



**UNIWERSYTET
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU**

Wydział Farmaceutyczny
Collegium Medicum w Bydgoszczy

Magdalena Skubiszewska

**Badania wybranych związków o potencjalnym działaniu
farmakologicznym w zaburzeniach funkcjonowania układu
nerwowego**

**Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu
w dyscyplinie nauki farmaceutyczne**

Promotor:

Dr hab. n. farm. Alicja Nowaczyk, prof. UMK

Promotor pomocniczy:

Dr n. farm. Łukasz Fijałkowski

Bydgoszcz rok 2022

Pani dr hab. n. farm. Alicji Nowaczyk, Prof. UMK za cierpliwość, poświęcony mi czas, nieocenioną pomoc w trakcie realizacji badań przedstawionych w niniejszej rozprawie doktorskiej oraz za całokształt współpracy naukowej

Panu dr n. farm. Łukaszowi Fijałkowskiemu za owocną współpracę, wszelkie wskazówki i cenne uwagi

Zespołowi badawczemu z Katedry Farmakodynamiki Wydziału Farmaceutycznego CM UJ w Krakowie pod przewodnictwem Pani prof. dr hab. Kingi Sałat oraz Pani dr hab. Monice Kubcackiej, prof. UJ za współpracę w prowadzeniu badań objętych niniejszą rozprawą doktorską

Zespołowi badawczemu Pani prof. Petrine Wellendorph oraz Pani dr Marii E.K. Lie z Katedry Farmakologii i Projektowania Leków, Wydziału Nauk Medycznych i o Zdrowiu Uniwersytetu Kopenhaskiego za współpracę w prowadzeniu badań objętych niniejszą rozprawą doktorską

Panu dr Wojciechowi Płonka z Centrum Bioinformatyki Uniwersytetu w Hamburgu oraz FQS Poland (Fujitsu Group) za współpracę w prowadzeniu badań objętych niniejszą rozprawą doktorską

Kochanemu mężowi Radkowi za zrozumienie, motywację do działania oraz wspieranie mnie w trudnych momentach

Rodzicom i siostrze za pomoc w wyborze drogi zawodowej i nigdy niegasnącą wiarę we mnie

Przyjaciółom za cierpliwość i wyrozumiałość

Z całego serca Wszystkim i Każdemu z osobna serdecznie dziękuję

SPIS TREŚCI

PUBLIKACJE BĘDĄCE PRZEDMIOTEM ROZPRAWY DOKTORSKIEJ	5
SŁOWA KUCZOWE	5
WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW	6
1. WPROWADZENIE	10
2. CEL PRACY	11
3. FARMAKOLOGIA BEZPIECZEŃSTWA	14
3.1. Rozwój farmakologii bezpieczeństwa	14
3.2. Klasyfikacja celi molekularnych – definicja przykłady leki	16
3.3. Kanały jonowe	18
3.3.1. Kanały potasowe bramkowane napięciem	19
3.3.2. Kanały wapniowe bramkowane napięciem	21
3.3.3. Kanały sodowe bramkowane napięciem	22
3.4. Metody badań	24
4. MODELOWANIE MOLEKULARNE	27
4.1. Metody modelowania molekularnego w procesie odkrywania nowych leków	27
4.2. Dokowanie ligandów	31
5. NOWE WYTYCZNE OCENY KARDIOTOKSYCZNOŚCI	34
6. BADANIA W OPARCIU O METODY DOKOWANIA POTENCJALNEJ KARDIOTOKSYCZNOŚCI TIAGABINY	53
7. PAROSKETYNA W FARMAKOTERAPII DEPRESJI	87
7.1. Depresja – zespół depresyjny	87
7.2. Leki przeciwdepresyjne	87
7.3. Paroksetyna	90
7.4. Paroksetyna a repozycjonowanie leków	90
7.5. Budowa chemiczna, cele terapeutyczne oraz potencjalne mechanizmy działania paroksetyny	92

8. BADANIA MOŻLIWOŚCI INDUKCJI NEUROGENEZY PRZEZ INTERAKCJĘ PAROKSETYNY Z TRANSPORTERAMI MONOAMIN ORAZ KWASU γ -AMINOMASŁOWEGO W OPARIU O METODY CHEMII OBLICZENIOWEJ.....	117
8.1. Możliwe przyczyny depresji.....	117
8.2. Badanie neurogenego mechanizmu działania paroksetyny.....	118
9. WNIOSKI	142
10. STRESZCZENIE	144
11. SUMMARY.....	145
12. PIŚMIENNICTWO	146
13. FINANSOWANIE ROZPRAWY DOKTORSKIEJ	155
14. WYKAZ RYCIN	156
15. WYKAZ TABEL	157
16. OŚWIADCZENIA WSPÓŁAUTORÓW O UDZIALE W PUBLIKACJI	158
17. ZAŚWIADCZENIA O UDZIALE W GRANTACH	165
18. OŚWIADCZENIE O ZMIANIE NAZWISKA.....	168
19. DOROBEK NAUKOWY.....	169

PUBLIKACJE BĘDĄCE PRZEDMIOTEM ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

1. **Skubiszewska (Kowalska), M.**; Nowaczyk, J.; Nowaczyk, A., *Kv11.1, Nav1.5, and Cav1.2 Transporter Proteins as Antitarget for Drug Cardiotoxicity*. International Journal of Molecular Sciences 8099; 2020, 21, 8099.

Punktacja: IF: 5.923, MNiSW: 140.

2. **Skubiszewska (Kowalska), M.**; Nowaczyk, A.; Fijałkowski, Ł.; Kubacka, M.; Podkowa, A.; Sałat, K.; Grzešek, G.; Nowaczyk, J., *Antiepileptic Drug Tiagabine Does Not Directly Target Key Cardiac Ion Channels Kv11.1, Nav1.5 and Cav1.2*. Molecules 2021, 26, 3522.

Punktacja: IF: 4.411, MNiSW: 140.

3. **Skubiszewska (Kowalska), M.**; Nowaczyk, J.; Fijałkowski, Ł.; Nowaczyk, A., *Paroxetine – overview of the molecular mechanisms of action*. International Journal of Molecular Sciences 2021, 22, 1662.

Punktacja: IF: 5.923, MNiSW: 140.

4. **Skubiszewska (Kowalska), M.**; Fijałkowski, Ł.; Nowaczyk, A., *Assessment of Paroxetine Molecular Interactions with Selected Monoamine and γ -Aminobutyric Acid Transporters*. International Journal of Molecular Sciences 2021, 22, (12), 6293.

Punktacja: IF: 5.923, MNiSW: 140.

SUMA punktacji prac objętych rozprawą doktorską: IF = 22.180; MNiSW = 560.000

słowa kluczowe: kanały jonowe, tiagabina, paroksetyna, neurogeneza, repozycjonowanie leków

keywords: ion channels, tiagabine, paroxetine, neurogenesis, repurposing

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

- ADMET – adsorpcja, dystrybucja, metabolizm, eliminacja, toksyczność
- ADs – zaburzenia lękowe
- ADT – AutoDockTools
- AhR – receptor węglowodorów arylowych
- AR–LBD – domena wiążąca ligand receptora androgenu
- AR – receptor androgenowy
- ATAD5 – rodzina ATPaz (białko 5 zawierające AAA5)
- BTX – batrachotoksyna
- Ca²⁺ – jony wapnia
- CADD – komputerowe wspomaganie projektowania leków
- CiPA – *Comprehensive In Vitro Proarrhythmia Assay*
- CoMFA – porównawcza analiza pola molekularnego
- CoMSIA – analiza wskaźników cząstkowego podobieństwa
- CNS – Ośrodkowy Układ Nerwowy
- D – moment dipolowy
- DA – Dopamina
- DEA – Agencja ds. Narkotyków
- EKG – elektrokardiogram
- EMA – Europejska Agencja Leków
- ER-LBD – domena wiążąca ligand receptora estrogenu
- ER – receptor estrogenowy
- FDA – Agencja ds. Żywności i Leków
- GABA – kwas γ -aminomasłowy
- HBA – liczba akceptorów wiązań wodorowych
- HBD – liczba akceptorów wiązań wodorowych
- hBGT1 – izoforma transportera GABA/betainy

hDAT – ludzki transporter dopaminy

hERG_{inh} – inhibitor ludzkiego genu Ether-à-go-go- related Gene

hGAT – ludzki transporter kwasu γ -aminomasłowego

hGAT1 – izoforma 1 ludzkiego transportera GABA

hGAT2 – izoforma 2 ludzkiego transportera GABA

hGAT3 – izoforma 3 ludzkiego transportera GABA

hNET – ludzki transporter norepinefryny

HSE – element odpowiedzi na szok cieplny

hSERT – ludzki transporter serotoniny

HVA – kanały wapniowe aktywowane wysokim napięciem

IC₅₀ – połowa maksymalnego stężenia hamującego

IND – zgłoszenie nowego badanego leku

IUPAC – Międzynarodowa Unia Chemii Czystej i Stosowanej

URPL – Urząd Rejestracji Produktów Leczniczych

K⁺ – jony potasowe

KCl – chlorek potasu

K_i – powinowactwo wiązania ligand-białko

LogD – ujemny logarytm współczynnika podziału oktanol / woda przy pH 7,4

LogP – ujemny logarytm podziału oktanol / woda

LogSw – ujemny logarytm rozpuszczalności w wodzie

LVA – kanały wapniowe aktywowane niskim napięciem

MAOA – monoaminooksydaza A

MAOB – monoaminooksydaza B

MAOIs – inhibitory monoaminooksydazy

MAT – transporter monoamin

MMP – permebilizacja błony mitochondrialnej

MV – objętość cząsteczkowa

MW – masa molekularna

Na⁺ – jony sodu

NASSA – antagonist Noradrenergicznego receptora α_2 , antagonist swoistych receptorów serotoninericznych 2 oraz 3

n_D – refrakcja molowa

NDA – wniosek o rejestrację nowego leku

NDRIs – inhibitory wychwytu zwrotnego noradrenaliny i dopaminy

NE – noradrenalina

NFD – nifedypina

NIDA – Narodowy Instytut ds. Narkomanii

NIH – Narodowy Instytut Zdrowia

nrf2 / ARE – element reagujący na czynnik jądrowy (pochodzący z erytrocytu 2) 2 / element reagujący na przeciwutleniacze

NRIs – selektywne inhibitory zwrotnego wychwytu noradrenaliny

NRISA – inhibitor wychwytu zwrotnego noradrenaliny, antagonist receptorów serotoninowych

PDB – format pliku zgodny z bazą danych struktur biologicznych

Perm Caco-2 – przepuszczalność komórek Caco-2

pIC₅₀ – ujemny logarytm z IC₅₀

pK_i – ujemny logarytm z K_i

PPAR- γ – receptor aktywowany przez proliferator peroksysomów γ

PRX – paroksetyna

PSA – polarna powierzchnia cząsteczki

QSAR – zależność ilościowa pomiędzy strukturą związku chemicznego a jej aktywnością biologiczną

QSPR – zależność ilościowa pomiędzy strukturą związku chemicznego a jej właściwościami fizykochemicznymi

RCSB – baza danych struktur biologicznych

RMS – wskaźnik dopasowania modelu

RNG – liczba pierścieni w cząsteczce

SARI – antagonistą receptorów serotoniny oraz inhibitor wychwyty zwrotnego serotoniny

SER – serotonina

SNRIs – inhibitory wychwyty zwrotnego serotoniny i noradrenaliny

SNRISA – inhibitor wychwyty zwrotnego serotoniny i noradrenaliny, antagonistą receptorów serotoniny, silny inhibitor receptora d2

SNS – układ współczulny

SPARI – częściowy agonista autoreceptora HT1a, jednoczesny inhibitor wychwyty zwrotnego serotoniny

SSRIs – inhibitory wychwyty zwrotnego serotoniny

TCAs – trójcykliczne leki przeciwdepresyjne

TEF – terfenadyna

TGB – tiagabina

Tsc – współczynnik podobieństwa Tanimoto

VGCCs – wapniowe kanały jonowe

VGICs – kanały jonowe bramkowane napięciem

VGPCs – potasowe kanały jonowe

VGSCs – sodowe kanały jonowe

WHO – Światowa Organizacja Zdrowia

1. WPROWADZENIE

Współczesna definicja stanu zdrowia zaproponowana przez Światową Organizację Zdrowia (*World Health Organisation, WHO*) podkreśla, iż zdrowie jest dobrostanem obejmującym nie tylko brak choroby lub niedomagań fizycznych, ale również pełnię zdrowia psychicznego i społecznego [1].

