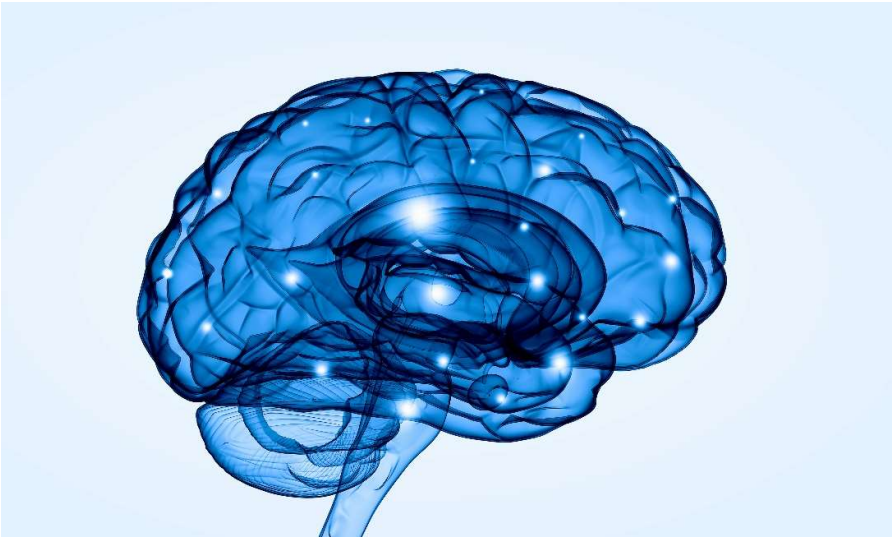
ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ Ι : ΧΗΜΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

Ανάπτυξη μοντέλου πρόβλεψης διαπερατότητας αιματοεγκεφαλικού φραγμού με χρήση χημειομετρικών μεθόδων

Διπλωματική εργασία

Αλεξάνδρα - Μαρία Βλόντζου



Επιβλέπων Καθηγητής: Τσόπελας Φώτιος

Αθήνα, Σεπτέμβριος 2022

Πρόλογος

Η διπλωματική εργασία με τίτλο «*Ανάπτυξη μοντέλου πρόβλεψης διαπερατότητας αιματοεγκεφαλικού φραγμού με χρήση χημειομετρικών μεθόδων* » εκπονήθηκε στη Σχολή Χημικών Μηχανικών Ε.Μ.Π κατά τη διάρκεια του έτους 2022, υπό την επίβλεψη του καθηγητή Τσόπελα Φώτιου.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Τσόπελα Φ., αρχικά για την ανάθεση ενός τόσο ενδιαφέροντος θέματος, αλλά και για την συνεχή καθοδήγηση και βοήθεια που μου προσέφερε καθ'όλη την διάρκεια εκπόνησης της παρούσας διπλωματικής.

Περίληψη

Το αντικείμενο της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η συσχέτιση των φυσικοχημικών ιδιοτήτων των φαρμάκων με την ικανότητα διέλευσης από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και η κατασκευή ενός μοντέλου πρόβλεψης, κάνοντας χρήση στατιστικών και χημειομετρικών μεθόδων ανάλυσης.

Αρχικά, μετά από αναζήτηση σε βάσεις δεδομένων, συλλέχθηκαν 126 φαρμακευτικές ενώσεις, από τις οποίες οι 54 έχουν ικανότητα διέλευσης από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και οι 72 δεν διέρχονται από τον φραγμό. Στην συνέχεια, δημιουργήθηκε μια βάση δεδομένων με τις φυσικοχημικές ιδιότητες αυτών των ενώσεων που χρησιμοποιήθηκαν στο μοντέλο, όπως η λιποφιλία εκφρασμένη τόσο με τον συντελεστή μερισμού (logP) όσο και του συντελεστή κατανομής (logD) σε σύστημα οκτανόλης- νερού, τοπολογικής πολικής επιφάνειας, θετικό και αρνητικό φορτίο σε φυσιολογικό pH, ο αριθμός δοτών και δεκτών δεσμών υδρογόνου, οι περιστρεφόμενοι δεσμοί και οι σταθερές του Abraham. Η βάση αυτή χρησιμοποιήθηκε για την εφαρμογή χημειομετρικών και στατιστικών μεθόδων. Αρχικά, καταστρώθηκαν τα διαγράμματα κατανομής, τα οποία έδειξαν ότι υπήρχε σημαντική συσχέτιση μεταξύ διαπερατότητας του φραγμού και του μοριακού βάρους, της λιποφιλίας, της TPSA, του αριθμού δεκτών δεσμού υδρογόνου και των σταθερών A,B και S του Abraham. Επίσης, παρατηρήθηκαν τιμές αποκοπής σε πολλά από τα διαγράμματα κατανομής, καταδεικνύοντας τις διαφορές των ενώσεων. Η ανάλυση σε κύριες συνιστώσες, κατηγοριοποίησε με επιτυχία τα δεδομένα και εμφάνισε ικανοποιητική ακρίβεια με $R_x^2 = 0.787$ και $Q_{cum}^2 = 0.449$. Η μέθοδος της μοντελοποίησης μίας κλάσης έδωσε πολύ ικανοποιητικά αποτελέσματα ευαισθησίας και ειδικότητας για την πρόβλεψη της διαπερατότητας με 92.6 % και 72.2% αντίστοιχα. Τέλος, η διακριτή ανάλυση μερικών ελαχίστων τετραγώνων κατέστησε εμφανές ότι το εμβαδό της τοπολογικής πολικής επιφάνειας συνεισφέρει περισσότερο από τις άλλες μεταβλητές στο μοντέλο, μαζί με τις σταθερές B,S,A του Abraham, τον αριθμό δοτών δεσμών υδρογόνου, το logP και το μοριακό βάρος, μοντελοποιώντας τα δεδομένα με ευαισθησία 92.6% και ειδικότητα 84.7%

Λέξεις-κλειδιά: Διαπερατότητα αιματοεγκεφαλικού φραγμού, στεγανοί σύνδεσμοι, ενεργητική και παθητική μεταφορά, λιποφιλία, χημειομετρία, μοντελοποίηση μίας κλάσης.

Abstract

The aim of this thesis is to correlate the physicochemical properties of drugs with their ability to penetrate the blood-brain barrier and to construct a predictive model using statistical and chemometric analysis methods.

Initially, after a database search, 126 pharmaceutical compounds were collected, of which 54 have the ability to cross the blood-brain barrier and 72 do not cross the barrier. A database was then created with the physicochemical properties of these compounds used in the model, such as lipophilicity expressed in terms of both partition coefficient (logP) and distribution coefficient (logD) in octanol-water system, topological polar surface area, positive and negative charge at physiological pH, number of hydrogen bond donors and acceptors, residual bonds and Abraham's constants. This basis was used to apply chemometric and statistical methods. First, the distributions of the variables were plotted, which showed that there was a significant correlation between barrier permeability and molecular weight, lipophilicity, TPSA, hydrogen bond acceptor number and Abraham's A, B and S constants. Also, cut-off values were observed in many of the distribution plots, demonstrating the differences in the compounds. Principal component analysis successfully categorized the data and showed satisfactory accuracy with $R_x^2 = 0.787$ και $Q_{cum}^2 = 0.449$. The class modelling method gave very satisfactory sensitivity and specificity results for permeability prediction with 92.6% and 72.2% respectively. Finally, discrete partial least squares analysis made it evident that the area of the topological polar surface contributes more than the other variables to the model, along with Abraham's B,S,A constants, hydrogen bond donor number, logP and molecular weight, modelling the data with a sensitivity of 92.6% and specificity of 84.7%.

Keywords: Blood-brain barrier permeability, tight junctions, active and passive transport, lipophilicity, chemometrics, class modelling.

Πίνακας Περιεχομένων

Πρόλογος 2

Περίληψη 3

Abstract 4

1. Θεωρητικό Υπόβαθρο 8

1.1 Ορισμός 8

1.2 Στόχοι φαρμάκων 8

1.3 Ανακάλυψη νέων φαρμάκων 10

1.4 Πορεία έγκρισης κυκλοφορίας φαρμάκων 11

1.4.1 Προκλινικές δοκιμές 12

1.4.2 Κλινικές δοκιμές 12

2. Αιματοεγκεφαλικός φραγμός (ΑΕΦ) 13

2.1 Φύση και λειτουργία 14

2.2 Κυτταρικές Δομές 16

2.2.1 Κύτταρα νευροβλαστικής μονάδας 17

2.2.2 Στενοσύνδεσμοι 18

2.3 Μεταφορά μέσω του ΑΕΦ 19

2.3.1 Παθητική Διάχυση 19

2.3.2 Ενεργητική Μεταφορά 20

2.3.3 Συζευγμένη μεταφορά 21

2.3.4 Μεταφορά βοηθούμενη από υποδοχέα 22

2.4 Διατάραξη ομοιόστασης ΑΕΦ σε παθολογικές καταστάσεις 22

3. Φαρμακοκινητική και φυσικοχημικές ιδιότητες φαρμάκων- 23

3.1 Φαρμακοκινητική 23

3.1.1 Δράση φαρμάκου 23

3.1.2 Απορρόφηση φαρμάκου 23

3.1.3 Κατανομή φαρμάκου 24
3.2 Φυσικοχημικές ιδιότητες φαρμάκων 25
3.2.1 Λιποφιλία 25
3.2.2 Μοριακό βάρος 28
3.2.3 Ικανότητα σχηματισμού δεσμών υδρογόνου 28
3.2.4 Συνολικό εμβαδό πολικής τοπολογικής επιφάνειας, (Topological Polar Surface Area, TPSA). 29
3.2.5 Ιοντικό φορτίο 29
3.2.6 Σταθερές Abraham 29
4. Πολυμεταβλητή ανάλυση δεδομένων 30
4.1 Χημειομετρία 31
4.2 Ανάλυση κύριων συνιστωσών (Principal Component Analysis,PCA) 32
4.3 Μοντελοποίηση μίας κλάσης (Class Modelling) 35
4.4 Διακριτή ανάλυση μερικών ελαχίστων τετραγώνων, Partial Least Squares – Discriminant Analysis 38
5. Ερευνητικό μέρος 41
5.1 Συλλογή δεδομένων διαπερατότητας αιματοεγκεφαλικού φραγμού 41
5.2 Επεξεργασία δεδομένων 42
5.2.1 Περιγραφικά στατιστικά μεταβλητών 42
5.2.2 Κατανομές μεταβλητών 44
5.2.3 Ανάλυση Κυρίων Συνιστώσων (PCA) 50
5.2.4 Μοντελοποίηση μίας κλάσης (Class Modelling) 51
5.2.5 Διακριτή Ανάλυση μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-DA). 58
6. Συζήτηση αποτελεσμάτων 64
6.1 Διαγράμματα κατανομής 64
6.2 Ανάλυση κύριων συνιστωσών 65
6.3 Μοντελοποίηση μίας κλάσης 66

6.4 Διακριτή Ανάλυση μερικών ελαχίστων τετραγώνων 67

7. Συμπεράσματα 68

8. Προτάσεις για βελτίωση 69

9. Βιβλιογραφία..... 70

Παράρτημα Πινάκων..... 79

1. Θεωρητικό Υπόβαθρο

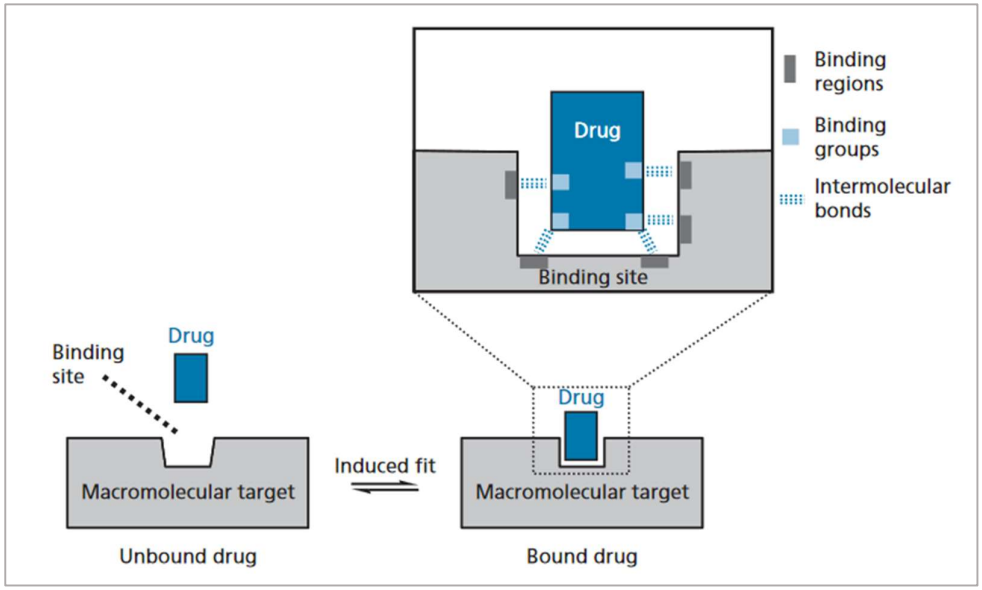
1.1 Ορισμός

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, φάρμακο θεωρείται κάθε ουσία ή μίγμα ουσιών που εμφανίζει βιολογική δράση στο ανθρώπινο σώμα ή σε κάποιον άλλον ζωντανό οργανισμό, με σκοπό την θεραπεία, την πρόληψη και την ανακούφιση των συμπτωμάτων ασθενειών, την ιατρική διάγνωση και την διόρθωση ή και τροποποίηση φυσιολογικών λειτουργιών.

1.2 Στόχοι φαρμάκων

Ο λόγος για τον οποίο απλές χημικές ενώσεις έχουν τόσο σημαντικές επιδράσεις στους πολύπλοκους μηχανισμούς του ανθρώπινου οργανισμού, έγκειται στον τρόπο με τον οποίο αυτός λειτουργεί. Το ανθρώπινο σώμα διατηρείται υγιές και λειτουργικό, μέσα από μία σειρά πολύπλοκων χημικών αντιδράσεων που πραγματοποιούνται σε μοριακό επίπεδο, στις οποίες δύνανται να συμμετέχουν και οι φαρμακευτικές ενώσεις που εισχωρούν στον οργανισμό και προκαλούν τροποποιήσεις σε αυτές τις αντιδράσεις. Ωστόσο, οι τροποποιήσεις αυτές, δεν είναι τυχαίες, αλλά εξαρτώνται από το που δρουν τα φάρμακα στο σώμα, δηλαδή ποιοι είναι οι στόχοι τους [1].

Ο τρόπος λειτουργίας των φαρμάκων γίνεται αντιληπτός μόνο σε μοριακό επίπεδο. Τα φάρμακα στοχεύουν κυρίως τις πρωτεΐνες (ένζυμα, υποδοχείς και πρωτεΐνες μεταφοράς) και τα νουκλεϊκά οξέα (DNA και RNA). Η αλληλεπίδραση ενός φαρμάκου με τα παραπάνω μακρομόρια επιτυγχάνεται μέσω της πρόσδεσης του φαρμάκου σε ορισμένες επιφάνειες των πρωτεϊνών και των νουκλεϊκών οξέων, οι οποίες ονομάζονται θέσεις πρόσδεσης (binding sites). Οι θέσεις αυτές έχουν σχήμα κοιλότητας στις οποίες τα φάρμακα προσδένονται μέσω δεσμών (Εικόνα 1). Ορισμένα φάρμακα δεσμεύονται μόνιμα πάνω σε αυτές τις θέσεις μέσω ομοιοπολικών δεσμών, ενώ τα περισσότερα φάρμακα εμφανίζουν ασθενέστερες αλληλεπιδράσεις, τους διαμοριακούς δεσμούς. Σε αυτούς τους δεσμούς περιλαμβάνονται μεταξύ άλλων, οι αλληλεπιδράσεις διπόλου-διπόλου, οι ηλεκτροστατικοί δεσμοί, οι δεσμοί υδρογόνου, οι αλληλεπιδράσεις Van der Waals και οι υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις [1].



Εικόνα 1 : Πρόσδεση φαρμάκου (drug) στην θέση πρόσδεσης (binding site) του μακρομορίου – στόχου μέσω διαμοριακών δεσμών [1].

Οι παραπάνω διαμοριακές δυνάμεις δεν είναι τόσο ισχυρές, ώστε να διατηρήσουν το φάρμακο μόνιμα προσδεδεμένο, αλλά πρέπει να έχουν τέτοια ισχύ που να είναι δυνατή η πρόσδεση του φαρμάκου για το κατάλληλο χρονικό διάστημα που χρειάζεται να εμφανίσει την βιολογική του δράση. Όσο πιο πολλούς διαμοριακούς δεσμούς εμφανίζει το φάρμακο, τόσο περισσότερο θα μείνει προσκολλημένο στον στόχο του. Ένα φάρμακο είναι δυνατόν να προσδεθεί σε παραπάνω από ένα μοριακό στόχο με αποτέλεσμα, την εμφάνιση δευτερευόντων δράσεων, συχνά ανεπιθύμητων. Έτσι, η εκλεκτικότητα ως προς τον στόχο είναι μία πολύ σημαντική παράμετρος κατά τον σχεδιασμό και την ανάπτυξη νέων φαρμάκων. Παρολα αυτά, η πρόσδεση σε πολλούς στόχους δεν είναι πάντα ανεπιθύμητη, καθώς είναι πιθανό να υπάρξει συνέργεια των δράσεων του φαρμάκου. Αυτή η θεώρηση της δράσης ενός φαρμάκου είναι γνωστή ως πολυφαρμακολογία ή σχεδιασμός σε πολλαπλούς στόχους [2].

Η μελέτη του τρόπου αλληλεπίδρασης των φαρμάκων με τα μόρια – στόχους και της επακόλουθης εμφάνισης φαρμακευτικής δράσης, ονομάζεται φαρμακοδυναμική. Όταν το φάρμακο προσδεθεί στο μακρομόριο εμφανίζει την αναμενόμενη δράση του. Η δράση ενός φαρμακομορίου μπορεί να κατηγοριοποιηθεί σε τέσσερα είδη δράσεων [3]:

1. Ενεργοποίηση : το φάρμακο επιταχύνει ή προκαλεί μία διεργασία. Για παράδειγμα η καφεΐνη ενεργοποιεί το κεντρικό νευρικό σύστημα .
2. Αναστολή : το φάρμακο αναστέλλει μία διεργασία ή την επιβραδύνει.

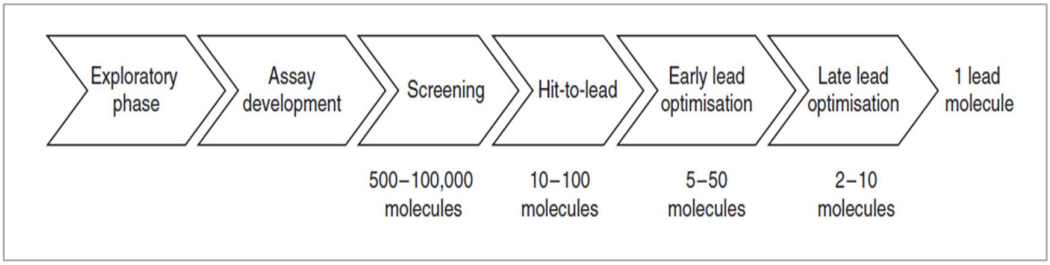
3. Συμπλοκοποίηση : με την δημιουργία συμπλόκου, ο υποδοχέας απενεργοποιείται και δεν επιτελεί την καθοριζόμενη λειτουργία του.
4. Αδρανοποίηση : Μέσω χημικής αντίδρασης το φάρμακο διακόπτει την λειτουργία του υποδοχέα .

1.3 Ανακάλυψη νέων φαρμάκων

Αρχικά, για την ανακάλυψη ενός νέου φαρμάκου, επιλέγεται η νόσος η οποία είναι θεμιτό να αντιμετωπιστεί. Στην συνέχεια, προσδιορίζεται ένας κατάλληλος φαρμακευτικός στόχος, για παράδειγμα ένας υποδοχέας, ένα ένζυμο ή νουκλεϊκό οξύ [1]. Ο στόχος της ανακάλυψης ενός φαρμάκου είναι να ταυτοποιήσει φαρμακολογικά ενεργά μόρια, για τα οποία υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι θα φτάσουν στο μόριο-στόχο σε επαρκείς ποσότητες για την άσκηση θεραπευτικής ή φαρμακολογικής επίδρασης. Υποψήφια φάρμακα εξερευνούνται σε ενώσεις ζωικής, φυτικής ή μικροβιολογικής προέλευσης. Το στάδιο της ανακάλυψης νέων φαρμάκων είναι μία ευέλικτη, σχετικά, διαδικασία, σε αντίθεση με τον σχεδιασμό του υποψήφιου φαρμάκου, λόγω αυστηρών κανονιστικών πλαισίων και δύναται να διαφέρει σημαντικά σε ερευνητικούς οργανισμούς.

Η κύρια μέθοδος που ακολουθείται για την ανακάλυψη φαρμάκων είναι με βάση το μόριο – στόχο (target – based). Ο στόχος μπορεί να είναι ένα γονίδιο, μία πρωτεΐνη ή ένας μοριακός μηχανισμός που έχει συνδεθεί με την σχετιζόμενη ασθένεια. Ένα μόριο μπορεί να αρχίσει να αναπτύσσεται ως φάρμακο, από την στιγμή που μπορεί να προσδεθεί σε έναν καλά καθορισμένο στόχο, ο οποίος είναι γνωστό ότι συμμετέχει σε μονοπάτια που οδηγούν σε παθογένεια. Παρόλα αυτά, η ενεργότητα του φαρμάκου και ο ρόλος του στην αντιμετώπιση της ασθένειας, μπορεί να γίνουν αντιληπτοί μόνο στην φάση των δοκιμών σε ζώα και αργότερα στις κλινικές δοκιμές. Μη προβλεπόμενες παρενέργειες και παράλληλες δράσεις μπορεί να εμφανιστούν σε επόμενα στάδια της ανακάλυψης και του σχεδιασμού φαρμάκων [4].

Παρακάτω περιγράφονται συνοπτικά τα στάδια ανακάλυψης νέων φαρμάκων με βάση της προσέγγισης του μορίου-στόχου και απεικονίζονται σχχηματικά στην Εικόνα 2.



Εικόνα 2 : Στάδια ανακάλυψης νέων φαρμακομορίων [4].

- Προκαταρκτικός έλεγχος (Exploratory phase) : Έρευνώνται στην βιβλιογραφία οι μηχανισμοί της ασθένειας που μελετάται και επαληθεύεται ότι ο στόχος που έχει επιλεχθεί είναι ο σωστός.
- Βιολογική δοκιμή (Assay development) : Πραγματοποιείται μέτρηση της αλλαγής της βιολογικής ενεργότητας (ενεργότητα ενζύμου, πρόσδεση στον υποδοχέα) που επιφέρουν χιλιάδες φαρμακομόρια.
- Εντοπισμός φαρμακοφόρας δομής (Screening): Εντοπίζονται κοινά δομικά χαρακτηριστικά των μορίων που είναι υπεύθυνα για την εμφάνιση αλληλεπίδρασης με τον στόχο, τα οποία χαρακτηρίζονται ως φαρμακοφόρες δομές. Είναι πολύ χρήσιμες, διότι προσφέρονται για περαιτέρω τροποποιήσεις με σκοπό την αύξηση της ισχύς της αλληλεπίδρασης με τον στόχο.
- Ένωση-οδηγός (Hit-to-lead) : Με βάση τις φαρμακοφόρες δομές, νέα, καλύτερα μόρια συντίθονται. Επίσης, πραγματοποιούνται *in vitro* έλεγχοι για εκτίμηση τοξικότητας των νέων ενώσεων.
- Βελτιστοποίηση ένωσης-οδηγού (Lead optimisataion): Τελευταίο στάδιο της διαδικασίας ανακάλυψης. Επιλογή μικρού αριθμού των καλύτερων μορίων που συντέθηκαν στην προηγούμενη φάση.

1.4 Πορεία έγκρισης κυκλοφορίας φαρμάκων

Συγκριτικά με τα στάδια ανακάλυψης νέων ενώσεων οδηγών και σχεδιασμού φαρμάκων, η τελική φάση προς την κυκλοφορία και την διάθεση του τελικού σκευάσματος στην αγορά, είναι σαφέστατα πιο δαπανηρή τόσο χρονικά όσο και οικονομικά. Αυτός είναι και ο λόγος που πολλά υποψήφια φάρμακα εγκαταλείπονται σε αυτή την φάση. Κατά μέσο όρο εκτιμάται ότι για κάθε 10000 υποψήφια μόρια που συντίθεται σε αρχικό στάδιο, 500 εξ αυτών θα δοκιμαστούν σε πειραματόζωα, 10 θα μπουν στην φάση I των κλινικών δοκιμών και τελικά μόνο 1, πιθανότατα, θα κυκλοφορήσει στην αγορά.

Η διαδικασία για την έγκριση των φαρμάκων περιλαμβάνει τρία βασικά στάδια. Πρώτον, το φάρμακο εξετάζεται ως προς την ασφάλειά του, αλλά και την αποτελεσματικότητά του. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω προκλινικών και κλινικών δοκιμών, με τις οποίες ελέγχονται η τοξικότητα, ο μεταβολισμός του φαρμάκου, η σταθερότητα καθώς και η φαρμακοτεχνική του μορφή. Δεύτερον, το φάρμακο θα πρέπει να κατοχυρωθεί νομικά, μέσω της εξασφάλισης των πνευματικών δικαιωμάτων. Τέλος, απαιτείται η σύνθεση του φαρμάκου σε μεγαλύτερες ποσότητες για περαιτέρω δοκιμές και για την τελική παραγωγή του σε μεγάλη κλίμακα [1].

1.4.1 Προκλινικές δοκιμές

Οι προκλινικές μελέτες περιλαμβάνουν τις μελέτες τοξικότητας του φαρμάκου, τις μελέτες μεταβολισμού κα μελέτες που αφορούν την σταθερότητά του και την φαρμακοτεχνική του μορφή [1].

Οι μελέτες τοξικότητας περιλαμβάνουν *in vitro* δοκιμασίες σε γενετικά τροποποιημένες κυτταρικές καλλιέργειες και *in vivo* δοκιμασίες σε διαγονιδιακά ποντίκια, ώστε να εξεταστούν τυχόν επιπτώσεις στην αναπαραγωγική ικανότητα των κυττάρων καθώς επίσης και την πιθανότητα καρκινογένεσης, η ύπαρξη της οποίας σταματά αυτομάτως την ανάπτυξη του υποψήφιου φαρμάκου.

Οι μελέτες μεταβολισμού αφορούν την μελέτη των δευτερευόντων ουσιών που παράγονται από την διάσπαση του φαρμάκου στο σώμα. Οι ενώσεις αυτές ονομάζονται μεταβολίτες και κρίνεται απαραίτητη η περαιτέρω έρευνά τους, κυρίως για να αποκλειστούν τυχόν τοξικές δράσεις στον οργανισμό. Ιδανικά, θα πρέπει να είναι αδρανείς και η απέκκριση τους να είναι γρήγορη.

Οι δοκιμές που αφορούν στην φαρμακολογία του φαρμάκου, έχουν κυρίως ως στόχο να εντοπίσουν τυχόν άλλες δράσεις του φαρμάκου σε άλλους μηχανισμούς του οργανισμού. Επίσης, από τις μελέτες αυτές προκύπτει η διάρκεια της δράσης του μορίου, μελετώντας τον χρόνο που χρειάζεται να αποδεσμευθεί από τον υποδοχέα, καθώς επίσης και η δόση που χρειάζεται να χορηγηθεί στον ασθενή .

1.4.2 Κλινικές δοκιμές

Οι κλινικές δοκιμές έπονται των προκλινικών και αφορούν ουσιαστικά την δοκιμή του φαρμάκου σε ασθενείς και εθελοντές για να προσδιοριστεί η θεραπευτική δόση, η

αποτελεσματικότητα και η ασφάλειά του. Οι κλινικές μελέτες είναι εξαιρετικά δαπανηρές, διαρκούν περίπου 5-7 χρόνια με τέσσερις διακριτές φάσεις [1], [5] .

Μελέτες φάσης I

Διαρκούν περίπου 1 χρόνο και εκτελούνται σε 100-200 υγιείς εθελοντές. Κυρίως αποσκοπούν στην εκτίμηση της ασφάλειας, την συλλογή δεδομένων για το εύρος δοσολογίας και των ανεπιθύμητες ενεργειών.

Μελέτες φάσης II

Διαρκούν περίπου 2 χρόνια και εκτελούνται σε μεγαλύτερη ομάδα ασθενών, για να διαπιστωθεί η θεραπευτική ιδιότητα και να διερευνηθεί περαιτέρω η ασφάλεια.

Μελέτες φάσης III

Το υπό μελέτη φάρμακο χορηγείται σε μεγαλύτερη ομάδα ασθενών (1000-3000). Σε αυτό το στάδιο, το φάρμακο συγκρίνεται με ήδη υπάρχουσες θεραπείες, καθώς επίσης και με το εικονικό φάρμακο που λαμβάνει μερίδα των ασθενών.

Μελέτες φάσης IV

Αφορούν σκευάσματα που έχουν ήδη κυκλοφορήσει και περιλαμβάνουν την καταγραφή πρόσθετων πληροφοριών σε σχέση με την καθημερινή χρήση του φαρμάκου.

