

PREPUSTNOST KRVNO-MOŽGANSKE PREGRADE PRI RAZVOJU UČINKOVIN Z DELOVANJEM V OSREDNJEM ŽIVČEVJU

BLOOD-BRAIN BARRIER PERMEATION IN DEVELOPMENT OF CENTRAL NERVOUS SYSTEM AGENTS

AVTORJA / AUTHORS:

Damijan Knez, mag. farm.,
izr. prof. dr. Marko Anderluh, mag. farm.

Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani,
Aškerčeva 7, 1000 Ljubljana

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:
E-mail: damijan.knez@ffa.uni-lj.si

POVZETEK

Za dosego farmakološkega učinka v centralnem živčnem sistemu je nujen predpogoj, da učinkovina prehaja preko krvno-možganske pregrade. Pri razvoju učinkovin z delovanjem v centralnem živčevju moramo zato poleg farmakodinamskih in farmakokinetičnih parametrov optimizirati tudi prehajanje spojine v možgane. V preglednem članku so predstavljeni *in silico* načini napovedovanja prehajanja krvno-možganske pregrade. Poleg pasivnega prehajanja je potrebno upoštevati tudi možnost aktivnega prenosa, ki lahko bistveno vpliva na prehodnost učinkovine.

KLJUČNE BESEDE:

krvno-možganska pregrada, napovedovanje prehajanja, in silico modeli

ABSTRACT

Permeability across blood-brain barrier is a necessity for achieving pharmacological effect in the central nervous system. Development of central nervous system agents requires optimization of drug permeability into brain additional to enhancement of other pharmacodynamic and pharmacokinetic parameters. Herein, *in silico* methods for prediction of blood-brain barrier permeability are reviewed. Furthermore, special attention is paid to the possibility of active transport as a mechanism of transport as in addition to passive permeability, it can fundamentally influence the permeability of central nervous system agent.

KEY WORDS:

blood-brain barrier, prediction of permeability, in silico models

1 UVOD

Terapija bolezni centralnega živčnega sistema (CŽS) predstavlja v svetu po prodaji zdravil in v Sloveniji po številu izdanih receptov drugo najpomembnejše področje farmakoterapije takoj za terapijo kardiovaskularnih obolenj



(1, 2). To nakazuje veliko potrebo po razvoju novih učinkovin na obeh področjih, vendar je razvoj zdravil na področju bolezni CŽS, glede na število novih registriranih zdravil, manj uspešen. Zaradi tega pri številnih patofizioloških stanjih, kot so Alzheimerjeva bolezen, Parkinsonova bolezen, nekatere dedne metabolne bolezni in metastaze v možganih, še vedno nimamo ustrezne vzročne terapije. Pri razvoju učinkovin z delovanjem v CŽS velikokrat predstavlja največjo oviro krvno-možganska pregrada (hematoencefalna bariera – HEB), ki selektivno regulira prehajanje substanc v CŽS. Po nekaterih podatkih kar 98 % spojin, ki kažejo farmakološki učinek v CŽS, v zgodnjih fazah razvoja nikoli ne doseže trga prav zaradi neprehodnosti HEB (3, 4).

Pri razvoju učinkovin z delovanjem v CŽS se vedno več pozornosti preusmerja iz povečevanja jakosti delovanja k napovedovanju in načrtovanju lastnosti spojin, ki jim bodo omogočale prehod do njihovih molekulskih tarč. V ta namen so bile razvite številne *in silico*, *in vitro* ter *in vivo* metode za določitev in napovedovanje prehajanja HEB. Z uporabo teh metod se lahko že v začetnih fazah izognemo spojinam, ki sicer izkazujejo želen učinek na izolirani tarči, vendar zaradi neprehajanja HEB *in vivo* ne bodo dosegle tega učinka v predkliničnih in kliničnih fazah razvoja. Rezultati meritev nam lahko služijo kot vodilo za spremembe kemijske strukture učinkovine, ki bodo pri človeku omogočile doseg terapevtskih koncentracij spojine na mestu delovanja.