W celu utrzymania należytej kondycji psychicznej niezwykle istotne jest zadbanie o prawidłowe funkcjonowanie ośrodkowego układu nerwowego (*Central Nervous System, CNS*). Zaburzona aktywność sieci neuronalnej, niezależnie od jej charakteru, prowadzi do występowania zaburzeń czuciowych, ruchowych oraz poznawczych, będących objawami wielu chorób, m.in. choroby Alzheimera [2], Parkinsona [3] czy epilepsji [4]. Sposób działania substancji w CSN nadal nie został jednoznacznie określony [5]. Zatem wyzwaniem współczesnej farmakologii jest szukanie leków ingerujących w struktury nerwowe, będących jednocześnie bezpiecznymi dla pozostałych struktur organizmu. Z tego względu badania toksyczności substancji będących kandydatami na nowe leki stają się coraz bardziej dokładne i rygorystyczne. Wprowadzono nowe sposoby badań nad lekiem, kładąc nacisk na mniej inwazyjne metody badawcze, m.in. testy *in silico*, które w szybki sposób dostarczają wstępnych informacji dotyczących działania substancji na ludzki organizm [6].

Zważając na powyższe fakty, w badaniach przeprowadzonych w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej podjęto próbę wyjaśnienia mechanizmów działania oraz ocenę ryzyka toksyczności stosowania wybranych leków oddziałujących na mózg i struktury nerwowe. Badaniem objęto dwa związki: paroksetynę (PRX) oraz tiagabinę (TGB). Oba leki są powszechnie używane w terapii zaburzeń neuronalnych, niemniej sposób modulacji układu nerwowego przez te substancje nie został jeszcze do końca zdefiniowany. Przeprowadzone badania obejmowały metody *in silico*, w tym modelowanie molekularne oraz testy bezpieczeństwa, których wyniki zostały zwalidowane testami *in silico*, *in vitro* oraz *in vivo* na szczurach.

2. CEL PRACY

Przedmiotem badań prowadzonych w niniejszej rozprawie były analizy wybranych związków o potencjalnym działaniu farmakologicznym w zaburzeniach funkcjonowania układu nerwowego. Szczegółowym celem naukowym były dwa aspekty:

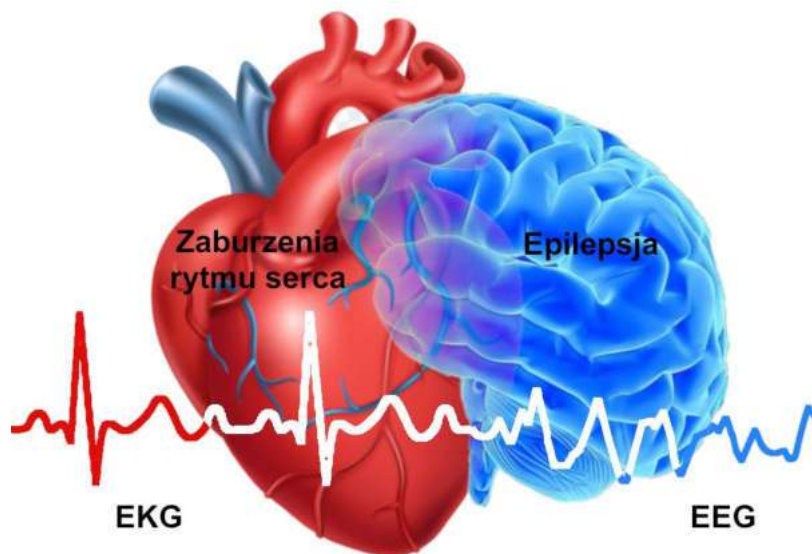
1. Ocena kardiotoksyczności tiagabiny będącej rezultatem interakcji leku z istotnymi dla tego typu aktywności kanałami jonowymi serca. Przeprowadzono serię testów *in silico*, mających na celu zbadanie inhibicji R–TGB na ludzkie kanały jonowe: $K_v11.1$, $Na_v1.5$ i $Ca_v1.2$. Cel realizowano przez wykonanie modelowania molekularnego, w tym dokowania ligandów oraz badań farmakologicznych. Badania *in silico* oddziaływania chemicznego TGB z modelami ludzkich kanałów jonowych bramowanych napięciem (*voltage-gated ion channels*, VGICs) przeprowadzono w Katedrze Chemii Organicznej CM UMK w Bydgoszczy. Wyniki uzyskane w doświadczeniach *in silico* zostały zwalidowane testami *in silico* oraz testami farmakologicznymi przeprowadzonymi na izolowanych narządach oraz *in vivo* na szczurach. Badania farmakologiczne wykonano we współpracy z naukowcami pod przewodnictwem prof. Kingi Sałat w Katedrze Farmakologii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie.

Badania własne dotyczyły oceny działania leku aktywnego w CNS na pracę serca (ryc. 1). Oceniano możliwość wywoływania tachykardii poprzez interakcję TGB oraz związków referencyjnych z modelami ludzkich kanałów jonowych serca, poprzez oszacowanie energii wiązania badanej cząsteczki w modelu ludzkich kanałów: $hK_v11.1$, $hNa_v1.5$, $hCa_v1.5$. Badaniem objęto następujące związki:

- związki referencyjne o udowodnionej inhibicji wybranych kanałów: terfenadynę (TEF), batrachotoksynę (BTX), nifedypinę (NFD);
- badaną substancję - TGB.

Finalnie, z sukcesem zadokowano i poddano analizie badane struktury chemiczne. Testy przeprowadzone dla związków referencyjnych potwierdziły, iż TEF jest silnym inhibitorem kanału $hK_v11.1$, BTX tworzy stabilny kompleks z kanałem $hNa_v1.5$, natomiast NFD wchodzi w silne interakcje z kanałem $hCa_v1.5$. Badania farmakologiczne obejmowały testy *in vivo* aktywności pracy serca przy użyciu elektrokardiogramu. Oceniano także wpływ substancji na blokowanie kanałów jonowych zależnych od wapnia w teście na izolowanej aorcie szczura. Porównanie wyników otrzymanych dla TGB z wynikami dla związków

referencyjnych pozwoliło wykluczyć rolę badanych kanałów jonowych w patomechanizmie tachykardii wywołanej TGB.



Ryc. 1. Wpływ działania leków na układ nerwowy i pracę serca.

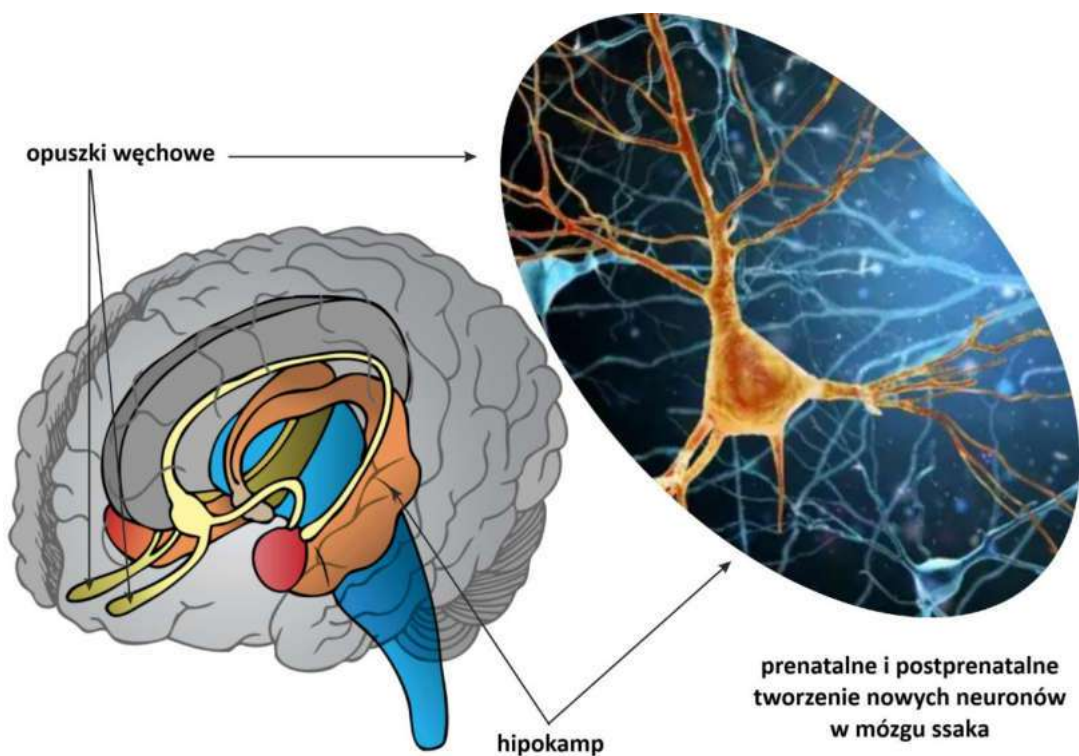
2. Ocena interakcji PRX z wybranymi celami terapeutycznymi (ryc. 2). Chcąc precyzyjnie określić mechanizm neurogennego działania badanego leku w CSN, który do tej pory nie został jeszcze jasno zdefiniowany, przedmiotem rozważań objęto wpływ PRX na poziom neuroprzekaźników kluczowych w występowaniu depresji: serotoniny (SER), noradrenaliny (NE), a także dopaminy (DA) oraz kwasu γ -aminomasłowego (GABA). W tym celu przeprowadzono badania modelowania molekularnego pomiędzy PRX a ludzkimi modelami transporterów ww. neuroprzekaźników (*monoamine transporters*, MATs): transporter norepinefryny (hNET), serotoniny (hSERT), dopaminy (hDAT), transportery kwasu γ -aminomasłowego (hGATs). Badania *in silico* przeprowadzono w Katedrze Chemii Organicznej CM UMK w Bydgoszczy. Walidację farmakologiczną, wyników uzyskanych w toku badań metodami obliczeniowymi, przeprowadzono we współpracy z Katedrą Projektowania Leków i Farmakologii, na Wydziale Zdrowia i Nauk Medycznych Uniwersytetu Kopenhaskiego.

Badania własne przeprowadzono dwuetapowo. Analizy rozpoczęto sprawdzeniem homologii struktur chemicznych badanych neuroprzekaźników oraz ich transporterów (*superimpositioning*). Dostarczyły one wstępnych informacji na temat podobieństwa konformacji neurotransmiterów podczas interakcji z receptorem oraz wartości dopasowania liganda do receptora, wyrażonej jako wartość wskaźnika dopasowania modelu (*Root Mean*

Square, RMS). W kolejnej fazie badań przeprowadzono testy dokowania molekularnego, porównując siłę wiązania PRX z badanymi MATs do stabilności utworzonych kompleksów transporterów ze związkami referencyjnymi. Badaniem objęto następujące związki:

- związki referencyjne o udowodnionej inhibicji wybranych transmiterów: SER, NA, DA, GABA
- badaną substancję PRX.