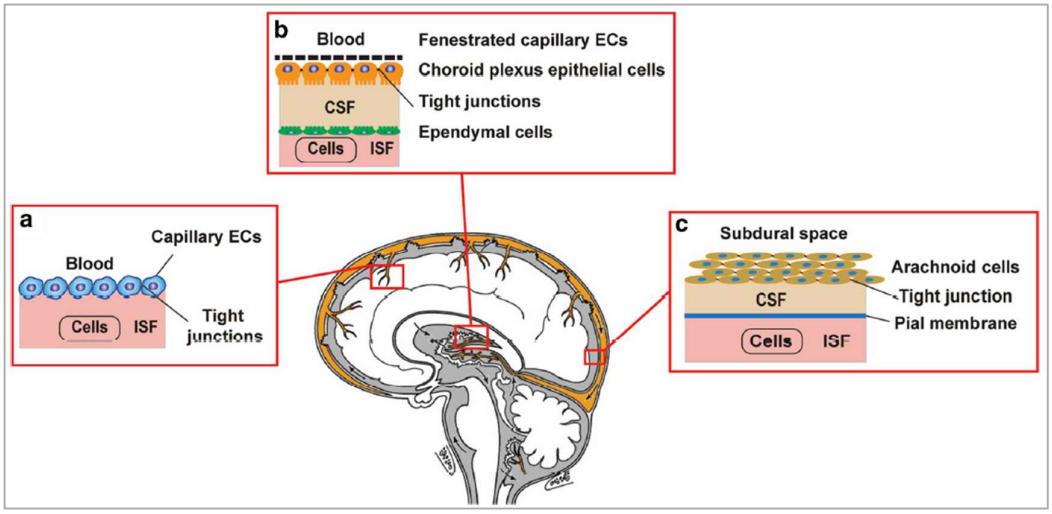
2. Αιματοεγκεφαλικός φραγμός (ΑΕΦ)

Η προσβασιμότητα του ανθρώπινου εγκεφάλου είναι μία παράμετρος που καθορίζει σε μεγάλο βαθμό την διαδικασία ανάπτυξης φαρμάκων για όλες τις ασθένειες. Για την νευροεπιστήμη, η μη επαρκής πρόσβαση στον εγκέφαλο είναι η αιτία μη αντιμετώπισης πολλών ασθενειών, που αφορούν το Κεντρικό Νευρικό Σύστημα. Αντίστροφα, η πιθανότητα έκθεσης του εγκεφάλου σε φάρμακα που δεν προορίζονται να δράσουν στο ΚΝΣ, οδηγεί στην αποτυχία περαιτέρω μελέτης και ανάπτυξής τους. Έτσι, τα τελευταία χρόνια πολλοί ερευνητές και επιστήμονες έχουν επικεντρώσει τις έρευνές τους στην μελέτη της πολύπλοκης λειτουργίας του εγκεφάλου και των μηχανισμών του, ώστε να καταστεί δυνατός ο σχεδιασμός φαρμάκων με δράση στο ΚΝΣ και κατά συνέπεια να αντιμετωπιστούν πολλές σοβαρές ασθένειες του νευρικού συστήματος [6].

2.1 Φύση και λειτουργία

Για την ομαλή λειτουργία του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος, χρειάζεται ένα υψηλά ελεγχόμενο μικροπεριβάλλον. Η ύπαρξη ενός βιολογικού φραγμού στην διεπιφάνεια του εγκεφάλου με το αίμα, διαχωρίζοντας έτσι, τον εγκέφαλο από το υπόλοιπο σώμα, διαπιστώθηκε από τον γερμανό επιστήμονα Paul Ehrlich, ο οποίος παρατήρησε ότι ο ιστός του εγκεφάλου έμεινε ανέπαφος, έπειτα από την έγχυση χρωστικής ουσίας στο κυκλοφορικό σύστημα ποντικιών [7]. Αυτά τα βιολογικά φράγματα δημιουργούνται από διαφορετικά κύτταρα σε τρεις πολύ σημαντικές διεπιφάνειες [8], όπως απεικονίζονται στην Εικόνα 3:

1. Αίματος – εγκεφάλου (Blood Brain Barrier),
2. Αίματος – εγκεφαλονωτιαίου υγρού (Blood Cerebrospinal Fluid Barrier)
3. Αραχνοειδής φραγμός



Εικόνα 3 : Τα βιολογικά φράγματα του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος [9].

Ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός (ΑΕΦ) δημιουργείται από ενδοθηλιακά κύτταρα που επικάθονται στην εσωτερική επιφάνεια των αιμοφόρων αγγείων και των λεμφικών αγγείων και είναι η μεγαλύτερη σε εμβαδόν διεπιφάνεια για την ανταλλαγή ουσιών μεταξύ του αίματος και του εγκεφάλου [10],[11]. Ο φραγμός αυτός διαδραματίζει πολύ μεγάλο ρόλο στην προστασία του παρεγχύματος του εγκεφάλου από ενώσεις που μεταφέρονται από το αίμα, εν δυνάμει επικίνδυνες, για το κεντρικό νευρικό σύστημα. Αυτό έχει ως συνέπεια να δυσχεραίνεται η μεταφορά φαρμάκων και άλλων εξωγενών ουσιών στο ΚΝΣ. Παρακάτω παρουσιάζονται αναλυτικά οι λειτουργίες του αιματοεγκεφαλικού φραγμού :

Ρύθμιση ιόντων (ion regulation)

Ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός παρέχει ένα ελεγχόμενο μικροπεριβάλλον μέσω ενός συνδυασμού ειδικών διαύλων ιόντων και μεταφορέων, οι οποίοι διατηρούν τη βέλτιστη ιοντική σύνθεση για τη καλή νευρική και συναπτική σηματοδοτική λειτουργία. Για παράδειγμα, τα επίπεδα των καλίου στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό διατηρούνται στο εύρος ~ 2,5-2,9 mM. Συγκριτικά, η συγκέντρωση στο πλάσμα είναι περίπου 4,5 mM, παρά τις διακυμάνσεις που μπορεί να σημειωθούν στο κάλιο, από την διατροφή ή κάποια παθολογική κατάσταση. Άλλα ιόντα όπως το ασβέστιο και το μαγνήσιο ρυθμίζονται επίσης ενεργά στον ΑΕΦ [12][13]. Τα σωστά επίπεδα του ασβεστίου και του καλίου είναι ουσιώδη για τον έλεγχο της διέγερσης των νευρώνων, αλλά είναι επίσης απαραίτητα για τη διακίνηση των μακροφάγων διαμέσου του φραγμού [14]. Επιπλέον, τα ιόντα ασβεστίου Ca2+ εμπλέκονται στη διαμόρφωση της ακεραιότητάς του και της μορφολογίας του ενδοθηλίου [15]. Για τα απαραίτητα υδατοδιαλυτά θρεπτικά συστατικά και τους μεταβολίτες που απαιτούνται από τον νευρικό ιστό, ο φραγμός επιτρέπει τη χαμηλή παθητική διαπερατότητα. Αντίθετα, για άλλα θρεπτικά συστατικά που δεν μπορούν να να περάσουν, υπάρχουν ειδικά συστήματα μεταφοράς που εκφράζονται στον ίδιο τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, έτσι ώστε να εξασφαλίζεται η επαρκής παροχή αυτών των ουσιών [16], [17].

Ρύθμιση νευροδιαβιβαστών

Το κεντρικό και περιφεριακό νευρικό σύστημα μοιράζονται πολλούς κοινούς νευροδιαβιβαστές. Έτσι, ο ΑΕΦ εξασφαλίζει την διατήρηση ξεχωριστών επιπέδων στα δύο συστήματα και προστατεύει τον εγκέφαλο από ανεπιθύμητες διακυμάνσεις στην συγκέντρωσή τους. Για παράδειγμα, το πλάσμα του αίματος περιέχει μεγάλες ποσότητες του γλουταμινικού οξέος, οι οποίες αλλάζουν μετά την πέψη της τροφής. Μεγάλη συγκέντρωση στον εγκέφαλο αυτής της ένωσης, έχει αρνητικά αποτελέσματα στον ιστό των νευρώνων [16] [18]. Ο ΑΕΦ περιορίζει την πρόσβαση στον εγκέφαλο ορισμένων βλαβερών αμινοξέων, ενώ επιτρέπει την είσοδο σε άλλα θρεπτικά αμινοξέα.

Ρύθμιση εισόδου μακρομορίων

Υπό φυσιολογικές συνθήκες, ο ΑΕΦ αποτρέπει σε πολλά μακρομόρια να εισέλθουν στον εγκέφαλο μέσω διάχυσης. Η διαρροή τέτοιων μορίων με μεγάλο μοριακό βάρος στον εγκέφαλο, μπορεί να έχει πολύ σοβαρά παθολογικά αποτελέσματα. Για παράδειγμα, η διαρροή της πρωτεΐνης αλβουμίνης του πλάσματος επιφέρει

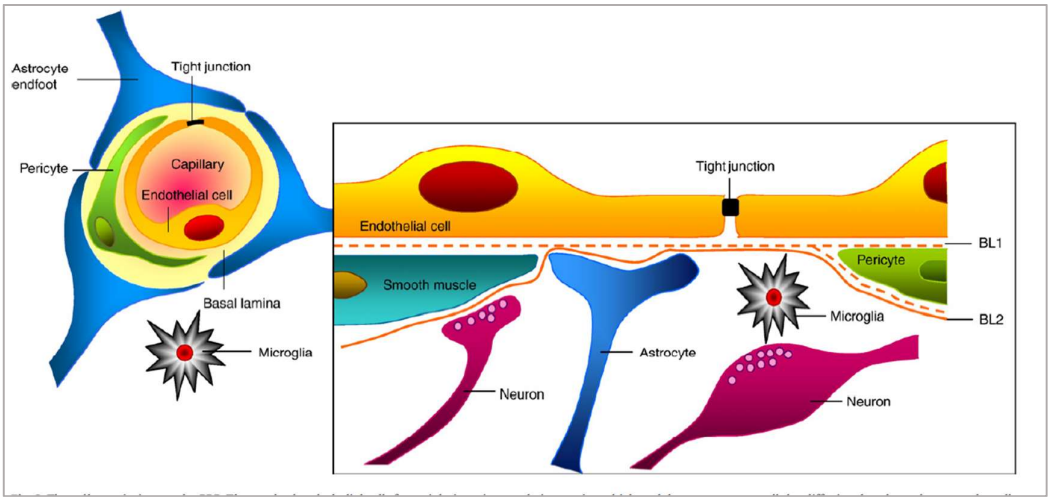
καταστροφικά αποτελέσματα στον νευρικό ιστό, προκαλώντας την ενεργοποίηση των κυττάρων, η οποία μπορεί να οδηγήσει στην απόπτωση [19] [20].

Προστασία από νευροτοξίνες

Στο αίμα κυκλοφορούν πολλές πιθανές νευροτοξίνες, συμπεριλαμβανομένων εκείνων που προέρχονται από ενδογενείς πηγές, όπως μεταβολίτες ή πρωτεΐνες, ή από εξωγενείς, όπως ξενοβιοτικά που προσλαμβάνονται με τη διατροφή ή αποκτώνται με άλλο τρόπο από το περιβάλλον. Η λειτουργία του αιματοεγκεφαλικού φραγμού είναι να ρυθμίζει την είσοδο των διαφόρων ουσιών που κυκλοφορούν με βάση τις ανάγκες του ΚΝΣ. Το ΚΝΣ των ενηλίκων έχει περιορισμένη ικανότητα αναγέννησης σε περίπτωση βλάβης και οι πλήρως διαφοροποιημένοι νευρώνες έχουν ελάχιστη ικανότητα να διαιρούνται και να αντικαθίστανται υπό κανονικές συνθήκες. Υπάρχει ένας συνεχής σταθερός ρυθμός θανάτου νευρικών κυττάρων από τη γέννηση σε όλη τη διάρκεια της ζωής στο υγιές ανθρώπινο εγκέφαλο, με σχετικά χαμηλά επίπεδα νευρογένεσης [21]. Αυτός είναι ο λόγος για τον οποίο οποιοσδήποτε παράγοντας που προάγει την επιτάχυνση του φυσικού ρυθμού κυτταρικού θανάτου (π.χ. αυξημένη πρόσβαση νευροτοξινών στον εγκέφαλο) θα γινόταν πρόωρα επικίνδυνος για την υγεία.

2.2 Κυτταρικές Δομές

Σε αντίθεση με άλλα αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα που επικάθονται στα περιφερικά αιμοφόρα αγγεία, τα μικροαγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα του εγκεφάλου παρουσιάζουν διακριτά μορφολογικά, δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά που τα διαφοροποιούν από τα υπόλοιπα κύτταρα. Η βασική διαφορά τους συνίσταται στον τρόπο με τον οποίο συγκολλώνται μεταξύ τους. Μεταξύ άλλων, διαφέρουν ως προς τα εξής: (1) την έκφραση των στενοσυνδέσμων (Tight Junctions), που σφραγίζουν τις παρακυτταρικές οδούς μεταξύ γειτονικών ενδοθηλιακών κυττάρων, εμποδίζοντας έτσι την ανεξέλεγκτη διέλευση πολικών (υδατοδιαλυτών) μορίων μεταξύ του αίματος και του εγκεφάλου (2) την έλλειψη ενδοκυττάρωσης και την έκφραση μηχανισμών ενεργού μεταφοράς για τη ρύθμιση της διέλευσης των απαραίτητων μορίων (συμπεριλαμβανομένων των θρεπτικών ουσιών και των απαραίτητων αμινοξέων), ενώ εμποδίζουν τη διέλευση δυνητικά ανεπιθύμητων ουσιών (τόσο ενδογενών όσο και ξενοβιοτικών) [22]. Οι κυτταρικές δομές του ΑΕΦ απεικονίζονται συγκεντρωτικά στην Εικόνα 4.



Εικόνα 4 : Κυτταρικές δομές του αιματοεγκεφαλικού φραγμού : Ενδοθηλιακά κύτταρα,περικύτταρα, αστροκύτταρα και στεγανοί σύνδεσμοι [9].

2.2.1 Κύτταρα νευροβλαστικής μονάδας

Ενδοθηλιακά κύτταρα

Τα ενδοθηλιακά κύτταρα του αιματοεγκεφαλικού φραγμού στον ανεπτυγμένο εγκέφαλο, χαρακτηρίζονται από διαφορετικά χαρακτηριστικά, τα οποία τα καθιστούν φαινοτυπικά διαφορετικά από άλλα ενδοθηλιακά κύτταρα που βρίσκονται σε διάφορα μέρη του σώματος. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα χαρακτηρίζονται από πεπλατυσμένη εμφάνιση, από την έκφραση των ενδοθηλιακών στενών συνδέσμων και από τον υψηλό αριθμό μιτοχονδρίων σε σύγκριση με τα αντίστοιχα κύτταρα από άλλες περιοχές[23]. Η διαφοροποίηση του ενδοθηλίου σε έναν λειτουργικό φραγμό αρχίζει κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής αγγειογένεσης και διατηρείται κατά την ενηλικίωση από μια στενή επαγωγική συσχέτιση με άλλους κυτταρικούς τύπους εντός της νευροβλαστικής ομάδας [8]. Η παρακυτταρική ροή υδρόφιλων μορίων διαμέσου του ενδοθηλίου του ΑΕΦ παρεμποδίζεται από τις στενές συνδέσεις που σφραγίζουν τα παρακυτταρικά μονοπάτια μεταξύ γειτονικών ενδοθηλιακών κυττάρων. Κατά μήκος του ενδοθηλίου, υπάρχει ταχεία ελεύθερη διάχυση του οξυγόνου από το αίμα στον εγκέφαλο και διάχυση διοξειδίου του άνθρακα προς την αντίθετη κατεύθυνση, η οποία είναι απαραίτητη για το φυσιολογικό μεταβολισμό και την ρύθμιση του pH στο διαμεσοκυττάριο υγρό του εγκεφάλου, τους νευρώνες και άλλα κύτταρα της νευροβλαστικής μονάδας [9].

Περικύτταρα

Τα περικύτταρα είναι κύτταρα που υπάρχουν κατά μήκος των τοιχωμάτων των τριχοειδών αγγείων (και των μετα-τριχοειδών φλεβιδίων). Στο ΚΝΣ, είναι σημαντικά για το σχηματισμό αιμοφόρων αγγείων, τη διατήρηση του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, τη ρύθμιση της εισόδου ανοσοκυττάρων στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ) και τον έλεγχο της εγκεφαλικής αιματικής ροής [24]**.** Η στενή σύνδεσή τους με τα ενδοθηλιακά κύτταρα επιτρέπει την ανταλλαγή ιόντων, μεταβολιτών, δεύτερων αγγελιοφόρων και ριβονουκλεϊκών οξέων μεταξύ των δύο κυτταρικών τύπων [25]. Τα περικύτταρα διαδραματίζουν επίσης ουσιαστικό ρόλο στη διατήρηση της ακεραιότητας του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, βοηθώντας στην αγγειογένεση και στη σταθερότητα των μικροαγγείων [25] [26]**.** Περικύτταρα, τα οποία διαθέτουν επίσης την ικανότητα συστολής, παρόμοια με τα λεία μυϊκά κύτταρα, μπορούν να ρυθμίζουν σε κάποιο βαθμό, τη διάμετρο των τριχοειδών αγγείων και την εγκεφαλική ροή αίματος (Cerebral Brain Flow.) [27], [28]. Τέλος, τα περικύτταρα μπορεί να επιτελούν φαγοκυττάρωση, απομακρύνοντας έτσι τους τοξικούς μεταβολίτες [29].

Αστροκύτταρα

Τα αστροκύτταρα αποτελούν ένα είδος νευρικού κυττάρου και ανήκουν στην κατηγορία των νευρογλοιακών κυττάρων. Είναι το πολυπληθέστερο είδος κυττάρων στο κεντρικό νευρικό σύστημα και συνδέονται με διάφορες βιοχημικές διεργασίες στον εγκέφαλο. Αυτές περιλαμβάνουν : (1) την διατήρηση της ιοντικής ομοιόστασης του εξωκυττάριου χώρου, (2) την ρύθμιση του pH, (3) την πρόσληψη νευροδιαβιβαστών και την προσφορά ενέργειας στους νευρώνες μέσω μεταφοράς πλούσιων ενεργειακά ενώσεων και μεταφορά σημάτων από τους νευρώνες [30]**.** Τα αστροκύτταρα παίζουν καθοριστικό ρόλο στην διατήρηση της λειτουργίας των τριχοειδών ενδοθηλιακών κυττάρων και στον έλεγχο της ροής του αίματος στον εγκέφαλο [8]. Τέλος, τα αστροκύτταρα συμμετέχουν στην ρύθμιση του νευρικού συστήματος και διαδραματίζουν ζωτικό ρόλο στην φλεγμονή του ΚΝΣ από νευροεκφυλιστικές ασθένειες [31].

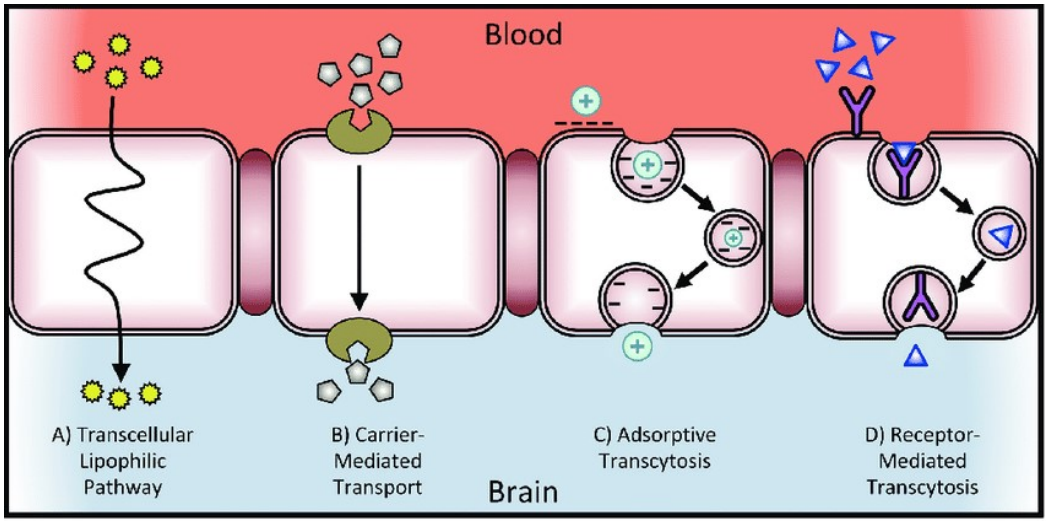
2.2.2 Στενοσύνδεσμοι

Μια ποικιλία ειδικών αδιαπέραστων συνδέσμων, γνωστοί ως στενοσύνδεσμοι, συνδέουν τα κενά μεταξύ των γειτονικών εγκεφαλικών ενδοθηλιακών κυττάρων. Οι στενοσύνδεσμοι σχηματίζονται από πρωτεΐνες που καλύπτουν τις κυτταρικές

μεμβράνες και καλούνται κλωντίνες και οκλουντίνες . Μέσα στα κύτταρα, οι πρωτεΐνες είναι προσκολλημένες στον κυτταροσκελετό (ένα δίκτυο ινών μέσα σε ένα κύτταρο που βοηθά στη δημιουργία του κυττάρου), ενώ εκτός του κυττάρου αλληλεπιδρούν με τις άλλες πρωτεΐνες στενής σύνδεσης των γειτονικών κυττάρων. Μόνο ορισμένα μικρά μόρια (νερό, κάποια αέρια όπως οξυγόνο και διοξείδιο του άνθρακα) και λιποδιαλυτές ουσίες (όπως τα μικρά μόρια λιπαρών οξέων) μπορούν να κινούνται παθητικά μέσω του φραγμού. Ακόμα, άλλα επιλεγμένα μόρια, όπως η γλυκόζη, πρέπει να μεταφερθούν από ειδικές πρωτεΐνες μεταφοράς ενσωματωμένες στις κυτταρικές μεμβράνες. Μ' αυτό τον τρόπο, λοιπόν, το μικροπεριβάλλον του εγκεφάλου διατηρείται, έτσι ώστε το νευρικό σύστημα να λειτουργεί βέλτιστα και το ΚΝΣ να προστατεύεται από βλαβερές ουσίες. Η δημιουργία των συνδέσμων αυτών είναι από τα πρώτα στοιχεία της ανάπτυξης του ΑΕΦ και ένας φραγμός στην ελεύθερη κίνηση πρωτεϊνών και μακρομορίων στα πρώτα στάδια διαμόρφωσης του εγκεφάλου [8].

2.3 Μεταφορά μέσω του ΑΕΦ

Παρακάτω αναφέρονται και αναλύονται συνοπτικά οι διάφοροι τρόποι μεταφοράς μέσω του ΑΕΦ. Οι τρόποι μεταφοράς απεικονίζονται και στην Εικόνα 5 συγκεντρωτικά.



Εικόνα 5 : Μέθοδοι μεταφοράς ενώσεων διαμέσου του αιματοεγκεφαλικού φραγμού [32].

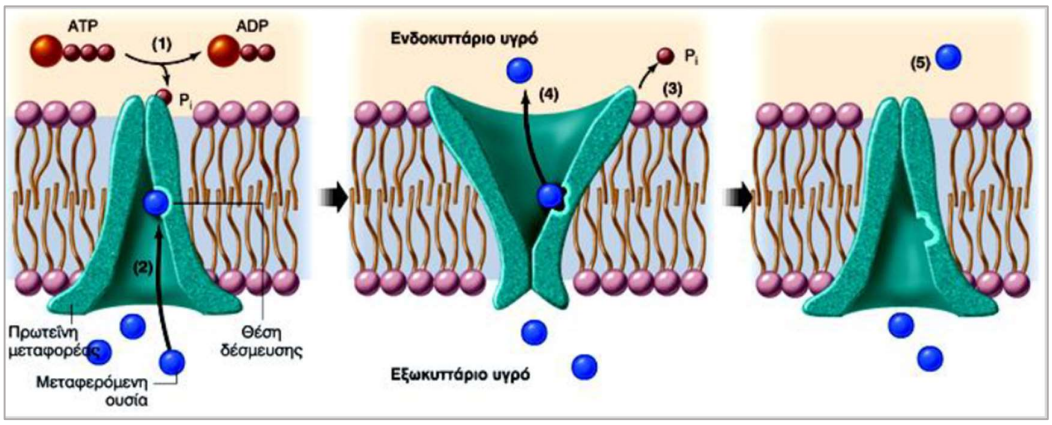
2.3.1 Παθητική Διάχυση

Σε γενικές γραμμές, μεγάλη ποικιλία λιποδιαλυτών μορίων μπορούν να περάσουν μέσω παθητικής διάχυσης τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και να εισέλθουν στον

εγκέφαλο [33]. Η κατεύθυνση της μεταφοράς εξαρτάται μόνο από την συγκέντρωση του μορίου σε κάθε πλευρά του φραγμού και η μετακίνηση θα γίνει από περιοχή υψηλής συγκέντρωσης, προς περιοχή χαμηλής συγκέντρωσης [34]. Υπάρχει έντονη συσχέτιση μεταξύ της λιποφιλίας ενός μορίου και του ρυθμού με τον οποίο αυτό εισέρχεται στο κεντρικό νευρικό σύστημα [35]. Μία παράμετρος που παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην μεταφορά μέσω διάχυσης είναι αρχικά, το μοριακό βάρος της ένωσης. Για μία ένωση με μοριακό βάρος >400 Da, η διαπερατότητα του ΑΕΦ δεν θα αυξηθεί με αύξηση της λιποφιλίας της ένωσης [36]. Επίσης, η μεγάλη πολική επιφάνεια του μορίου και ο σχηματισμός περισσότερων από 6 δεσμών υδρογόνου, είναι αμφότεροι περιοριστικοί παράγοντες για την είσοδο στο ΚΝΣ. Πιο συγκεκριμένα, όταν οι δεσμοί υδρογόνου, που μπορεί να σχηματίσει το μόριο είναι πάνω από 8, τότε είναι απίθανο να διαπεράσει τον αεφ με παθητική διάχυση σε θεραπευτικές ποσότητες [35].

2.3.2 Ενεργητική Μεταφορά

Για να εισέλθει στον ΑΕΦ μία ένωση που δεν εμφανίζει βαθμίδωση συγκέντρωσης θα πρέπει να παραχθεί έργο. Οι πρωτεΐνες μεταφοράς παρέχουν την απαιτούμενη ενέργεια, ώστε να ξεπεραστεί η βαθμίδα συγκέντρωσης και να επιτευχθεί η είσοδος στον εγκέφαλο. Αυτό το είδος κίνησης των μορίων καλείται ενεργητική μεταφορά και πραγματοποιείται από ειδικές πρωτεΐνες, που καλούνται αντλίες. Οι αντλίες αυτές δεσμεύουν ενέργεια, κυρίως, από την υδρόλυση του ATP [34] (Εικόνα 6). Αρκετές από αυτές τις πρωτεΐνες δέσμευσης ATP, εκφράζονται στα ενδοθηλιακά κύτταρα στην εξωτερική πλευρά της μεμβράνης του αιματοεγκεφαλικού φραγμού. Πρόκειται για αντλίες εκροής ATP για ξενοβιοτικά και ενδογενείς μεταβολίτες, οι οποίες περιορίζουν τη διαπερατότητα πολλαπλών τοξινών, συμπεριλαμβανομένου και θεραπευτικών παραγόντων [37]. Αυτή η ανθεκτικότητα του ΚΝΣ σε φαρμακευτικούς παράγοντες αποδίδεται στην υψηλή έκφραση αυτών των πρωτεϊνών. Μειωμένη έκφραση ή και κακή λειτουργία των πρωτεϊνών, έχει παρατηρηθεί σε ασθενείς με Alzheimer και με την νόσο του Parkinson [38].

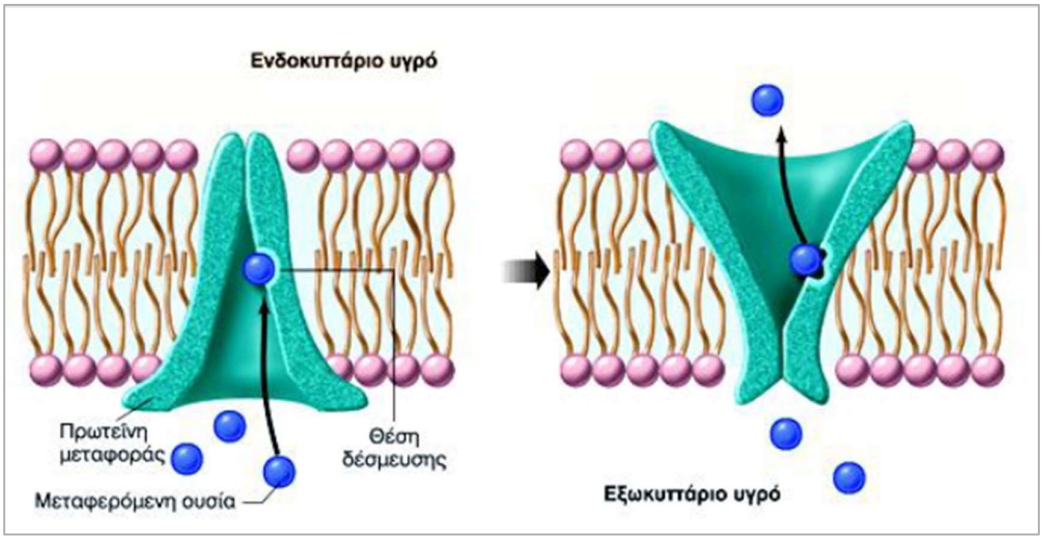


Εικόνα 6: Ενεργός μεταφορά ουσιών με την χρήση ενέργειας προερχόμενη από υδρόλυση μορίων ATP [39].

2.3.3 Συζευγμένη μεταφορά

Ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός απομονώνει τον εγκέφαλο και περιορίζει την διάχυση πολλών σημαντικών πολικών θρεπτικών συστατικών, όπως η γλυκόζη και τα αμινοξέα, απαραίτητα για τον μεταβολισμό. Κατά συνέπεια, είναι απαραίτητο να υπάρχουν άλλοι τρόποι μεταφοράς τους στον εγκέφαλο. Οι συζευγμένοι μεταφορείς είναι κωδικοποιούμενα γονίδια εντός της οικογένειας γονιδίων μεταφορέων διαλυτών ουσιών. Αυτή περιλαμβάνει περισσότερα από 300 γονίδια μεταφορέων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες της κυτταρικής μεμβράνης και διευκολύνουν τη μεταφορά ενός ευρέος φάσματος υποστρωμάτων διαμέσου βιολογικών μεμβρανών [40]. Αυτά περιλαμβάνουν αμινοξέα, υδατάνθρακες, μονοκαρβοξυλικά οξέα, λιπαρά οξέα, ορμόνες, νουκλεοτίδια, οργανικά ανιόντα, αμίνες, χολίνη, και βιταμίνες, όπως απεικονίζεται και στην Εικόνα 7. Οι στεγανές συνδέσεις διατηρούν την πολικότητα του

ΑΕΦ, καθώς διαχωρίζουν τις πρωτεΐνες μεταφοράς και αποτρέπουν την την ελεύθερη μετακίνησή τους από τη μία πλευρά του ενδοθηλίου στη στην άλλη [9].



