0.947	Zwitterion
Haloperidol	0.93	0	0.933	0	positive
Ibuprofen	0	1	0	0.999	negative
Imipramine	0.99	0	0.991	0	positive
Indomethacin	0	1	0	0.998	negative
Ketoconazole	0.15	0	0.15	0	Neutral
Ketoprofen	0	1	0	0.999	negative

Levofloxacin	0.05	0.1	0.898	0.947	Zwitterion
Levomethadyl	0.99	0	0.986	0	positive
Loperamide	0.93	0	0.933	0	positive
Mebendazole	0	0	0.004	0.002	Neutral
Methylprednisolone	0	0	0	0	Neutral
Metronidazole	0	0	0	0	Neutral
Mibefradil	1	0	0.998	0	positive
Nitrofurantoin	0	0.47	0	0.473	Neutral
Ondansetron	0.88	0	0.875	0	positive
Papaverine	0.1	0	0.1	0	Neutral
Pergolide	0.92	0	0.918	0	positive
Perphenazine	0.74	0	0.737	0	positive
Phenacetin	0	0	0	0	Neutral
Phenytoin	0	0.1	0	0.102	Neutral
Pindolol	0.99	0	0.994	0	positive
Piroxicam	0	0.99	0	0.993	negative
Prazosin	0.22	0	0.218	0	Neutral
Prenylamine	0.99	0	0.986	0	positive
Propafenone	0.99	0	0.994	0	positive
Propoxyphene	0.95	0	0.946	0	positive
Propranolol	0.99	0	0.994	0	positive
Protryptiline	0.88	0	0.875	0	positive
Quinidine	0.95	0	0.946	0	positive
Rosiglitazone	0.03	0.65	0.26	0.877	Zwitterion
Saquinavir	0.22	0	0.218	0	Neutral
Sertindole	0.78	0	0.779	0	positive
Sibutramine	0.99	0	0.994	0	positive
Sparfloxacin	0.05	0.03	0.965	0.947	Zwitterion
Sulfamethoxazole	0	0.98	0	0.978	negative
Tamoxifen	0.96	0	0.957	0	positive
Terbutaline	0.98	0	0.98	0	positive
Terfenadine	0.97	0	0.965	0	positive
Terodiline	0.99	0	0.986	0	positive
Thioridazine	0.99	0	0.991	0	positive
Trazodone	0.22	0	0.218	0	Neutral
Trimethoprim	0.47	0	0.469	0	Neutral
Verapamil	0.98	0	0.982	0	positive

Πίνακας Π. 3. Τιμές δεικτών από διαφορετικά είδη μικκυλιακής και ακινητοποιημένων μεμβρανών χρωματογραφίας για τα προς μελέτη φάρμακα

Φάρμακο	logk(IAM)-DD2	logk(IAM)-Valko	CHI(IAM)	logk(SDS)	logk(Tween)	logk(Brij)
Acetaminophen	0.18	1.24	4.00	-0.030	0.301	0.46
Acetazolamide		-0.50	-0.50			
Acyclovir	-1.15	1.03	-7.00	-0.330	-0.461	-0.54
Amiloride	0.862	2.52	30.7			
Amiodarone		9.89				
Amoxicillin	-0.29	1.30	6.30	-1.554	-1.266	
Antipyrine	0.45	1.40	9.70			
Azithromycin	2.50					
Benzylpenicillin	-0.6					
Budesonide		3.32	38.7			
Celecoxib				1.461		
Cephalexin		1.11	-2.30			
Chlorpheniramine	2.03	4.58	47.2	1.560		
Ciprofloxacin	1.31			-0.960	-0.721	-0.23
codeine	1.29					
Diazepam	2.12	3.18	37.4			
Diclofenac		2.77	33.5	0.841	1.465	
Diltiazem	2.65	3.71		1.800	1.540	
Diphenhydramine	1.82	4.14	44.6			
Domperidone	3.213	3.75	41.9	1.937		
Doxepin	2.50	5.61	52.3			
Droperidol		3.4	39.3			
Encainide		3.74	41.9			
Flunitrazepam	1.79	2.56	31.2	1.815	1.483	
Fluoxetine	2.98	5.73	52.9	3.210	1.640	
Haloperidol	2.65	4.24	45.2	1.673		
Ibuprofen	0.87	1.97	22.8	0.85	1.188	1.01
Imipramine	2.73	6.04	54.1	2.01		
Indomethacin	2.41	2.68	32.5	0.84		1.00
Ketoconazole		3.89	42.9			
Ketoprofen	0.74	1.92	21.9	0.21		0.64
Levofloxacin	0.84			-1.32	-0.719	-0.02
Mebendazole	2.44	3.19	37.5	2.05	1.190	
Methylprednisolone	1.74	2.65	32.1	1.401	1.701	1.16
Metronidazole		2.79	-3.30			
Nitrofurantoin		1.30	6.20	-0.074	0.137	
Ondansetron		3.15	37.2			
Papaverine		2.86	34.4			
Perphenazine		6.60	56.3			
Phenacetin	1.03	1.46	18.9			

Phenytoin		2.59	31.6			
Pindolol	1.47	2.49	30.3	1.303	0.678	
Piroxicam	1.35	1.31	6.8			0.78
Prazosin		2.60	31.6			
Propafenone		3.75	42.3	2.040		1.30
Propranolol	2.33	4.23	45.1	2.273	1.729	
Protryptiline	2.79	5.45	51.6			
Quinidine	2.34	4.20	45.0	1.966		
Saquinavir		3.97	43.5			
Sulfamethoxazole	-0.04				0.19	0.40
Tamoxifen		7.29	58.7			
Terbutaline	0.78	1.67	16.8	1.092	-0.017	
Thioridazine	3.98			1.401	2.224	1.85
Trazodone	2.34	3.05	36.3	1.712	2.326	
Trimethoprim	1.05	1.86	20.8	1.365	1.075	0.71
Verapamil	2.76	3.74	42.0			