Docelowo udało się zidentyfikować stopień homologii celów oraz prawdopodobieństwo wiązania PRX do badanych neurotransmiterów. Otrzymane wyniki wskazują, iż istnieje wysokie prawdopodobieństwo tworzenia silnych połączeń z hDAT, hNET i hSERT, natomiast możliwość interakcja pomiędzy PRX a hGATs jest na niższym poziomie. Badania dokowania molekularnego dowiodły, iż PRX tworzy kompleksy ze wszystkimi badanymi celami terapeutycznymi, niemniej najsilniej wchodzi w interakcję z hSERT. Badania farmakologiczne przeprowadzone na liniach komórkowych chomika chińskiego dotyczyły testu wychwytu zwrotnego [³H]GABA. Udowodniono, iż PRX wchodzi w interakcję ze wszystkimi izoformami hGAT (hGAT1, hGAT2, hGAT3, hBGT1), najsilniej wiążąc się z hBGT1. Jednakże otrzymane wyniki jednoznacznie potwierdzają, iż wartość energii utworzonego kompleksu PRX-hSERT czyli jego stabilność jest kluczowa w procesie neurogenezy.



Ryc. 2. Prawdopodobna lokalizacja obszaru mózgu, w którym zachodzi neurogeneza.

3. FARMAKOLOGIA BEZPIECZEŃSTWA

3.1. Rozwój farmakologii bezpieczeństwa

Farmakologia bezpieczeństwa (*Safety pharmacology*) jest jedną z najdynamiczniej rozwijających się dyscyplin farmacji. Zadaniem tego typu badań jest dostarczenie szczegółowych danych na temat potencjalnych działań niepożądanych leków, które wg prawa farmaceutycznego stanowią wszystkie niezamierzone działania farmakodynamiczne substancji wywierające zaburzenia funkcji fizjologicznych organizmu, których efekty obserwowane są w trakcie farmakoterapii lub po jej zakończeniu [7]. Dane dotyczące bezpieczeństwa są niezbędne w planowaniu oraz przeprowadzaniu badań *in vitro* oraz *in vivo*. Ta część farmakologii odpowiedzialna jest również za określenie możliwych mechanizmów działań niepożądanych, które mogą posłużyć opracowywaniu nowych strategii badawczych [8].

W Europie nadzorem oraz monitorowaniem bezpieczeństwa farmakoterapii zajmuje się Europejska Agencja Leków (EMA), natomiast w Polsce Urząd Rejestracji Produktów Leczniczych (URPL) [9]. Obie instytucje wydają pozwolenia dopuszczające do obrotu środki lecznicze, ale także weryfikuje spełnianie zasad bezpieczeństwa leków już zatwierdzonych. Zasady bezpieczeństwa stosowania leków są określone oraz weryfikowane również przez Agencję ds. Żywności i Leków w Stanach Zjednoczonych (*Food and Drugs Administration, FDA*), która czerpie wiedzę na temat działań niepożądanych z literatury medycznej czy raportów medycznych a także informacji dostarczanych przez instytucje: Agencję ds. Zwalczania Narkotyków (*Drug Enforcement Agency, DEA*) [10], Narodowy Instytut Zdrowia (*National Institute of Health, NIH*) [11], Narodowy Instytut ds. Narkomanii (*National Institute on Drug Abuse, NIDA*) [12].

Za początek poszerzonych badań z zakresu farmakologii bezpieczeństwa uważa się lata dziewięćdziesiąte XX wieku, który był wynikiem serii wycofań leków z rynku z powodu powikłań układu sercowo - naczyniowego [13]. Cofnięcie pozwolenia na stosowanie objęło m.in. TEF (lek zarejestrowany w leczeniu kataru siennego), który wycofano w 1998r., po opisanu 350 zgonów spowodowanych wysokim stężeniem tego leku w organizmie. Mechanizm toksycznego działania TEF polega na wydłużeniu odcinka QT potencjału czynnościowego serca [14]. Wcześniej uważano, iż tylko leki kardiologiczne mogą wpływać na pracę serca. Niemniej z czasem zauważono, iż działanie żadnego leku nie ogranicza się do jednego celu terapeutycznego, dlatego niezbędnym jest monitorowanie każdego obszaru działania leku, nie tylko toksyczności mogącej wynikać z wiodącego mechanizmu działania

i rejestracji substancji. Badania przedkliniczne TEF dostarczyły jedynie danych na temat toksycznego działania leku po podaniu dużej bądź toksycznej dawki.

Przed 1990 r. badania bezpieczeństwa stosowania leku prowadzone były tylko w fazie przedklinicznej odkrywania nowego leku. Mnogość skutków ubocznych, pojawiających się w późniejszych etapach badań, doprowadziła do wprowadzenia wymagań testowania substancji na każdym etapie badań klinicznych oraz w fazie post-marketingowej (ryc. 3).



Ryc. 3. Etapy badań nad lekiem oraz rodzaje testów toksyczności wykonywane na każdym z nich. Oznaczenia skrótów: zgłoszenie nowego badanego leku (*Investigational New Drug*, IND), wniosek o rejestrację nowego leku (*New Drug Application*, NDA).

Biorąc pod uwagę fakt, iż skutki uboczne stosowania leków wynikają z interakcji leku z określonym celem, przed przystąpieniem do wykonywania testów niezbędny jest wybór odpowiednich metod. Istotnym jest również fakt wykonywania badań w ustalonej hierarchii. W tym celu EMA w zaleceniach S7A zebrała ogólne zasady dotyczące bezpieczeństwa przeprowadzania badań farmakologicznych. Wg ww. wytycznych testy należy zacząć od określenia wpływu substancji na najważniejsze układy organizmu: układ sercowo-naczyniowy, oddechowy oraz nerwowy [15].

Pomimo ciągłego rozwoju nowych technologii służących poprawie bezpieczeństwa stosowania leków, określenie profilu toksyczności nadal stanowi ogromne wyzwanie. Problematycznym jest określenie stosunku korzyści do strat wynikających ze stosowania leku. Dodatkowo niezwykle istotne są również odległe działania niepożądane leków, które są bardzo trudne do wykrycia na poziomie badań klinicznych. Obecnie w celu odzwierciedlenia ryzyka stosowania leku określa się poziom jego selektywności do poszczególnych celów molekularnych, określając wartości liczbowe różnych parametrów. Pożądane i niepożądane

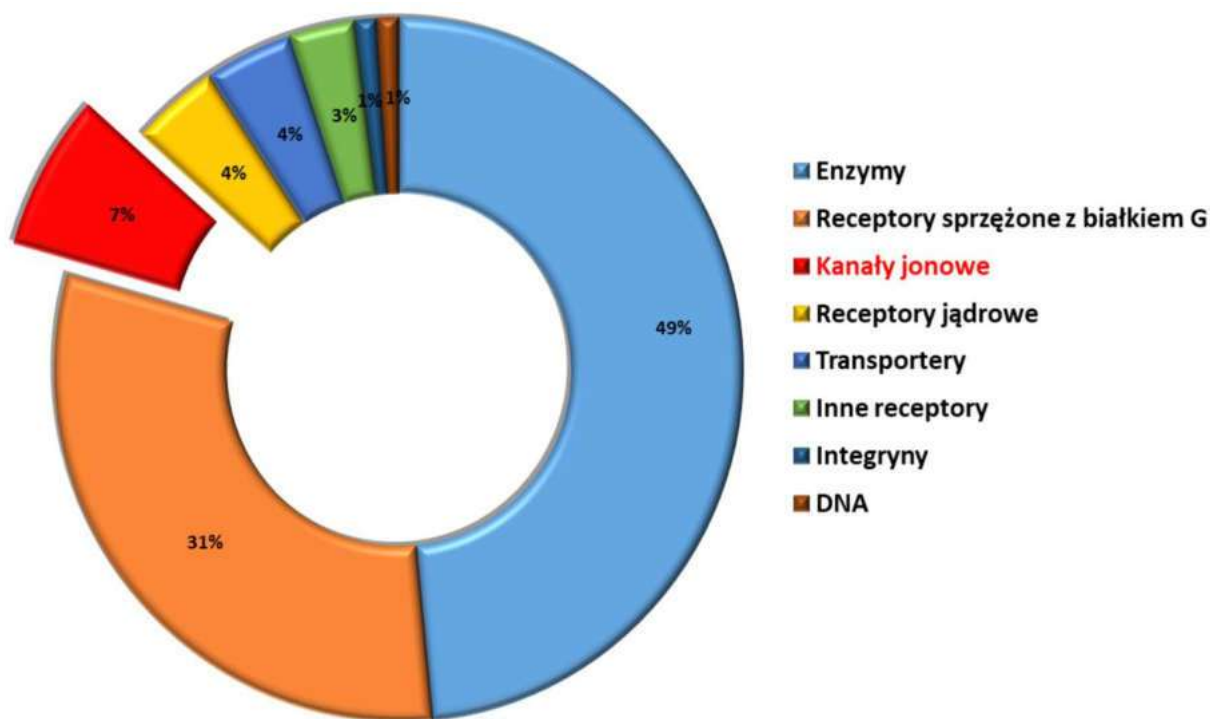
efekty eksperymentalne (*in vitro* lub *in vivo*) leku są na ogół związane z jego stężeniem w miejscach działania. Powszechnie K_i charakteryzuje się stałą dysocjacji kompleksu, która jest określana przez wiązanie ligandu w określonym miejscu działania. Przykładem analizowanego efektu biologicznego może być np. przejście jonów przez kanał jonowy. Parametrem charakteryzującym ten efekt jest stężeniem IC_{50} , zapewniające 50% redukcję wybranego prądu jonowego, który jest określany metodami elektrofizjologicznymi w komórkach wyrażających określony kanał. W podejściu obliczeniowym K_i wyznaczane jest w procesie obliczeniowym. Należy w tym miejscu podkreślić, że wartości liczbowe tych parametrów są na ogół dobrze skorelowane ($IC_{50} \approx K_i$). Niemniej, dla większości badanych związków dostępne są tylko dane uzyskane jedną z metod eksperymentalnych. W badaniach porównawczych (walidacyjnych) zazwyczaj opieramy się na założeniu, że obliczona wartość K_i (lub pK_i) odzwierciedla zdolność wiązania leku dla konkretnego celu terapeutycznego, a IC_{50} (lub pIC_{50}) bardziej odzwierciedla funkcjonalną siłę inhibitora. Ogólnie przyjmuje się, że obliczona wartość K_i (lub pK_i) jest pomocna w oszacowaniu prawdopodobieństwa, że dany lek będzie hamował określony cel białkowy i powodował klinicznie istotne efekty farmakoterapeutyczne. Z tego powodu zwykle zakładamy, że wartość liczbowa IC_{50} odpowiada wartości liczbowej K_i (lub $pIC_{50} \approx pK_i$). Umownie, pIC_{50} (lub pK_i) ≤ 4 jest powszechnie stosowane jako wartość progowa odzwierciedlająca małą siłę inhibicji lub mało istotne efekty farmakologiczne [16]. Niemniej nie jest to doskonały system klasyfikacji aktywności (bądź jej braku) określonego związku dla konkretnego białka. Godnym podkreślenia jest, że ciągle trwają badania nad ulepszaniem metod identyfikacji niezamierzonych działań leków. W tym celu powstają coraz nowsze programy wykorzystujące metody chemii obliczeniowej. Natomiast celem ograniczenia badań na zwierzętach wykorzystywane są m.in. komórki macierzyste, trójwymiarowe modele tkankowe oraz humanizowane modele myszy.