Εικόνα 7 : Συζευγμένη μεταφορά ουσιών μέσω πρωτεϊνών από την μία πλευρά της μεμβράνης στην άλλη [39].

2.3.4 Μεταφορά βοηθούμενη από υποδοχέα

Η παρουσία πεπτιδικών δεσμών περιορίζει τα μεγαλύτερα πεπτίδια και τις πρωτεΐνες από το να χρησιμοποιούν τα συστήματα μεταφοράς που αναφέρθηκαν παραπάνω, για να να διασχίσουν τον ΑΕΦ [41]. Αυτές οι διαλυμένες ουσίες μεγάλου μοριακού βάρους μπορούν να εισέλθουν στο ΚΝΣ ανέπαφες, μέσω ενδοκυτταρικών μηχανισμών σε μια διαδικασία που ονομάζεται διακυττάρωση (transcytosis). Παρόλο που τα περισσότερα μεγάλα μόρια, που μεταφέρονται από το αίμα, εμποδίζονται φυσικά να εισέλθουν στο στον εγκέφαλο λόγω της παρουσίας του ΑΕΦ και των στεγανών συνδέσμων, υπάρχουν ειδικοί και μη ειδικοί διακυτταρωτικοί μηχανισμοί για τη μεταφορά μιας ποικιλίας μεγάλων μορίων και συμπλόκων [9].

2.4 Διατάραξη ομοιόστασης ΑΕΦ σε παθολογικές καταστάσεις

Η δυσλειτουργία του του αιματοεγκεφαλικού φραγμού αναφέρεται σε πολλές παθολογικές καταστάσεις του ΚΝΣ όπως είναι η σκλήρυνση κατά πλάκας [42], η υποξική και η ισχαιμική προσβολή [43], η νόσος του Parkinson και η νόσος του Alzheimer [44], η επιληψία [45] και οι όγκοι του εγκεφάλου [46]. Οι παρατηρούμενες δυσλειτουργίες του φραγμού μπορεί να κυμαίνονται από ήπιες και παροδικές αλλαγές

στη διαπερατότητα του φραγμού, που προκύπτουν από το άνοιγμα των στενών συνδέσμων, έως τη χρόνια διάσπαση του φραγμού και τις αλλαγές στα συστήματα μεταφοράς. Η διαδικασία αυτή, μπορεί επίσης να σχετίζεται και με την αποικοδόμηση της βασικής του μεμβράνης [47]. Η μικρογλοιακή ενεργοποίηση και διήθηση διαφόρων συστατικών του πλάσματος και ανοσοποιητικών κυττάρων στο εγκεφαλικό παρέγχυμα, έχουν ως αποτέλεσμα τη διαταραχή της ομοιόστασης του ΚΝΣ και ποικίλες βλάβες στο περιβάλλον του εγκεφάλου. Στις περισσότερες περιπτώσεις, δεν είναι δυνατόν να προσδιοριστεί αν η παραβίαση του φραγμού είναι αιτιώδης για την έναρξη της νόσου ή αποτέλεσμα της εξέλιξης της νευρολογικής νόσου. Παρόλα αυτά, οι διαταραχές της λειτουργίας του φραγμού μπορεί συχνά να θεωρηθούν ότι συμβάλλουν και επιδεινώνουν την όποια αναπτυσσόμενη παθολογία [48].

3. Φαρμακοκινητική και φυσικοχημικές ιδιότητες φαρμάκων-

3.1 Φαρμακοκινητική

3.1.1 Δράση φαρμάκου

Η δράση ενός φαρμάκου χωρίζεται σε τρεις φάσεις. Η πρώτη είναι η φαρμακευτική φάση, η οποία περιλαμβάνει την αποσύνθεση ενός δισκίου (για χορήγηση δια στόματος) ή κάψουλας στον γαστρεντερικό σωλήνα, την απελευθέρωση του φαρμάκου και την διάλυσή του στο εκεί περιβάλλον. Έπειτα, ακολουθεί η φαρμακοκινητική φάση, η οποία περιλαμβάνει την απορρόφηση από τον γαστρεντερικό σωλήνα στην κυκλοφορία του αίματος και τους διάφορους παράγοντες που επηρεάζουν την πορεία και την επιβίωση του φαρμάκου, καθώς αυτό φτάνει στον μοριακό του στόχο. Η τελική φαρμακοδυναμική φάση, αναφέρεται στον τρόπο με τον οποίο ένα φάρμακο αλληλεπιδρά με αυτόν τον στόχο και το φαρμακευτικό αποτέλεσμα που προκύπτει [1].

3.1.2 Απορρόφηση φαρμάκου

Η πιο συνήθης οδός χορήγησης ενός φαρμάκου είναι η δια στόματος χορήγηση. Όταν ένα φάρμακο καταποθεί από τον ασθενή, εισέρχεται στον γαστρεντερικό σωλήνα, σύστημα το οποίο περιλαμβάνει το στόμα, τον λαιμό, το στομάχι, το λεπτό και το παχύ έντερο. Η μεγαλύτερη ποσότητα του φαρμάκου θα βρεθεί στο στομάχι, όπου θα έρθει αντιμέτωπο με τα γαστρικά υγρά που θα διαλύσουν την ουσία εάν αυτή δεν είναι προστατευμένη από ένα δισκίο ή μία κάψουλα. Στην συνέχεια, το φάρμακο εισέρχεται

στο λεπτό έντερο, όπου συναντά πεπτικά ένζυμα ικανά να το αποδομήσουν και έπειτα περνάει μέσα από τα κύτταρα του εντερικού τοιχώματος για να εισέλθει στην κυκλοφορία του αίματος. Από το αίμα μεταφέρεται στο ήπαρ, όπου πραγματοποιείται ο μεταβολισμός της φαρμακευτικής ένωσης, δηλαδή η ουσία τροποποιείται σε μεταβολίτες, δευτερογενείς δραστικές ουσίες, ώστε να απεκκριθούν πιο έυκολα. Τέλος, εάν το φάρμακο δεν έχει απεκκριθεί μέχρι αυτό το στάδιο, μεταφέρεται μέσω του αίματος στα διάφορα μέρη του σώματος για να φτάσει το μόριο-στόχο του. Είναι εμφανές, λοιπόν, ότι μία φαρμακευτική ουσία πρέπει να πληροί πολλές και αυστηρές απαιτήσεις ταυτόχρονα για να είναι αποτελεσματικό. Όχι μόνο θα πρέπει να είναι χημικά σταθερό στην χημική αποδόμηση, αλλά θα πρέπει να έχει και τις απαραίτητες φυσικοχημικές ιδιότητες για να απορροφηθεί, να κατανεμηθεί στους ιστούς και να απεκκριθεί από τον οργανισμό, με αποτελεσματικό τρόπο .

3.1.3 Κατανομή φαρμάκου

Μόλις ένα φάρμακο απορροφηθεί, κατανέμεται γρήγορα στο αίμα, ενώ η κατανομή στους ιστούς και στα όργανα πραγματοποιείται με βραδύτερο ρυθμό. Οι φυσικές ιδιότητες, μεταξύ άλλων παραμέτρων, είναι αυτές που επηρεάζουν την έκταση και το ποσοστό της κατανομής.

Το φάρμακο πρέπει να διαφύγει από την κυκλοφορία του αίματος, έτσι ώστε να φτάσει στον στόχο του. Η διατομή των πόρων των τριχοειδών αγγείων που υπάρχουν στο ανρθώπινο οργανισμό, επιτρέπει την διέλευση στην πλειονότητα των δραστικών ενώσεν και αποτρέπουν την διαφυγή των πρωτεϊνών του πλασματος του αίματος. Έτσι, το φάρμακο διαπερνά τους πόρους του κυτταρικού τοιχώματος και μπορεί να κινηθεί ελεύθερα προς τον στόχο του. Ωστόσο, υπάρχει ένα ποσοστό του φαρμάκου που δεσμεύεται από τις πρωτεΐνες πλάσματος και δεν μπορεί να διαπεράσει αυτούς τους πόρους, με συνέπεια να μην φτάνει στον στόχο του.

Ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός είναι ένα σημαντικό εμπόδιο στην πορεία του φαρμάκου, ιδιαίτερα για εκείνα όσα δρουν στον εγκέφαλο. Τα τριχοειδή αγγεία στην περιοχή του εγκεφάλου είναι καλυμμένα από κύτταρα σε σφιχτή διάταξη, τα οποία δεν διαθέτουν πόρους. Έτσι, το φάρμακο που έχει ως στόχο τον εγκέφαλο, πρέπει να διαπεράσει τις κυτταρικές μεμβράνες, ελλείψει πόρων των τριχοειδών, ξεπερνώντας επίσης το λιπώδες στρώμα με το οποίο είναι καλυμμένα τα αγγεία αυτά. Η ύπαρξη του φραγμού αυτού, καθιστά αδύνατη την διέλευση πολικών φαρμάκων στον εγκέφαλο και

δημιουργεί νέες προκλήσεις στον σχεδιασμό των φαρμάκων που πρέπει να δράσουν στο κεντρικό νευρικό σύστημα.

3.2 Φυσικοχημικές ιδιότητες φαρμάκων

3.2.1 Λιποφιλία

Σύμφωνα με τον ορισμό κατά IUPAC, η λιποφιλία εκφράζει την συγγένεια ενός μορίου ως προς ένα λιπόφιλο περιβάλλον. Η λιποφιλία καθορίζει σε μεγάλο βαθμό την βιολογική δράση που παρουσιάζει ένα φάρμακο, καθώς επηρεάζει τόσο τα παθητικά φαινόμενα διάχυσης, όσο και τα φαινόμενα σύνδεσης με πρωτεΐνες, επηρεάζοντας έτσι την φαρμακοκινητική και φαρμακοδυναμική συμπεριφορά [2]. Η έννοια της λιποφιλίας θα πρέπει να διαχωρίζεται με αυτήν της υδροφοβίας, η οποία είναι η συσσωμάτωση μη πολικών ομάδων ή μορίων σε υδατικό περιβάλλον και η οποία δημιουργείται εξαιτίας της τάσης των μορίων του νερού να απογεύγουν τα μη πολικά μόρια. Η λιποφιλία είναι ένα συνολικό αποτέλεσμα διαμοριακών δυνάμεων που αναπτύσσονται μεταξύ της διαλυμένης ουσίας και των δύο φάσεων στις οποίες αυτή κατανέμεται. Η λιποφιλία είναι μία σύνθετη ιδιότητα, αποτελούμενη από δύο συνιστώσες, την υδροφοβία και την πολικότητα των ενώσεων.

Λιποφιλία = Υδροφοβικότητα – Πολικότητα

Η υδροφοβία είναι το φαινόμενο κατά το οποίο μόρια μη πολικών ουσιών, όταν βρεθούν μέσα σε υδατικό περιβάλλον, προσεγγίζουν μεταξύ τους ως αποτέλεσμα της αμοιβαίας άπωσης με το νερό. Αντίθετα, η πολικότητα εκφράζει την ισχύ και την κατεύθυνση των διαμοριακών δυνάμεων επαγωγής [49]. Ο λιπόφιλος χαρακτήρας ενός φαρμάκου καθορίζει πόσο εύκολα αυτό διέρχεται διαμέσου των κυτταρικών μεμβρανών και είναι σημαντικός για τις αλληλεπιδράσεις με τους υποδοχείς. Η αλλαγή ενός υποκαταστάτη σε ένα φάρμακο μπορεί να έχει άμεση επίδραση στην λιπόφιλη συμπεριφορά του και κατ'επέκταση στο φαρμακολογικό του αποτέλεσμα. Για τον λόγο αυτόν η ποσοτική του πρόβλεψη είναι πρωταρχικής σημασίας στον σχεδιασμό και την ανακάλυψη νέων φαρμάκων [1]. Η ποσοτική έκφραση της λιποφιλίας εκφράζεται από δύο πολύ σημαντικά μεγέθη, τον συντελεστή μερισμού (logP) και τον συντελεστή κατανομής (logD).

3.2.1.1 Συντελεστής μερισμού, logP

Ο λιπόφιλος χαρακτήρας ενός φαρμάκου μπορεί να υπολογιστεί πειραματικά εξετάζοντας την σχετική κατανομή του μορίου σε μίγμα n-οκτανόλης-νερού. Τα λιπόφιλα μόρια θα προτιμήσουν να διαλυθούν στην οργανική στιβάδα της n-οκτανόλης του διφασικού συστήματος, ενώ τα υδρόφιλα θα προτιμήσουν την υδατική. Η κατανομή του φαρμάκου μεταξύ λιποειδικής και υδατικής φάσης εκφράζεται από την ισορροπία:

$$[\varphi\acute{\alpha}\rho\mu\alpha\kappa o]_{\upsilon\delta\alpha\tau\iota\kappa\acute{\eta}\ \varphi\acute{\alpha}\sigma\eta} \overset{P}{\leftrightarrow} [\varphi\acute{\alpha}\rho\mu\alpha\kappa o]_{\lambda\iota\pi\acute{\omega}\delta\eta\varsigma\ \varphi\acute{\alpha}\sigma\eta}$$

Η σταθερά P καλείται συντελεστής μερισμού, αποτελεί μέτρο της λιποφιλίας και εκφράζεται από την παρακάτω εξίσωση [1], [2] :

$$P = \frac{\Sigma\upsilon\gamma\kappa\acute{\varepsilon}\nu\tau\rho\omega\sigma\eta\ \varphi\alpha\rho\mu\acute{\alpha}\kappa o\upsilon\ \sigma\tau\eta\nu\ \sigma\tau\iota\beta\acute{\alpha}\delta\alpha\ n-o\kappa\tau\alpha\nu\acute{o}\lambda\eta\varsigma}{\Sigma\upsilon\gamma\kappa\acute{\varepsilon}\nu\tau\rho\omega\sigma\eta\ \varphi\alpha\rho\mu\acute{\alpha}\kappa o\upsilon\ \sigma\tau\eta\nu\ \upsilon\delta\alpha\tau\iota\kappa\acute{\eta}\ \sigma\tau\iota\beta\acute{\alpha}\delta\alpha} \quad (1)$$

Ο συντελεστής P χρησιμοποιείται καλύτερα με την λογαριθμική του μορφή, logP και αναφέρεται στην κατανομή της ουδέτερης μορφής του φαρμάκου στις δύο στιβάδες. Το logP χρησιμοποιείται στην φαρμακευτική βιομηχανία για να ερμηνευθεί καλύτερα η συμπεριφορά υποψήφιων φαρμακευτικών μορίων στον ανθρώπινο οργανισμό. Αυτό συμβαίνει επειδή η λιποφιλία είναι πρωταρχικής σημασίας για την απορρόφηση, την κατανομή, τον μεταβολισμό και την απέκκριση του φαρμάκου από τον οργανισμό (ιδιότητες ADME) [50]. Οι λιπόφιλες ενώσεις εμφανίζουν υψηλές τιμές συντελεστή P σε αντιδιαστολή με τις υδρόφιλες ενώσεις, που έχουν χαμηλές τιμές P. Έχει αποδειχθεί ότι η αύξηση της λιποφιλίας επιφέρει και αύξηση της βιολογικής δράσης του φαρμάκου. Αυτό εξηγείται από το γεγονός ότι, τα φάρμακα πρέπει να διαπεράσουν τα λιπόφιλα στρώματα, τις κυτταρικές μεμβράνες, για να φτάσουν στο μόριο-στόχο. Επιπλέον, η αύξηση της λιποφιλίας βοηθά το φάρμακο να προσδένεται στην περιοχή στόχο, εφόσον η θέση πρόσδεσης ενός ενζύμου ή ενός υποδοχέα είναι υδρόφοβη. Παρόλα αυτά, η αύξηση του συντελεστή μερισμού δεν συνεπάγεται και επ'αόριστη αύξηση της βιολογικής του δράσης [1]. Ένα πολύ λιπόφιλο μόριο :

- Έχει χαμηλή διαλυτότητα, επηρεάζοντας την βιοδιαθεσιμότητα στον οργανισμό και άρα το φάρμακο δεν θα είναι ικανό να επιτελέσει το φαρμακευτικό του έργο.
- Μπορεί να παγιδευτεί από αποθήκες λίπους και να συσσωρευτεί στον οργανισμό, προκαλώντας τοξικότητα.

- Δεν είναι δυνατό να διαπεράσει ορισμένα φράγματα, όπως για παράδειγμα ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός. Ένα φάρμακο που δρα στο κεντρικό νευρικό σύστημα πρέπει να έχει τιμή logP περίπου ίση με 2, ενώ φάρμακα που δρουν στο υπόλοιπο σώμα το ιδανικό εύρος τιμών logP είναι 1.3-1.8 [51] [52].

Ο συντελεστής μερισμού αποτελεί θερμοδυναμική σταθερά, χαρακτηριστική για κάθε ένωση και εξαρτάται από την θερμοκρασία και τους διαλύτες, μεταξύ των οποίων γίνεται η κατανομή του μορίου. Ως οργανικός διαλύτης, επιλέγεται συνήθως η n-οκτανόλη, επειδή προσομοιάζει αποτελεσματικά τις λιποειδικές φάσεις του οργανισμού (βιολογικές μεμβράνες, υδρόφοβα τμήματα πρωτεϊνών) και για αυτό χρησιμοποιείται σε φαρμακευτικές και τοξικολογικές μελέτες [53].

3.2.1.2 Συντελεστής κατανομής, logD

Αναφέρθηκε ότι ο συντελεστής μερισμού αναφέρεται στην κατανομή της ουδέτερης, μη ιονισμένης μορφής του φαρμάκου σε δύο μη αναμειγνυόμενες φάσεις. Η πλειονότητα των ενώσεων, όμως, φέρουν κέντρα ιοντισμού και έτσι, ο πραγματικός μερισμός τους στις δύο φάσεις είναι άμεσα εξαρτώμενος από το pH του περιβάλλοντος στο οποίο βρίσκονται. Σε αυτήν την περίπτωση, το logP δεν μπορεί να εκφράσει την λιποφιλία της ένωσης και για αυτό χρησιμοποιείται ο φαινομενικός συντελεστής μερισμού ή συντελεστής κατανομής D [2], [54]. Ο συντελεστής υπολογίζεται με παρόμοιο τρόπο με τον συντελεστή μερισμού, με την διαφορά ότι η υδατική φάση αντικαθιστάται από ένα ρυθμιστικό διάλυμα σε διαφορετικά pH. Έτσι, το logD μίας ένωσης παίρνει διαφορετικές τιμές, ανάλογα με το pH στο οποίο έγινε η μέτρηση. Ο συντελεστής κατανομής εκφράζεται από την παρακάτω σχέση :

$$logD = \frac{\text{Άθροισμα συγκεντρώσεων ιοντισμένων μορφών στην οργανική φάση}}{\text{Άθροισμα συγκεντρώσεων ουδέτερης μορφής στην υδατική φάση}} \quad (2)$$

Καθώς ο μερισμός των ιοντισμένων μορφών της ένωσης στην οργανική φάση είναι πολύ μικρότερος από τον μερισμό των αδιάστατων μορφών της, πρακτικά θεωρείται ότι στην οργανική φάση κατανέμεται μόνο η αδιάστατη μορφή [55], [56].

Με βάση τις εξισώσεις Henderson – Hasselbach το logD μπορεί να υπολογιστεί μέσω του logP προσθέτοντας έναν διορθωτικό όρο, όπως φαίνεται στις παρακάτω εξισώσεις [53].

Για οξέα : $logD = logP - \log(1 + 10^{(pH - pK\ \ )})$ (3)

Για βάσεις : $logD = logP - \log(1 + 10^{(pKa - \ \ )})$ (4)

3.2.2 Μοριακό βάρος

Το μοριακό βάρος είναι μία πολύ σημαντική ιδιότητα των φαρμάκων, που επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό την ικανότητα διέλευσης από κυτταρικές μεμβράνες. Ειδικότερα, πολύ μικρά μόρια (ΜΒ<200) έχουν την δυνατότητα να διαπερνούν τις μεμβράνες διακυτταρικά, με αποτέλεσμα να εμφανίζουν αυξημένη διαπερατότητα, ανεξάρτητα από την λιποφιλία. Αντίθετα, μεγάλο ΜΒ δυσχεραίνει αρκετά την κίνηση των μορίων διαμέσω των κυτταρικών μεμβρανών [2]. Το μοριακό βάρος εξετάζεται επίσης, στην περίπτωση φαρμάκων που δρουν στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα και πρέπει, επομένως, να διαπεράσουν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό (ΑΕΦ). Το όριο της αποδεκτής τιμής του μοριακού βάρους για μεταφορά διαμέσου του ΑΕΦ έχει μελετηθεί σε διάφορες έρευνες, που αφορούν την διείσδυση του φαρμάκου, καθώς είναι πρωταρχικής σημασίας [57], [58]. Μία αύξηση του μοριακού βάρους από 200 Da σε 450 Da, αντιστοιχεί σε μείωση της διαπερατότητας του φραγμού κατά εκατό φορές [36].

3.2.3 Ικανότητα σχηματισμού δεσμών υδρογόνου

Οι δεσμοί υδρογόνου είναι ένας συγκεκριμένος τύπος ηλεκτροστατικής αλληλεπίδρασης μεταξύ ενός πρωτονίου ενός ατόμου (αζώτου ή οξυγόνου), ο οποίος είναι και ο δότης και ενός ζεύγους ηλεκτρονίων ατόμων, όπως του αζώτου, του οξυγόνου και του φθορίου, το οποίο λειτουργεί ως δέκτης. Η ισχύς του δεσμού υδρογόνου εξαρτάται από το είδος του δότη και του δέκτη, το περιβάλλον και την γωνία της αλληλεπίδρασης. Οι συγκεκριμένοι δεσμοί διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ του φαρμάκου και του υποδοχέα [59]. Στον σχεδιασμό φαρμάκων, οι δεσμοί υδρογόνου χρησιμοποιούνται για να επιτευχθεί ειδικότητα στο φάρμακο υπό σχεδιασμό. Ο αριθμός των δεσμών Η σε ένα φαρμακευτικό μόριο μπορεί να είναι περιορισμένοι εξαιτίας απαιτήσεων για την πολικότητα, ώστε το φάρμακο να επιδεικνύει καλύτερη απορρόφηση και διαπερατότητα. Σύμφωνα με τον νόμο του Lipinski, για παράδειγμα, ενώσεις με παραπάνω από πέντε δότες δεσμού υδρογόνου ή με παραπάνω από δέκα δέκτες δεσμού υδρογόνου, θεωρούνται να έχουν κακή απορρόφηση και διαπερατότητα [60].

3.2.4 Συνολικό εμβαδό πολικής τοπολογικής επιφάνειας, (Topological Polar Surface Area, TPSA).

Η μοριακή πολική επιφάνεια, αντιπροσωπεύει το πολικό κομμάτι του μορίου [61]. Η πολική επιφάνεια καθορίζεται αφαιρώντας από την μοριακή επιφάνεια, την επιφάνεια που καταλαμβάνουν τα άτομα άνθρακα, τα αλλογόνα κα τα άτομα υδρογόνου συνδεδεμένα με άτομα άνθρακα. Με άλλα λόγια,η μοριακή επιφάνεια σχετίζεται άμεσα με τα ετεροάτομα (κυρίως οξυγόνο, άζωτο και φωσφορικά άτομα) και με άτομα υδρογόνου που συμμετέχουν σε πολικούς δεσμούς [62]**.** Μία εκτενής μελέτη της PSA, τονίζει ότι η μοριακή επιφάνεια συσχετίζεται καλύτερα με τους δεσμούς υδρογόνου (δέκτες και δότες) παρά με την λιποφιλία ($r^2 = 0{,}76$ έναντι $r^2 = 0.30$) [63]. Η συγκεκριμένη παράμετρος, είναι χρήσιμη στην φαρμακοκινητική και σχετίζεται επίσης με την διαπερατότητα των μεμβρανών, ιδιαίτερα όσον αφορά την απορρόφηση φαρμάκων που χορηγούνται από το στόμα [64].

3.2.5 Ιοντικό φορτίο

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, τα περισσότερα φαρμακομόρια φέρουν κέντρα ιοντισμού και αν βρεθούν στο κατάλληλο περιβάλλον, δύναται να επικρατεί η ιοντισμένη μορφή τους. Αυτό εξαρτάται κυρίως από το pH του περιβάλλοντος στο οποίο θα βρεθεί και την σταθερά ιοντισμού του μορίου, pKa. Κατά τον σχεδιασμό νέων φαρμάκων ο βαθμός ιοντισμού του μορίου είναι μία πολύ σημαντική παράμετρος που πρέπει να λαμβάνεται υπόψη, καθώς επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό τις αλληλεπιδράσεις μορίου – υποδοχέα, καθώς επίσης και την διέλευση μέσω μεμβρανών [2].

3.2.6 Σταθερές Abraham

Το μοντέλο του Abraham αναπτύχθηκε και χρησιμοποιείται ευρέως για να προβλέψει τον συντελεστή μερισμού για οργανικούς διαλύτες και ιοντικούς διαλύτες [65] και τον μερισμό φαρμακομορίων μεταξύ του αίματος και οργάνων του οργανισμού [66].Το μοντέλο βασίζεται στην linear free energy relationship:

$$\log P = c + e\,E + s\,S + a\,A + b\,B + v\,V \qquad (5)$$

Όπου logP είναι ο συντελεστής μερισμού του συστήματος νερού/διαλύτη. Υπό συγκεκριμένες προϋποθέσεις, το μοντέλο αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί επίσης, για

την πρόβλεψη την διαλυτότητα ορισμένων οργανικών ενώσεων σε οργανικούς διαλύτες, με βάση την παρακάτω εξίσωση:

$$\log S_s = \log S_w + c + e\,E + s\,S + a\,A + b\,B + v\,V \qquad (6)$$

Όπου: S_s είναι η μοριακή συγκέντρωση της διαλυμένης ουσίας στον διαλύτη

S_w είναι η μοριακή συγκέντρωση της διαλυμένης ουσίας στο νερό,

c,e,s,a,b οι συντελεστές που αφορούν τον διαλύτη

A,B,E,S,V είναι παράμετροι που περιγράφουν την διαλυμένη ένωση.

Ειδικότερα, η παράμετρος E εκφράζει την περίσσεια μοριακής διαθλασιμότητας, πληροφορία η οποία αντλείται από το δείκτη διάθλασης, η παράμετρος S αναφέρεται στην διπολικότητα/πολωσιμότητα, οι παράμετροι A και B είναι η μέση οξύτητα και βασικότητα των δεσμών υδρογόνου και τέλος, η παράμετρος V είναι ο χαρακτηριστικός όγκος κατά McGowan. Οι παραπάνω παράμετροι υπολογίζονται μέσω γραμμικής παλινδρόμησης χρησιμοποιώντας ως δεδομένο πειραματικά καθορισμένους συντελεστές μερισμού και διαλυτότητες διαλυμένων ουσιών με γνωστούς συντελεστές παραμέτρους Abraham [67].

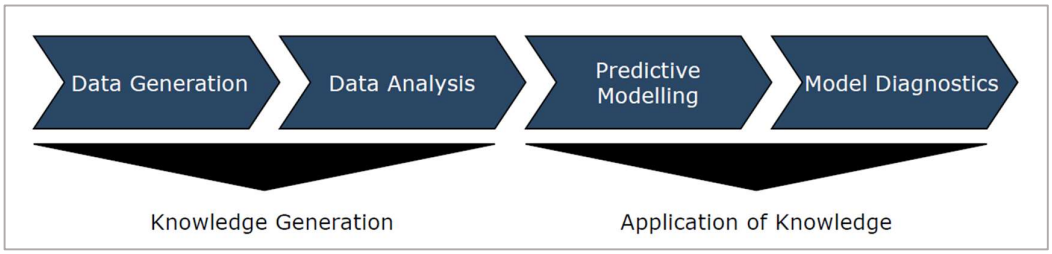
4. Πολυμεταβλητή ανάλυση δεδομένων

Η πολυμεταβλητή ανάλυση είναι ένα από τα πιο ισχυρά εργαλεία για την διαχείριση μεγάλου όγκου δεδομένων στην σύγχρονη εποχή. Η ανάγκη για καλύτερες και αποτελεσματικότερες αποφάσεις, που θα εξοικονομήσουν χρόνο αλλά και κόστος, σε εταιρείες και στον επιστημονικό κλάδο γενικότερα, έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη μεθόδων για την ανάλυση μεγάλου όγκου δεδομένων. Στην πράξη, όλες οι μεταβλητές έχουν κάποια αλληλοεξάρτηση μεταξύ τους, γεγονός που καθιστά πιο δύσκολη την ανάλυσή τους και κατ'επέκταση την εξαγωγή συμπερασμάτων για τον τρόπο συμπεριφοράς τους. Η πολυπαραμετρική ανάλυση δεδομένων περιλαμβάνει μία ευρεία ποικιλία εξαιρετικά χρήσιμων μεθόδων. Παρακάτω, θα αναλυθούν μερικές από αυτές, οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν και στην παρούσα εργασία, όπως είναι η ανάλυση κύριων συνιστωσών, η μοντελοποίηση μίας κλάσης και η διακριτή ανάλυση μερικών ελαχίστων τετραγώνων.

4.1 Χημειομετρία

Η χημειομετρία μπορεί να οριστεί ως η χημική αρχή που χρησιμοποιεί μαθηματικές και στατιστικές μεθόδους, (α) για να σχεδιάσει ή να επιλέξει τις βέλτιστες συνθήκες σε ένα πείραμα αναλυτικής χημείας και (β) να αντλήσει τον μέγιστο αριθμό πληροφοριών αναλύοντας τα χημικά δεδομένα που προκύπτουν. Τυπικές εφαρμογές της χημειομετρίας περιλαμβάνουν μεταξύ άλλων την ανάπτυξη ποσοτικών συσχετίσεων μεταξύ δομής και δράσης, καθώς επίσης και την αξιολόγηση αναλυτικών χημικών δεδομένων [68].

Η χημειομετρία χρησιμοποιεί τις αρχές της πολυμεταβλητής στατιστικής ανάλυσης δεδομένων και της μηχανικής μάθησης για να παράγει και να αναλύσει δεδομένα με πολλές παραμέτρους ή μεταβλητές, δίνοντας έμφαση στην παραγωγή συμπερασμάτων και γνώσεων για το μέλλον. Με απλά λόγια, η χημειομετρία μπορεί να θεωρηθεί μία διαδικασία τεσσάρων βημάτων, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 8. Συγκεκριμένα, αρχικά παράγονται τα δεδομένα προς ανάλυση από την διεξαγωγή ενός πειράματος (data generation), στην συνέχεια τα δεδομένα αυτά αναλύονται με χρήση στατιστικών και όχι μόνο μεθόδων. Η ανάλυση παράγει ένα προβλεπτικό μοντέλο και τέλος πραγματοποιείται ο έλεγχος του μοντέλου, ώστε να καθοριστεί ο βαθμός αξιοπιστίας του [69].