2 BARIERE CENTRALNEGA ŽIVČNEGA SISTEMA

Komunikacija v živčevju poteka s kombinacijo kemičnih in električnih signalov. V poenostavljenem pogledu električni signali pri nemieliniziranih nevronih vključujejo majhne premike ionov preko citoplazemske membrane nevronov, kar povzroči odmike od ravnovesja – mirovnega membranskega potenciala. Natančnost, zanesljivost in ponovljivost teh signalov zagotavljajo homeostatski mehanizmi, ki vzdržujejo konstantno ionsko sestavo zunajcelične tekočine, ki obdaja nevronske celice. Pri homeostazi igrajo pomembno vlogo bariere med krvjo in CŽS, ki zagotavljajo zaščito nevronov pred njihovi v ionski sestavi krvi, do katerih prihaja zaradi vnosa hrane in fizičnega napora. Po nekaterih dokazih je bila prav potreba po regulaciji ionske sestave zunajcelične tekočine najmočnejši evolucijski pritisk za razvoj

učinkovitih barrier, hkrati s to funkcijo pa so se vzpostavile še druge, na primer vpliv na prehod drugih snovi (ksenobiotiki, telesu lastni proteini), ločitev nevrotansmitterjev na periferni in centralni del (pomembno pri nesinaptičnem signaliziranju med nevroni) in preprečevanje navzkrižnega signaliziranja med periferijo in centralnim živčevjem.

Glavne pregrade so:

- endotelij parenhimske mikrocirkulacije – hematoencefalna bariera (HEB),
- epitelij horoidnega plesusa – pregrada med krvjo in cerebrospinalno tekočino (CSF) in
- epitelij pajčevnice (arahnoida).

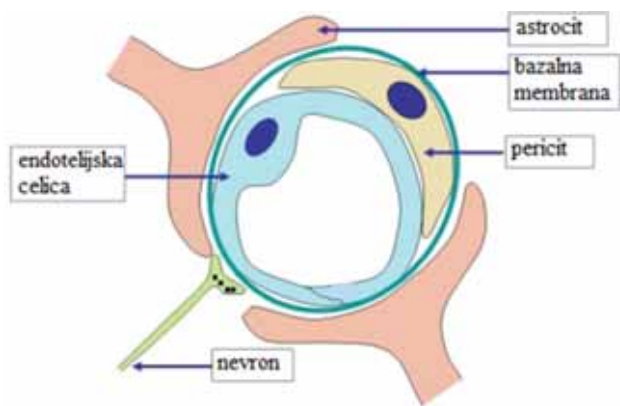
Po funkciji in sestavi je najbolje opisana HEB, saj predstavlja po površini največji stik med krvnim obtokom in CŽS, poleg tega pa je tudi najbližje nevromom.

Tesni stiki med endotelijskimi celicami HEB zmanjšajo prehodnost ionov in drugih majhnih hidrofilnih topljencev preko paracelularne poti, zaradi zmanjšane nespecifične pinocitoze in transcitoze pa je omejena tudi transcelularna prehodnost. Dodatno oviro za prehod substanc predstavljajo encimi, ki razgradijo substance, preden te dosežejo nevronske celice. Najpomembnejši encimi so acetilholinesteraza, alkalna fosfataza, γ -glutamil transferaza ter monoaminska oksidaza. Pri zmanjšanju prehodnosti HEB igrajo pomembno vlogo tudi številni prenašalci – ABC prenašalni proteini (5, 6).

2.1 SESTAVA HEMATOENCEFALNE BARIERE

Glavne celične komponente HEB so endotelijske celice, astrociti in periciti (Slika 1). Endotelijske celice tvorijo neprekinjen ovoj na notranji površini kapilar in imajo največji vpliv na prehodnost HEB. V bližini apikalne površine so med seboj povezane s tesnimi stiki. Te celice imajo značilnosti endotelija (izražanje von Willebrandovega faktorja, privzem acetiliranega lipoproteina z nizko gostoto (LDL), visoka aktivnost alkalne fosfataze in γ -glutamil transferaze) in epitelija (tesni stiki, nizek nivo pinocitoze). Endotelijske celice ležijo na bazalni membrani, na kateri se nahajajo tudi periciti, ki pokrivajo približno 22–32 % površine endotelija. Vloga pericitov je regulacija endotelijske proliferacije, angiogeneze in vnetnih procesov. Izrastki astrocitov z bazalne strani pokrivajo endotelijske celice. Izločajo regulatorna faktorja, kot sta transformirajoči rastni dejavnik β (TGF- β) in interleukin 6 (IL-6). Negativno nabiti glikokaliks na luminalni

površini možganskega endotelija deluje kot predfilter, ki omejuje dostop določenih molekul do površine endotelijske membrane (5, 7).



Slika 1: Shematska predstavitev glavnih celičnih komponent krvno-možganske pregrade (prirejeno po (5)).