3.2. Klasyfikacja celi molekularnych

W poszukiwaniu nowych leków niezbędnym jest określenie sposobu działania substancji w organizmie. Zatem aby prawidłowo określić mechanizm działania leku w pierwszej kolejności należy zlokalizować jego cel terapeutyczny. Celem (*target*) nazwano cząsteczkę, która przyczynia się do zapoczątkowania bądź progresji choroby. Modułacja celu terapeutycznego przez lek może zmienić jego aktywność, co w konsekwencji prowadzi do przywrócenia prawidłowego funkcjonowania komórek oraz tkanek. Przeciwnieństwem celu

terapeutycznego jest antycel (*anti-target*), odgrywający zasadniczą rolę w prawidłowym funkcjonowaniu organizmu. Zaburzenie funkcji antycelu prowadzi do pogorszenia stanu zdrowia a nawet skróceniem czasu przeżycia, zapoczątkowania bądź występowania skutków ubocznych. Wyróżnić należy również białka tzw. kontracele (*counter-target*), które wykazują homologię względem celów, ale nie mają znaczącego udziału przebiegu. Jednak w przypadku modulowania przez lek kontracele mogą potencjalnie powodować występowanie niepożądane zmiany ich funkcji lub skutki uboczne. Dobrym przykładem działania kontracelu są modulacje przeciwciała przez lek potencjalnie powodujące niepożądane zmiany ich funkcji lub skutki uboczne [17].

Prawidłowa identyfikacja celu ma fundamentalne znaczenie w ocenie toksyczności leków. Należy podkreślić, iż leki nigdy nie działają na jeden cel, dlatego konieczne są wnikliwe analizy mechanizmów działania substancji. Na ryc. 4 przedstawiono podziału celów terapeutycznych wg klas biochemicznych. Największą grupę stanowią enzymy oraz receptory sprzężone z białkiem G. Niemniej, kanały jonowe są trzecią co do wielkości grupą stanowiącą miejsce wiązania leku. Jest to niezwykle istotne ze względu na fakt, iż jedną z najczęstszych przyczyn wstrzymania bądź wycofania substancji leczniczej z obrotu jest ryzyko kardiotoxyczności. Przyczyną tego zjawiska jest często nieprawidłowo funkcjonujące przewodnictwo sercowe, będące wynikiem zaburzenia pracy kanałów jonowych [18].



Ryc. 4. Podział celów terapeutycznych [19].

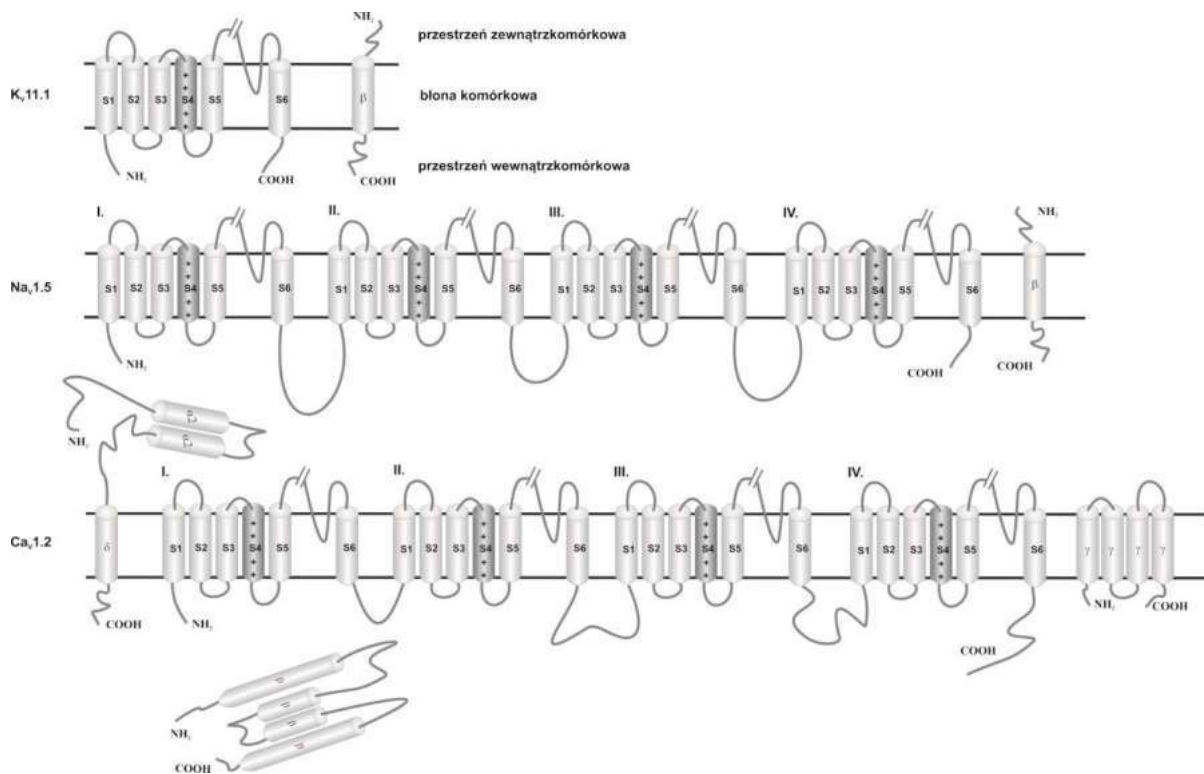
3.3. Kanały jonowe

Transmisja informacji w żywych komórkach jest możliwa dzięki przepływowi strumienia jonów, co skutkuje zmiennym ich rozkładem po obu stronach błony komórkowej. Daje to możliwość utrzymania odpowiedniej wartości potencjału dwuwarstwy lipidowej. Potencjał błony oraz strumień jonów tworzą zatem sieć informacyjną, która reguluje funkcje komórkowe. W tej sieci transbłonowej potencjał elektrochemiczny jest głównym źródłem energii, natomiast jony są nośnikami informacji [20].

Kanały jonowe osadzone są w błonie komórkowej, w wybranych błonach organelli wewnątrzkomórkowych i innych układach pośredniczących we współpracy między organellami. Są jedynymi w swoim rodzaju transporterami - transdukcja sygnału przebiega ze znacznie większą szybkością niż u np. transporterów metabolitów [20]. Co więcej, w przeciwieństwie do innych przenośników, kanał jonowy otwiera się jednocześnie po obu stronach błony. Przepływ jonów jest możliwy dzięki utrzymaniu potencjału błony komórkowej, co sprawia, że kanały jonowe są niezbędne do prawidłowej sygnalizacji komórkowej [21].

Aktywność kanałów jest ściśle regulowana zarówno pod względem selektywności substratowej, jak i przepuszczalności, a zatem pozostają w stanie otwartym tylko przejściowo. Odkryto wiele sposobów regulujących pracę kanałów, w tym mechanizmy bramkowania napięciem, wiązanie ligandów czy fosforylacja [20]. Kanały jonowe są zaangażowane w wiele procesów zachodzących w organizmie, m.in. w regulację pobudliwości komórek nerwowych, miocytów oraz mięśni szkieletowych [22]. Kluczową rolę w sygnalizacji elektrycznej odgrywają kanały jonowe bramkowane napięciem (*voltage-gated ion channels* VGICs). Nadrodzina VGICs obejmuje: potasowe kanały jonowe (*voltage-gated potassium channels*, VGKCs), sodowe kanały jonowe (*voltage-gated sodium channels*, VGNaCs), wapniowe kanały jonowe (*voltage-gated calcium channels*, VGCaCs) oraz chlorkowe i protonowe kanały jonowe. Niemniej trzy pierwsze stanowią największą grupę kanałów, których zaburzenie funkcjonowania prowadzi do występowania wielu schorzeń [20].

Budowę badanych w niniejszej rozprawie VGICs przedstawiono na ryc. 5. Podjednostki α tworzą pory, dzięki którym jony mogą przemieszczać się w obrębie błony komórkowej. Prawidłowe funkcjonowanie kanału jest możliwe dzięki obecności podjednostek pomocniczych β , δ oraz γ . Budowa poszczególnych kanałów jonowych oraz miejsce ich występowania determinują funkcje jakie pełnią one w organizmie.



Ryc. 5. Schemat budowy wybranych do badań VGICs.

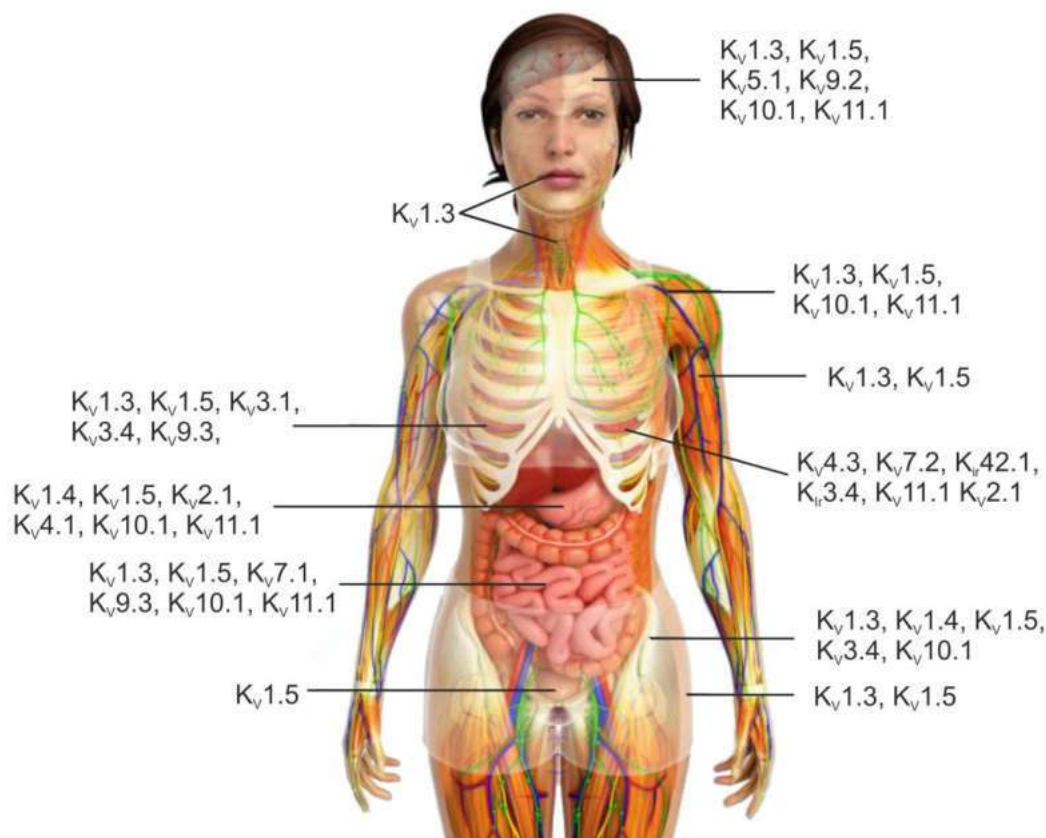
3.3.1. Kanały potasowe bramkowane napięciem

VGKCs stanowią największą i najbardziej zróżnicowaną grupą kationowych kanałów jonowych. Dzielą się na 12 podrodzin ($K_v1 - K_v12$) kodowanych przez około 40 genów [23]. Rodzaj i sposób połączenia podjednostek α oraz pomocniczych podjednostek β determinuje właściwości biofizyczne oraz farmakologiczne kanałów. Ryc. 6 przedstawia schemat lokalizacji kanałów potasowych w organizmie człowieka.