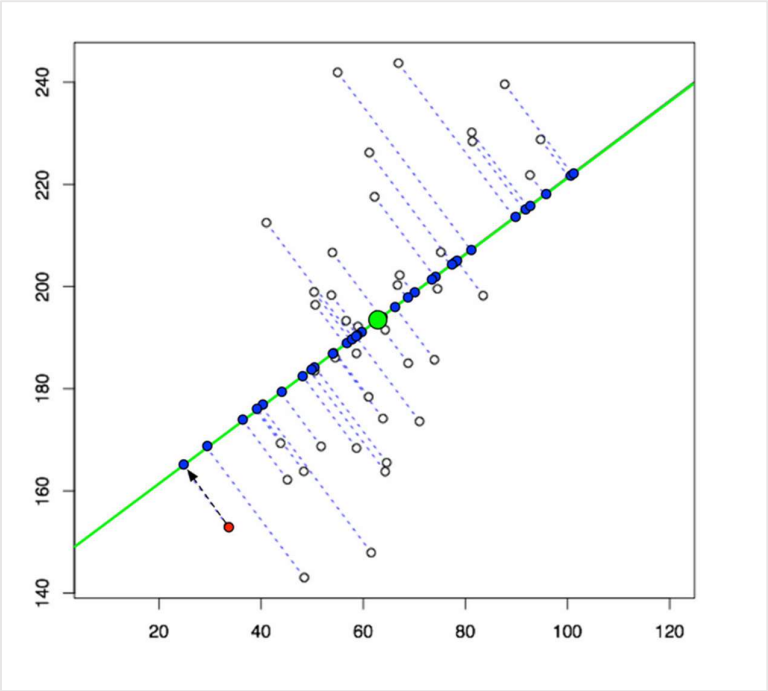
Εικόνα 8 : Απεικόνιση της χημειομετρίας ως διαδικασία τεσσάρων βημάτων για την εξαγωγή συμπερασμάτων από την ανάλυση πραγματικών χημικών δεδομένων [69].

Ένα σημαντικό κομμάτι της χημειομετρίας είναι η χρήση μεθόδων που βασίζονται σε πραγματικά δεδομένα. Ο στατιστικός σχεδιασμός πειραμάτων (Statistical design of Experiments) χρησιμοποιείται για την παραγωγή ενός συνόλου δεδομένων και στην συνέχεια υπεισέρχονται οι μέθοδοι της πολυμεταβλητής ανάλυσης για την εξαγωγή χρήσιμων συμπερασμάτων. Για δεκαετίες, το πεδίο της χημειομετρίας επικεντρώνεται πολύ στον τομέα της εγκυρότητας του μοντέλου (model diagnostics), για να εξασφαλιστεί, ότι οι νέες παρατηρήσεις και τα νέα δεδομένα μπορούν να προβλεφθούν με επιτυχία από το μοντέλο [70]. Η αρχή αυτή βρίσκει μεγάλη εφαρμογή στις αρχές

ποιότητας σχεδιασμού, το οποίο χρησιμοποιείται ολοένα και περισσότερα στην φαρμακοβιομηχανία [71].

4.2 Ανάλυση κύριων συνιστωσών (Principal Component Analysis,PCA)

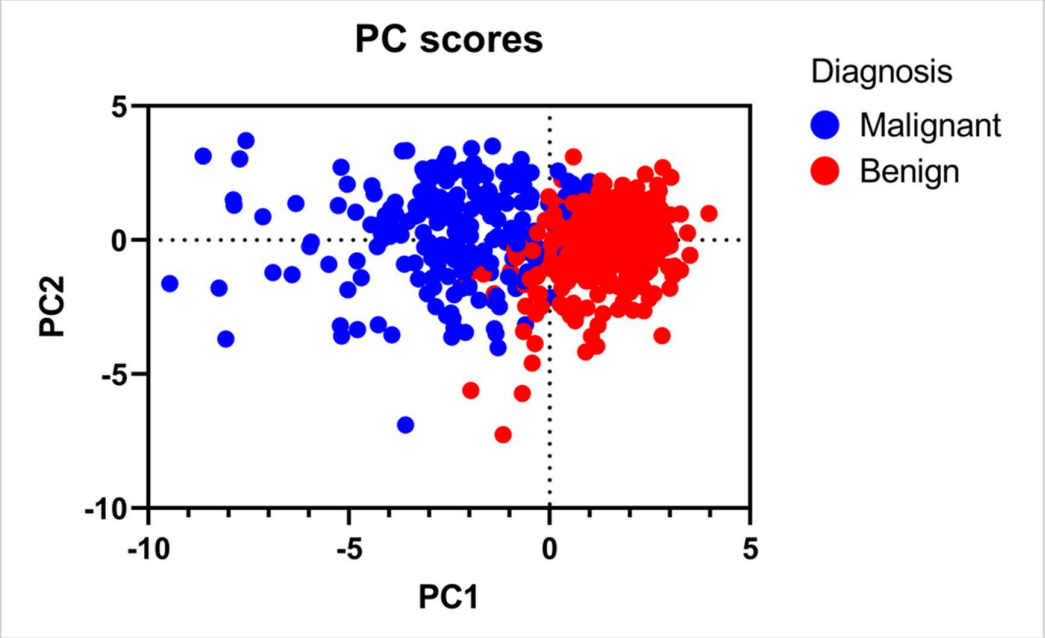
Η μέθοδος Ανάλυσης Κύριων Συνιστωσών (PCA) είναι η πιο διαδεδομένη μέθοδος που χρησιμοποιείται στην χημειομετρία. Είναι μία από τις πολλές τεχνικές πολυμεταβλητής ανάλυσης, που επιτρέπει την αναγνώριση και την διερεύνηση μοτίβων σε ένα δεδομένο σύνολο πληροφοριών [72]. Αποτελεί μία γραμμική μέθοδο συμπίεσης δεδομένων, η οποία συνίσταται από τον μετασχηματισμό των συντεταγμένων ενός συνόλου δεδομένων σε ένα άλλο σύστημα συντεταγμένων , πιο χρήσιμο για την ανάλυση και την εξαγωγή πολύτιμων συμπερασμάτων. Η PCA αναλύει έναν πίνακα δεδομένων ο οποίος απεικονίζει τις παρατηρήσεις, οι οποίες περιγράφονται από εξαρτώμενες μεταβλητές [73]. Σκοπός της ανάλυσης αυτής είναι να εξάγει τις σημαντικές πληροφορίες από τον πίνακα δεδομένων και να τις εκφράσει ως ένα σύνολο νέων ορθογώνιων μεταβλητών, τις κύριες συνιστώσες. Η PCA χρησιμοποιεί ένα σύνολο δεδομένων στο οποίο n παρατηρήσεις εκφράζονται από p μεταβλητές. Στην περίπτωση της μελέτης της διαπερατότητας του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, οι παρατηρήσεις είναι οι υπό μελέτη φαρμακευτικές ενώσεις και οι μεταβλητές, οι μετρούμενες ιδιότητές τους. Αυτό το είδος δεδομένων παράγει έναν πολυδιάστατο πίνακα με εν δυνάμει εκατοντάδες γραμμές και στήλες. Έτσι, είναι πολύ δύσκολο να εξαχθούν χρήσιμα συμπεράσματα από τα χαοτικά πρωτογενή δεδομένα, χωρίς την χρήση μίας τεχνικής όπως είναι η PCA. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της προβολής των δεδομένων σε έναν υποχώρο μικρότερης διάστασης, διατηρώντας μεγάλο μέρος της αρχικής διακύμανσης μεταξύ των σημείων. Έτσι, δημιουργούνται νέες «λανθάνουσες» μεταβλητές, οι κύριες συνιστώσες, οι οποίες είναι διανύσματα κάθετα μεταξύ τους στον χώρο και άρα ανεξάρτητες (Εικόνα 9)[74]. Η πρώτη κύρια συνιστώσα θα καταγράψει το μεγαλύτερο μέρος της διακύμανσης μεταξύ των δεδομένων, η δεύτερη συνιστώσα το δεύτερο μεγαλύτερο μέρος της διακύμανσης, που δεν απεικονίζεται στην πρώτη και ούτε καθεξής. Γενικά, η πρώτη συνιστώσα απεικονίζει την σημαντικότερη πηγή διαφοροποίησης ή ομοιότητας των δεδομένων .



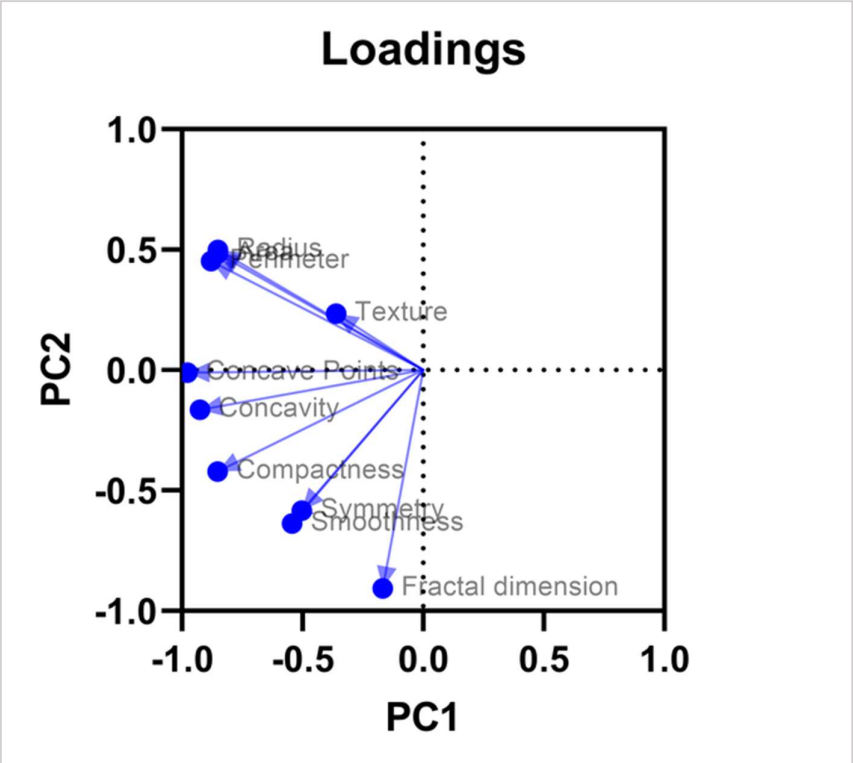
Εικόνα 9 : Προβολή των σημείων σε χώρο μικρότερης διάστασης [75] .

Με την τεχνική της PCA καταστρώνονται δύο πολύ χρήσιμα διαγράμματα. Πρώτον, γίνεται γραφική απεικόνιση της κατανομής των παρατηρήσεων στις κύριες συνιστώσες (score-plot) (Εικόνα 10) [76]. Δεύτερον, το διάγραμμα φορτίων (loading-plot) καταγράφει την επιρροή και την σημαντικότητα της κάθε αρχικής μεταβλητής στις νέες συνιστώσες που προκύπτουν (Εικόνα 11). Το διάγραμμα κατανομής αντιπροσωπεύει τις παρατηρήσεις στον νέο χώρο που δημιουργεί η PCA, ενώ αντίστοιχα, το διάγραμμα φορτίων αντιπροσωπεύουν τις μεταβλητές στον νέο χώρο, καταδεικνύοντας τις μεταξύ τους ομοιότητες και διαφορές. Όσες παρατηρήσεις βρίσκονται κοντά μεταξύ τους στο score – plot έχουν παρόμοια χαρακτηριστικά, καθώς η ομοιότητα που υπάρχει εξαρχής μεταφέρεται στις κύριες συνιστώσες που δημιουργούνται. Αντίστοιχα, μεταβλητές που βρίσκονται κοντά μεταξύ τους στο διάγραμμα φορτίων εμφανίζουν παρόμοια επίδραση στην διαφοροποίηση των δεδομένων και άρα είναι θετικώς συσχετισμένα. Αντιθέτως, μεταβλητές που βρίσκονται μακριά μεταξύ τους, διαφέρουν ως προς την επίδρασή τους στα δεδομένα και είναι αρνητικώς συσχετισμένα. Με τον τρόπο αυτόν, είναι δυνατός

ο αποκλεισμός ορισμένων μεταβλητών, με παρόμοια επίδραση, από την ανάλυση, απλοποιώντας έτσι το πείραμα [72].



Εικόνα 10 :Κατανομή δεδομένων καρκινικών κυττάρων στις κύριες συνιστώσες [77].



Εικόνα 11: Διάγραμμα φορτίων των μελετούμενων μεταβλητών για τα καρκινικά κύτταρα, στις νέες συνιστώσες που προκύπτουν [77].

Στην PCA τα κύρια μεγέθη που εξετάζονται για τον έλεγχο της ποιότητας της ανάλυσης είναι τα εξής :

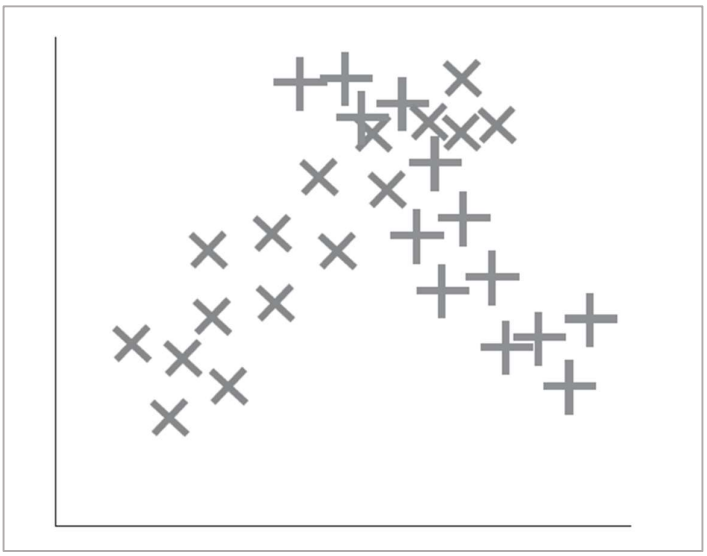
- $R_x^2(cum)$: Συνολικό άθροισμα τετραγώνων όλων των μεταβλητών X που ερμηνεύεται από όλες τις κύριες συνιστώσες, εκφράζει την προσαρμογή του μοντέλου.
- $Q_x^2(cum)$: Το συνολικό κλάσμα της συνολικής διακύμανσης των X που μπορεί να προβλεφτεί σύμφωνα με τη διαδικασία διασταυρούμενης αξιολόγησης για όλες τις συνιστώσες, εκφράζει την προβλεπτική του ισχύ.

Υψηλές τιμές των δύο παραπάνω μεγεθών, υποδηλώνουν καλή ακρίβεια του μοντέλου, όσον αφορά την ταξινόμηση.

4.3 Μοντελοποίηση μίας κλάσης (Class Modelling)

Η μοντελοποίηση μίας κλάσης είναι μία επιβλεπόμενη μέθοδος ταξινόμησης των δεδομένων σε κλάσεις, με βάση το αν παρουσιάζουν κοινές ιδιότητες και κοινά χαρακτηριστικά. Ως κλάση περιγράφεται ένα σύνολο παρατηρήσεων/αντικειμένων που έχουν μία ή παραπάνω κοινές ιδιότητες. Συνήθως, αυτές οι ιδιότητες μπορούν να περιγραφούν από μαθηματικές μεταβλητές και άρα οι παρατηρήσεις που διαμορφώνουν μία κλάση χαρακτηρίζονται από ίδιες ή παρόμοιες τιμές αυτών των μεταβλητών [78].

Μία ειδική κατηγορία μοντελοποίησης μίας κλάσης είναι η ήπια ανεξάρτητη μοντελοποίηση αναλογιών κλάσεων ή αλλιώς SIMCA. Η μέθοδος αυτή εισήχθη από τον Σουηδό χημικό Svante Wold το 1970 και είναι πολύ χρήσιμη για τον εντοπισμό μοτίβων σε πειράματα αναλυτικής χημείας [73]. Η έννοια της «ήπιας» μοντελοποίησης (soft modelling) εξηγείται από το γεγονός ότι δύο κλάσεις μπορούν να αλληλοεπικαλύπτονται και έτσι, ένα αντικείμενο μπορεί να ανήκει και στις δύο κλάσεις (Εικόνα 12). Για παράδειγμα, μία χημική ένωση μπορεί να περιέχει διαφορετικές χημικές ομάδες και άρα, να εμφανίζει και διαφορετική συμπεριφορά. Αντίθετα, στην μη ήπια μοντελοποίηση (hard modelling), τα αντικείμενα ανήκουν αυστηρά σε μία από τις δύο κατηγορίες (πχ φύλο).

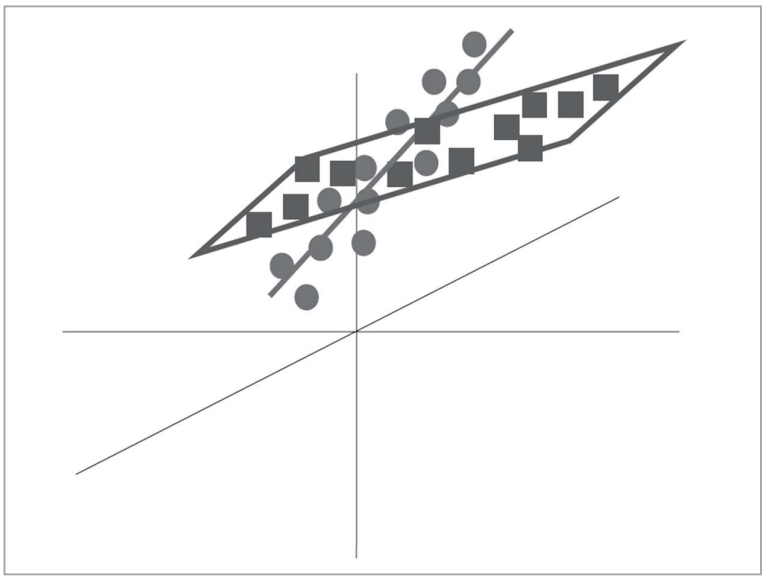


Εικόνα 12 : Άλληλοεπικαλυπτόμενες κλάσεις [73] .

Στην συγκεκριμένη μέθοδο, η κατηγοριοποίηση σε μία κλάση έχει γίνει εκ των προτέρων. Ειδικότερα, διάφορες παρατηρήσεις από τα δεδομένα επιλέγονται ως σύνολο εκμάθησης (training set) και ταξινομούνται στην κλάση 1. Η μέθοδος SIMCA προσπαθεί να βρει τα όρια των ήδη γνωστών κλάσεων και να αναθέσει τις υπόλοιπες, δηλαδή το σύνολο ελέγχου (test set), αλλά και νέες παρατηρήσεις στις υπάρχουσες κλάσεις. Έτσι, καθίσταται δυνατή η πρόβλεψη εκ των προτέρων, χωρίς την διεξαγωγή κάποιου χρονοβόρου πειράματος, σε ποια κατηγορία ανήκει ένα αντικείμενο με βάση τα χαρακτηριστικά του [79].

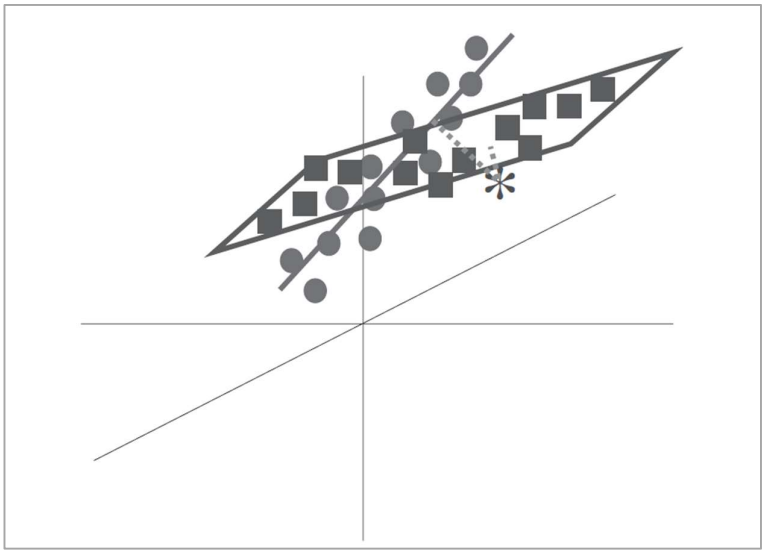
Τα βασικά βήματα της μεθόδου SIMCA είναι τα εξής:

Κάθε κατηγορία μοντελοποιείται ανεξάρτητα με την μέθοδο της PCA, από την οποία μπορεί να προκύψει διαφορετικός αριθμός κυρίων συνιστωσών για κάθε κατηγορία. Η Εικόνα 13 απεικονίζει δύο σύνολα, το καθένα από τα οποία χαρακτηρίζονται από έναν ορισμένο αριθμό κύριων συνιστωσών. Το πρώτο γκρουπ μετρήσεων (κύκλοι) μπορεί να προσεγγιστεί από μία ευθεία γραμμή, η οποία είναι και η μοναδική συνιστώσα του. Αντίθετα, το δεύτερο γκρουπ μετρήσεων κατανέμεται σε ένα επίπεδο, οι άξονες του οποίου είναι οι δύο πρώτες συνιστώσες του [73].



Εικόνα 13 : Δύο σύνολα μετρήσεων που μοντελοποιούνται από διαφορετικό αριθμό κύριων συνιστωσών [73].

Η συγκεκριμένη μέθοδος μοντελοποιεί τα δεδομένα και καθορίζει τα όρια της κλάσης, που τα διαφοροποιεί. Η απόσταση μίας παρατήρησης από την προκύπτουσα κλάση, μπορεί να καθοριστεί από την γεωμετρική απόσταση της μέτρησης αυτής από τις κύριες συνιστώσες, όπως φαίνεται στην Εικόνα 14 για την μέτρηση που απεικονίζεται με αστερίσκο [73].



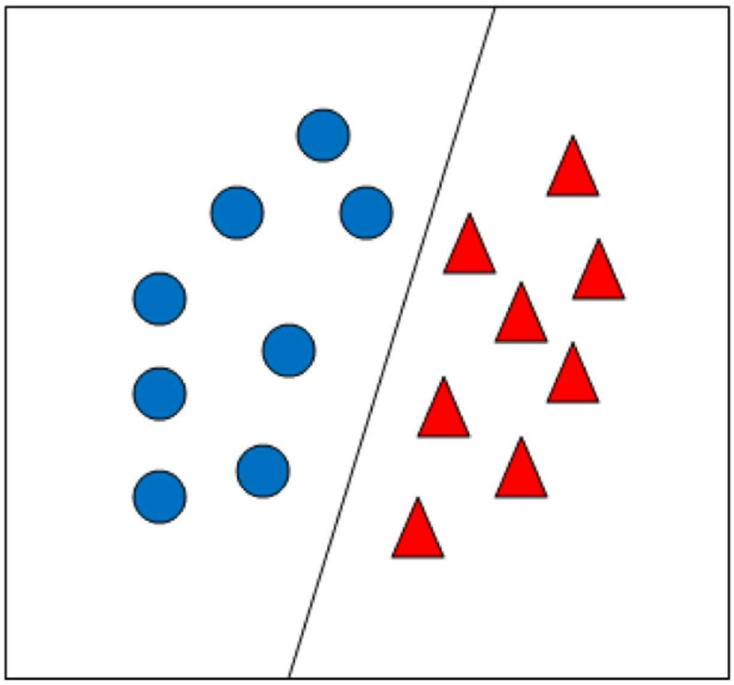
Εικόνα 14: Απόσταση ενός αγνώστου δείγματος (με αστερίσκο) από δύο υπάρχουσες κλάσεις [73].

Το άγνωστο δείγμα είναι πολύ πιο κοντά στο επίπεδο που σχηματίζεται από τις μετρήσεις που απεικονίζονται με τετράγωνα, από ότι στην γραμμή που σχηματίζεται

από το πρώτο γκρουπ. Έτσι, μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι η άγνωστη μέτρηση ανήκει στην δεύτερη κατηγορία [80].

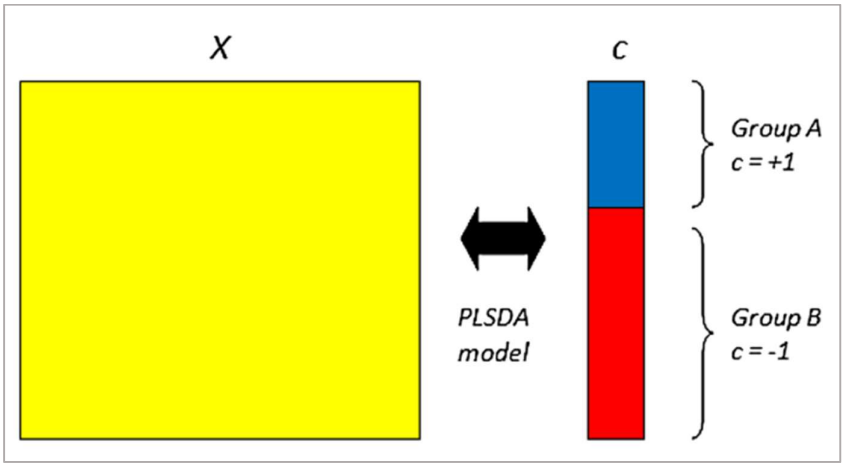
4.4 Διακριτή ανάλυση μερικών ελαχίστων τετραγώνων, Partial Least Squares – Discriminant Analysis

Η διακριτή ανάλυση μερικών ελαχίστων τετραγώνων, όπως και η PCA, είναι μία μέθοδος ταξινόμησης και μείωσης των διαστάσεων των δεδομένων. Έχει ευρεία εφαρμογή τόσο σε ομικές αναλύσεις (μεταβολομική,πρωτεομική), όσο και στην χημειομετρία. Η μέθοδος αυτή είναι μία επιβλεπόμενη εκδοχή (supervised method) της PCA, καθώς επιτυγχάνει την μείωση των διαστάσεων των πληροφοριών, αλλά λαμβάνοντας υπόψη την κατηγορία στην οποία ανήκουν τα δεδομένα που αναλύονται [81]. Χρησιμοποιείται, κυρίως, στην χημειομετρία ως μέθοδος ταξινόμησης, η οποία έχει την δύναμη να αποφανθεί σε ποια κατηγορία ανήκει ένα δεδομένο σύνολο δειγμάτων. Η συγκεκριμένη μέθοδος μπορεί να θεωρηθεί μία γραμμική μέθοδος ταξινόμησης με 2 κλάσεις, όταν η μεταβλητή y είναι κατηγορική. Δηλαδή, η μέθοδος προσπαθεί να εντοπίσει μία ευθεία γραμμή, η οποία διαχωρίζει τα δεδομένα σε δύο υποπεριοχές, όπως φαίνεται στην Εικόνα 15. Σε αυτή την περίπτωση, απεικονίζεται ο παράγοντας διάκρισης για τα δύο υποσύνολα, τους μπλε κύκλους και τα κόκκινα τετράγωνα [82].



Εικόνα 15 :Ευθεία γραμμή που διαχωρίζει τα δύο σύνολα δεδομένων [82].

Σκοπός της μεθόδου είναι να εντοπίσει την συνάρτηση εκείνη που θα διαχωρίσει τα δείγματα σε δύο κατηγορίες. Η ύπαρξη δύο μεταβλητών μόνο, είναι η πιο απλή περίπτωση που μπορεί να μελετηθεί. Στην πράξη όμως, μελετούνται δεκάδες μεταβλητές ταυτόχρονα, καθιστώντας το πρόβλημα της ταξινόμησης πιο περίπλοκο. Στην περίπτωση αυτή, ο παράγοντας διάκρισης δεν θα είναι μία ευθεία γραμμή, αλλά ένα επίπεδο στον πολυδιάστατο χώρο. Ο πολυδιάστατος πίνακας Χ των δεδομένων χωρίζεται σε σύνολο εκμάθησης και σύνολο ελέγχου και μέσα από μία σειρά υπολογισμών, καταστρώνεται το μοντέλο που θα τα κατηγοριοποιήσει σε δύο σύνολα [82]. Η βασική αρχή της μεθόδου απεικονίζεται στην Εικόνα 16:



Εικόνα 16 : Ανάλυση δεδομένων πολυδιάστατου πίνακα X και κατηγοριοποίηση σε δύο διακριτά σύνολα (Group A, Group B). [82].

5. Ερευνητικό μέρος

5.1 Συλλογή δεδομένων διαπερατότητας αιματοεγκεφαλικού φραγμού

Ως πρώτο στάδιο στην ανάπτυξη του προβλεπτικού μοντέλου αναζητήθηκαν φάρμακα που είναι γνωστό ότι διαπερνούν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και φάρμακα που δεν τον διαπερνούν. Στην συνέχεια, δημιουργήθηκε μία βάση δεδομένων με όλες τις απαραίτητες φυσικοχημικές ιδιότητες για την ανάπτυξη του μοντέλου. Πραγματοποιήθηκε αναζήτηση για την συλλογή των επιθυμητών ενώσεων και των ιδιοτήτων τους, σε πολλές διαφορετικές βάσεις δεδομένων : DrugBank Online (https://go.drugbank.com/) , PubChem (https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/) , ChemBL (https://www.ebi.ac.uk/chembl/) , ChemBI (https://www.ebi.ac.uk/chebi/) , ADMET lab2.0 (https://admetmesh.scbdd.com/service/evaluation/cal) , Swiss ADME (http://www.swissadme.ch/) , U.S Food and Drug Administration (https://www.fda.gov/drugs).