Figure 1: Schematic representation of principal cellular components of blood-brain barrier (adapted according to (5)).

2.2 TESNI STIKI

Tesni stiki možganskih endotelijskih celic predstavljajo glavno fizično oviro, ki omejuje paracelarni prenos in preusmerja prenos snovi predvsem na transcelularno pot. Molekulske komponente tesnih stikov delimo na transmembranske in submembransko nameščene povezovalne proteine. Transmembranski proteini so okcludin, celične adhezivne molekule (glikoproteini JAM-A, -B, -C, -4 in celičnim adhezivnim molekulam podoben protein) ter več proteinov iz družine kladrinov. Citoplazemski submembransko nameščeni povezovalni proteini, imenovani tudi ogrodni proteini, omogočajo vezavo transmembranskih proteinov na aktinske filamente citoskeleta. Najpomembnejši ogrodni proteini so *zonula occludens*-ZO (ZO-1, ZO-2 in ZO-3), cingulin in paracingulin (5, 7, 8).

3 PREHAJANJE SNOVI

Večina majhnih molekul ter plinov vstopa v možgane s transcelularno pasivno difuzijo preko lipidnih membran ter s paracelularno difuzijo. Specifični proteini na apikalni in bazalni membrani endotelijske celice regulirajo prehod

ionov, hranil in molekul za izgradnjo proteinov ter DNA. Proteini iz družine ABC prenašalnih proteinov (P-gp, BCRP) se nahajajo predvsem na apikalni membrani in zmanjšajo vstop številnih toksinov iz okolja in hrane v CŽS, izločajo pa tudi številne neuporabne produkte, nastale v možganih. Substrati teh proteinov so tudi številne zdravilne učinkovine (2, 5). Prehod večjih peptidnih in proteinskih molekul poteka s transcitozo, ki je regulirana preko receptorjev ali nespecifično z adsorpcijo pozitivno nabitih makromolekul (5).

4 PARAMETRI ZA OPIS PREHAJANJA KRVNO-MOŽGANSKE PREGRADE

Parametri za kvantitativno oceno prehajanja HEB posredno ali neposredno opisujejo bodisi hitrost bodisi obseg prehajanja (Preglednica 1) (2). Pri razvoju učinkovin, optimizaciji spojine vodnice in izbiri kandidatov za nadaljnji razvoj je ključnega pomena izbira ustreznih parametrov prehajanja. Izbira neprimernih kazalcev prehajanja, ki ne napovejo oziroma ne pripomorejo bistveno k razumevanju prehoda HEB, lahko vodi razvoj novih učinkovin v slepo ulico ali neuspešen zaključek.

Preglednica 1: Parametri za oceno prehajanja krvno-možganske pregrade

Table 1: Parameters for assessing blood-brain barrier permeability

Simbol	Parameter
$C_{p,u}, C_{b,u}, C_{CSF}$	Koncentracija nevezane učinkovine v plazmi, možganih ali CSF
$K_{p,uu} (C_{b,u} / C_{p,u})$	Razmerje med koncentracijo nevezane učinkovine v možganih in plazmi
B / P $\log BB = \log (B / P)$	Razmerje med koncentracijo učinkovine v možganih in plazmi
$f_{u,p}, f_{u,b}$	Delež nevezane (proste) učinkovine v plazmi oziroma možganih
P_{app}	Navidezna pasivna permeabilnost HEB
$\log PS$	Permeabilnostni površinski produkt za hematoencefalno bariero



Koncentracija nevezane učinkovine na mestu delovanja je ključna za *in vivo* farmakološki učinek. Za znotrajcelične tarče bi bilo idealno določiti koncentracijo nevezane učinkovine v znotrajcelični tekočini. Ker je takšna določitev težavna, se kot nadomestek uporabljajo koncentracija v zunajcelični tekočini, koncentracija v možganih ali koncentracija učinkovine v plazmi. Za večino spojin je po literaturnih podatkih koncentracija nevezane učinkovine znotraj celice v mejah trikratnika koncentracije nevezane učinkovine v zunajcelični tekočini. To je tudi v skladu s hipotezo, da je koncentracija učinkovine v ravnotežnem stanju enaka na obeh straneh biološke membrane, če v distribucijo niso vključeni prenašalci (2).