Podstawową rolą VGKCs jest udział w inicjowaniu i przewodzeniu potencjału czynnościowego oraz utrzymywanie na prawidłowym poziomie jego wartości [24]. Przykładowo aktywacja kanałów dla jonów potasu (K^+) zmniejsza, natomiast hamowanie aktywności zwiększa pobudliwość neuronów [23].

Jony metali, małe cząsteczki organiczne (MW 200 – 500 Da) oraz toksyczne peptydy (MW 3-6 kDa) mogą zaburzać aktywność VGKCs [23]. Substancje te blokują pory przewodzące jony bądź modyfikują bramkowanie kanału wiążąc się z podjednostkami pomocniczymi lub domeną czujnika napięcia.

W komórkach CNS oraz miocytach serca kanały potasowe wraz z sodowymi i wapniowymi są odpowiedzialne za repolaryzację błony komórkowej. Biorą również udział w proliferacji komórek oraz posiadają właściwości neuroprotektcyjne [25].



Ryc. 6. Schematyczna lokalizacja kanałów potasowych w poszczególnych częściach ludzkiego organizmu [26].

Rodzina kanałów jonowych K_v1 najobficiej zlokalizowana jest w układzie nerwowym, kontroluje pobudliwość neuronalną [27]. Udowodniono, iż inhibicja aksonalnych kanałów $K_v1.1$ i $K_v1.2$ poprawia przewodzenie impulsów w uszkodzonych włóknach nerwowych. Wiele innych rodzin omawianych kanałów zaangażowanych jest w pracę układu nerwowego. $K_v2.1$ bierze udział w repolaryzacji neuronów. Zmniejszenie stężenia potasu poprzez nadaktywność kanałów $K_v3.4$ przyczynia się do apoptotycznej śmierci neuronów, natomiast hamowanie aktywności tego kanału ma działanie neuroprotekcyjne. Zwiększoną aktywność kanału $K_v3.4$ zaobserwowano ponadto w chorobie Alzheimera – udowodniono, iż inhibicja ww. białka może zmniejszyć utratę neuronów i częściowo przywrócić funkcje poznawcze. Aktywacja kanału $K_v4.2$ może być celem terapeutycznym w leczeniu bólu zapalnego [27].

Niemniej, wiele kanałów potasowych wpływa na układ sercowo–naczyniowy. Wśród nich znajduje się najlepiej dotychczas poznany, kodowany przez gen *KCNH2* kanał $K_v11.1$ (inaczej *human Ether-à-go-go-Related Gene*, hERG). Odgrywa on kluczową rolę w depolaryzacji błony komórkowej potencjału czynnościowego [28]. Hamowanie jego aktywności zostało wykorzystane do oceny kardiotoksycznego działania danego leku. Wśród innych kanałów posiadających potencjał sercowo–naczyniowy należy wyróżnić: $K_v1.5$,

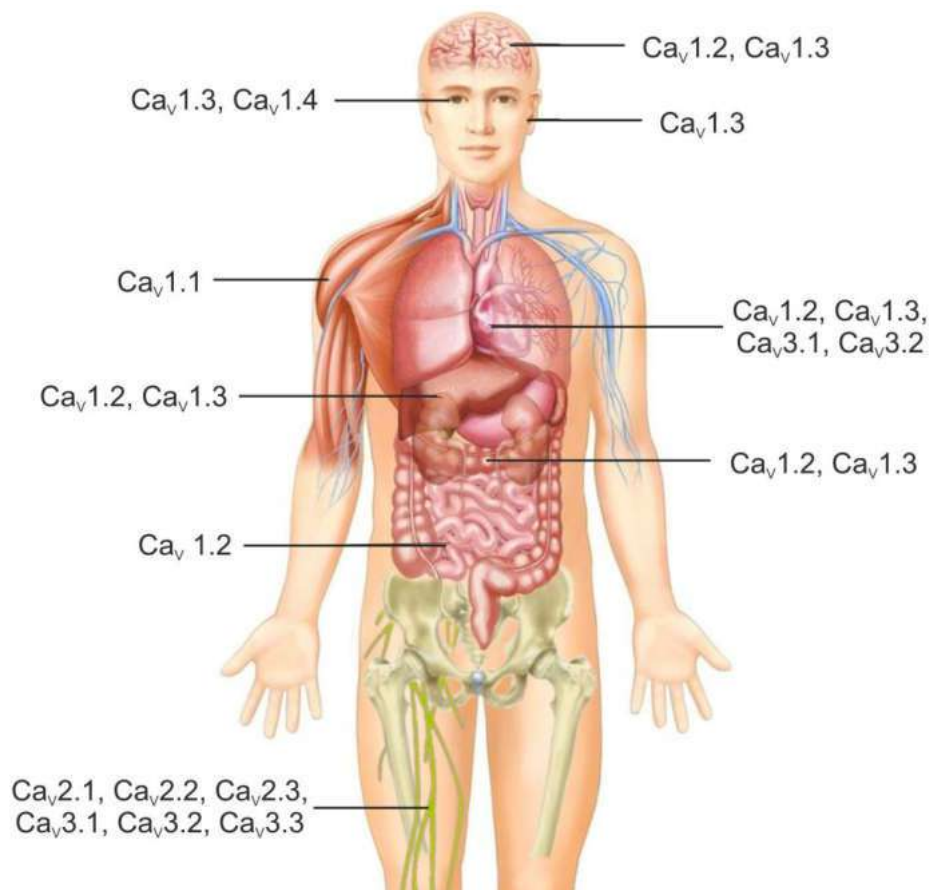
biorący udział we wczesnych fazach repolaryzacji potencjału czynnościowego; $K_v4.3$, którego inhibicja może być potencjalnie wykorzystywana w leczeniu arytmii; $K_v7.1$ – mutacja genu kodującego ten kanał może doprowadzić do wydłużenia odcinka QT potencjału czynnościowego [29, 30].

Kanały potasowe mogą również brać udział w kontrolowaniu innych funkcji organizmu. Farmakologiczne wzmocnienie aktywności tego kanału $K_v1.1$ może stanowić szansę terapeutyczną w leczeniu hipomagnezemii, ponieważ jedną z jej przyczyn mogą być mutacje ww. kanału. Natomiast $K_v1.3$ jest celem w leczeniu chorób immunologicznych, a także cukrzycy typu II oraz otyłości. W komórkach β hamowanie $K_v2.1$ zwiększa wydzielanie insuliny, co sugeruje potencjalną rolę terapeutyczną tego kanału dla cukrzycy typu II [31].

3.3.2. Kanały wapniowe bramkowane napięciem

VGCaCs biorą udział w skurczu mięśnia sercowego, regulacji hormonalnej a także w uwalnianiu neuroprzekaźników, pobudzeniu neuronów oraz proliferacji komórek i ekspresji genów. Podziału VGCaCs dokonano w zależności od wartości napięcia aktywującego kanał. Wyróżniono: kanały wapniowe aktywowane wysokim napięciem (HVA), do których należą: $Ca_v1.1 - 1.4$ i $Ca_v2.1 - 2.3$ oraz aktywowane niskim napięciem (LVA): $Ca_v3.1 - 3.3$, nazwane inaczej kanałami przejściowymi T [32]. Jedną z najistotniejszych grup VGCaCs jest rodzina Ca_v1 . Lokalizacja poszczególnych kanałów to przede wszystkim: mięśnie szkieletowe ($Ca_v1.1$), siatkówka oka ($Ca_v1.4$) oraz komórki: CSN, serca oraz układu endokrynnego ($Ca_v1.2$, $Ca_v1.3$) (ryc. 7) [31].

$Ca_v1.1$ odpowiada za wyzwalanie skurczu mięśni szkieletowych. Prawidłowy skurcz mięśnia sercowego jest uzależniony od aktywności kanału $Ca_v1.2$. Jego aktywacja prowadzi do napływu jonów wapnia (Ca^{2+}) do komórki, co generuje skurcz mięśnia. Aktywność kanału $Ca_v1.2$ jest niezwykle istotna w prawidłowej pracy serca. Badania przeprowadzone na myszach wskazują, iż zarówno utrata jak i zwiększona aktywność $Ca_v1.2$ może doprowadzić do poważnych anomalii związanych z wyzwalaniem potencjału czynnościowego serca i przewodzeniem impulsu. Farmakologiczna inhibicja kanału $Ca_v1.3$, obecnego w komórkach mięśnia sercowego, zmniejsza częstość akcji serca. Natomiast w siatkówce oka, napięciowo czynne kanały $Ca_v1.4$ (typu L) zlokalizowane są w zakończeniach synaptycznych fotoreceptorów pręcikowych i czopkowych. Zaburzenie ich funkcjonowania prowadzi m.in. do ślepoty nocnej czy choroby oczu Wysp Alandzkich [33].



Ryc. 7. Schematyczna lokalizacja kanałów wapniowych w poszczególnych częściach ludzkiego organizmu [31, 34]

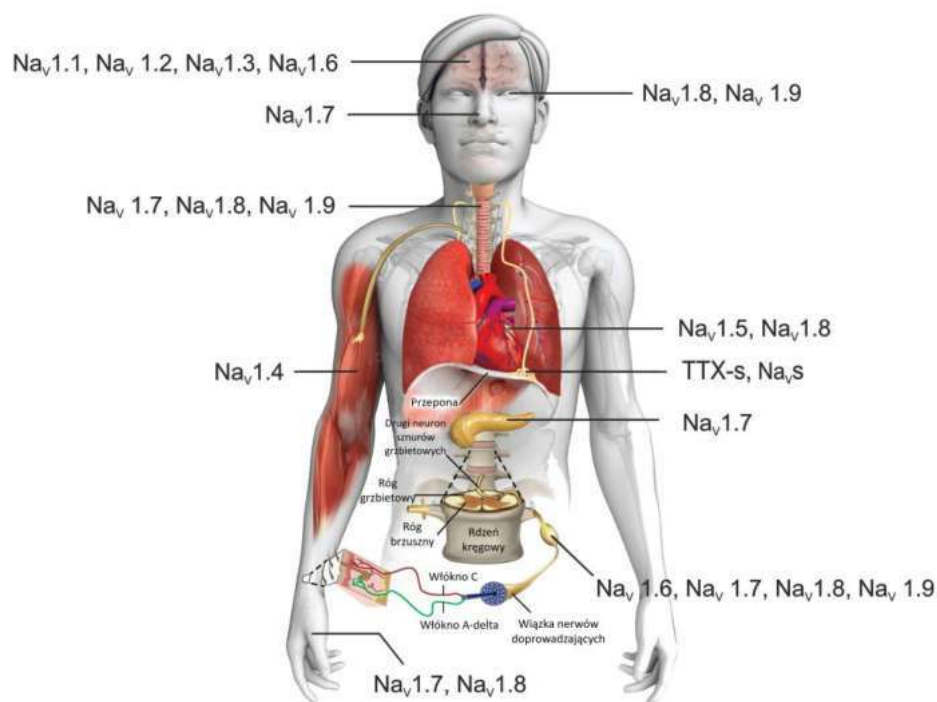
Omawiane kanały odgrywają niezwykle istotną rolę w prawidłowej pracy układu nerwowego. Badania wskazują, iż $Ca_v1.3$ i $Ca_v1.2$ aktywują zależne od Ca^{2+} szlaki zaangażowane w kontrolę ekspresji genów. Prawidłowa aktywność tych kanałów wspiera plastyczność i rozwój neuronów, co stymuluje proces uczenia się i zapamiętywania. Interesującym jest fakt, iż niedobór bądź zahamowanie aktywności $Ca_v1.2$ w przodomózgowiu myszy nasila zachowania lękowe i depresyjne [35], natomiast pobudzenie $Ca_v1.3$ prowadzi do występowania podobnych objawów [31].