Πίνακας Π. 4. Τιμές δεικτών από διαφορετικούς τύπους χρωματογραφίας ακινητοποιημένων πρωτεϊνών για τα προς μελέτη φάρμακα

Φάρμακο	logk(HSAact)	logk(HAS-acet)	logk(HAS-2prop)	logkHSA	logk(AGPact)	logk(AGPact)	logk(AGP2-prop)
Acetaminophen	0.33	-0.0	0.06	0.45	0.10	-0.20	-0.24
Acetazolamide				1.47			
Acyclovir	-0.64			0.29			
Amiloride				0.54			
Amiodarone				4.39			
Amoxicillin				0.49			
Antipyrine		-1.0	-0.73	0.43	0.88	0.56	0.30
Azithromycin							
Benzylpenicillin							
Budesonide				1.73			
Celecoxib							
Cephalexin				0.45			
Chlorpheniramine		0.8	0.74	1.2	1.80	1.59	1.35
Ciprofloxacin	0.33						

codeine							
Diazepam		2.0	1.83	2.94	1.80	1.73	1.28
Diclofenac		2.0		5.42			
Diltiazem		0.9	0.49		2.07	2.20	1.26
Diphenhydramine		0.6	0.47	1.09	1.87	1.90	1.16
Domperidone				2.64			
Doxepin		1.2	1.10	1.95	2.30	1.95	1.89
Droperidol				2.29			
Encainide				0.97			
Flunitrazepam		1.0	0.96	1.77	1.44	0.67	0.74
Fluoxetine		1.5	1.24	4.01	2.10	2.05	1.77
Haloperidol		1.3		1.84			
Ibuprofen	0.73	0.6		6.28			
Imipramine		1.3	1.08	1.95	2.25	2.07	1.77
Indomethacin		2.4	2.02	6.17	1.59	1.49	1.04
Ketoconazole				2.90			
Ketoprofen		1.9	1.95	4.80	0.98	1.37	1.37
Levofloxacin	0.30						
Mebendazole		1.6	1.58	2.46	1.92	1.67	1.51
Methylprednisolone	0.54	0.5		1.35			
Metronidazole				0.76			
Nitrofurantoin	-0.21			0.85			
Ondansetron				1.69			
Papaverine				2.35			
Perphenazine		2.1	2.05	3.27	3.19	2.97	2.74
Phenacetin		0.6	0.22	0.76	0.07	0.26	0.08
Phenytoin		1.0	0.98	1.60	1.60	1.47	1.06
Pindolol				0.54			
Piroxicam		1.8	1.62	4.36	1.70	1.54	1.20
Prazosin				1.81			
Propafenone		1.0	0.95	2.62	1.82	1.25	1.11
Propranolol		0.9	0.77	1.33	2.20	2.01	1.66
Protryptiline		1.4		1.99			
Quinidine		0.7	0.71	1.66	1.71	1.48	1.27
Saquinavir				3.38			
Sulfamethoxazole	-0.12	0.4					
Tamoxifen				4.84			
Terbutaline		-0	-0.32	0.67	0.28	0.12	0.11
Thioridazine		2.3					
Trazodone		1.7	1.68	2.46	2.36	2.40	1.65
Trimethoprim	0.46	0.5	0.23	0.80	1.10	0.64	0.33
Verapamil				1.70			

Πίνακας Π. 5. Τιμές pIC_{50} για το κάθε φάρμακο

Φάρμακο	pIC_{50}
Alphacetylmethadol	-1.079181246
Amiodarone	-1.068141991
Amoxicillin	-4.698970004
Astemizole	1.10720997
Budesonide	-2.176091259
Budipine	-1.008600172
Chlorpheniramine	-1.229169703
Ciprofloxacin	-2.738780558
Cisapride	1.389815968
Clobutinol	-0.462397998
codeine	-2.477121255
Diazepam	-1.290034611
Diltiazem	-1.012556037
Diphenhydramine	-1.319552176
Dofetilide	0.353705215
Domperidone	0.900779905
Doxepin	-0.812913357
Droperidol	1.492144128
Encainide	-0.77815125
Fluoxetine	0.095431982
Grepafloxacin	-1.588271707
Haloperidol	0.558933593
Imipramine	-0.310480891
Indomethacin	-2.477121255
Ketoconazole	-1.403977964
Levofloxacin	-2.827692289
Mibefradil	-0.155336037
Ondansetron	0.091514981
Papaverine	-1.494154594
Pergolide	0.920818754
Perphenazine	-0.001300933
Phenytoin	-2.380211242
Prazosin	-0.76604086
Prenylamine	0.229147988
Propafenone	-0.628133388
Propoxyphene	-1.650307523
Propranolol	-1.500144958
Protryptiline	-0.071882007
Quinidine	-0.649154677
Saquinavir	-1.184691431

Sertindole	1.15490196
Sibutramine	-0.638239591
Sparfloxacin	-1.434169553
Sulfamethoxazole	-3.342422681
Tamoxifen	-1.656098202
Terfenadine	0.934596051
Thioridazine	0.529104617
Trazodone	-0.747929441
Trimethoprim	-3.572871602
Verapamil	0.087087449