Ključni parameter za oceno distribucijskega ravnotežja med krvjo in možgani je razmerje med koncentracijo nevezane učinkovine v možganih in plazmi $K_{p,uu}$, saj vključuje vpliv tako pasivne difuzije kot tudi prenašalnih sistemov (2, 9). Vrednost parametra približno 1 za neko spojino pomeni, da je ta spojina v distribucijskem ravnotežju med možgani in krvjo. Takšna situacija je idealna za razvoj učinkovin, saj se lahko v tem primeru koncentracija nevezane učinkovine v plazmi uporablja za oceno $C_{b,u}$. Spojine z delovanjem v CZS tipično prehajajo s pasivno difuzijo in niso substrati za prenašalce. Kadar je vrednost $K_{p,uu}$ za spojino manjša od 1, je takšna spojina običajno substrat za prenašalce, ki prenašajo substrate v eliminatorni smeri, ali pa je prehodnost v CZS omejena s slabo pasivno difuzijo (pogosto pri relativno bolj polarnih spojinah). Primera zdravilne učinkovine sta atenolol ($C_{CSF} / C_{p,u}$ (človek) = 0,038 zaradi nizke pasivne prehodnosti HEB) ter sakvinavir ($K_{p,uu,CSF} = 0,0955$ zaradi nizke pasivne prehodnosti in izločanja s P-gp) (2,10). Pri spojinah, za katere želimo doseči prehajanje HEB, je potrebno izvesti modifikacije kemijske strukture, ki bodo povečale prehajanje HEB s pasivnim transportom ali pa bodo onemogočile izločanje s prenašalci. Vrednost parametra nad 1 kaže na to, da je spojina substrat za prenašalne sisteme, ki prenašajo substance skozi HEB v CZS. Primera sta oksikodon ($K_{p,uu} = 3,1$ pri podganah) in difenhidramin ($K_{p,uu} = 5,5$ pri podganah). Prav primera teh zdravilnih učinkovin kažeta, da bi lahko razvoj novih učinkovin vodili tudi v smeri izkoriščanja nekaterih prenašalcev za povečanje prehodnosti HEB. V terapiji je že poznanih nekaj zdravilnih učinkovin, ki brez prisotnosti prenašalcev sploh ne bi dosegle CZS (pregabalin, L-DOPA) (2).

Čeprav sta si logaritem razmerja med koncentracijo učinkovine v možganih in krvi $\log BB$ ter $K_{p,uu}$ med seboj

zelo podobna, naj bi se za optimizacijo prehajanja uporabljal le slednji. Na $\log BB$ močno vpliva nespecifična vezava na lipide in/ali proteine v plazmi in možganih. *In vivo* izmerjene koncentracije učinkovin je smiselno vedno pretvoriti v koncentracije nevezane učinkovine, te pa uporabiti za izračun $K_{p,uu}$ (2, 11).

Delež nevezane učinkovine v plazmi oziroma možganih uporabljamo za izračun koncentracije nevezane učinkovine v plazmi in možganih. Gre za eksperimentalno izmerjeno vrednost, pridobljeno z ravnotežno dializo ali z drugimi nevro-farmakokinetičnimi meritvami. Sam razvoj učinkovine ne sme temeljiti na optimizaciji deleža nevezane učinkovine, saj ta delež nima vpliva na učinkovitost *in vivo*, prav tako nima kliničnega pomena za peroralno uporabljanje zdravila. Večji delež nevezane učinkovine v plazmi ne zagotavlja večjega deleža nevezane učinkovine v možganih in obratno (2).

Navidezna pasivna permeabilnost HEB (P_{app}) opisuje hitrost prehajanja snovi skozi HEB zaradi pasivne difuzije, ne opisuje pa obsega prehajanja spojine v CZS. Kljub temu lahko nizka pasivna prehodnost zmanjša obseg prehajanja skozi HEB zaradi nizke absorpcije, omejene s počasno pasivno difuzijo. Visoka prehodnost omogoča hitro doseganje distribucijskega ravnotežja, to pa še vedno ne zagotavlja visoke koncentracije nevezane učinkovine v CZS. Visoka vrednost P_{app} je torej prednost za učinkovino, vendar še ni nujno, da *in vivo* zagotavlja visoko učinkovitost. Visoka pasivna prehodnost zahteva višjo lipofilnost ($\log P$), kar pa vodi do večjega deleža nespecifične vezave, hitrejšega metabolizma in posledično nizke koncentracije nevezane učinkovine v možganih (2).