3.3.3. Sodowe kanały jonowe bramkowane napięciem

Zrozumienie funkcji VGNaCs opiera się na badaniach biofizycznych, dzięki którym zróżnicowano trzy stany funkcjonalne kanałów: otwarty, spoczynkowy i inaktywowany. Przy normalnym potencjale błonowym kanały znajdują się w stanie spoczynkowym. Depolaryzacja błony aktywuje kanały do stanu otwartego, umożliwiając szybki napływ jonów sodu (Na^+) do komórki. Podczas długotrwałej depolaryzacji kanały ulegają inaktywacji i zmniejsza się napływ Na^+ . W tym stanie kanały pozostają zamknięte, chyba że błona

ulegnie repolaryzacji, która pozwoli im powrócić do stanu spoczynku. Balansowanie kanałów pomiędzy stanami ma istotne znaczenie dla działania leków. Selektywność terapeutyczna niektórych z substancji blokujących kanały sodowe, np. lignokainy, fenytoiny czy lamotryginy, jest konsekwencją działania kanału w określonej konformacji. W przeciwieństwie do blokerów kanałów otwartych (np. tetrodotoksyny) leki te wiążą się i stabilizują kanały w stanie nieaktywnym. Wyjaśnia to selektywne hamowanie podczas trwałej depolaryzacji, umożliwiając kontrolę pobudliwości bez upośledzenia normalnej funkcji oraz tłumaczy profil bezpieczeństwa leków VGNaC [36].

Dotychczas zidentyfikowano dziewięć różnych podjednostek α , na podstawie których wyodrębniono poszczególne jonowe kanały sodowe ($Na_v1.1$ – $Na_v1.9$). W zależności od lokalizacji (ryc. 8) pełnią one różne funkcje.



Ryc. 8. Schematyczna lokalizacja kanałów sodowych w poszczególnych częściach ludzkiego organizmu [37].

Kanały: $Na_v1.1$ – $Na_v1.3$ najobficiej występują w CSN. Są celem terapeutycznym wielu leków w terapii bólu, udaru, ale także migreny ($Na_v1.1$). W leczeniu stwardnienia wykorzystywane jest interakcja leków z $Na_v1.6$. Prawidłowa aktywność układu mięśniowo-szkieletowego jest kontrolowana przez kanał $Na_v1.4$. Natomiast kanały $Na_v1.7$ – 1.9 działają głównie w obwodowym układzie nerwowym, wykorzystywane są w leczeniu bólu oraz zaburzeń nocyceptycznych [38]. Najdokładniej poznano i opisano kanał $Na_v1.5$ kodowany przez gen $SCN5A$, najobficiej występujący w komórkach mięśnia sercowego. Mutacje

w SCN5A mogą prowadzić do zagrażających życiu arytmii. W licznych badaniach ustalono także, że największa liczba mutacji występuje w SCN5A w porównaniu do jakiegokolwiek innego genu kanału jonowego serca. Mutacje prowadzą do wydłużenia odstępu QTc w badaniu EKG, co wskazuje na jego dużą i powszechną ekspresję w komorach serca. Dodatkowo potwierdzono, że mutacje powodujące występowanie niefunkcjonalnych kanałów są związane z niewydolnością serca [39].

3.4. Metody badań

Istnieją trzy główne kategorie eksperymentów wykorzystywanych do testowania substancji chemicznych: badania *in silico*, badania *in vitro* oraz badania *in vivo*. Integracja wszystkich obszarów badań jest najbardziej pożądana podczas określania właściwości, mechanizmów działania oraz bezpieczeństwa stosowania leków.

- Testy z wykorzystaniem technik obliczeniowych – *in silico*

Badania *in silico* (w krzemie) to szereg testów wykonywanych przy pomocy oprogramowania komputerowego. Analizy właściwości cząsteczek ustalane są na podstawie struktury chemicznej związków. Pomimo, iż metody te są stosunkowo nową formą badawczą (terminu *in silico* pierwszy raz użyto w 1989 roku w pracy Pedra Miramontesa) bardzo szybko zyskały na znaczeniu i obecnie są szeroko wykorzystywane w badaniach nad lekiem [40]. Badania *in silico* przeprowadzane są na każdym etapie wprowadzania nowego leku na rynek. Wykorzystując omawiane metody tworzone są bazy danych struktur ligandów oraz receptorów w procesie projektowania nowej cząsteczki. W dalszym etapie metody obliczeniowe służą wyznaczeniu liczbowych parametrów fizykochemicznych substancji, dostarczając wiedzy na temat ich właściwości. Zależność pomiędzy strukturą a aktywnością biologiczną badanego związku szacowana jest przy pomocy ilościowych metod obliczeniowych QSAR (*Quantitative Structure-Activity Relationship*). Zaawansowane metody dokowania molekularnego są źródłem informacji na temat łączenia się leku z receptorem. Testy *in silico* są wykorzystywane również w ocenie właściwości biologicznych oraz toksyczności badanego leku [41].

Metody obliczeniowe są obecnie niezastąpionym źródłem wstępnej oceny właściwości oraz działania cząsteczek. Wprowadzenie technik komputerowych pozwoliło na zwiększenie wydajności badań przesiewowych cząsteczek, a także testowanie substancji modelowych. Testy *in silico* oraz *in vitro* zostały wprowadzone w myśl zasady 3R (*Replacement, Reduction, Refinement* – odpowiednio: *zastąpienie, redukcja, udoskonalenie*)

[42], której głównym założeniem jest ograniczenie liczby testów prowadzonych na żywych organizmach. Udało się również skrócić czas oraz ograniczyć koszty związane z odkrywaniem nowych leków. Pomimo wielu korzyści metody te mają jednak pewne ograniczenia. Głównym problemem jest fakt, iż leki ulegają złożonym, niescharakteryzowanym przemianom metabolicznym i farmakokinetycznym w organizmie, dlatego niezbędnym jest potwierdzenie uzyskanych metodami obliczeniowymi danych testami *in vitro* oraz *in vivo* [43].

- *Testy z wykorzystaniem technik badań pozaustrojowych – In vitro oraz ex vivo*

Pod pojęciem badań *in vitro* (w szkle) oraz *ex vivo* (z istoty żywej) kryją się wszelkie testy prowadzone poza organizmem żywym. Pozaustrojowymi systemami wykorzystywanymi w tego typu badaniach są m.in.: izolowane organy i tkanki, hodowle komórkowe, fragmenty komórek, organelle subkomórkowe, receptory, kanały jonowe, transportery oraz enzymy [44]. Badania omawianymi technikami wykonywane są na początku badań nad lekiem, najczęściej są kolejnym etapem po przeprowadzeniu testów metodami obliczeniowymi. Przykładowo w początkowych etapach badań nad lekiem wpływ kanałów jonowych na elektrofizjologię komórek sercowych określa się przy pomocy metod pozaustrojowych, co jest powszechnie stosowaną metodą walidacji wyników *in silico*.

Głównym celem prowadzenia badań pozaustrojowo jest uzyskanie informacji na temat mechanizmu działania oraz profilu bezpieczeństwa stosowania badanej substancji. Po wyselekcjonowaniu najbardziej obiecujących związków badania *in vitro* dostarczają wstępnych informacji na temat aktywności biologicznej substancji. Zastosowanie technik pozaustrojowych dało możliwość m.in. obserwowania aktywności związku w kierunku indukowania apoptozy komórek bądź ich proliferacji, zmiany ekspresji genów czy możliwości wpływu na potencjał oporności wielolekowej. Niemniej należy pamiętać, iż badania *in vitro* prowadzone z użyciem pojedynczych komórek bądź enzymów nie zawsze dostarczają rzetelnych danych, dlatego zalecane jest wykonanie testów *ex vivo*, prowadzonych na bardziej złożonych modelach. Badania te wymagają pobrania materiału biologicznego od zwierząt, natomiast ilość wykorzystywanych organizmów żywych w tego rodzaju badaniach jest niewielka [45].

Badania *in vitro* oraz *ex vivo* są skutecznym narzędziem, wykorzystywanym w celu jak najbardziej dokładnego odtworzenia warunków panujących w organizmie żywym. Aktualnie obiecującą techniką badań *in vitro* jest biodrukowanie trójwymiarowe (*Three-dimensional (3D) bioprinting*), wykorzystująca biomateriały oraz komórki do tworzenia tkanek.

Zastosowanie technologii druku 3D pozwoliło na odtworzenie warunków panujących w żywym organizmie, co umożliwiło wykonywanie zaawansowanych badań takich jak: czas i szybkość uwalniania leku w organizmie [46].

- *Testy na żywych organizmach – In vivo*

Termin *in vivo* (*na żywym*) odnosi się do badań wykonywanych na organizmach żywych. Na podstawie wstępnych wyników otrzymanych metodami pozaustrojowymi przeprowadzane są testy określające skuteczność substancji w wybranym modelu biologicznym. Wybór doświadczeń przeprowadzanych *in vivo* zawsze dobierany jest indywidualnie, należy wybrać najbardziej użyteczne w badanym typie aktywności. Modele zwierzęce dostarczają informacji na temat skuteczności leku, jednakże na ich podstawie nie zawsze można określić symptomy oraz objawy niepożądane generowane aplikacją substancji [45].

Badania prowadzone *in vivo* mają swoje ograniczenia, przede wszystkim ze względów humanitarnych. W przeprowadzaniu tego typu testów preferuje się zwierzęta żywe, nieznieczulone. Kolejnym ważnym aspektem jest trudność w przeniesieniu danych otrzymanych na zwierzętach na organizm człowieka. Wynika to z faktu, iż patofizjologia niektórych chorób jest często odmienna u różnych gatunków. Co więcej, metabolizmy zwierząt i ludzi różnią się od siebie, co może powodować zmiany w aktywności badanej substancji, wpływając na farmakologię oraz toksykologię leku, w wyniku czego otrzymane wartości mogą być niejednoznaczne [41].

Rozwój nauk biomedycznych pozwolił na poszerzenie zakresu badań nad nowymi lekami. Metody *in silico* oraz *in vitro* pozwalają odrzucić substancje o niskim potencjale terapeutycznym. Wykorzystanie metod obliczeniowych wykonywanych *in silico* oraz badań *in vitro* i *ex vivo* pozwoliło zwiększyć dokładność oraz skuteczność badań. Prowadzenie testów na organizmach żywych ograniczono do minimum, jednak racjonalne przeprowadzenie badań *in vivo* jest niezbędne przed rozpoczęciem testów na ludziach, w celu określenia właściwości badanej substancji. Pomimo postępów poczynionych przez toksykologów i farmakologów w opracowywaniu modeli *in silico*, *in vitro* i *in vivo* do przewidywania lub badania toksyczności kandydatów na leki, oszacowanie toksyczności leku u ludzi pozostaje trudnym wyzwaniem i należy do najczęstszych przyczyn niepowodzeń wprowadzania nowego leku na rynek [47].