Για μεγαλύτερη ευκολία οι ενώσεις που διαπερνούν τον φραγμό συμβολίζονται ως ΑΕΦ + (ή BBB+) και όσες δεν τον διαπερνούν ως ΑΕΦ – (ή BBB -).Για κάθε μία από τις επιλεγμένες φαρμακευτικές ενώσεις καταγράφηκαν οι ιδιότητες που θα χρησιμοποιηθούν ως μεταβλητές, ώστε να καταστρωθεί το προβλεπτικό μοντέλο. Συγκεκριμένα, μέσω του προγράμματος ADME Boxes 3.0 έγινε αναζήτηση των εξής φυσικοχημικών ιδιοτήτων. Τα δεδομένα παρουσιάζονται αναλυτικά στους Πίνακες 9,10 του Παραρτήματος :

- Μοριακό Βάρος
- Συντελεστής κατανομής, logD
- Συντελεστής μερισμού, logP
- Συνολικο εμβαδόν πολικής επιφάνειας, TPSA
- Θετικό και αρνητικό φορτίο σε φυσιολογικό pH=7,4 F^+, F^-
- Κλάσμα θετικού και αρνητικού φορτίου όταν η ένωση δρα ως επαμφοτερίζουσα, $F^+ + F_z$, $F^- + F_z$ σε pH=7.4
- Αριθμός δεκτών δεσμών υδρογόνου, HBA (Hydrogen Bond Acceptor)
- Αριθμός δοτών δεσμών υδρογόνου, HBD (Hydrogen Bond Donor)
- Αριθμός περιστρεφόμενων δεσμών, No of rotatable bonds
- Σταθερές A, B, S, E, V του Abraham

5.2 Επεξεργασία δεδομένων

Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την ανάλυση των δεδομένων, εφαρμόζοντας τις μεθόδους που αναφέρθηκαν στο κεφάλαιο 4.

5.2.1 Περιγραφικά στατιστικά μεταβλητών

Το αρχικό στάδιο της ανάλυσης των δεδομένων περιλαμβάνει την εύρεση των περιγραφικών στατιστικών για καθεμία κατηγορία ενώσεων. Μέσω του προγράμματος υπολογιστικών φύλλων του Excel καταγράφηκαν η μέση, η ελάχιστη και η μέγιστη τιμή και η τυπική απόκλιση, για κάθε μία από τις 16 μεταβλητές που μελετήθηκαν, για τις ΑΕΦ - φαρμακευτικές ενώσεις (Πίνακες 1,2) και για τις ΑΕΦ + ενώσεις (Πίνακες 3,4).

Πίνακας 1

Περιγραφικά στατιστικά φυσικοχημικών ιδιοτήτων των ενώσεων που δεν διαπερνούν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό.

Στατιστικό μέγεθος	Μοριακό Βάρος	logD	logP	TPSA	F^+	F^-	$F^- + F_z$	$F^+ + F_z$
Ελάχιστη τιμή	130.1	-8.00	-6.00	9.2	0.00	0.00	0.00	0.00
Μέγιστη τιμή	853.9	7.49	7.80	337.3	1.00	1.00	18.40	1.00
Μέση τιμή	398.0	0.40	1.30	116.3	0.16	0.17	0.60	0.33
Τυπική απόκλιση	173.6	3.00	2.51	58.0	0.34	0.32	2.17	0.43

Πίνακας 2

Περιγραφικά στατιστικά φυσικοχημικών ιδιοτήτων των ενώσεων που δεν διαπερνούν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό (συνέχεια Πίνακα 1).

Στατιστικό μέγεθος	HBA	HBD	Περιστρεφόμενοι δεσμοί	A	B	E	S	V
Ελάχιστη τιμή	1	0	0	0.00	0.10	-0.50	0.05	0.77
Μέγιστη τιμή	65	15	14	2.48	5.92	4.84	5.98	6.38
Μέση τιμή	8	3	5	0.71	2.29	2.46	2.84	2.82

Τυπική απόκλιση	8	2	3	0.51	1.16	0.88	0.97	1.36

Πίνακας 3

Περιγραφικά στατιστικά μεγέθη φυσικοχημικών ιδιοτήτων των ενώσεων που διαπερνούν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό.

Στατιστικό μέγεθος	Μοριακό Βάρος	logD	logP	TPSA	F +	F -	F- + Fz	F+ + Fz
Ελάχιστη τιμή	135.2	-5.48	-6.00	3.24	0.00	0.00	0.00	0.00
Μέγιστη τιμή	477.6	6.23	7.80	135.48	1.00	1.00	1.00	1.00
Μέση τιμή	294.1	1.94	2.10	38.40	0.44	0.13	0.15	0.46
Τυπική απόκλιση	86.4	2.00	2.30	23.15	0.45	0.34	0.36	0.46

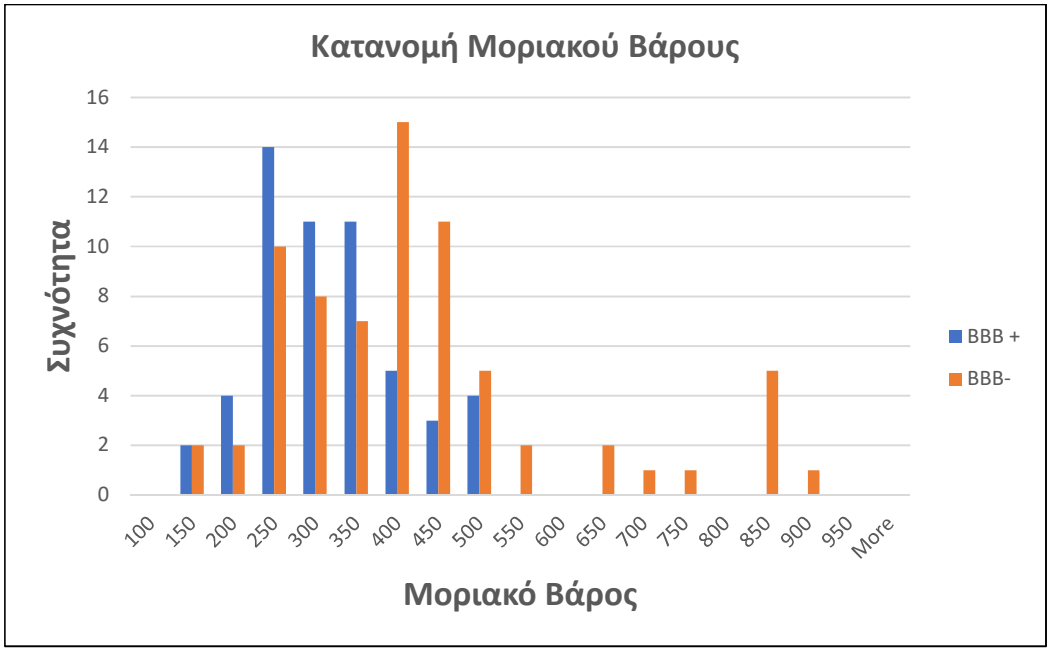
Πίνακας 4

Περιγραφικά στατιστικά μεγέθη φυσικοχημικών ιδιοτήτων των ενώσεων που διαπερνούν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό (συνέχεια Πίνακα 3).

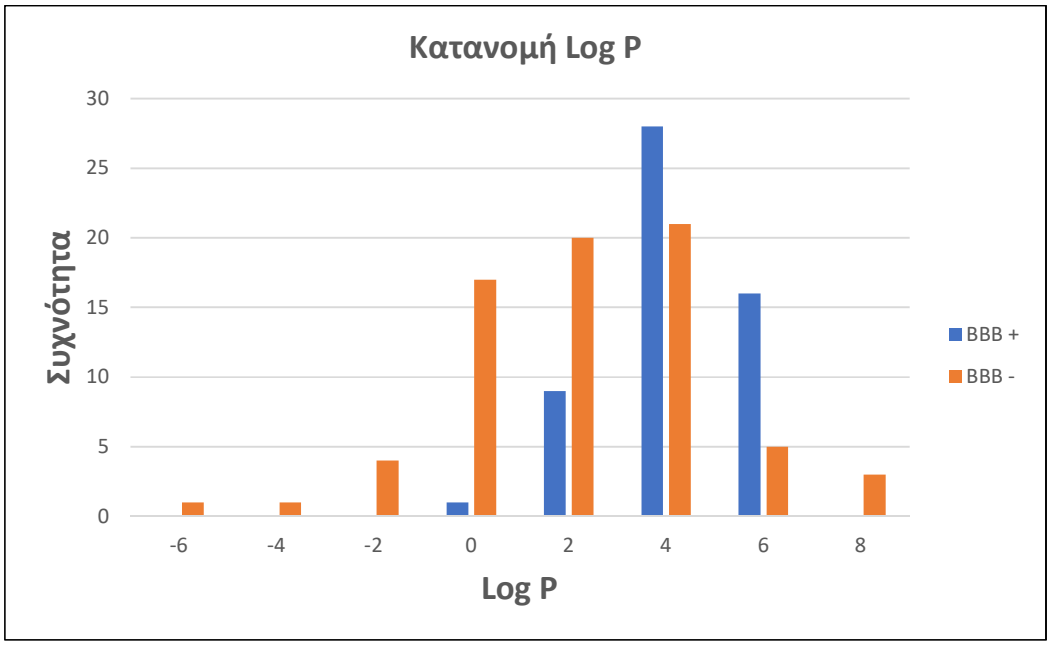
Στατιστικό μέγεθος	HBA	HBD	Περιστρεφόμενοι δεσμοί	A	B	E	S	V
Ελάχιστη τιμή	1	0	0	0,00	0,12	-0,48	0,01	0,70
Μέγιστη τιμή	13	7	10	1,85	2,82	3,51	4,23	3,64
Μέση τιμή	3	1	4	0,26	1,16	1,66	1,81	2,26
Τυπική απόκλιση	2	1	2	0,32	0,49	0,77	0,72	0,67

5.2.2 Κατανομές μεταβλητών

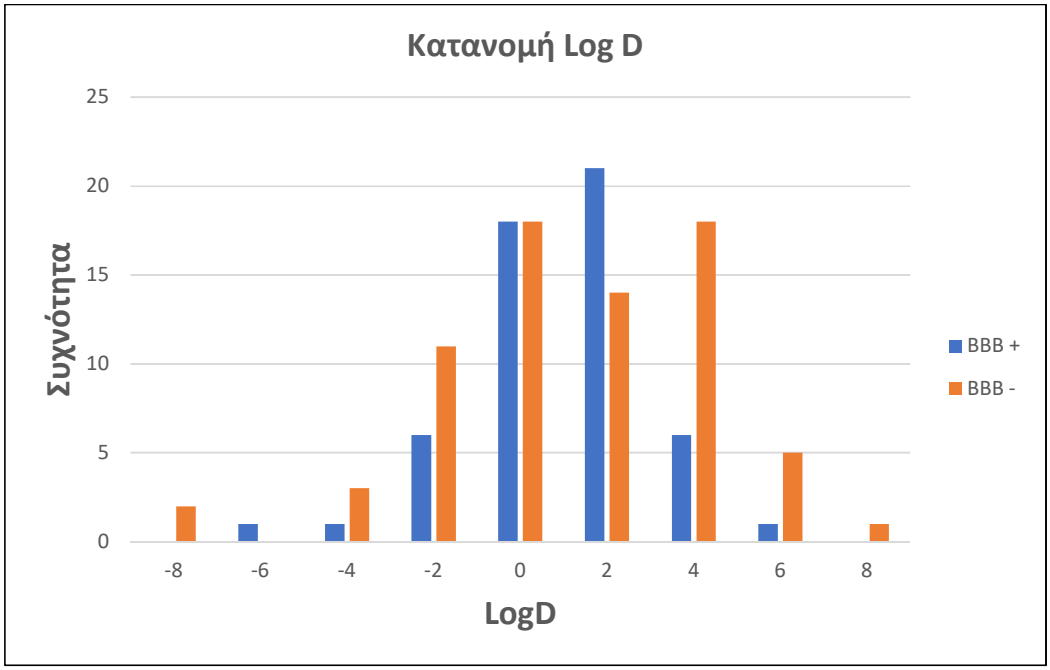
Στην συνέχεια, καταστρώθηκαν διαγράμματα που απεικονίζουν συγκριτικά τις κατανομές των μεταβλητών για τις δύο κατηγορίες ενώσεων, όπως απεικονίζονται στα διαγράμματα Δ.1 έως Δ.11. Επίσης, πραγματοποιήθηκε στατιστικός έλεγχος t-test ώστε να διαπιστωθεί εάν διαφέρουν οι μέσοι όροι των μεταβλητών για κάθε μία κατηγορία ενώσεων και άρα, αν παρουσιάζει ενδιαφέρον η μεταξύ τους σύγκριση. Ο στατιστικός έλεγχος, συγκρίνοντας τις μέσες τιμές της κάθε μεταβλητής για τις ΑΕΦ + και μη ενώσεις, έδωσε ως αποτέλεσμα $p - value < 0.050$ με διάστημα εμπιστοσύνης 95% και άρα συμπεραίνεται ότι οι μέσοι όροι παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά.



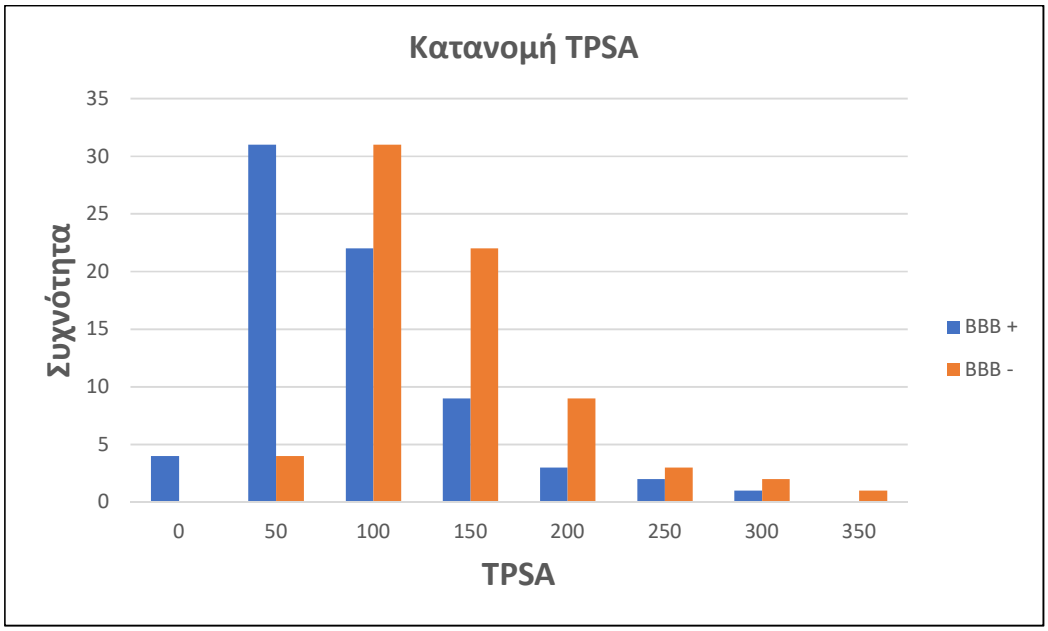
Διάγραμμα 1 : Κατανομή μοριακού βάρους για τις ΑΕΦ + και ΑΕΦ - ενώσεις.



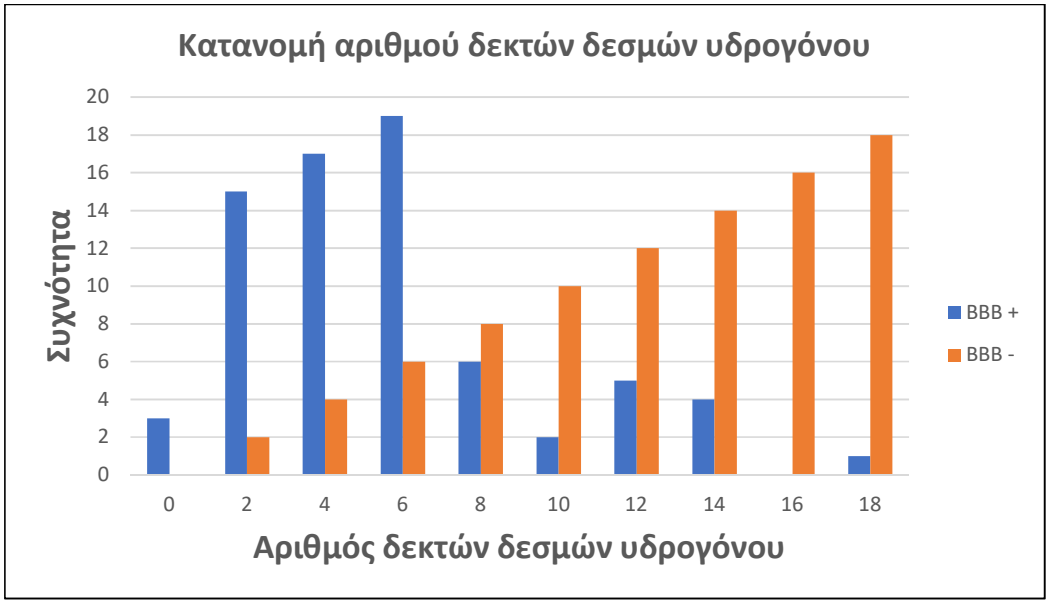
Διάγραμμα 2 : Κατανομή λογαρίθμου συντελεστή μερισμού logP για τις ΑΕΦ + και ΑΕΦ - ενώσεις.



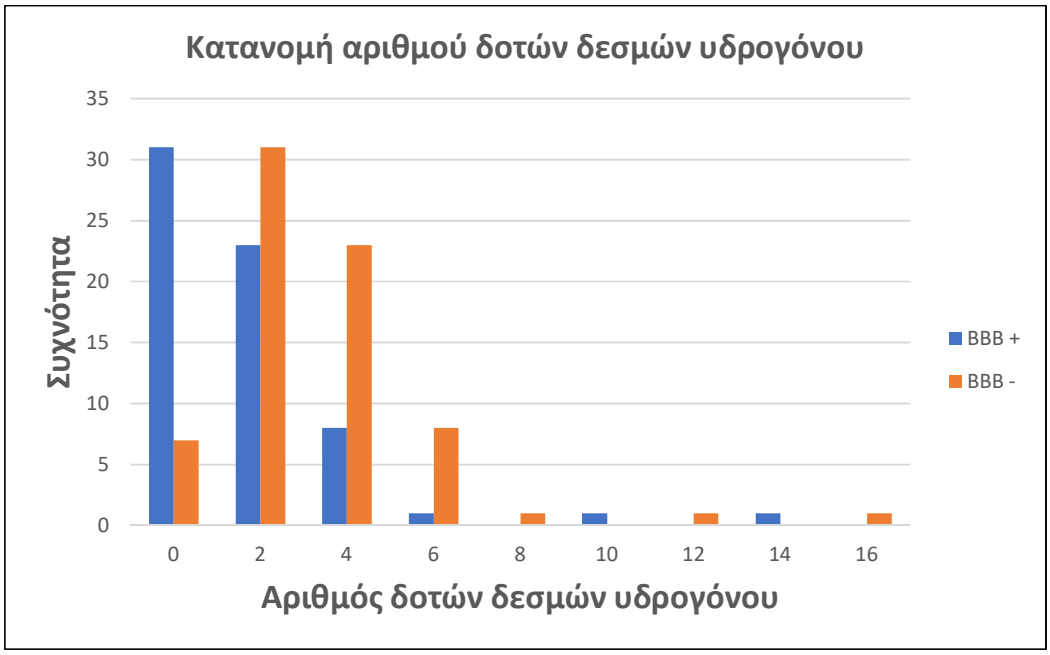
Διάγραμμα 3 : Κατανομή συντελεστή κατανομής logD για τις ΑΕΦ + και ΑΕΦ - ενώσεις.



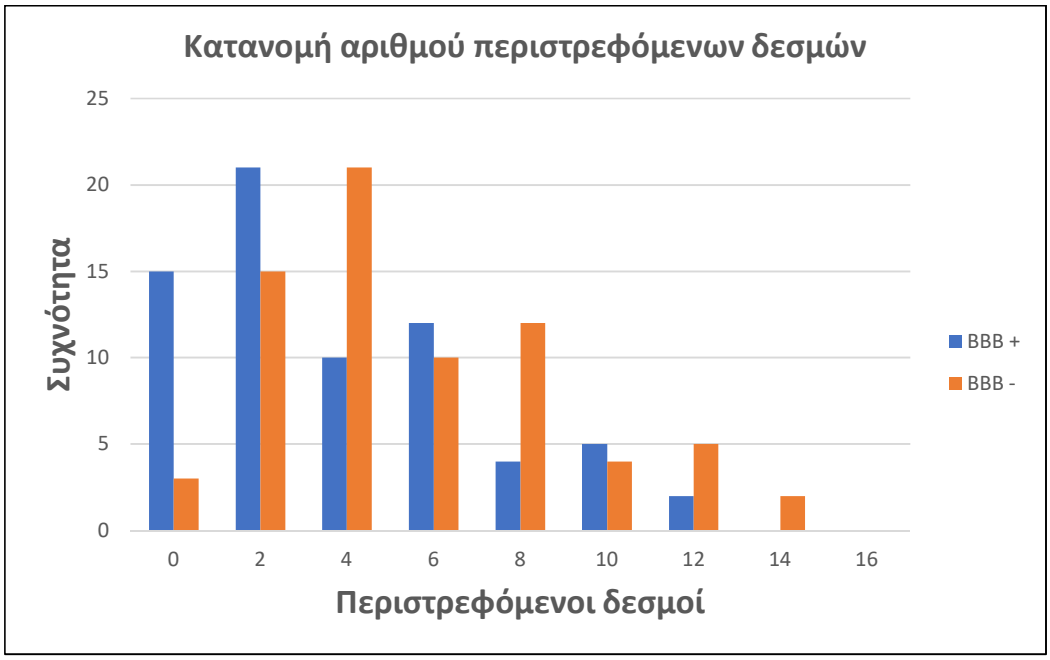
Διάγραμμα 4 : Κατανομή ολικής τοπολογικής πολικής επιφάνειας για τις ΑΕΦ + και ΑΕΦ - ενώσεις.



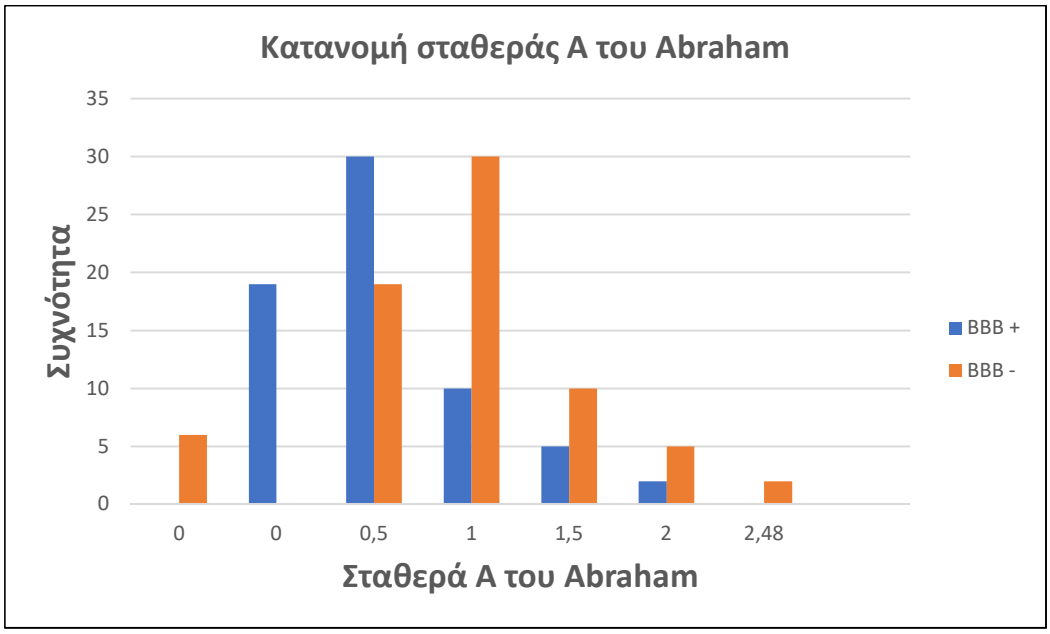
Διάγραμμα 5 : Κατανομή αριθμού δεκτών δεσμών υδρογόνου για τις ΑΕΦ + και ΑΕΦ - ενώσεις



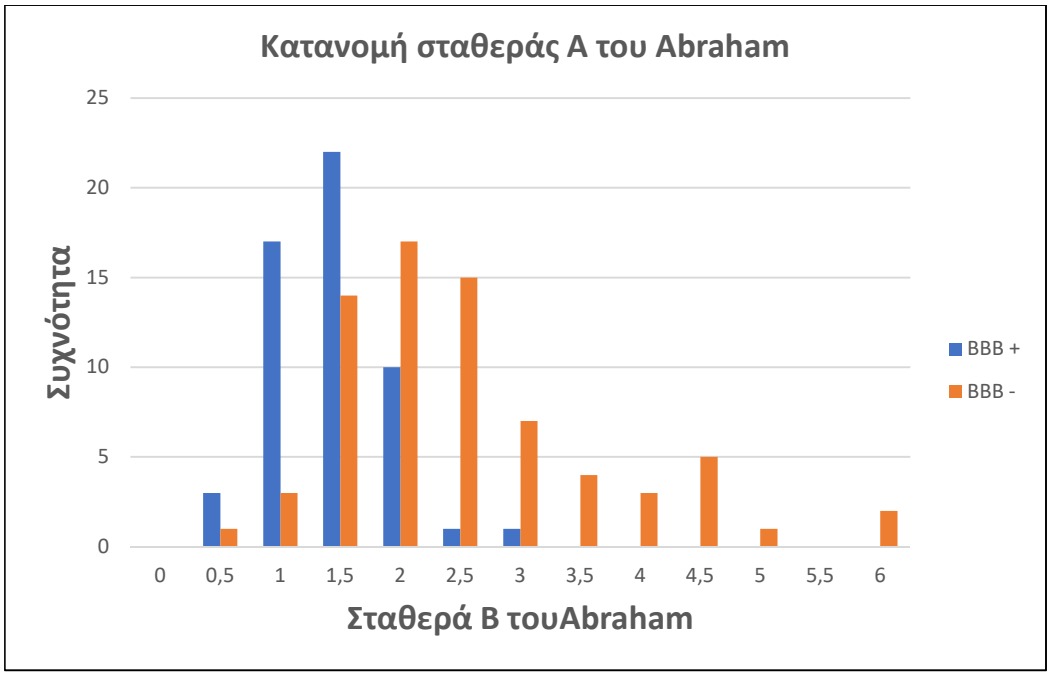
Διάγραμμα 6 : Κατανομή αριθμού δοτών δεσμών υδρογόνου για τις ΑΕΦ + και ΑΕΦ - ενώσεις



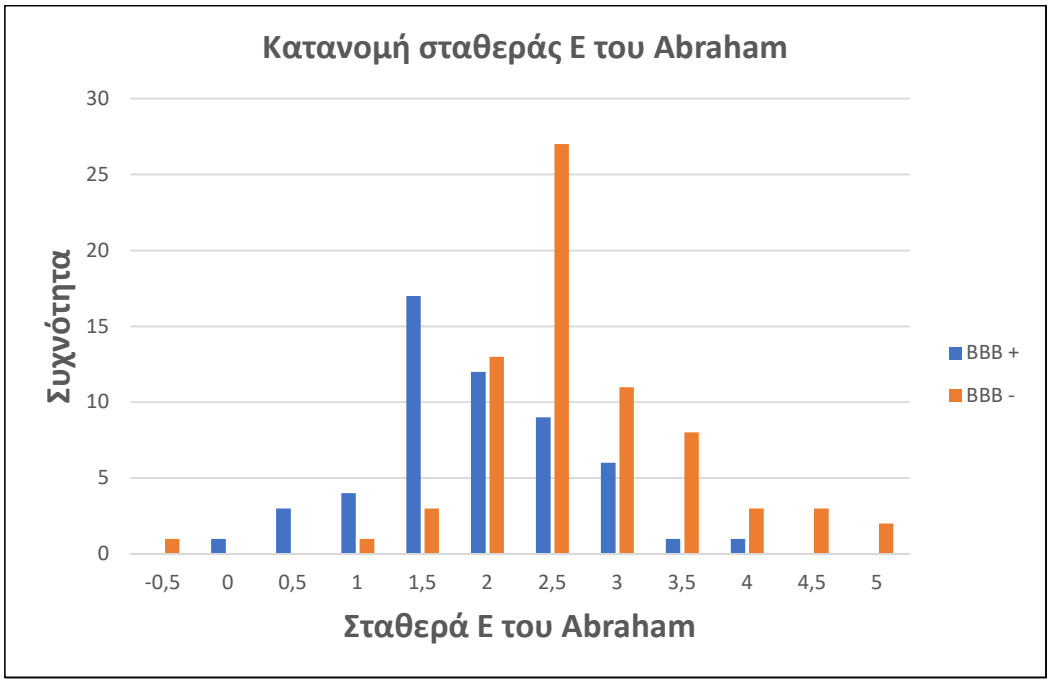
Διάγραμμα 7 : Κατανομή αριθμού περιστρεφόμενων δεσμών για τις ΑΕΦ + και ΑΕΦ - ενώσεις.



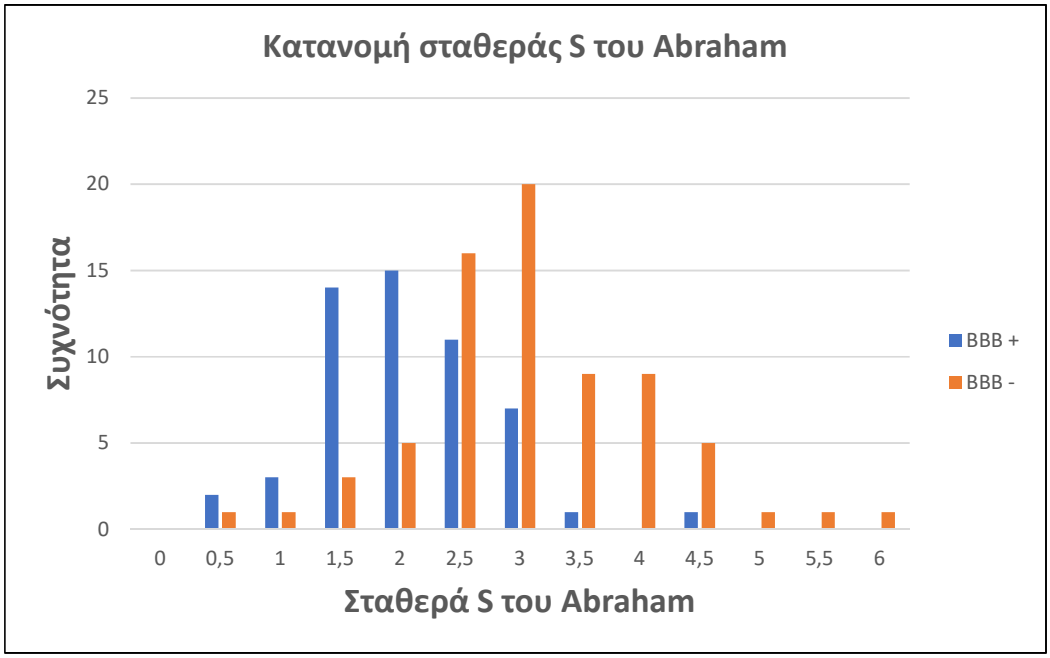
Διάγραμμα 8 : Κατανομή συντελεστή A του Abraham για τις ΑΕΦ + και ΑΕΦ - ενώσεις.