$\log PS$ je zanesljivo *in vivo* merilo za prehodnost HEB in predstavlja merilo za enosmerni očištek spojine iz krvi v možgane preko HEB. $\log PS$ posredno napove tudi koncentracijo nevezane učinkovine, saj je slednja odvisna od celokupne koncentracije učinkovine v plazmi in $\log PS$ produkta. Zaradi zahtevne določitve je ta parameter manj uporabljan, kljub temu pa so bili postavljeni nekateri *in silico* modeli za njegovo napovedovanje (11-13).

5 DOLOČANJE PREHODNOSTI KRVNO-MOŽGANSKE PREGRADE

Razvoj kombinatorne kemije in velikih knjižnic spojin je močno povečal število spojin, ki gredo skozi začetna reševanja visoke zmogljivosti na določeni tarči. Določanje farmakokinetičnih parametrov prehajanja HEB z *in vivo* meritvami ter *in vitro* metodami je zaradi visoke cene in dolgotrajnosti neekonomično. Zaradi tega se je pozornost usmerila predvsem v *in silico* napovedovanje prehajanja HEB (3, 14).

5.1 IN SILICO METODE

In silico metode predstavljajo cenejšo in predvsem hitrejšo alternativo *in vitro* in *in vivo* metodam. Modeliranje prehajanja HEB predstavlja velik izziv v načrtovanju učinkovin zaradi v določenih primerih nezanesljive kvalitete in kvantitete eksperimentalnih podatkov. Na osnovi takšnih podatkov je težko postaviti uporabno povezavo med molekulsko strukturo in izmerjeno porazdelitvijo učinkovine med krvjo in CŽS. LogPS se navaja kot najprimernejši indeks za določanje prehodnosti HEB, vendar zaradi pomanjkanja eksperimentalnih vrednosti za ta parameter večina *in silico* pristopov še vedno uporablja vrednosti logBB kot merilo za prehodnost HEB. Ključno vlogo pri postavitvi modela igrajo trije parametri, in sicer količina in kvaliteta podatkov v modelnem in testnem setu, deskriptorji ter pristop modeliranja, vsi pa močno vplivajo na uporabnost in učinkovitost modela (3, 11, 14).

5.1.1 Podatki

Računalniške modele je potrebno zgraditi na osnovi skrbno izbranih in analiziranih podatkov. Model bo kljub slabim vhodnim podatkom uspel postaviti povezavo med molekulskimi deskriptorji in prehodnostjo HEB, vendar bo kvaliteta napovedi v takem primeru seveda slaba.

Razvitih je bilo veliko modelov na osnovi logBB vrednosti, vendar je količina podatkov za postavitev in preverjanje usreznosti teh modelov še vedno relativno majhna (13–15). Ti podatki so pridobljeni na osnovi različnih eksperimentalnih protokolov in so pogosto med seboj celo nasprotujoči. Pasivna difuzija še vedno predstavlja primaren mehanizem prenosa spojin iz krvnega obtoka v možgane, zato se praktično vsi, do sedaj postavljeni, *in silico* modeli HEB nanašajo na pasivno difuzijo. Spojine, ki prehajajo tudi z aktivnim transportom, večina modelov predstavi kot odstopajoče

točke. Javno dostopno bazo s podatki za 302 spojine so postavili z združitvijo *in vivo* in *in vitro* podatkov o prehodnosti HEB s pasivno difuzijo. Standardna deviacija za vrednosti logBB za ta set spojin znaša okoli 0,3 logaritemske enote. Noben model, postavljen na osnovi tega seta spojin, torej ne more napovedati vrednosti logBB z napako manjšo kot 0,3 log enote. To pomeni, da imajo vsi QSPR (kvantitativni odnos med strukturo in lastnostjo) modeli, izpeljani na tej osnovi, napovedno moč omejeno s kvaliteto podatkov, uporabljenih za postavitev modela (3, 13).

5.1.2 Molekulski deskriptorji

Prvi poskusi povezave fizikalno-kemijskih lastnosti spojine in prehodnosti HEB so bili osredotočeni predvsem na lipofilnost spojine. Prelom predstavljajo Hanscheve raziskave, ki so pokazale parabičen odnos med logP in aktivnostjo v CŽS, podatkih iz le-teh pa kažejo optimalno prehajanje HEB spojine z logP vrednostmi okoli 2. Lipofilnost spojine je eden od pomembnih parametrov za prehodnost, z njo pa je povezanih tudi več problemov, kot je npr. nizka vodotopnost (3).