4. MODELOWANIE MOLEKULARNE

Modelowanie molekularne jest działem nauki polegającym na odtworzeniu układów chemicznych oraz biologicznych przy zastosowaniu metod *in silico* w celu wyjaśnienia badanego procesu. Zrozumienie wybranego procesu prowadzi w praktyce do jego przyspieszenia bądź spowolnienia, w zależności od potrzeb. Celem badań molekularnych jest znalezienie empirycznego rozwiązania badanego zagadnienia w formie matematycznego równania lub w postaci graficznej, które wiąże struktury związków z ich biologicznymi właściwościami, co pozwala określić np. wartość siły interakcji substancji z celem terapeutycznym [48].

Modele komputerowe są budowane przy użyciu równań matematycznych, których generowanie opiera się na informacjach pochodzących z badań eksperymentalnych. Głównym założeniem matematycznego modelowania interakcji molekularnych jest fakt, iż właściwości biologiczne wszystkich cząsteczek są determinowane przez ich budowę chemiczną. Proces ten daje możliwość automatycznego generowania struktur, tworzenia i analizy baz danych oraz przewidywania trójwymiarowych modeli białkowych na podstawie znajomości ich sekwencji [49].

Metody komputerowe znalazły również zastosowanie w procesie odkrywania nowych leków. Redukcja czasu kolejnych etapów badań jest priorytetem dla ośrodków naukowych. Osiągnięcie tego celu stało się możliwe po wprowadzeniu biologii i chemii obliczeniowej. Zastosowanie technik komputerowego wspomagania projektowania leków (*Computer Assisted Drug Design, CADD*) pozwoliło na efektywną identyfikację i optymalizację nowych molekuł o pożądanej aktywności biologicznej [48, 50].

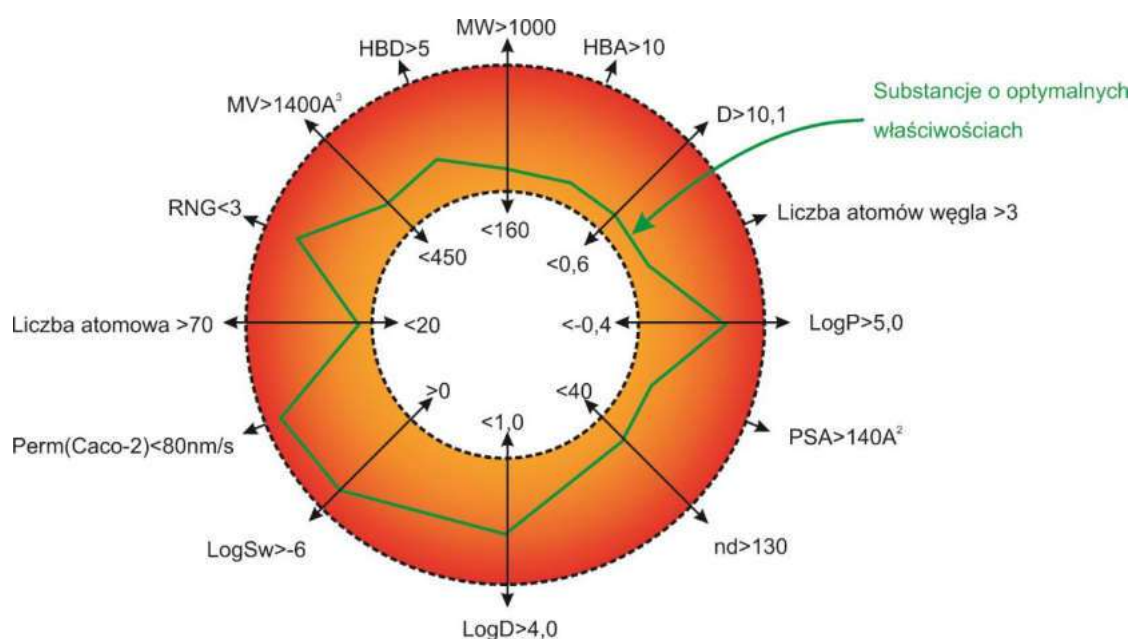
Oczekiwania jakie stawia się kandydatom na leki to przede wszystkim: efektywność oraz bezpieczeństwo stosowania, odpowiednie właściwości fizykochemiczne, stabilność oraz innowacyjność. Z tego względu badania *in silico* wspierają proces odkrywania nowych leków na każdym etapie badań przedklinicznych i klinicznych.

4.1. Metody modelowania molekularnego w procesie odkrywania nowych leków

Metody komputerowe wykorzystywane są już w pierwszych etapach badań przedklinicznych. Tworzenie baz danych, zawierających struktury chemiczne ligandów oraz receptorów pozwoliło na szybkie porównanie budowy cząsteczek oraz dało możliwość tworzenia farmakoforu. Wg Międzynarodowej Chemii Czystej i Stosowanej (*International Union of Pure and Applied Chemistry, IUPAC*) farmakofor to zbiór modelowych elementów

strukturalnych oraz elektronowych istotnych w utworzeniu optymalnego kompleksu z receptorem, niezbędnego do wyzwolenia bądź inhibicji odpowiedzi biologicznej [50].

W następnym etapie badań metody *in silico* są niezbędne w wyznaczaniu pożądanych właściwości fizykochemicznych substancji. Na podstawie przeprowadzonych badań na 50 000 strukturach pochodzących z bazy WDI (*World Drug Index, WDI*) [51] zoptymalizowano zakresy liczbowe cech jakie powinna posiadać substancja o właściwościach leczniczych. Wyznaczono zbiór parametrów fizykochemicznych mających decydujący wpływ na rozpuszczalność i przenikalność substancji chemicznej przez błonę biologiczną. Stworzono tzw. tarczę trafności (ryc. 9) zawierającą wartości liczbowe parametrów oraz zakresy ich zmian dla 95% leków dopuszczonych do stosowania.



Ryc. 9. Tarcza Trafności. Użyte skróty: masa molekularna (*Molecular Weight, MW*), liczba akceptorów wiązań wodorowych (*Hydrogen Bond Acceptors, HBA*), moment dipolowy (*Dipole Moment, D*), logarytm współczynnika podziału oktanol / woda (*Logarithm of the Octanol Water Partition Coefficient, LogP*), polarna powierzchnia (*Polar Surface Area, PSA*), refrakcja molowa (*Molar Refractivity, nd*), Logarytm współczynnika podziału oktanol/woda przy pH 7,4 (*Logarithm of the Octanol Water Partition Coefficient at pH 7.4, LogD*), logarytm rozpuszczalności w wodzie (*Logarithm of the Solubility In Water, LogSw*), przepuszczalność komórek *Caco-2* (*Caco-2 Permeability, Perm Caco-2*), liczba pierścieni w cząsteczce (*Ring, RNG*), objętość cząsteczkowa (*Molecular Volume, MV*), liczba akceptorów wiązań wodorowych (*Hydrogen Bond Donors, HBD*).

Tarcza trafności stała się podstawą do stworzenia wielu programów komputerowych (np. OSIRIS Data Warrior [52], ACDlabs [53]) służących do wyznaczenia liczbowych parametrów, co dało możliwość szybkiej, wstępnej oceny właściwości badanej struktury.

Tarcza trafności wraz z regułami zdefiniowanym przez Lipińskiego (1997 r.) [54] oraz Vebera (2002 r.) [55], wykorzystywana jest do wyznaczenia optymalnych cech dla leków oraz *podobieństwa* badanych struktur do leków. Pierwsza z nich opiera się na czterech parametrach: HBD, HBA, LogP, MW. Natomiast Veber klasyfikuje związek jako podobny do leku analizując wybrane deskryptory: MW, suma miejsc wiązania i suma donorów i akceptorów wiązań wodorowych (HAD), liczbę wiązań ulegających rotacji (*Rotatable bond*, RTB) oraz PSA. Wyznaczanie indeksu podobieństwa związków do leków (*Drugability*, DA) jest metodą porównania właściwości cząsteczek oraz ich cech strukturalnych. Polega na badaniu struktur różnych grup związków i ocenie na ile są one *podobne* do zarejestrowanych już leków. Daje to możliwość porównania powinowactwa badanych struktur do określonych celów biologicznych. Udowodnienie *podobieństwa* związków do znanych farmaceutyków jest jednym z badań rutynowo wykorzystywanych do zawężenia grupy kandydatów na leki.

Kolejne etapy modelowania komputerowego są uzależnione od danych, które dostępne są przed przystąpieniem do projektowania leków. Znając jedynie strukturę ligandów oprócz wyznaczenia modelu farmakoforowego stosowane są zaawansowane metody obliczeniowe QSAR lub sieci neuronowe opisujące korelację ilościowej zależności pomiędzy strukturą substancji a jej działaniem. Badania te opierają się na założeniu, iż matematyczną funkcją parametrów fizykochemicznych (tzw. deskryptorów) leku można opisać jego cechy biologiczne. Właściwości biofizyko-chemiczne są możliwe do określenia przy pomocy metody QSPR (*Quantitative Structure Property Relationships*). Trójwymiarowe metody QSAR: analiza wskaźników cząstkowego podobieństwa (*Comparative Molecular Similarity Index Analysis*, CoMSIA) oraz porównawcza analiza pola molekularnego CoMFA (ang. *Comparative Molecular Field Analysis*) wykorzystywane są do porównania struktur molekularnych o podobnych właściwościach, co umożliwia identyfikację cech istotnych w procesie wiązania ligandu z receptorem [50].

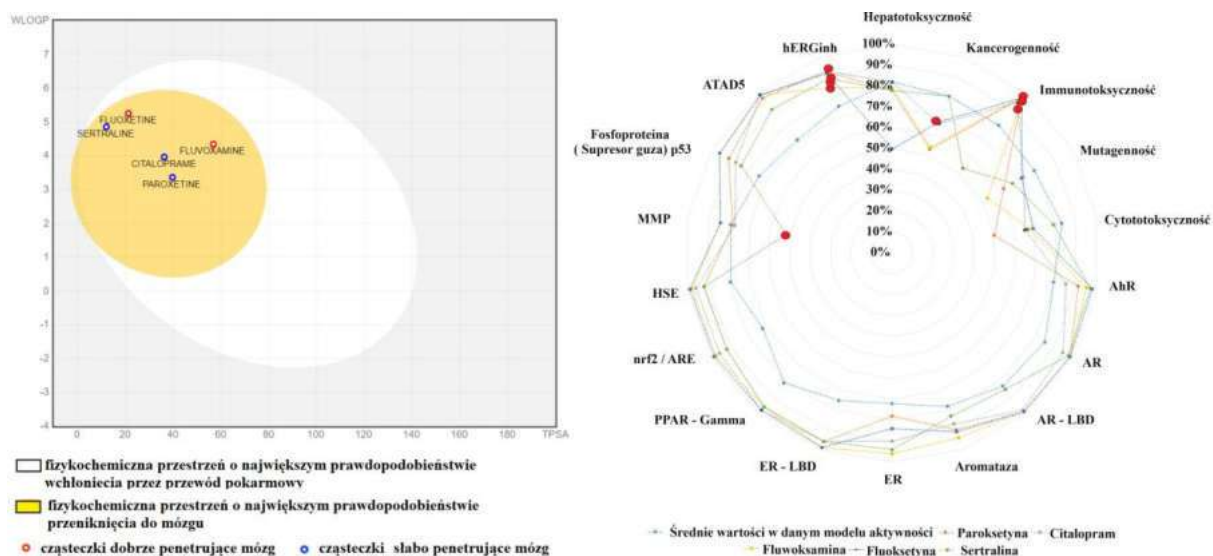
Znając budowę przestrzenną istotnego farmakologicznie białka można wykorzystać metody dokowania molekularnego, umożliwiające identyfikację miejsca wiążącego w białku oraz dokładne dane na temat rodzaju wiązań i siły utworzonego kompleksu z ligandem.