Διάγραμμα 9 : Κατανομή συντελεστή B του Abraham για τις ΑΕΦ + και ΑΕΦ - ενώσεις.



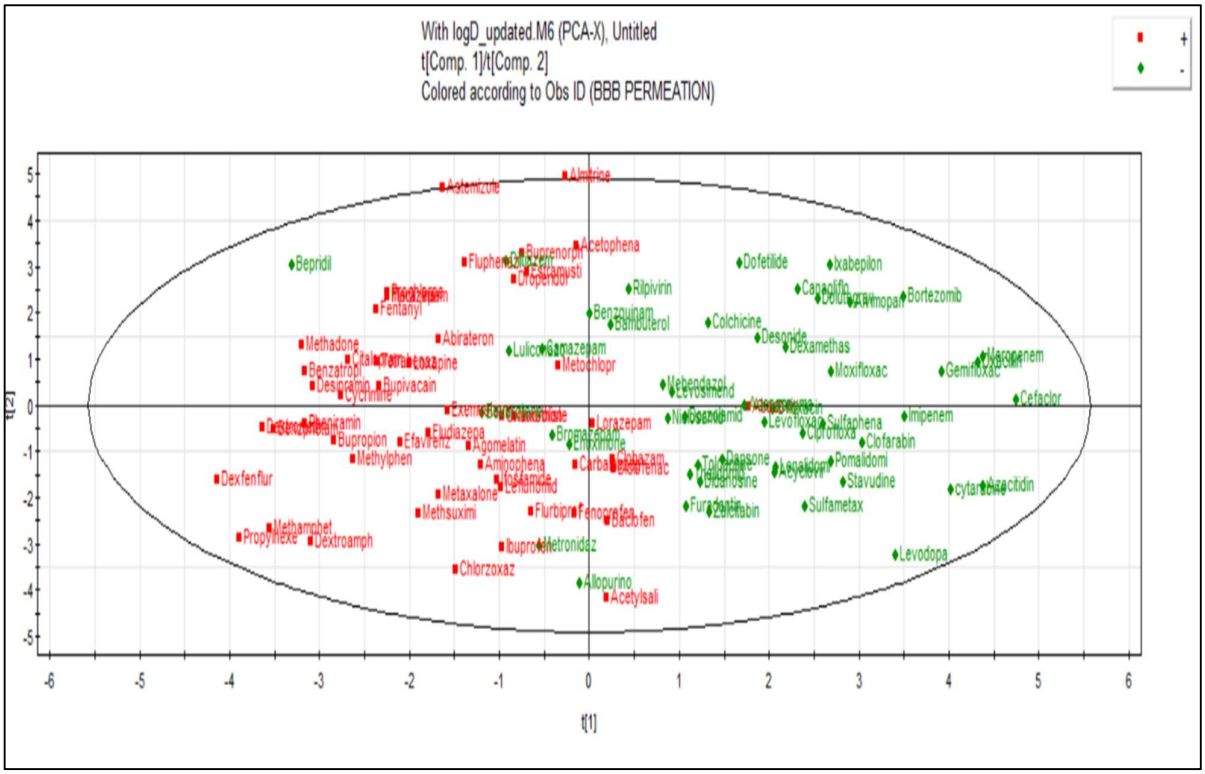
Διάγραμμα 10 : Κατανομή συντελεστή E του Abraham για τις ΑΕΦ + και ΑΕΦ - ενώσεις.



Διάγραμμα 11 : Κατανομή συντελεστή S του Abraham για τις ΑΕΦ + και ΑΕΦ - ενώσεις.

5.2.3 Ανάλυση Κυρίων Συνιστώσων (PCA)

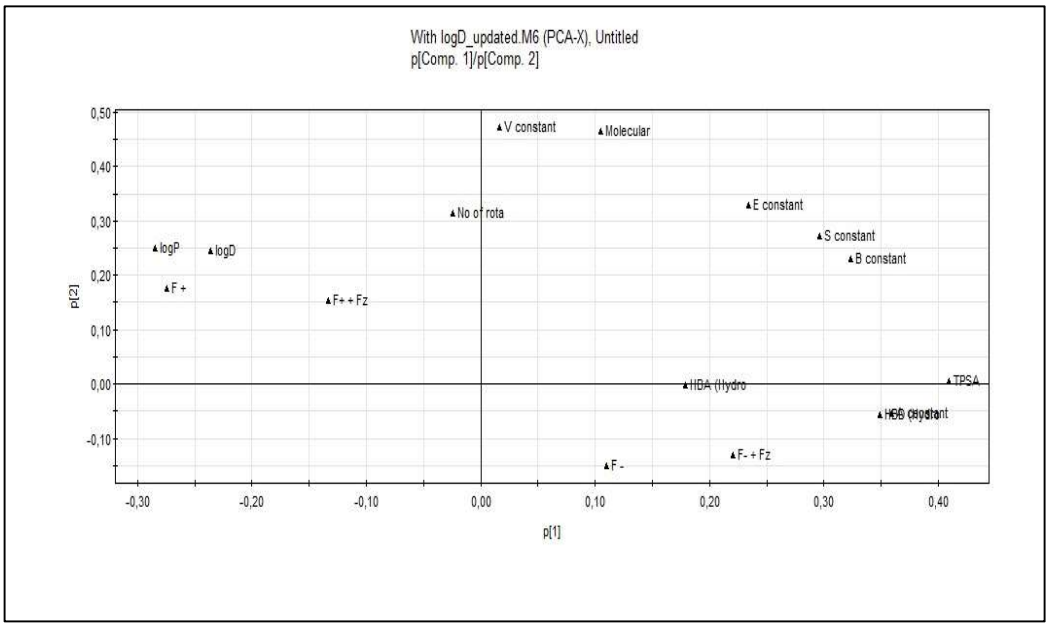
Για την ταξινόμηση των δεδομένων πραγματοποιήθηκε η ανάλυση κυρίων συνιστωσών (PCA) μέσω του υπολογιστικού προγράμματος SIMCA. Το Διάγραμμα 12 παρουσιάζει την κατανομή των φαρμάκων στον νέο χώρο που έχει δημιουργηθεί από τις κύριες συνιστώσες (score-plot). Ειδικότερα, παρουσιάζεται η κατανομή ανάμεσα στις δύο πρώτες συνιστώσες, αφού αυτές εξηγούν καλύτερα το μεγαλύτερο μέρος της διακύμανσης των δεδομένων.



Διάγραμμα 12 : Κατανομή ενώσεων ανάμεσα στις 2 πρώτες κύριες συνιστώσες με την μέθοδο PCA. Με πράσινο χρώμα απεικονίζονται οι ΑΕΦ - ενώσεις, ενώ με κόκκινο οι ΑΕΦ +.

Η μέθοδος PCA ανέλυσε τα δεδομένα σε 4 κύριες συνιστώσες και η ακρίβεια του μοντέλου εκφράζεται με τα εξής μεγέθη : $R_x^2 = 0.787$ και $Q_{cum}^2 = 0.449$.

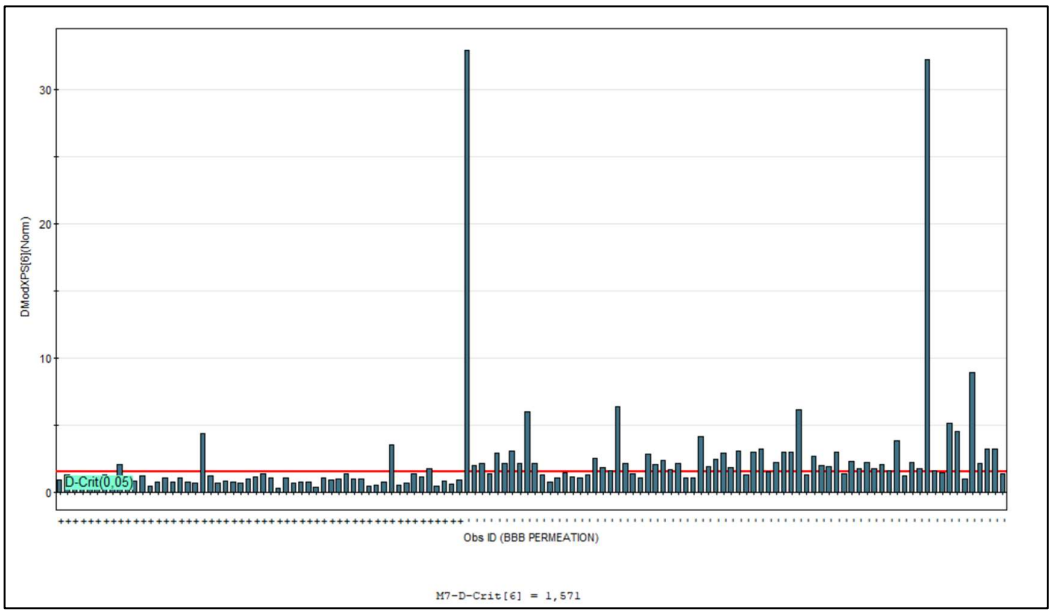
Το Διάγραμμα 13 απεικονίζει την συσχέτιση μεταξύ των μεταβλητών και την επίδραση της καθεμίας στην κάθε κύρια συνιστώσα. Επίσης, μέσα από το διάγραμμα των φορτίων γίνονται εμφανείς οι ομοιότητες και οι διαφορές των μεταβλητών όσον αφορά σην πληροφορία που εκφράζουν στο μοντέλο. Μεταβλητές κοντά η μία στην άλλη εκφράζουν πρακτικά την ίδια πληροφορία και έχουν παρόμοια επιρροή στο μοντέλο.



Διάγραμμα 13 : Διάγραμμα φορτίων (loading-plot). Συσχέτιση μεταβλητών και επίδρασης τους στις κύριες συνιστώσες.

5.2.4 Μοντελοποίηση μίας κλάσης (Class Modelling)

Για την εφαρμογή της μεθόδου μοντελοποίησης μίας κλάσης έγινε και πάλι χρήση του λογισμικού SIMCA. Η συγκεκριμένη μέθοδος είναι μία επιβλεπόμενη μέθοδος ταξινόμησης, δηλαδή πρέπει να είναι γνωστό σε ποια κατηγορία ανήκουν τα δεδομένα, ώστε να κατασκευαστεί το μοντέλο. Έτσι, επιλέχθηκαν τυχαία 43 από τις 54 ενώσεις που διαπερνούν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και κατηγοριοποιήθηκαν ως class 1. Αυτές οι ενώσεις αποτελούν το σύνολο που θα εκπαιδεύσει το μοντέλο (training set) ώστε να μπορέσει να κατηγοριοποιήσει και τις υπόλοιπες ενώσεις, οι οποίες αποτελούν το σύνολο ελέγχου (test set). Το πιο σημαντικό γράφημα αυτής της μεθόδου παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 14. Η κόκκινη γραμμή που απεικονίζεται αντιπροσωπεύει την κρίσιμη απόσταση, κάτω από την οποία τα φάρμακα κατηγοριοποιούνται στο class 1, άρα εμφανίζονται ως ΑΕΦ +, ενώ όσα είναι πάνω από την γραμμή δεν ανήκουν σε αυτό το class και άρα δεν φαίνονται ως ΑΕΦ- . Οι αποστάσεις των ενώσεων από την κρίσιμη απόσταση και η προκύπτουσα τάξη τους καταγράφονται στον Πίνακα 5 για τις ΑΕΦ + και Πίνακα 6 για τις ΑΕΦ -. Επίσης, για τα αποτελέσματα προέκυψαν τα εξής νούμερα : $R_x^2 = 0.931$ και $Q_{cum}^2 = 0.690$.



Διάγραμμα 14 : Αποτέλεσμα μεθόδου μοντελοποίησης μίας κλάσης.

Πίνακας 5 :

Απόσταση παρατηρήσεων από το μοντέλο για τις ενώσεις που διαπερνούν τον ΑΕΦ (class 1) και σύγκριση πραγματικής και προβλεπόμενης από το μοντέλο κλάσης.

Φαρμακευτική Ένωση	Απόσταση από το μοντέλο	Πραγματική κλάση	Προβλεπόμενη κλάση	Σύνολο δεδομένων
Abacavir	0.99	1	1	Training Set
Abiraterone	1.38	1	1	Training Set
Acetophenazine	0.76	1	1	Training Set
Acetylsalicylic acid	0.61	1	1	Training Set
Agomelatine	0.75	1	1	Training Set
Almitrine	1.02	1	1	Training Set
Aminophenazone	1.31	1	1	Training Set
Astemizole	1.23	1	1	Training Set
Baclofen	2.08	1	**0**	Training Set

Benzatropine	0.79	1	1	Training Set
Benzphetamine	0.92	1	1	Training Set
Buprenorphine	1.24	1	1	Training Set
Bupivacaine	0.53	1	1	Training Set
Bupropion	0.79	1	1	Training Set
Carbamazepine	1.12	1	1	Training Set
Chlorzoxazone	0.82	1	1	Training Set
Citalopram	1.08	1	1	Training Set
Clobazam	0.78	1	1	Training Set
Cycrimine	0.70	1	1	Training Set
Desflurane	4.38	1	**0**	Training Set
Desipramine	1.23	1	1	Training Set
Dexfenfluramine	0.70	1	1	Training Set
Dextroamphetamine	0.88	1	1	Training Set
Dextromethorphan	0.78	1	1	Training Set
Diclofenac	0.70	1	1	Training Set
Droperidol	1.05	1	1	Training Set
Efavirenz	1.20	1	1	Training Set
Estramustine	1.41	1	1	Training Set
Exemestane	1.11	1	1	Training Set
Fenoprofen	0.35	1	1	Training Set

Fentanyl	1.10	1	1	Training Set
Fludiazepam	0.76	1	1	Training Set
Fluphenazine	0.83	1	1	Training Set
Flurazepam	0.83	1	1	Training Set
Flurbiprofen	0.43	1	1	Training Set
Ibuprofen	1.10	1	1	Training Set
Ifosfamide	0.95	1	1	Training Set
Leflunomide	1.06	1	1	Training Set
Lorazepam	1.39	1	1	Training Set
Loxapine	1.01	1	1	Training Set
Meclizine	1.06	1	1	Training Set
Metaxalone	0.51	1	1	Training Set
Methadone	0.54	1	1	Training Set
Methamphetamine	0.81	1	1	Test Set
Methotrexate	3.58	1	**0**	Test Set
Methsuximide	0.61	1	1	Test Set
Methylphenidate	0.74	1	1	Test Set
Metochlopramide	1.44	1	1	Test Set
Norethisterone	1.15	1	1	Test Set
Oxandrolone	1.84	1	**0**	Test Set
Pheniramine	0.52	1	1	Test Set

Prochlorperazine	0.85	1	1	Test Set
Propylhexedrine	0.68	1	1	Test Set
Tetrabenazine	0.92	1	1	Test Set

Πίνακας 6:

Απόσταση παρατηρήσεων από το μοντέλο για τις ενώσεις που δεν διαπερνούν τον ΑΕΦ (class 0) και σύγκριση πραγματικής και προβλεπόμενης από το μοντέλο κλάσης.

Φαρμακευτική Ένωση	Απόσταση από το μοντέλο	Πραγματική κλάση	Προβλεπόμενη κλάση
5-Fluorouracil	32.91	0	0
Acenocoumarol	2.03	0	0
Acyclovir	2.18	0	0
Allopurinol	1.44	0	**1**
Alvimopan	2.97	0	0
Amiodarone	2.22	0	0
Amoxicillin	3.10	0	0
Azacitidine	2.17	0	0
Azythromycin	6.06	0	0
Bambuterol	2.16	0	0
Benzquinamide	1.36	0	**1**
Bepridil	0.78	0	**1**
Bexarotene	1.14	0	**1**

Bortezomib	1.47	0	**1**
Bromazepam	1.18	0	**1**
Camazepam	1.12	0	**1**
Canagliflozin	1.36	0	**1**
Cefaclor	2.60	0	0
Cefamandole	1.88	0	0
Cefpodoxime	1.67	0	0
Ceftalorine	6.41	0	0
Ciprofloxacin	2.21	0	0
Clofarabine	1.45	0	**1**
Colchicine	1.09	0	**1**
Conivaptan	2.90	0	0
cytarabine	2.09	0	0
Dapsone	2.44	0	0
Desonide	1.72	0	0
Dexamethasone	2.15	0	0
Didanosine	1.13	0	**1**
Diltiazem	1.07	0	**1**
Docetaxel	4.18	0	0
Dofetilide	1.96	0	0
Dolutegravir	2.47	0	0

Doripenem	2.97	0	0
Dorzolamide	1.90	0	0
Doxorubicin	3.10	0	0
Enoximone	1.33	0	**1**
Ertapenem	3.02	0	0
Furadantin	3.26	0	0
Gemifloxacin	1.54	0	**1**
Imipenem	2.26	0	0
Indinavir	3.01	0	0
Ixabepilone	3.04	0	0
Kanamycin	6.16	0	0
Lenalidomide	1.32	0	**1**
Levodopa	2.75	0	0
Levofloxacin	2.05	0	0
Levosimendan	1.95	0	0
Luliconazole	2.99	0	0
Mebendazole	1.38	0	**1**
Meropenem	2.34	0	0
Metronidazole	1.77	0	0
Moxifloxacin	2.26	0	0
Niclosamide	1.80	0	0

Ofloxacin	2.12	0	0
Oxacillin	1.65	0	0
Paclitaxel	3.88	0	0
Pomalidomide	1.29	0	**1**
Rilpivirine	2.25	0	0
Sevoflurane	1.80	0	0
Stavudine	32.23	0	0
Sulfametaxazole	1.67	0	0
Sulfaphenazole	1.50	0	**1**
Tacrolimus	5.19	0	0
Telithromycin	4.58	0	0
Thalidomide	1.01	0	**1**
Tobramycin	8.96	0	0
Tolcapone	2.20	0	0
Vinblastine	3.25	0	0
Vincristine	3.25	0	0
Zalcitabine	1.42	0	**1**

5.2.5 Διακριτή Ανάλυση μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-DA).

Τέλος, μέσω του στατιστικού προγράμματος XLSTAT του Excel εφαρμόστηκε η μέθοδος της διακριτής ανάλυσης μερικών ελαχίστων τετραγώνων. Σκοπός είναι η εξαγωγή μίας συνάρτησης που θα μπορεί να προβλέψει το αν μία ένωση είναι ικανή να διαπερνά τον ΑΕΦ ή όχι, χρησιμοποιώντας μόνο τις τιμές των μεταβλητών που έχουν

ήδη παρουσιαστεί. Στην συγκεκριμένη περίπτωση ως μεταβλητή y χρησιμοποιείται η κατηγορική μεταβλητή της διαπερατότητας, η οποία δίνει ως αποτέλεσμα το 0 αν η ένωση δεν διαπερνά τον φραγμό ή 1 αν η ένωση τον διαπερνά. Από την μέθοδο προκύπτουν δύο συναρτήσεις κατηγοριοποίησης, μία για την κατηγορία 0 (Εξίσωση 7) και μία για την κατηγορία 1 (Εξίσωση 8).

Συναρτήσεις κατηγοριοποίησης:

$$F(0) = 0.059 + 0.00019 * MW - 0.009 * logD - 0.015 * logP + 0.001 * TPSA - 0{,}068 * F^{+} + 0.017 * F^{-} + 0.007 * (F^{-} + Fz) - 0.026 * (F^{+} + Fz) + 0.005 * HBA + 0{,}017 * HBD + 0.005 * Περ.Δεσμοί + 0.078 * A + 0.041 * B + 0.039 * E + 0.043 * S + 0.018 * V \quad (7)$$

$$F(1) = 0.94 - 0.0019 * MW + 0.015logP - 0.001 * TPSA - 0{,}068 * F^{+} - 0.017 * F^{-} - 0.007 * (F^{-} + Fz) + 0.026 * (F^{+} + Fz) - 0.005 * HBA - 0{,}017 * HBD - 0.005 * Περ.Δεσμοί - 0.078 * A - 0.041 * B - 0.039 * E - 0.043 * S - 0.018 * V \quad (8)$$

Για κάθε δείγμα υπολογίζονται και οι δύο συναρτήσεις και εάν ισχύει $F(0) > 0.5$ η ένωση κατατάσσεται στην κατηγορία 0 (δεν διαπερνά τον ΕΦ), ενώ εάν ισχύει $F(1) > 0.5$, η ένωση κατατάσσεται στην κατηγορία 1 (διαπερνά τον ΑΕΦ). Τα αποτελέσματα φαίνονται στον Πίνακα 7.

Πίνακας 7

Αποτελέσματα μεθόδου PLS-DA, παρατηρούμενη και προβλεπόμενη από το μοντέλο κλάση των ενώσεων.

Observation	Τοξικότητα (παρατ)	Τοξικότητα (προβλ)	Observation	Τοξικότητα (παρατ)	Τοξικότητα (προβλ)	Observation	Τοξικότητα (παρατ)	Τοξικότητα (προβλ)
Obs1	1	**0**	Obs43	1	1	Obs86	0	0
Obs2	1	1	Obs44	1	1	Obs87	0	0
Obs3	1	**0**	Obs45	1	**0**	Obs88	0	0
Obs4	1	1	Obs46	1	1	Obs89	0	0

Obs5	1	1	Obs47	1	1	Obs90	0	0
Obs6	1	**0**	Obs48	1	1	Obs91	0	0
Obs7	1	1	Obs49	1	1	Obs92	0	**1**
Obs8	1	1	Obs50	1	1	Obs93	0	0
Obs9	1	1	Obs51	1	1	Obs94	0	0
Obs10	1	1	Obs52	1	1	Obs95	0	0
Obs11	1	1	Obs53	1	1	Obs96	0	0
Obs12	1	1	Obs54	1	1	Obs97	0	0
Obs13	1	1	Obs55	0	0	Obs98	0	0
Obs14	1	1	Obs56	0	0	Obs99	0	0
Obs15	1	1	Obs57	0	0	Obs100	0	0
Obs16	1	1	Obs58	0	**1**	Obs101	0	0
Obs17	1	1	Obs59	0	0	Obs102	0	0
Obs18	1	1	Obs60	0	**1**	Obs103	0	0
Obs19	1	1	Obs61	0	0	Obs104	0	**1**
Obs20	1	1	Obs62	0	0	Obs105	0	0
Obs21	1	1	Obs63	0	0	Obs106	0	0
Obs22	1	1	Obs64	0	0	Obs107	0	**1**
Obs23	1	1	Obs65	0	0	Obs108	0	0

Obs24	1	1	Obs66	0	**1**	Obs109	0	0
Obs25	1	1	Obs67	0	**1**	Obs110	0	0
Obs26	1	1	Obs68	0	0	Obs111	0	0
Obs27	1	1	Obs69	0	**1**	Obs112	0	0
Obs28	1	1	Obs70	0	**1**	Obs113	0	0
Obs29	1	1	Obs72	0	0	Obs114	0	0
Obs30	1	1	Obs73	0	0	Obs115	0	**1**
Obs31	1	1	Obs74	0	0	Obs116	0	0
Obs32	1	1	Obs75	0	0	Obs117	0	0
Obs33	1	1	Obs76	0	0	Obs118	0	0
Obs34	1	1	Obs77	0	0	Obs119	0	0
Obs35	1	1	Obs78	0	0	Obs120	0	0
Obs36	1	1	Obs79	0	0	Obs121	0	0
Obs37	1	1	Obs80	0	0	Obs122	0	0
Obs38	1	1	Obs81	0	0	Obs123	0	0
Obs39	1	1	Obs82	0	0	Obs124	0	0
Obs40	1	1	Obs83	0	0	Obs125	0	0
Obs41	1	1	Obs84	0	0	Obs126	0	0
Obs42	1	1	Obs85	0	**1**	Obs71	0	0

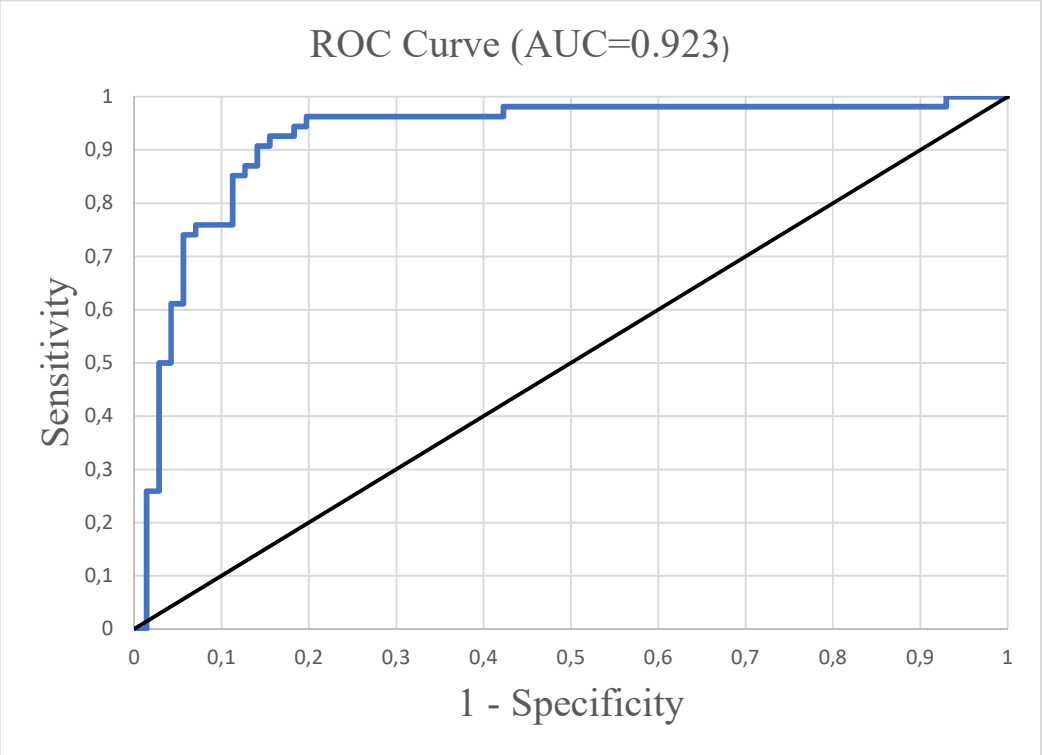
Από την σύγκριση μεταξύ των παρατηρούμενων και των προβλεπόμενων τιμών είναι δυνατό να υπολογιστεί η ευαισθησία και η ειδικότητα του μοντέλου. Η ευαισθησία θα ισοδυναμεί με το κλάσμα :

$$\frac{Αριθμός\ ΑΕΦ +\ ενώσεων\ που\ κατατάσσονται\ σωστά\ στο\ class\ 1}{Συνολικός\ αριθμός\ ΑΕΦ +\ ενώσεων} = \frac{50}{54} = 92.6\ \%$$

Και αντίστοιχα η ειδικότητα του μοντέλου είναι ίση με το κλάσμα:

$$\frac{Αριθμός\ ΑΕΦ -\ ενώσεων\ που\ δεν\ κατατάσσονται\ \ στο\ class\ 1}{Συνολικός\ αριθμός\ ΑΕΦ -\ ενώσεων} = \frac{61}{72} = 84.7\%$$

Η σχέση αυτών των δύο μεγεθών είναι εμφανής και στο Διάγραμμα 15 . Η ιδανική περίπτωση είναι η γραμμή να εφάπτεται με την οριζόντια στον άξονα χ γραμμή ίση με το 1. Όσο πιο κοντά είναι στην διαγώνιο γραμμή η καμπύλη, τόσο πιο τυχαίο είναι το μοντέλο και άρα μη αξιόπιστο. Ένα μέγεθος που υποδηλώνει την σχέση μεταξύ των δύο μεγεθών είναι το εμβαδόν κάτω από την καμπύλη (AUC). Στο παρακάτω διάγραμμα το εμβαδόν λαμβάνει την τιμή AUC=0.923. Πρακτικά, αυτό σημαίνει ότι για δύο σημεία που ανήκουν σε διαφορετικές κατηγορίες, το μοντέλο έχει πιθανότητα ίση με 92.3% να τα διαχωρίσει και να τα κατηγοριοποιήσει σωστά στις ανάλογες κλάσεις.



Διάγραμμα 15 : Καμπύλη συσχέτισης ευαισθησίας – ειδικότητας μοντέλου.