Leta 1988 je Young s sodelavci postavil eno izmed prvih eksaktnih povezav med logBB in molekulskim deskriptorjem $\Delta\log P$ (slednji je definiran kot razlika med porazdelitvenima koeficientoma oktanol/voda in cikloheksan/voda). Po trditvah avtorja predstavlja porazdelitev med cikloheksanom in vodo porazdelitev v nepolarnih predelih možganov, porazdelitev med vodo in oktanolom pa vezavo na proteine, kar omejuje prehod spojine preko HEB (13, 16).

V sklopu različnih raziskav so bili določeni deskriptorji, ki imajo največji vpliv na prehodnost HEB:

- lipofilnost (običajno podana z logP),
- število donorjev vodikovih vezi (HBD),
- polarna površina (PSA: površina vseh polarnih atomov; običajno dušikov in kisikov, vključno z vezanimi vodiki na te heteroatome),
- molekulska teža in oblika molekule (cilindrična, sferična),
- število akceptorjev vodikove vezi (HBA) in
- število vrtljivih vezi (3, 13, 17, 18).

Deskriptorji so pogosto medsebojno odvisni (neortogonalni), zato je vedno potrebno upoštevati spremembe vseh, ne pa se osredotočati samo na en parameter (3).

Kot možni parametri se pri nekaterih modelih pojavljajo tudi parametri solvatacije (dipolarnost/polarizabilnost (S); kislost H-vezi (A); bazičnost H-vezi (B); McGowanov karakteristični



molarni volumen (V); prebitna molarna refrakcija (E)) (16, 17). Pojavljajo se tudi deskriptorji, ki izhajajo iz kvantno mehanskih izračunov (COSMO σ -moment), ter še nekateri drugi: topilo dostopna polarna površina (SASA) in amfifilna komponenta SASA (določena z Monte-Carlo simulacijo spojine v vodi) (3, 16). Večino molekulskih deskriptorjev je mogoče enostavno izračunati s pomočjo programske opreme ali pa jih eksperimentalno določiti (3).

5.1.3 Metode za postavitev modelov

Po izračunu vrednosti za molekulske deskriptorje in zbranih eksperimentalnih podatkih o prehodnosti HEB je potrebno identificirati QSPR model, ki poveže ti dve vrednosti. Najpogostejše uporabljane metode so zbrane v Preglednici 2 (3, 9, 14).

Preglednica 2: In silico metode, ki se uporabljajo pri napovedovanju prehodnosti hematocencefalne bariere

Table 2: In silico methods used in prediction of blood-brain barrier permeability

Metoda	Komentar
Multipla linearna regresija	Največkrat uporabljena statistična metoda za določitev linearnega odnosa med deskriptorji in logBB. Največje omejitve pri tej metodi predstavlja neortogonalnost (matematična odvisnost) deskriptorjev.
Analiza glavne komponente, regresija glavne komponente, metoda delnih najmanjših kvadratov (PLS)	Statistične metode za določitev linearnega odnosa, ki se vedno bolj pogosto uporabljajo pri postavitvi QSPR modelov prehajanja HEB.
Linearna diskriminantna analiza	Omogoča razdelitev velikega števila spojin v razrede (CŽS + in – spojine), omogoča tudi določitev ključnih komponent, ki največ prispevajo k nekemu procesu.
Genetska metoda delnih najmanjših kvadratov	Združuje elemente genetskega algoritma in PLS, hkrati pa še vedno omogoča enostavno interpretacijo linearne povezave med spremenljivkami.
Nevronske mreže, metoda podpornih vektorjev, odločitvena drevesa	Omogočajo določitev nelinearnega odnosa med deskriptorji in logBB.

Zelo pomembna metoda v razvoju novih učinkovin je tudi *analiza podstruktur*, ki se uporablja za razumevanje in napovedovanje molekularnih lastnosti. Za klasifikacijo spojin,

ki nimajo poznane HEB prehodnosti, se uporabijo podatkovni seti spojin, ki dokazano prehajajo HEB. Oba seta spojin se računalniško fragmentirata na manjše strukturne enote. Sledi izračun frekvence pojavnosti teh enot v obeh skupinah in nato medsebojna primerjava, ki omogoča napoved določenih molekulskih lastnosti in tudi same prehodnosti krvno-možganske pregrade (3).