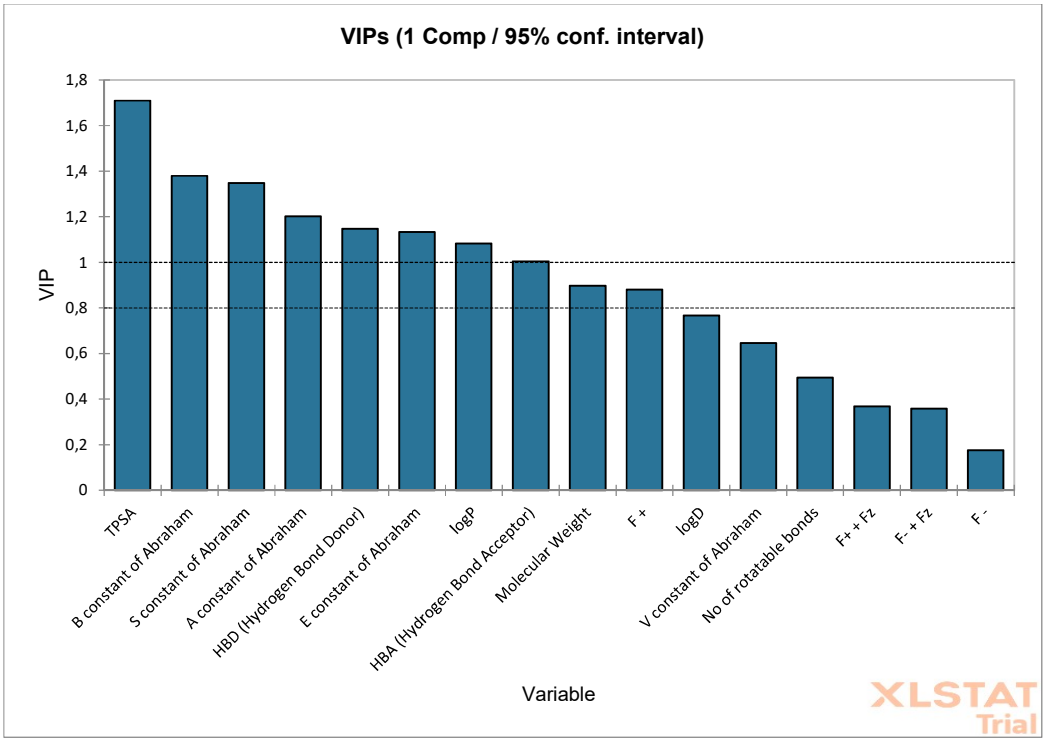
Από το μοντέλο υπολογίζεται επίσης και η ποιότητά του μέσω των μεγεθών R_x^2 και Q_{cum}^2, όπως φαίνεται στον Πίνακα 8:

Πίνακας 8

Ποιότητα μοντέλου ανάλυσης PLS.

Ποιότητα μοντέλου	
Q_{cum}^2	0.361
R_x^2	0.385

Στο διάγραμμα 16 παρουσιάζεται η συνεισφορά της κάθε μεταβλητής στο μοντέλο. Έτσι, γίνεται εμφανές ποιες μεταβλητές διαδραματίζουν σημαντικότερο ρόλο και πρέπει να ληφθούν υπόψη περισσότερο σε σχέση με τις υπόλοιπες.



Διάγραμμα 16 : Συνεισφορά κάθε μεταβλητής στην κατασκευή του μοντέλου διακριτής ανάλυσης PLS (Variable Importance in the Projection (VIP)).

6. Συζήτηση αποτελεσμάτων

6.1 Διαγράμματα κατανομής

Τα διαγράμματα κατανομής καταστρώθηκαν αφού έγινε σύγκριση των μέσων όρων για κάθε μεταβλητή σε κάθε κατηγορία ενώσεων μέσω του στατιστικού ελέγχου t-test. Ο έλεγχος έδειξε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ ορισμένων μεταβλητών. Παρακάτω αναλύονται εκτενέστερα οι διαφορές που παρατηρήθηκαν.

Αρχικά, στο διάγραμμα κατανομής του μοριακού βάρους για τις δύο κατηγορίες ενώσεων (Διάγραμμα 1) , παρατηρείται ότι οι ενώσεις που δεν διαπερνούν τον ΑΕΦ συγκεντρώνονται περισσότερο σε μοριακά βάρη της τάξεως των 400 kg/mol και άνω, σε σχέση με τις υπόλοιπες. Οι τελευταίες, αντίθετα, εμφανίζουν χαμηλότερα μοριακά βάρη, γεγονός λογικό εφόσον για να διαπεράσει ένα μόριο τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, απαιτείται να είναι μικρό σε μέγεθος. Ειδικότερα, η πλειοψηφία των ενώσεων που τον διαπερνούν εντοπίζεται σε μοριακά βάρη της τάξεως των 350 kg/mol και κάτω. Έτσι, ως ένα αρχικό συμπέρασμα θα μπορούσε να ειπωθεί ότι η τιμή αποκοπής για το μοριακό βάρος είναι περίπου το εύρος τιμών 350-400.

Στο διάγραμμα της κατανομής του logP (Διάγραμμα 2) τα περισσότερα ΚΝΣ φάρμακα παρουσιάζουν τιμές του συντελεστή μερισμού στο εύρος 4 – 6, ενώ τα μη ΚΝΣ είναι κατανεμημένα σε χαμηλότερες τιμές του logP. Ως τιμή αποκοπής θα ήταν πιθανό να οριστεί η τιμή $logP = 4$.

Στην κατανομή του συντελεστή κατανομής logD οι διαφορές μεταξύ των δύο κατηγοριών δεν είναι τόσο εμφανής. Για τις ενώσεις που περνούν τον ΑΕΦ παρατηρείται ότι κατανέμονται περισσότερο στο εύρος logD=0-2 ενώ υπάρχουν και ορισμένες ενώσεις που έχουν ακραίες τιμές συντελεστή μερισμού (-6,6). Παρόμοιες παρατηρήσεις εξάγονται και για τα φάρμακα που δεν δρουν στο ΚΝΣ, καθώς πολλά φάρμακα κατανέμονται στο εύρος 0 – 4 αλλά και στο -2, ενώ και πάλι υπάρχουν ενώσεις με ακραίες τιμές (-8,8).

Συσχέτιση μεταξύ της διαπερατότητας του ΑΕΦ και της πολικής επιφάνειας παρατηρείται στο αντίστοιχο διάγραμμα κατανομής της για τα δύο σύνολα ενώσεων. Ειδικότερα, για τις ενώσεις που τον διαπερνούν παρατηρούνται μεγαλύτερες πολικές επιφάνειες με κατανομή από $100\,Å^2$ και άνω, ενώ οι υπόλοιπες ενώσεις συγκεντρώνονται περισσότερο σε χαμηλότερες τιμές επιφανειών, από $100\,Å^2$ περίπου

και κάτω. Άρα, η τιμή 100 θα μπορούσε να οριστεί ως τιμή αποκοπής για την ολική τοπολογική πολική επιφάνεια ενός μορίου.

Πολύ μεγάλη διαφοροποίηση παρατηρείται στην κατανομή του αριθμού δεκτών δεσμών υδρογόνου HBA. Πιο συγκεκριμένα, οι κατανομές για τις δύο κατηγορίες εντοπίζονται σε αντίθετα άκρα, με τις ΑΕΦ + να συγκεντρώνονται ολοένα και πιο πολύ σε μεγαλύτερες τιμές HBA, από 8 έως 18 περίπου δέκτες, ενώ οι ΑΕΦ - από 0 έως 6. Έτσι, γίνεται ξεκάθαρη η συσχέτιση μεταξύ της τοξικότητας και του αριθμού δεκτών στους δεσμούς υδρογόνου που σχηματίζει ένα μόριο και μπορεί να διακριθεί μία τιμή αποκοπής περίπου ίση με 6. Επίσης, για την μεταβλητή HBD η διαφοροποίηση δεν είναι μεγάλη μεταξύ των δύο σετ δεδομένων. Παρ'όλα αυτά, παρατηρείται ότι οι ΑΕΦ + έχουν λιγότερους δότες δεσμού υδρογόνου από τις ΑΕΦ- , έως και καθόλου, εφόσον οι περισσότερες βρίσκονται στην τιμή 0. Για τους περιστρεφόμενους δεσμούς δεν παρατηρείται κάποια αξιοσημείωτη διαφορά μεταξύ των δύο κατανομών, με τις περισσότερες ΑΕΦ+ να κατέχουν από 0 έως 2 δεσμούς και τις ΑΕΦ- 2 έως 4.

Όσον αφορά στις σταθερές του Abraham οι ενώσεις που εισχωρούν στον αιματοεγκεφαλικό φραγμό κατανέμονται σε μεγάλο βαθμό στο εύρος 0.5-1 για την σταθερά A, από 1,5 και άνω για την σταθερά B, στο εύρος 2 -3 για την σταθερά E και από 2.5 και άνω για την σταθερά S. Αντίστοιχα τα φάρμακα που δεν διαπερνούν τον ΑΕΦ κατανέμονται στου εύρος 0 με 0.5 για την σταθερά A, 0.5 με 2 για την σταθερά B, 1.5-2.5 για την σταθερά E και 1.5-2.5 για την σταθερά S.

6.2 Ανάλυση κύριων συνιστωσών

Από το διάγραμμα των παρατηρήσεων (Διάγραμμα 12) είναι εμφανής η κατανομή των δύο κατηγοριών των φαρμάκων ανάμεσα στις δύο συνιστώσες. Η πρώτη συνιστώσα έχει κατηγοριοποιήσει επιτυχώς τις ενώσεις, αφού αριστερά από αυτήν κατανέμονται όσες διαπερνούν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό με κόκκινο χρώμα και δεξιά της με πράσινο χρώμα όσες δεν τον διαπερνούν. Η ποιότητα του μοντέλου κρίνεται ικανοποιητική και επισημαίνεται με τα δύο μεγέθη : $R_x^2 = 0.787$ και $Q_{cum}^2 = 0.449$. Όσο πιο κοντά στην μονάδα είναι, τόσο πιο ακριβές και αξιόπιστο είναι η ανάλυση και η ταξινόμηση των δεδομένων.

Το Διάγραμμα 13 απεικονίζει την συνεισφορά των μελετούμενων μεταβλητών στην διαμόρφωση των συνιστωσών και την συσχέτιση μεταξύ τους. Το διάνυσμα της

προβολής του σημείου κάθε μεταβλητής δείχνει και το βάρος αυτής στην συνιστώσα στην οποία προβάλλεται. Δηλαδή, παίρνοντας την προβολή του logP για παράδειγμα τόσο στον άξονα χ όσο και στον άξονα y, διαπιστώνεται ότι επηρεάζει περισσότερο την πρώτη συνιστώσα από ότι την δεύτερη. Έτσι, διαπιστώνεται ότι η TPSA, το logD, το logP καθώς και το θετικό φορτίου της ένωσης σε φυσιολογικό pH, συμβάλλουν περισσότερο στην διαμόρφωση της πρώτης κύριας συνιστώσας. Επίσης, παρατηρείται ότι ορισμένες μεταβλητές, όπως ο αριθμός δοτών δεσμών υδρογόνου και η σταθερά A του Abrahan, τοποθετούνται πολύ κοντά η μία στην άλλη και άρα εκφράζουν την ίδια πληροφορία για τα δεδομένα.

6.3 Μοντελοποίηση μίας κλάσης

Η μοντελοποίηση μίας κλάσης με την χρήση του λογισμικού SIMCA κατηγοριοποίησε αποτελεσματικά τις δύο κατηγορίες ενώσεων, όπως φαίνεται και στο Διάγραμμα 14 . Το μοντέλο κατέταξε σωστά στο class 1, δηλαδή ΑΕΦ+, 41 από τις 43 ενώσεις του training set, ενώ από το test set κατατάχθηκαν σωστά τα 9 από τα 11 φάρμακα. Έτσι, η ευαισθησία του μοντέλου περιγράφεται από τα εξής ποσοστά : $\frac{41}{43} = 95.4\ \%$ για το training set και $\frac{9}{11} = 81.8\ \%$ για το test set. Συνολικά για τις ενώσεις που δεν διαπερνούν τον ΑΕΦ θα ισχύει το ποσοστό : $\frac{41+9}{54} = 92.6\ \%$. Όσον αφορά την ειδικότητα του μοντέλου, από τις 72 ενώσεις που είναι γνωστό ότι δεν διαπερνούν τον ΑΕΦ, οι 20 από αυτές κατατάχθηκαν ψευδώς στην class 1. Άρα, η ειδικότητα του μοντέλου είναι : $\frac{52}{72} = 72.2\%$. Πρακτικά αυτό σημαίνει ότι υπάρχει πιθανότητα ίση με 92.6% να γίνει σωστή κατηγοριοποίηση μίας ένωσης ως ΑΕΦ + από το μοντέλο που κατασκευάστηκε και πιθανότητα 72.2% σωστής μη κατηγοριοποίησης μίας ένωσης ως ΑΕΦ +.

Τέλος, για την ακρίβεια της μοντελοποίησης προέκυψαν τα εξής νούμερα: $R_x^2 = 0.931$ και $Q_{cum}^2 = 0.690$. Η ιδανική περίπτωση είναι τα μεγέθη αυτά να είναι ίσα με την μονάδα. Ωστόσο, κάτι τέτοιο δεν είναι εφικτό για ανάλυση που βασίζεται σε βιολογικά δεδομένα και έτσι η ακρίβεια του μοντέλου κρίνεται ικανοποιητική, αφού δεν βρίσκονται πολύ μακριά από την μονάδα.

6.4 Διακριτή Ανάλυση μερικών ελαχίστων τετραγώνων

Το μοντέλο διακριτής ανάλυσης μερικών ελαχίστων τετραγώνων έδωσε τις εξής τιμές για τα R_x^2 και Q_{cum}^2 : $R_x^2 = 0.385$ και $Q_{cum}^2 = 0.361$. Οι τιμές αυτές, κρίνονται μέτριες καθώς είναι αρκετά μακριά από την μονάδα, γεγονός που υποδηλώνει ότι το μοντέλο δεν έχει μεγάλη προβλεπτική ισχύ. Μέσω των συναρτήσεων κατηγοριοποίησης που προέκυψαν, ταξινομήθηκαν σωστά στην κατηγορία 1 (διέλευση από τον ΑΕΦ) 50 από τα 54 φάρμακα και άρα θα ισχύει: $ευαισθησία = \frac{50}{54} = 92.6\%$ και στην κατηγορία 0, 61 από τα 72 φάρμακα, άρα : $ειδικότητα = \frac{61}{72} = 84.7\%$. Από το Διάγραμμα 16 γίνεται εμφανές ότι το εμβαδό της τοπολογικής πολικής επιφάνειας συνεισφέρει περισσότερο από τις άλλες μεταβλητές στο μοντέλο, μαζί με τις σταθερές B,S,A του Abraham, τον αριθμό δοτών δεσμών υδρογόνου, το logP και το μοριακό βάρος.

7. Συμπεράσματα

Με γνώμονα τα παραπάνω αποτελέσματα, πραγματοποιηθήκε με επιτυχία η συσχέτιση των μεταβλητών που μελετήθηκαν με την εμφάνιση διαπερατότητας των φαρμακομορίων στον αιματοεγκεφαλικό φραγμό του εγκεφάλου. Επίσης, κατασκευάστηκαν σχετικά αξιόπιστα μοντέλα για την πρόβλεψη της δυνατότητας υποψήφιων φαρμάκων να διαπερνούν τον φραγμό και να δρουν στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα.

Οι κατανομές των τιμών των μεταβλητών των δύο κατηγοριών ενώσεων, έδειξαν ότι υπήρχε σημαντική συσχέτιση μεταξύ διαπερατότητας ΑΕΦ και μοριακού βάρους, logP, TPSA, του αριθμού δεκτών δεσμού υδρογόνου και των σταθερών A,B και S του Abraham. Επίσης, παρατηρήθηκαν cut-off τιμές στα διαγράμματα, οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως όρια για την δυνατότητα εισχώρησης στο ΚΝΣ. Αντίθετα, για τις υπόλοιπες μεταβλητές, οι διαφοροποιήσεις δεν ήταν τόσο εμφανείς και άρα δεν μπορούν να εξαχθούν χρήσιμα συμπεράσματα.

Η ανάλυση σε κύριες συνιστώσες ταξινόμησε επιτυχώς τα πολυμεταβλητά δεδομένα με την πρώτη συνιστώσα να εντοπίζει την διακύμανση των δεδομένων και να τα διαχωρίζει αποτελεσματικά. Η ανάλυση εμφάνισε ικανοποιητική ακρίβεια με $R_x^2 = 0.787$ και $Q_{cum}^2 = 0.449$.

Η μοντελοποίηση μίας κλάσης αποδείχθηκε μία πολύ χρήσιμη και ισχυρή μέθοδος για την κατηγοριοποίηση των δεδομένων και την πρόβλεψη της δυνατότητας εισχώρησης των ενώσεων στον αιματοεγκεφαλικό φραγμό. Η αποτελεσματικότητα του μοντέλου φαίνεται από την ευαισθησία (92.6 %) και την ειδικότητά του (72.2%.).

Τέλος, μέσω της διακριτής ανάλυσης μερικών ελαχίστων τετραγώνων έγινε εφικτός ο προσδιορισμός συναρτήσεων κατηγοριοποίησης. Η μέθοδος αυτή αποδείχθηκε ιδιαίτερα χρήσιμη και αποτελεσματική για την περιγραφή των ήδη υπάρχοντων δεδομένων, ωστόσο κρίνοντας από τις τιμές $R_x^2 = 0.385$ και $Q_{cum}^2 = 0.361$ κρίνεται απαραίτητη η βελτίωσή του, για την εφαρμογή του σε αναλύσεις άλλων συνόλων δεδομένων.

8. Προτάσεις για βελτίωση

Η δυνατότητα που έχει μία ένωση να διαπερνά τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό διαδραματίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη υποψηφίων φαρμάκων, όσον αφορά την δράση τους στο κεντρικό νευρικό σύστημα και την εμφάνιση ανεπιθύμητων παρενεργειών σε αυτό. Έτσι, κρίνεται αναγκαία η περαιτέρω μελέτη και ανάπτυξη τέτοιων προβλεπτικών μοντέλων, όπως αυτό που παρουσιάστηκε στην παρούσα διπλωματική, καθώς εξοικονομούν χρόνο και χρήμα κατά την διάρκεια των ερευνών για την ανακάλυψη νέων φαρμάκων.

Αρχικά, ένας τρόπος βελτίωσης του μοντέλου είναι η συλλογή ακόμα περισσότερων ενώσεων, ώστε να υπάρχει μεγαλύτερη διαφοροποίηση των δεδομένων και έτσι το μοντέλο θα έχει μεγαλύτερη προβλεπτική ικανότητα και μεγαλύτερη αξιοπιστία, όσον αφορά την περιγραφή άλλων ενώσεων.

Επίσης, θα μπορούσαν να εμπλουτιστούν τα δεδομένα με χρήση δεδομένων βιομιμητικής χρωματογραφίας και διάφορων χρωματογραφικών συντελεστών, με σκοπό την αύξηση της προβλεπτικής ικανότητας του μοντέλου.

Τέλος, στην εποχή των μεγάλων όγκων δεδομένων και της τεχνητής νοημοσύνης, τόσο η χημειομετρία όσο και η πρόβλεψη της τοξικότητας και της δράσης των φαρμάκων, μπορεί να επωφεληθεί σε πολύ μεγάλο βαθμό από μεθόδους μηχανικής μάθησης . Τέτοιες μέθοδοι περιλαμβάνουν μεταξύ άλλων : βαθιά μάθηση (deep learning), νευρωνικά δίκτυα, ταξινόμηση κατά Bayes και μηχανές διανυσμάτων υποστήριξης (support vector machines). Τα εργαλεία αυτά ενδείκνυνται για την διαχείριση μεγάλου όγκου δεδομένων και άρα μπορούν να αποτελέσουν πολύ ισχυρά εργαλεία για την ανάπτυξη προβλεπτικών μοντέλων.

9. Βιβλιογραφία

[1] Graham L. Patrick, *Φαρμακευτική Χημεία*, 1st Novemb. Athens: Εκδόσεις Κριτική, 2021.

[2] Β. Δημόπουλος and Τ.-Κ. Άννα, *Βασικές Αρχές Σχεδιασμού και Ανάπτυξης φαρμάκων*. 2015.

[3] K. Whalen, *Illustrated Reviews : Pharmacology*, vol. 3, no. April. 2015.

[4] J. A. Rosier, M. A. Martens, and J. R. Thomas, *Global New Drug Development*. 2014.

[5] "Κλινικές Μελέτες." https://www.novartis.gr/our-work/research-and-development/clinical-trials.

[6] Andreas Reichel, *Pharmacokinetics of Cns Penetration: Blood – Brain Barrier in Drug Discovery Optimizing Brain Exposure of CNS Drugs and Minimizing Brain Side*. 2015.

[7] S. Liebner, C. J. Czupalla, and H. Wolburg, "Current concepts of blood-brain barrier development.," *Int. J. Dev. Biol.*, vol. 55, no. 4–5, pp. 467–476, 2011, doi: 10.1387/ijdb.103224sl.

[8] N. J. Abbott, A. A. K. Patabendige, D. E. M. Dolman, S. R. Yusof, and D. J. Begley, "Structure and function of the blood-brain barrier.," *Neurobiol. Dis.*, vol. 37, no. 1, pp. 13–25, Jan. 2010, doi: 10.1016/j.nbd.2009.07.030.

[9] H. Kadry, B. Noorani, and L. Cucullo, "A blood–brain barrier overview on structure, function, impairment, and biomarkers of integrity," *Fluids Barriers CNS*, vol. 17, no. 1, pp. 1–24, 2020, doi: 10.1186/s12987-020-00230-3.

[10] S. Nag and B. David J, "Blood Brain Barrier, Exchange of metabolites and gases," in *Pathology and Genetics: Cerebrovascular Diseases*, H. Kalimo, Ed. ISN Neuropath Press, 2005, pp. 22–29.

[11] N. J. Abbott, "Dynamics of CNS barriers: evolution, differentiation, and modulation.," *Cell. Mol. Neurobiol.*, vol. 25, no. 1, pp. 5–23, Feb. 2005, doi: 10.1007/s10571-004-1374-y.

[12] S. M. Jeong, K. D. Hahm, J. W. Shin, J. G. Leem, C. Lee, and S. M. Han, "Changes in magnesium concentration in the serum and cerebrospinal fluid of

neuropathic rats.," *Acta Anaesthesiol. Scand.*, vol. 50, no. 2, pp. 211–216, Feb. 2006, doi: 10.1111/j.1399-6576.2006.00925.x.

[13] V. Nischwitz, A. Berthele, and B. Michalke, "Speciation analysis of selected metals and determination of their total contents in paired serum and cerebrospinal fluid samples: An approach to investigate the permeability of the human blood-cerebrospinal fluid-barrier.," *Anal. Chim. Acta*, vol. 627, no. 2, pp. 258–269, Oct. 2008, doi: 10.1016/j.aca.2008.08.018.

[14] H. E. Gendelman *et al.*, "Monocyte chemotactic protein-1 regulates voltage-gated K+ channels and macrophage transmigration.," *J. neuroimmune Pharmacol. Off. J. Soc. NeuroImmune Pharmacol.*, vol. 4, no. 1, pp. 47–59, Mar. 2009, doi: 10.1007/s11481-008-9135-1.

[15] I. Wilhelm *et al.*, "Regulation of cerebral endothelial cell morphology by extracellular calcium.," *Phys. Med. Biol.*, vol. 52, no. 20, pp. 6261–6274, Oct. 2007, doi: 10.1088/0031-9155/52/20/012.

[16] N. J. Abbott, L. Rönnbäck, and E. Hansson, "Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier.," *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 7, no. 1, pp. 41–53, Jan. 2006, doi: 10.1038/nrn1824.

[17] H. Wolburg, S. Noell, K. Wolburg-Buchholz, A. Mack, and P. Fallier-Becker, "Agrin, aquaporin-4, and astrocyte polarity as an important feature of the blood-brain barrier.," *Neurosci. a Rev. J. bringing Neurobiol. Neurol. psychiatry*, vol. 15, no. 2, pp. 180–193, Apr. 2009, doi: 10.1177/1073858408329509.

[18] J. Bernacki, A. Dobrowolska, K. Nierwińska, and A. Małecki, "Physiology and pharmacological role of the blood-brain barrier.," *Pharmacol. Rep.*, vol. 60, no. 5, pp. 600–622, 2008.

[19] A. Nadal, E. Fuentes, J. Pastor, and P. A. McNaughton, "Plasma albumin is a potent trigger of calcium signals and DNA synthesis in astrocytes.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 92, no. 5, pp. 1426–1430, Feb. 1995, doi: 10.1073/pnas.92.5.1426.

[20] M. B. Gingrich and S. F. Traynelis, "Serine proteases and brain damage - is there a link?," *Trends Neurosci.*, vol. 23, no. 9, pp. 399–407, Sep. 2000, doi: 10.1016/s0166-2236(00)01617-9.

[21] D. A. Lim, Y.-C. Huang, and A. Alvarez-Buylla, “The adult neural stem cell niche: lessons for future neural cell replacement strategies.,” *Neurosurg. Clin. N. Am.*, vol. 18, no. 1, pp. 81–92, ix, Jan. 2007, doi: 10.1016/j.nec.2006.10.002.

[22] P. Ballabh, A. Braun, and M. Nedergaard, “The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications.,” *Neurobiol. Dis.*, vol. 16, no. 1, pp. 1–13, Jun. 2004, doi: 10.1016/j.nbd.2003.12.016.

[23] B. Engelhardt, “Development of the blood-brain barrier.,” *Cell Tissue Res.*, vol. 314, no. 1, pp. 119–129, Oct. 2003, doi: 10.1007/s00441-003-0751-z.

[24] T. Dalkara, Y. Gursoy-Ozdemir, and M. Yemisci, “Brain microvascular pericytes in health and disease.,” *Acta Neuropathol.*, vol. 122, no. 1, pp. 1–9, Jul. 2011, doi: 10.1007/s00401-011-0847-6.

[25] A. Armulik, G. Genové, and C. Betsholtz, “Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises.,” *Dev. Cell*, vol. 21, no. 2, pp. 193–215, Aug. 2011, doi: 10.1016/j.devcel.2011.07.001.

[26] E. A. Winkler, R. D. Bell, and B. V Zlokovic, “Central nervous system pericytes in health and disease.,” *Nat. Neurosci.*, vol. 14, no. 11, pp. 1398–1405, Oct. 2011, doi: 10.1038/nn.2946.

[27] C. N. Hall *et al.*, “Capillary pericytes regulate cerebral blood flow in health and disease.,” *Nature*, vol. 508, no. 7494, pp. 55–60, Apr. 2014, doi: 10.1038/nature13165.

[28] C. M. Peppiatt, C. Howarth, P. Mobbs, and D. Attwell, “Bidirectional control of CNS capillary diameter by pericytes.,” *Nature*, vol. 443, no. 7112, pp. 700–704, Oct. 2006, doi: 10.1038/nature05193.

[29] A. P. Sagare *et al.*, “Pericyte loss influences Alzheimer-like neurodegeneration in mice.,” *Nat. Commun.*, vol. 4, p. 2932, 2013, doi: 10.1038/ncomms3932.

[30] M. V Sofroniew and H. V Vinters, “Astrocytes: biology and pathology.,” *Acta Neuropathol.*, vol. 119, no. 1, pp. 7–35, Jan. 2010, doi: 10.1007/s00401-009-0619-8.

[31] L. E. Clarke and B. A. Barres, “Emerging roles of astrocytes in neural circuit development.,” *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 14, no. 5, pp. 311–321, May 2013, doi: 10.1038/nrn3484.

[32] S. Curley and N. Cady, "Biologically-Derived Nanomaterials for Targeted Therapeutic Delivery to the Brain," *Sci. Prog.*, vol. 101, pp. 273–292, 2018, doi: 10.3184/003685018X15306123582346.

[33] X. Liu, M. Tu, R. S. Kelly, C. Chen, and B. J. Smith, "Development of a computational approach to predict blood-brain barrier permeability.," *Drug Metab. Dispos.*, vol. 32, no. 1, pp. 132–139, Jan. 2004, doi: 10.1124/dmd.32.1.132.

[34] P. B. Gahan, "Molecular biology of the cell (4th edn) B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, K. Roberts and P. Walter (eds), Garland Science, 1463 pp., ISBN 0-8153-4072-9 (paperback) (2002)," *Cell Biochem. Funct.*, vol. 23, no. 2, p. 150, 2005, doi: https://doi.org/10.1002/cbf.1142.

[35] D. E. Clark, "In silico prediction of blood-brain barrier permeation.," *Drug Discov. Today*, vol. 8, no. 20, pp. 927–933, Oct. 2003, doi: 10.1016/s1359-6446(03)02827-7.

[36] H. Fischer, R. Gottschlich, and A. Seelig, "Blood-brain barrier permeation: molecular parameters governing passive diffusion.," *J. Membr. Biol.*, vol. 165, no. 3, pp. 201–211, Oct. 1998, doi: 10.1007/s002329900434.

[37] D. S. Miller, "Regulation of ABC transporters blood-brain barrier: the good, the bad, and the ugly.," *Adv. Cancer Res.*, vol. 125, pp. 43–70, 2015, doi: 10.1016/bs.acr.2014.10.002.

[38] B. V Zlokovic, "Neurovascular pathways to neurodegeneration in Alzheimer's disease and other disorders.," *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 12, no. 12, pp. 723–738, Nov. 2011, doi: 10.1038/nrn3114.

[39] Alberts b. - bray d. - hopkin k. - johnson a. - lewis j. - raff m. - roberts k. - walter p., *Βασικές Αρχές Κυτταρικής Βιολογίας*. Broken Hill Publishers, 2015.

[40] L. Lin, S. W. Yee, R. B. Kim, and K. M. Giacomini, "SLC transporters as therapeutic targets: emerging opportunities.," *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 14, no. 8, pp. 543–560, Aug. 2015, doi: 10.1038/nrd4626.

[41] B. V Zlokovic, D. J. Begley, and D. G. Chain-Eliash, "Blood-brain barrier permeability to leucine-enkephalin, D-alanine2-D-leucine5-enkephalin and their N-terminal amino acid (tyrosine).," *Brain Res.*, vol. 336, no. 1, pp. 125–

132, Jun. 1985, doi: 10.1016/0006-8993(85)90423-8.

[42] J. Correale and A. Villa, "The blood-brain-barrier in multiple sclerosis: functional roles and therapeutic targeting.," *Autoimmunity*, vol. 40, no. 2, pp. 148–160, Mar. 2007, doi: 10.1080/08916930601183522.

[43] C. Kaur and E. A. Ling, "Blood brain barrier in hypoxic-ischemic conditions.," *Curr. Neurovasc. Res.*, vol. 5, no. 1, pp. 71–81, Feb. 2008, doi: 10.2174/156720208783565645.

[44] B. S. Desai, A. J. Monahan, P. M. Carvey, and B. Hendey, "Blood-brain barrier pathology in Alzheimer's and Parkinson's disease: implications for drug therapy.," *Cell Transplant.*, vol. 16, no. 3, pp. 285–299, 2007, doi: 10.3727/000000007783464731.

[45] S. Remy and H. Beck, "Molecular and cellular mechanisms of pharmacoresistance in epilepsy.," *Brain*, vol. 129, no. Pt 1, pp. 18–35, Jan. 2006, doi: 10.1093/brain/awh682.