5.1.4 Tipi in silico modelov

Najpreprostejši modeli so tako imenovani »rules of thumb« modeli. Ti predstavljajo enostavno vodilo glede vrednosti molekulskih deskriptorjev, ki favorizirajo prehajanje preko HEB. Na osnovi združenih izsledkov številnih raziskav so izoblikovali 5 preprostih pravil:

1. Če je vsota atomov N in O v molekuli manjša ali enaka 5, potem obstaja velika verjetnost, da bo spojina prehajala HEB.
2. Če je $(\text{ClogP} - (\text{N} + \text{O})) > 0$, bo vrednost logBB verjetno pozitivna ($\text{ClogP} - \text{izračunan logP}$), kar nakazuje dobro prehajanje.
3. Za dobro prehodnost HEB naj bi bila vrednost PSA pod določeno mejo. Mejo nekateri postavljajo pri $90 \text{ \AA}^2$, večina pa nekje pri vrednostih $60\text{--}70 \text{ \AA}^2$.
4. Molska masa spojine naj bi bila manjša od 450.
5. Vrednost porazdelitvenega koeficienta logD (pri fiziološkem pH) naj bi bila v območju od 1 do 3 (3, 4, 19).

Naslednji nivo kompleksnosti predstavljajo klasifikacijski modeli CŽS + / – , ki predstavljajo alternativo kvantitativnim napovednim modelom. Ti modeli klasificirajo spojine na osnovi njihove zmožnosti/nezmožnosti prehajanja v CŽS (CŽS + ali CŽS – spojine). Meje za določitev sposobnosti prehajanja spojin so pri različnih modelih različne. Mejne vrednosti logBB se v večini primerov gibljejo okoli vrednosti 0 oziroma 0,3, razpon pa sega od –1 do 0,63. Možna je tudi razdelitev na osnovi farmakološkega učinka. Če spojina dosega farmakološki učinek, se uvrsti med CŽS + spojine, če pa učinka ne izkazuje, pa med CŽS – spojine (20). CŽS + spojine morajo za dosego učinka preiti HEB, pri CŽS – spojinah pa odsotnost učinka še ne pomeni neprehajanja HEB, saj učinkovina lahko prehaja HEB, vendar ne doseže zadostne koncentracije za dosego učinka. Premajhna koncentracija na mestu delovanja je lahko posledica obsežnega metabolizma, aktivnega izločanja ali celo posledica dejstva, da spojina sploh ne interagira s tarčo (premajhna učinkovitost) (19, 21). Razdelitev lahko izvedemo tudi s pomočjo odločitvenih dreves na osnovi deskriptorjev, ki so povezani s prehodnostjo bariere (9).

Najvišje na hierarhični lestvici modelov za določanje prehodnosti HEB pa se nahajajo QSPR modeli na osnovi podatkov o logBB, kjer se postavi matematična zveza med deskriptorji in parametrom prehajanja HEB (19).

6 POMEN AKTIVNEGA PRENOSA

Prenašalci, ki z aktivnim prenosom prenašajo spojine preko HEB, so pomembni za ohranjanje normalnega fiziološkega stanja. Tega načina prenosa pogosto ne upoštevamo pri načrtovanju učinkovin, kjer lahko ti prenašalci bodisi povečajo ali pa zmanjšajo prehajanje učinkovin preko HEB. Za napovedovanje koncentracije proste učinkovine v možganih v teh primerih nimamo dobrih *in vitro* ter *in vivo* modelov. Problematična je tudi prenosljivost podatkov iz živalskih modelov na človeka, saj celice HEB različnih živalskih vrst izražajo različne prenašalce v različnem obsegu. Kot primer lahko navedemo, da glodavci v celicah HEB izražajo večje količine P-gp kot človek (12). Koncentracija spojine v cerebrospinalni tekočini prav tako ni primerna za napoved koncentracije spojine v možganih, saj P-gp na barieri med krvjo in cerebrospinalno tekočino črpa spojine preferenčno v cerebrospinalno tekočino, P-gp, izražen na endotelijskih celicah v HEB, pa iz možganov v kri (2).

7 SKLEP

Razumevanje procesov prehajanja HEB je ključno za uspešen razvoj učinkovin z delovanjem v centralnem živčnem sistemu. Optimizacija prehajanja spojin z delovanjem v ČŽS mora temeljiti na parametrih, ki čim bolj celovito ter tudi mehanistično opisujejo prehod HEB. Potrebno se je usmeriti v boljše in zanesljivejše napovedovanje prehajanja HEB, zaželeno pa bi bilo vključiti tudi možnost napovedovanja aktivnega prenosa, saj lahko imajo prenašalni proteini bistven vpliv na prehajanje krvno-možganske pregrade. Preudarna uporaba računalniških metod skupaj z *in vitro* in *in vivo* metodami določanja prehodnosti HEB lahko v prihodnosti močno poveča uspešnost razvoja novih zdravilnih učinkovin z delovanjem v centralnem živčevju.