[46] H. Bronger *et al.*, "ABCC drug efflux pumps and organic anion uptake transporters in human gliomas and the blood-tumor barrier.," *Cancer Res.*, vol. 65, no. 24, pp. 11419–11428, Dec. 2005, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-1271.

[47] M. L. Moya *et al.*, "A Reconfigurable In Vitro Model for Studying the Blood-Brain Barrier.," *Ann. Biomed. Eng.*, vol. 48, no. 2, pp. 780–793, Feb. 2020, doi: 10.1007/s10439-019-02405-y.

[48] Y. Persidsky, S. H. Ramirez, J. Haorah, and G. D. Kanmogne, "Blood-brain barrier: structural components and function under physiologic and pathologic conditions.," *J. neuroimmune Pharmacol. Off. J. Soc. NeuroImmune Pharmacol.*, vol. 1, no. 3, pp. 223–236, Sep. 2006, doi: 10.1007/s11481-006-9025-3.

[49] Β. Δημόπουλος, "Επισημάνσεις Χημικής βιολογίας στην Φαρμακοχημεία," 2013.

[50] M. J. Casavant, *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, vol. 288, no. 16. 2002.

[51] A. Leo, C. Hansch, D. Elkins, A. H. Law, and B. N. Behavior, "Leo, A. Hansch,

C. Elkins, D. 1971. Partition Coefficients and their Uses," *Chem. Rev.*, vol. 71, no. 6, pp. 525–616, 1971.

[52] C. Hansch, J. P. Björkroth, and A. Leo, "Hydrophobicity and central nervous system agents: on the principle of minimal hydrophobicity in drug design.," *J. Pharm. Sci.*, vol. 76, no. 9, pp. 663–687, Sep. 1987, doi: 10.1002/jps.2600760902.

[53] B. A. & A. D. J., *Burger's medicinal chemistry and drug discovery (6th ed.). Wiley.*, 6th ed. Wiley, 2003.

[54] M. L. Landry and J. J. Crawford, "Log D Contributions of Substituents Commonly Used in Medicinal Chemistry," *ACS Med. Chem. Lett.*, vol. 11, no. 1, pp. 72–76, 2020, doi: 10.1021/acsmedchemlett.9b00489.

[55] F. N. Tsopelas, M. T. Ochsenkühn-Petropoulou, A. Tsantili-Kakoulidou, and K.-M. Ochsenkühn, "Study of the lipophilicity of selenium species.," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 381, no. 2, pp. 420–426, Jan. 2005, doi: 10.1007/s00216-004-2822-8.

[56] U. Holzgrabe, "Lipophilicity in Drug Action and Toxicology, V. Pliska, B. Testa, H. van der Waterbeemd (Hersg.) VCH, Weinheim, 1996. 438 S. geb. DM 198,–, ISBN 3-527-29383-3," *Pharm. Unserer Zeit*, vol. 28, no. 6, p. 345, 1999, doi: https://doi.org/10.1002/pauz.19990280622.

[57] V. A. Levin, "Relationship of octanol/water partition coefficient and molecular weight to rat brain capillary permeability.," *J. Med. Chem.*, vol. 23, no. 6, pp. 682–684, Jun. 1980, doi: 10.1021/jm00180a022.

[58] H. van de Waterbeemd, G. Camenisch, G. Folkers, J. R. Chretien, and O. A. Raevsky, "Estimation of blood-brain barrier crossing of drugs using molecular size and shape, and H-bonding descriptors.," *J. Drug Target.*, vol. 6, no. 2, pp. 151–165, 1998, doi: 10.3109/10611869808997889.

[59] A. Abelian, M. Dybek, J. Wallach, B. Gaye, and A. Adejare, "Chapter 6 - Pharmaceutical chemistry," in *Remington (Twenty-third Edition)*, Twenty-Thi., A. Adejare, Ed. Academic Press, 2021, pp. 105–128.

[60] L. Schaeffer, *The Role of Functional Groups in Drug - Receptor Interactions*, Fourth Edi. Elsevier Ltd, 2008.

[61] D. M. Wilson *et al.*, "Fragment- and structure-based drug discovery for developing therapeutic agents targeting the DNA Damage Response," *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, vol. 163, pp. 130–142, 2021, doi: https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2020.10.005.

[62] A. M. Doweyko, "Three-Dimensional quantitative structure-activity relationship: The state of the art," *Compr. Med. Chem. II*, vol. 4, pp. 575–595, Nov. 2006, doi: 10.1016/B0-08-045044-X/00266-2.

[63] V. J. Gillet and A. R. Leach, "Chemoinformatics," in *Comprehensive Medicinal Chemistry II*, J. B. Taylor and D. J. Triggle, Eds. Oxford: Elsevier, 2007, pp. 235–264.

[64] W. Jahnke, *Comprehensive Medicinal Chemistry II Volume 3 : Drug Discovery Technologies*, vol. 3. Elsevier, 2006.

[65] J. and M. H. A. William E Acree, "The analysis of solvation in ionic liquids and organic solvents using the Abraham linear free energy relationship," *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, vol. 83, no. May, pp. 1163–1169, 2006, doi: 10.1002/jctb.

[66] M. H. Abraham, A. Ibrahim, and W. E. J. Acree, "Air to liver partition coefficients for volatile organic compounds and blood to liver partition coefficients for volatile organic compounds and drugs.," *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 42, no. 6, pp. 743–751, Jun. 2007, doi: 10.1016/j.ejmech.2006.12.011.

[67] T. W. Stephens *et al.*, "Thermochemical investigations of solute transfer into ionic liquid solvents: updated Abraham model equation coefficients for solute activity coefficient and partition coefficient predictions," *Phys. Chem. Liq.*, vol. 52, no. 4, pp. 488–518, 2014, doi: 10.1080/00319104.2014.880114.

[68] J. R. Chretien and R. Verwaerde, "What is Chemometrics?," *Analusis*, vol. 26, no. 8, 1998, doi: 10.1002/9783527699377.ch1.

[69] R. Sjögren, "Synergies between Chemometrics and Machine Learning," pp. 1–50, 2021.

[70] T. W. Stephens, V. Chou, A. N. Quay, C. Shen, N. Dabadge, and A. Tian, "Thermochemical investigations of solute transfer into ionic liquid solvents: updated Abraham model equation coefficients for solute activity coefficient and partition coefficient predictions," *Phys. Chem. Liq.*, vol. 52, no. 1, p. 47, 2014,

[Online]. Available: https://doi.org/10.1080/00319104.2014.880114.

[71] ICH Q8, "EMEA/CHMP, 2009, ICH Topic Q 8 (R2) Pharmaceutical Development, Step 5: Note for Guidance on Pharmaceutical Development," *Regul. ICH*, vol. 8, no. June, 2009, [Online]. Available: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002872.pdf.

[72] C. B.Y., "PCA: The Basic Building Block of Chemometrics," *Anal. Chem.*, no. November 2012, 2012, doi: 10.5772/51429.

[73] R. G. Brereton, *Applied Chemometrics for scientists*. Wiley, 2007.

[74] A. Maćkiewicz and W. Ratajczak, "Principal components analysis (PCA)," *Comput. Geosci.*, vol. 19, no. 3, pp. 303–342, 1993, doi: 10.1016/0098-3004(93)90090-R.

[75] Programathically, "Principal Components Analysis Explained," *Classical Machine Learning*. https://programmathically.com/principal-components-analysis-explained-for-dummies/.

[76] S. K. P. Lau *et al.*, "Metabolomic profiling of plasma from melioidosis patients using UHPLC-QTOF MS reveals novel biomarkers for diagnosis," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 17, no. 3, 2016, doi: 10.3390/ijms17030307.

[77] G. Pad, "Graphs for Prinipal Component Analysis," [Online]. Available: https://www.graphpad.com/guides/prism/latest/statistics/stat_pca_graphs_tab.htm.

[78] P. Oliveri, "Class-modelling in food analytical chemistry: Development, sampling, optimisation and validation issues – A tutorial," *Anal. Chim. Acta*, vol. 982, pp. 9–19, 2017, doi: 10.1016/j.aca.2017.05.013.

[79] S. Wold, "Pattern recognition by means of disjoint principal components models," *Pattern Recognit.*, vol. 8, no. 3, pp. 127–139, 1976, doi: https://doi.org/10.1016/0031-3203(76)90014-5.

[80] O. M. Kvalheim and T. V Karstang, "Chapter 7 SIMCA - Classification by Means of Disjoint Cross Validated Principal Components Models," in *Multivariate pattern recognition in chemometrics, illustrated by case studies*, vol. 9, R. G. Brereton, Ed. Elsevier, 1992, pp. 209–248.

[81] D. Ruiz-Perez, H. Guan, P. Madhivanan, K. Mathee, and G. Narasimhan, "So you think you can PLS-DA?," *BMC Bioinformatics*, vol. 21, no. Suppl 1, pp. 1–10, 2020, doi: 10.1186/s12859-019-3310-7.

[82] R. G. Brereton and G. R. Lloyd, "Partial least squares discriminant analysis: Taking the magic away," *J. Chemom.*, vol. 28, no. 4, pp. 213–225, 2014, doi: 10.1002/cem.2609.

Παράρτημα Πινάκων

Πίνακας 9.

Φυσικοχημικά δεδομένα που συλλέχθηκαν για όλες τις μελετούμενες ενώσεις.

Φαρμακομόρια	MW	logD	logP	TPSA	HBA	HBD	Περ. Δεσμοί	A	B	E	S	V
Abacavir	286.3	1.22	1.2	101.9	6	3	4	0.67	1.49	2.77	2.37	2.09
Abiraterone	349.5	6.23	4.76	33.1	2	1	1	0.00	1.21	1.95	2.54	3.19
Acetophenazine	411.0	2.78	2.62	47.0	6	1	7	0.23	2.22	2.98	2.67	3.19
Acetylsalicylic acid	180.2	-2.50	1.18	63.6	3	1	3	0.57	0.77	0.84	1.42	1.29
Agomelatine	243.3	2.56	2.69	38.3	2	1	4	0.26	0.95	1.67	1.94	1.96
Almitrine	477.6	4.67	5	69.2	7	2	10	0.26	1.99	2.98	2.62	3.60
Aminophenazone	231.3	1.00	1.1	26.8	4	0	2	0.00	1.79	1.56	1.88	1.87
Astemizole	458.6	3.99	5.7	16.1	5	1	8	0.13	1.64	3.10	2.70	3.56
Baclofen	213.7	-0.97	1.3	63.3	3	2	4	0.78	1.02	1.10	1.47	1.58
Benzatropine	307.4	0.95	4.27	12.5	2	0	4	0.00	1.00	1.81	1.58	2.53
Benzphetamine	239.4	4.09	4.1	3.2	1	0	5	0.00	0.74	1.32	1.28	2.13
Buprenorphine	467.6	3.06	4.98	62.2	5	2	5	0.59	1.66	2.42	1.67	3.64
Bupivacaine	288.4	2.79	3.41	32.3	3	1	5	0.26	1.19	1.32	1.59	2.51
Bupropion	239.7	2.96	3.6	29.1	2	1	4	0.09	1.02	1.14	1.32	1.94

Carbamazepine	236.3	2.30	2.3	46.3	3	2	0	0.53	1.20	2.15	2.11	1.81
Chlorzoxazone	169.6	1.62	1.6	38.3	2	1	0	0.45	0.50	1.24	1.32	1.05
Citalopram	324.4	1.10	3.76	36.3	3	0	5	0.00	1.08	1.66	1.87	2.53
Clobazam	300.7	-0.27	2.12	40.6	2	0	1	0.00	1.47	2.29	2.49	2.13
Cycrimine	287.4	1.07	4	23.5	2	1	5	0.31	1.07	1.37	1.16	2.49
Desflurane	168.0	1.72	2.3	9.2	7	0	2	0.18	0.12	-0.48	0.01	0.70
Desipramine	266.4	2.28	4.9	15.3	2	1	4	0.09	0.91	1.62	1.82	2.26
Dexfenfluramine	231.3	1.95	3.5	12.0	1	1	5	0.13	0.48	0.40	0.58	1.71
Dextroamphetamine	135.2	-0.58	1.82	26.0	1	1	2	0.21	0.69	0.79	0.95	1.24
Dextromethorphan	271.4	2.57	3.6	12.5	2	0	1	0.00	0.87	1.46	1.05	2.24
Diclofenac	296.1	1.33	4.51	49.3	3	2	4	0.70	0.67	1.81	1.95	2.03
Droperidol	379.4	3.72	3.5	52.7	5	1	6	0.33	1.67	2.51	2.73	2.82
Efavirenz	325.7	4.39	4.6	38.3	3	1	3	0.42	0.61	1.21	1.38	1.89
Estramustine	440.4	5.39	4.97	49.8	2	1	6	0.31	1.27	2.16	3.03	3.26
Exemestane	296.4	3.11	3.7	34.1	2	0	0	0.00	1.14	1.81	2.60	2.39
Fenoprofen	242.3	-0.02	3.1	46.5	2	1	4	0.57	0.78	1.39	1.63	1.88
Fentanyl	336.5	3.27	4.05	23.6	2	0	6	0.00	1.81	1.83	2.18	2.84
Fludiazepam	302.7	2.75	2.75	32.7	2	0	1	0.00	1.04	2.03	1.69	2.09
Fluphenazine	437.5	3.82	4.36	30.0	4	1	7	0.26	1.80	2.16	2.30	3.09

Flurazepam	387.9	3.08	3.8	35.9	3	0	6	0.00	1.55	2.18	1.89	2.90
Flurbiprofen	244.3	1.10	4.16	37.3	2	1	3	0.57	0.58	1.50	1.51	1.84
Ibuprofen	206.3	0.44	3.97	37.3	2	1	4	0.59	0.81	0.73	1.01	1.78
Ifosfamide	261.1	0.86	0.86	51.4	4	1	5	0.14	1.18	0.50	2.20	1.75
Leflunomide	270.2	1.59	1.59	55.1	4	1	3	0.47	0.81	1.13	1.67	1.69
Lorazepam	321.2	2.45	2.39	61.7	3	2	1	0.45	1.63	2.51	1.28	2.11
Loxapine	397.8	2.69	3.6	28.1	3	0	0	0.00	1.49	2.30	1.67	2.39
Meclizine	390.9	5.24	5.8	6.5	2	0	5	0.00	1.30	2.45	2.04	3.13
Metaxalone	221.3	2.30	2.3	47.6	2	1	3	0.23	0.86	1.12	1.47	1.69
Methadone	309.4	2.71	3.93	20.3	2	0	7	0.00	1.09	1.51	1.72	2.71
Methamphetamine	149.2	-0.09	2.07	12.0	1	1	3	0.13	0.59	0.74	0.80	1.38
Methotrexate	454.4	-5.48	-1.55	135.5	13	7	9	1.85	2.82	3.51	4.23	3.22
Methsuximide	203.2	1.12	1.46	37.4	2	0	1	0.00	1.07	1.33	1.40	1.58
Methylphenidate	233.3	0.30	2.01	38.3	2	1	4	0.13	0.94	1.01	1.29	1.91
Metochlopramide	299.8	0.73	2.64	67.6	5	3	7	0.50	1.63	1.50	2.31	2.34
Norethisterone	298.4	2.85	3	37.3	2	1	1	0.40	1.07	1.81	2.44	2.44
Oxandrolone	306.4	2.77	4.2	46.5	2	1	0	0.31	1.11	1.34	2.79	2.48
Pheniramine	240.3	0.22	2.85	16.1	2	0	5	0.00	1.02	1.37	1.41	2.09

Prochlorperazine	373.9	4.01	4.79	35.0	3	0	4	0.00	1.47	2.63	2.11	2.82
Propylhexedrine	155.3	-0.30	2.37	12.0	1	1	3	0.13	0.53	0.37	0.43	1.51
Tetrabenazine	317.4	1.86	3.18	38.8	4	0	4	0.00	1.44	1.56	2.02	2.56
5-Fluorouracil	130.1	-0.98	-0.89	58.2	4	2	0	0.57	1.02	0.72	0.84	0.77
Acenocoumarol	353.3	0.65	1.98	107.0	6	1	5	0.31	1.32	2.25	2.85	2.48
Acyclovir	225.2	1.56	-1.56	114.8	8	4	4	0.40	1.88	2.04	2.10	1.52
Allopurinol	136.1	-0.56	-0.4	74.4	3	2	0	0.27	1.54	1.43	1.04	0.88
Alvimopan	424.5	-0.73	3.25	89.9	5	3	8	1.33	1.96	2.22	2.84	3.40
Amiodarone	645.3	7.49	7.8	42.7	4	0	11	0.00	1.30	3.33	2.49	3.75
Amoxicillin	365.4	-4.84	0.87	133.0	6	4	5	1.55	2.90	2.70	3.22	2.54
Azacitidine	244.2	-2.13	-3.5	141.0	9	5	2	0.87	2.69	2.13	2.04	1.58
Azythromycin	749.0	-0.32	4.02	180.1	14	5	7	0.97	4.91	2.50	2.67	6.00
Bambuterol	367.4	-0.97	1.5	91.3	4	2	8	0.38	2.25	1.53	2.20	2.91
Benzquinamide	404.9	1.41	1.7	68.3	5	0	7	0.00	2.08	1.73	2.81	3.16
Bepridil	366.5	4.90	5.2	15.7	3	0	10	0.00	1.32	1.79	1.81	3.16
Bexarotene	348.5	4.34	6.9	37.3	2	1	3	0.57	0.67	1.69	1.29	2.94
Bortezomib	384.2	2.01	2.04	124.4	8	4	9	1.14	2.37	2.16	3.46	3.00
Bromazepam	316.2	2.05	2.05	54.4	3	1	1	0.33	1.62	2.31	1.38	1.94
Camazepam	371.8	2.88	2.48	62.2	3	0	3	0.00	1.66	2.39	2.43	2.67
Canagliflozin	444.5	3.05	3.44	90.2	5	4	5	1.02	1.81	3.03	2.54	3.19

Cefaclor	367.8	-4.63	0.4	112.7	5	3	4	1.06	2.54	2.65	3.41	2.42
Cefamandole	462.5	-3.54	0.5	150.5	8	3	7	1.02	3.18	3.63	4.03	3.04
Cefpodoxime	427.5	-4.06	0.1	156.4	9	3	7	1.07	2.95	2.95	3.67	2.77
Ceftalorine	685.7	-0.83	2.17	337.3	16	5	11	1.60	3.88	4.84	5.98	4.30
Ciprofloxacin	331.3	-3.41	-1.08	72.9	6	2	3	0.73	1.85	2.20	2.50	2.30
Clofarabine	303.7	-1.69	0.9	119.0	8	4	2	0.87	1.88	2.52	2.42	1.83
Colchicine	399.4	1.03	1.03	83.1	7	1	5	0.26	2.08	2.17	3.32	2.99
Conivaptan	498.6	4.42	6.3	78.1	3	2	4	0.75	2.01	4.38	4.35	3.79
cytarabine	243.2	-2.40	-2.18	128.6	8	5	2	0.87	2.62	2.09	2.21	1.62
Dapsone	248.3	0.97	0.97	94.6	4	4	2	0.45	1.35	1.87	2.84	1.80
Desonide	416.5	2.00	1.4	93.1	6	2	0	0.48	2.16	2.31	3.18	3.13
Dexamethasone	392.5	1.80	1.8	94.8	5	3	2	0.71	1.92	2.04	3.51	2.91
Didanosine	236.2	1.24	-1.26	88.7	7	2	2	0.48	1.78	1.90	2.17	1.60
Diltiazem	414.5	1.84	2.8	59.1	4	0	7	0.00	2.12	2.42	2.55	3.14
Docetaxel	807.9	3.60	2.4	224.5	15	5	13	1.03	4.01	3.47	4.18	5.92
Dofetilide	441.6	1.06	2.1	121.6	8	2	11	0.72	2.16	2.43	3.30	2.19
Dolutegravir	419.4	5.57	2.2	99.2	8	2	3	0.57	2.71	2.53	3.71	2.78
Doripenem	420.5	-2.64	-3.4	196.0	10	5	7	1.67	3.41	2.87	2.96	2.85
Dorzolamide	324.4	-1.59	-0.5	106.3	5	2	3	0.58	1.78	1.60	2.49	2.14
Doxorubicin	543.5	-0.46	1.27	206.1	12	7	5	1.17	3.34	3.75	3.69	3.73
Enoximone	248.3	2.63	1.97	58.2	2	2	3	0.36	1.32	1.89	2.23	1.80

Ertapenem	475.5	-1.13	-1.63	181.6	10	5	7	2.00	3.23	3.20	3.55	3.30
Furadantin	238.2	0.77	-0.47	123.7	9	1	3	0.24	1.34	1.65	2.03	1.45
Gemifloxacin	389.4	-2.52	-0.81	121.4	9	3	5	0.78	2.48	2.67	2.58	2.66
Imipenem	299.4	-1.66	0.53	139.0	7	4	7	1.02	2.32	2.18	1.84	2.11
Indinavir	613.8	3.39	2.9	118.0	7	4	12	0.98	3.59	3.63	4.27	4.90
Ixabepilone	506.7	3.25	3.6	140.0	7	3	2	0.88	2.25	2.18	2.91	4.03
Kanamycin	484.5	-8.00	-6	282.6	15	11	6	2.48	5.92	3.25	3.76	3.36
Lenalidomide	259.3	-0.03	-0.45	92.5	4	2	1	0.56	1.91	2.20	2.74	1.83
Levodopa	197.2	-2.40	-2.05	103.8	5	5	3	1.56	1.44	1.33	1.77	1.43
Levofloxacin	361.4	-2.00	-0.24	73.3	7	1	2	0.57	2.05	2.26	2.58	2.05
Levosimendan	280.3	2.66	2.66	113.4	7	2	5	0.39	1.75	2.10	2.47	2.09
Luliconazole	354.3	3.25	5.4	92.2	3	0	3	0.00	1.05	2.68	2.50	2.28
Mebendazole	295.3	2.82	3.26	84.1	4	2	4	0.71	1.38	2.45	2.76	2.13
Meropenem	383.5	-2.47	0.05	135.5	8	3	5	1.02	2.88	2.44	2.80	2.76
Metronidazole	171.2	-0.02	-0.02	86.9	6	1	3	0.18	1.03	1.05	1.60	1.19
Moxifloxacin	401.4	-2.87	-0.42	82.1	7	2	4	0.72	2.04	2.45	2.65	2.82
Niclosamide	327.1	3.72	4	92.5	4	2	3	0.77	0.78	2.17	2.67	2.06
Ofloxacin	361.4	-2.49	-0.39	73.3	7	1	2	0.57	2.05	2.26	2.58	2.50
Oxacillin	401.4	-1.64	1.97	138.0	8	2	4	0.84	2.32	3.10	3.19	2.76
Paclitaxel	853.9	3.95	3.95	221.3	15	4	14	0.90	4.13	4.05	5.22	6.20
Pomalidomide	273.2	-0.45	-0.23	109.6	7	3	1	0.51	1.99	2.35	2.71	1.85

Rilpivirine	366.4	3.82	4.86	97.4	6	2	7	0.16	1.26	2.87	3.13	2.88
Sevoflurane	200.1	2.05	2.05	9.2	1	0	4	0.02	0.10	-0.50	0.05	0.85
Stavudine	224.2	0.82	-0.81	78.9	65	2	2	0.47	1.65	1.55	2.96	1.56
Sulfametaxazole	253.3	-0.85	0.89	106.6	6	3	3	0.59	1.21	1.99	2.43	1.72
Sulfaphenazole	314.4	-0.09	1.52	90.0	4	2	3	0.59	1.49	2.81	3.18	2.23
Tacrolimus	804.0	4.45	4.45	178.4	13	3	7	0.71	3.98	2.82	3.98	6.38
Telithromycin	812.0	1.53	3	171.9	11	1	11	0.12	4.40	3.49	4.53	6.32
Thalidomide	258.2	0.12	0.33	83.6	6	1	1	0.34	1.72	2.01	2.53	1.75
Tobramycin	467.5	-8.00	-4	268.2	14	15	6	2.18	5.91	3.03	3.56	3.35
Tolcapone	273.2	3.22	3	106.4	6	2	3	0.80	0.89	1.93	2.25	1.91
Vinblastine	811.0	3.40	3.7	154.1	13	3	10	0.54	4.01	4.46	3.72	6.07
Vincristine	825.0	2.52	2.82	171.2	14	3	10	0.54	4.25	4.59	4.30	6.08
Zalcitabine	211.2	-1.26	-0.47	88.2	6	3	2	0.44	1.90	1.63	1.78	1.51

Πίνακας 10:

Φορτία φαρμάκων σε pH=7.4, θετικό και αρνητικό κλάσμα F^{+}, F^{-}, άθροισμα φορτίων ιόντος και αμφολύτη F_z.

Φαρμακομόρια	F +	F -	F- + Fz	F+ + Fz
Abacavir	0.006	0	0	0
Abiraterone	0.022	0	0	0.022
Acetophenazine	0.737	0	0	0.737

Acetylsalicylic acid	0	1	1	0
Agomelatine	0	0	0	0
Almitrine	0.816	0	0	0.816
Aminophenazone	0.04	0	0	0.04
Astemizole	0.982	0	0	0.982
Baclofen	0	0.035	1	0.965
Benzatropine	0.999	0	0	0.999
Benzphetamine	0.307	0	0	0.307
Buprenorphine	0.928	0	0.005	0.933
Bupivacaine	0.779	0	0	0.779
Bupropion	0.638	0	0	0.638
Carbamazepine	0	0	0	0
Chlorzoxazone	0	0.184	0.184	0
Citalopram	0.991	0	0	0.991
Clobazam	0	0.996	0.996	0
Cycrimine	0.999	0	0	0.999
Desflurane	0	0	0	0
Desipramine	0.999	0	0	0.999
Dexfenfluramine	0.965	0	0	0.965
Dextroamphetamine	0.996	0	0	0.996
Dextromethorphan	0.933	0	0	0.933
Diclofenac	0	0.999	0.999	0

Droperidol	0.848	0	0	0.848
Efavirenz	0	0	0	0
Estramustine	0	0	0	0
Exemestane	0	0	0	0
Fenoprofen	0	0.999	0.999	0
Fentanyl	0.848	0	0	0.848
Fludiazepam	0	0	0	0
Fluphenazine	0.737	0	0	0.737
Flurazepam	0.875	0	0	0.875
Flurbiprofen	0	0.999	0.999	0
Ibuprofen	0	0.999	0.999	0
Ifosfamide	0	0	0	0
Leflunomide	0	0	0	0
Lorazepam	0	0	0	0
Loxapine	0.584	0	0	0.584
Meclizine	0.027	0	0	0.027
Metaxalone	0	0	0	0
Methadone	0.946	0	0	0.946
Methamphetamine	0.996	0	0	0.996
Methotrexate	0	0.989	1	0.011
Methsuximide	0	0	0	0
Methylphenidate	0.972	0	0	0.972

Metochlopramide	0.989	0	0	0.989
Norethisterone	0	0	0	0
Oxandrolone	0	0	0	0
Pheniramine	0.986	0	0	0.986
Prochlorperazine	0.848	0	0	0.848
Propylhexedrine	0.999	0	0	0.999
Tetrabenazine	0.946	0	0	0.946
5-Fluorouracil	0	0.184	18.4	0
Acenocoumarol	0	0.998	0.998	0
Acyclovir	0	0.009	0.009	0
Allopurinol	0	0.015	0.015	0
Alvimopan	0	0.015	0.999	0.984
Amiodarone	0.957	0	0	0.957
Amoxicillin	0	0.61	1	0.39
Azacitidine	0	0.054	0.054	0
Azythromycin	0.996	0	0	0.996
Bambuterol	0.981	0	0	0.981
Benzquinamide	0.025	0	0	0.025
Bepridil	0.953	0	0	0.953
Bexarotene	0	1	1	0
Bortezomib	0	0	0.067	0.067
Bromazepam	0	0	0	0

Camazepam	0	0	0	0
Canagliflozin	0	0	0	0
Cefaclor	0	0.61	1	0.39
Cefamandole	0	1	1	0
Cefpodoxime	0	1	1	0
Ceftalorine	0	0	1	1
Ciprofloxacin	0.051	0.033	0.947	0.965
Clofarabine	0	0	0	0
Colchicine	0	0	0	0
Conivaptan	0.025	0	0	0.025
cytarabine	0.001	0	0	0.001
Dapsone	0	0	0	0
Desonide	0	0	0	0
Dexamethasone	0	0	0	0
Didanosine	0	0.022	0.022	0
Diltiazem	0.835	0	0	0.835
Docetaxel	0	0	0	0
Dofetilide	0.878	0.004	0.083	0.957
Dolutegravir	0	0.416	0.416	0
Doripenem	0	0.007	1	0.993
Dorzolamide	0.847	0.005	0.2	0.947
Doxorubicin	0.846	0	0.002	0.848

Enoximone	0	0	0	0
Ertapenem	0	0.221	1	0.779
Furadantin	0	0.473	0.473	0
Gemifloxacin	0.043	0.174	0.947	0.816
Imipenem	0	0	0.999	0.999
Indinavir	0.168	0	0	0.168
Ixabepilone	0	0	0	0
Kanamycin	0.865	0	0	0.865
Lenalidomide	0	0.362	0.362	0
Levodopa	0	0.018	1	0.982
Levofloxacin	0.047	0.096	0.947	0.898
Levosimendan	0	0	0	0
Luliconazole	0.004	0	0	0.004
Mebendazole	0.004	0.002	0.002	0.004
Meropenem	0	0.043	1	0.957
Metronidazole	0	0	0	0
Moxifloxacin	0.052	0.011	0.948	0.989
Niclosamide	0	0.61	0.61	0
Ofloxacin	0.047	0.096	0.947	0.898
Oxacillin	0	1	1	0
Paclitaxel	0	0	0	0
Pomalidomide	0	0.362	0.362	0

Rilpivirine	0	0	0	0
Sevoflurane	0	0	0	0
Stavudine	0	0.006	0.006	0
Sulfametaxazole	0	0.978	0.978	0
Sulfaphenazole	0	0.98	0.98	0
Tacrolimus	0	0	0	0
Telithromycin	0.927	0	0	0.927
Thalidomide	0	0.362	0.362	0
Tobramycin	0.997	0	0	0.997
Tolcapone	0	0.818	0.818	0
Vinblastine	0.527	0	0	0.527
Vincristine	0.527	0	0	0.527
Zalcitabine	0.001	0	0	0.001