8 REFERENCE

1. Ambulantno predpisovanje zdravil v Sloveniji po ATC klasifikaciji v letu 2011. IVZ, Ljubljana 2012.
2. Di L, Rong H, Feng B. Demystifying brain penetration in central nervous system drug discovery. *J Med Chem* 2013; 56 (1): 2–12.
3. Mensch J, Oyarzabal J, Mackie C, Augustijns P. In vivo, in vitro and in silico methods for small molecule transfer across the BBB. *J Pharm Sci* 2009; 98 (12): 4429–68.
4. Pardridge WM. Alzheimer's disease drug development and the problem of the blood-brain barrier. *Alzheimers Dement* 2009; 5 (5): 427–32.
5. Abbott NJ. Blood-brain barrier structure and function and the challenges for CNS drug delivery. *J Inher Metab Dis* 2013; 36 (3): 437–49.
6. Wilhelm I, Fazakas C, Krizbai IA. In vitro models of the blood-brain barrier. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 2011; 71 (1): 113–28.
7. Jezernik K, Erdani Kreft M. Tesnostične pregrade v našem telesu. *Med razgl* 2010; 49: 51–62.
8. Gunzel D, Fromm M. Claudins and other tight junction proteins. *Compr Physiol* 2012; 2 (3): 1819–52.
9. Suenderhauf C, Hammann F, Huwyler J. Computational prediction of blood-brain barrier permeability using decision tree induction. *Molecules* 2012; 17 (9): 10429–45.
10. Friden M, Winiwarter S, Jerndal G, Bengtsson O, Wan H, Bredberg U, Hammarlund-Udenaes M, Antonsson M. Structure-brain exposure relationships in rat and human using a novel data set of unbound drug concentrations in brain interstitial and cerebrospinal fluids. *J Med Chem* 2009; 52 (20): 6233–43.
11. Pardridge WM. Log(BB), PS products and in silico models of drug brain penetration. *DDT* 2004; 9 (9): 392–3.
12. Syvanen S, Lindhe O, Palmer M, Kornum BR, Rahman O, Langstrom B, Knudsen GM, Hammarlund-Udenaes M. Species differences in blood-brain barrier transport of three positron emission tomography radioligands with emphasis on P-glycoprotein transport. *Drug Metab Dispos* 2009; 37 (3): 635–43.
13. Goodwin JT, Clark DE. In silico predictions of blood-brain barrier penetration: considerations to "keep in mind". *J Pharmacol Exp Ther* 2005; 315 (2): 477–83.
14. Kumar R, Sharma A, Tiwari RK. Can we predict blood brain barrier permeability of ligands using computational approaches? *Interdiscip Sci* 2013; 5 (2): 95–101.
15. Hou TJ, Xu XJ. ADME evaluation in drug discovery. 3. Modeling blood-brain barrier partitioning using simple molecular descriptors. *J Chem Inf Comput Sci* 2003; 43 (6): 2137–52.
16. Mehdipour AR, Hamidi M. Brain drug targeting: a computational approach for overcoming blood-brain barrier. *Drug Discov Today* 2009; 14 (21–22): 1030–6.
17. Clark DE. Rapid calculation of polar molecular surface area and its application to the prediction of transport phenomena. 2. Prediction of blood-brain barrier penetration. *J Pharm Sci* 1999; 88 (8): 815–21.
18. Chen Y, Zhu QJ, Pan J, Yang Y, Wu XP. A prediction model for blood-brain barrier permeation and analysis on its parameter biologically. *Comput Methods Programs Biomed* 2009; 95 (3): 280–7.
19. Clark DE. In silico prediction of blood-brain barrier permeation. *DDT* 2003; 8 (20): 927–33.
20. Ajay, Bemis GW, Murcko MA. Designing libraries with CNS activity. *J Med Chem* 1999; 42 (24): 4942–51.
21. Vilar S, Chakrabarti M, Costanzi S. Prediction of passive blood-brain partitioning: straightforward and effective classification models based on in silico derived physicochemical descriptors. *J Mol Graph Model* 2010; 28 (8): 899–903.