Podczas opracowywania nowych leków niezbędna jest ocena jego właściwości biologicznych oraz farmakokinetycznych. Dostępne techniki obliczeniowe, oparte na mechanice kwantowej dały możliwość modelowania różnych układów cząsteczkowych oraz obliczeń niezbędnych do określenia budowy, struktury oraz ich biologicznych właściwości. Wśród programów dostarczających tego typu informacji można wyróżnić: Gaussian [56] czy

BallView (*Biochemical ALgorithms Library*) [57]. Krytycznym etapem w procesie odkrywania leków jest profilowanie wchłaniania, dystrybucji, metabolizmu, wydalania oraz toksyczności (ADMET) kandydatów na leki. Badania kinetyczne wraz z badaniami toksyczności substancji, pomagają zbudować jej profil farmakologiczny. Pomimo, iż metody przesiewowe *in vitro* o średniej i dużej przepustowości są szeroko stosowane, nadal trudnym zadaniem jest określenie dokładnych parametrów ADMET każdego związku. W odpowiedzi na tę sytuację, testy *in silico* zyskały na znaczeniu, będąc uzupełnieniem testów wykonywanych na organizmach żywych. Metody te polegają na określeniu wartości liczbowej prawdopodobieństwa badanych parametrów ADME, na podstawie analizy struktur chemicznych związków. Techniki matematyczne służą również obliczaniu wartości prawdopodobieństwa toksyczności bądź braku toksyczności w badanym obszarze aktywności. Wśród oprogramowania komputerowego, służącego ocenie właściwości substancji na uwagę zasługuje: admetSAR [58], ProTOX II [59] czy SwissADME [60].

Techniki przedstawiania zależności pomiędzy parametrami fizykochemicznymi są prezentowane za pomocą m.in. algorytmów matematycznych oraz metod graficznych. Na ryc. 10 zaprezentowano wybrane wstępne badania własne przedstawione na konferencjach naukowych. Badania wstępne obejmowały m.in. zależności fizykochemiczne oraz toksyczność paroksetyny i wybranych antydepresantów z grupy o kodzie ATC: N06AB. Wykres w postaci jaja (*Egg plots*) obrazuje fizykochemiczne przestrzenie cząsteczek o największym prawdopodobieństwie absorpcji żołądkowo-jelitowej lub odpowiednio przeniknięcie do mózgu. Wielowymiarowe wykresy radiacyjne umożliwiają szybkie badania porównawcze i wizualizację w wybranych zbiorach analizowanych cząstek zbierają wartości otrzymane dla badanych struktury [61].

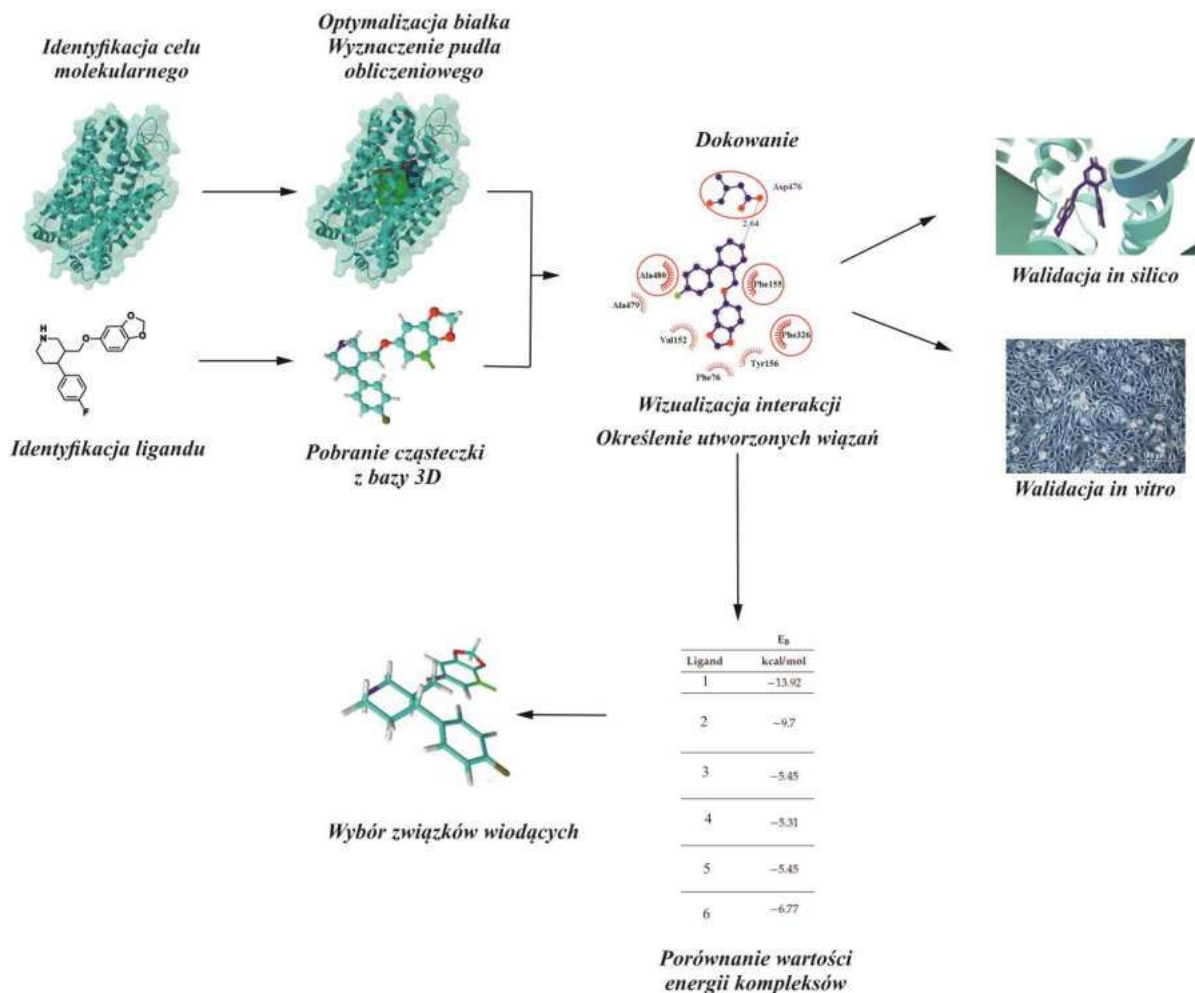
Uzyskane metodami chemii obliczeniowej wyniki, przedstawione na ryc. 10 w pełni znajdują potwierdzenie w danych farmakologicznych. Dane piśmiennicze wskazują, iż badane leki przeciwdepresyjne doskonale przenikają przez barierę krew–mózg i z łatwością ulegają wchłanianiu w jelitach. Wyniki wartości prawdopodobieństwa toksyczności, otrzymane testami *in silico* dla badanych leków, znajdują także potwierdzenie w badaniach przeprowadzonych na żywych organizmach [62]. Niemniej, dzięki przedstawionym danym potwierdzono, iż metody *in silico* są wiarygodnym źródłem informacji o lekach.



Ryc. 10. Graficzne przedstawienie wyników otrzymanych metodami modelowania molekularnego w zbiorze leków z grupy ATC: N06AB: paroksetyna, sertralina, fluoksamina, fluoksetyna, citalopram. Po prawej analiza fizykochemicznych przestrzeni parametrów cząsteczek o największym prawdopodobieństwie absorpcji żołądkowo–jelitowej lub odpowiednio przeniknięcia do mózgu oraz ocena prawdopodobieństwa penetracji mózgu przez cząsteczki: >95% prawdopodobieństwo – cząsteczki dobrze penetrujące i odpowiednio <95% – cząsteczki słabo penetrujące. Po lewej stronie analiza porównawcza profilu toksyczności: hERGinh – inhibitor ludzkiego genu Ether-à-go-go- related gene; hERGinh – inhibitor ludzkiego genu Ether-à-go-go- related Gene; ATAD5 – rodzina ATPaz – białko 5 zawierające AAA5; MMP – permebilizacja błony mitochondrialnej, HSE – element odpowiedzi na szok cieplny; nrf2/ARE – element reagujący na czynnik jądrowy (pochodzący z erytrocytów 2) 2/element reagujący na przeciwutleniacze; PPAR–Gamma – receptor aktywowany przez proliferator peroksyosomów Gamma; ER–LBD – domena wiążąca ligand receptora estrogenu; ER – receptor estrogenowy; AR–LBD – Domena wiążąca ligand receptora androgenu; AR – receptor androgenowy; AhR – receptor węglowodorów arylowych [63].

4.2. Dokowanie ligandów

Metodologia dokowania molekularnego bada zachowanie małych cząsteczek w miejscu wiązania z docelowym białkiem. Technika ta jest szeroko wykorzystywana w badaniach nad nowymi lekami, opiera się na symulacji optymalnej konformacji połączenia ligand–receptor, co pozwala przewidzieć ich sposób wiązania. Proces ten przebiega dzięki użyciu odpowiedniego algorytmu chemii obliczeniowej oraz funkcji matematycznych służących przewidywaniu powinowactwa wiązania pomiędzy dwoma cząsteczkami po ich zadokowaniu (ryc. 11) [64].



Ryc. 11. Etapy procesu dokowania molekularnego. Pierwszym etapem dokowania jest identyfikacja punktów uchwytu białka, czyli tzw. miejsca wiązania, dzięki którym ligand będzie mógł wchodzić z nim w interakcję. Kluczowym zagadnieniem w tym zakresie jest zdefiniowanie w programie tzw. pudła obliczeniowego w formie prostopadłościanu przestrzennie zawierającego charakterystyczne *wgłębienia*, *szczeliny* obejmujące miejsce wiązania. Następnie prowadzi się analizę struktur liganda, aby określić formę aktywną związku np. z dwóch enancjomerów. Proces dokowania polega na umieszczeniu liganda w obszarze pudła obliczeniowego białka oraz uruchomieniu odpowiednich algorytmów optymalizujących strukturę kompleksu ligand – białko. W toku przeprowadzonych badań uzyskuje się szereg trójwymiarowych modeli kompleksu ligand – białko, który przy pomocy dostępnego oprogramowania można opisać liczbowo charakterystycznymi parametrami (np. E_b , pK_i ,...). Utworzone kompleksy należy uszeregować zgodnie z rosnącą energią kompleksu, co daje możliwość wytypowania najbardziej stabilnych połączeń. Dane uzyskane metodami chemii obliczeniowej należy w kolejnym etapie badań potwierdzić testami farmakologicznymi.

Dokowanie molekularne ma trzy główne, powiązane ze sobą cele. Pierwszy z nich polega na poprawnym przewidywaniu pozycji liganda w miejscu wiązania z receptorem. Kolejny jest uszeregowanie ligandów zgodnie z najbardziej korzystnymi parametrami istotnymi w procesie oddziaływania z receptorem. Ostatni polega na oszacowaniu

i interpretacji związanych z tym procesem fizykochemicznych oddziaływań molekularnych [65].

W zależności od zastosowanej metodologii badań algorytmy poszukiwania odpowiedniej konformacji liganda dzielą się na trzy główne grupy: systematyczne, stochastyczne oraz deterministyczne [65]. W niniejszej pracy badania własne przeprowadzono przy użyciu metod stochastycznych, a dokładnie algorytmu genetycznego. Korzystając z oprogramowania AutoDock oraz AutoDockTools (ADT) przeprowadzono proces dokowania ligand–białko (ryc. 9). Metoda ta pozwoliła na uzyskanie połączeń o najniższej wartości energii. Następnie przeprowadzono walidację *in silico* oraz *in vitro*.

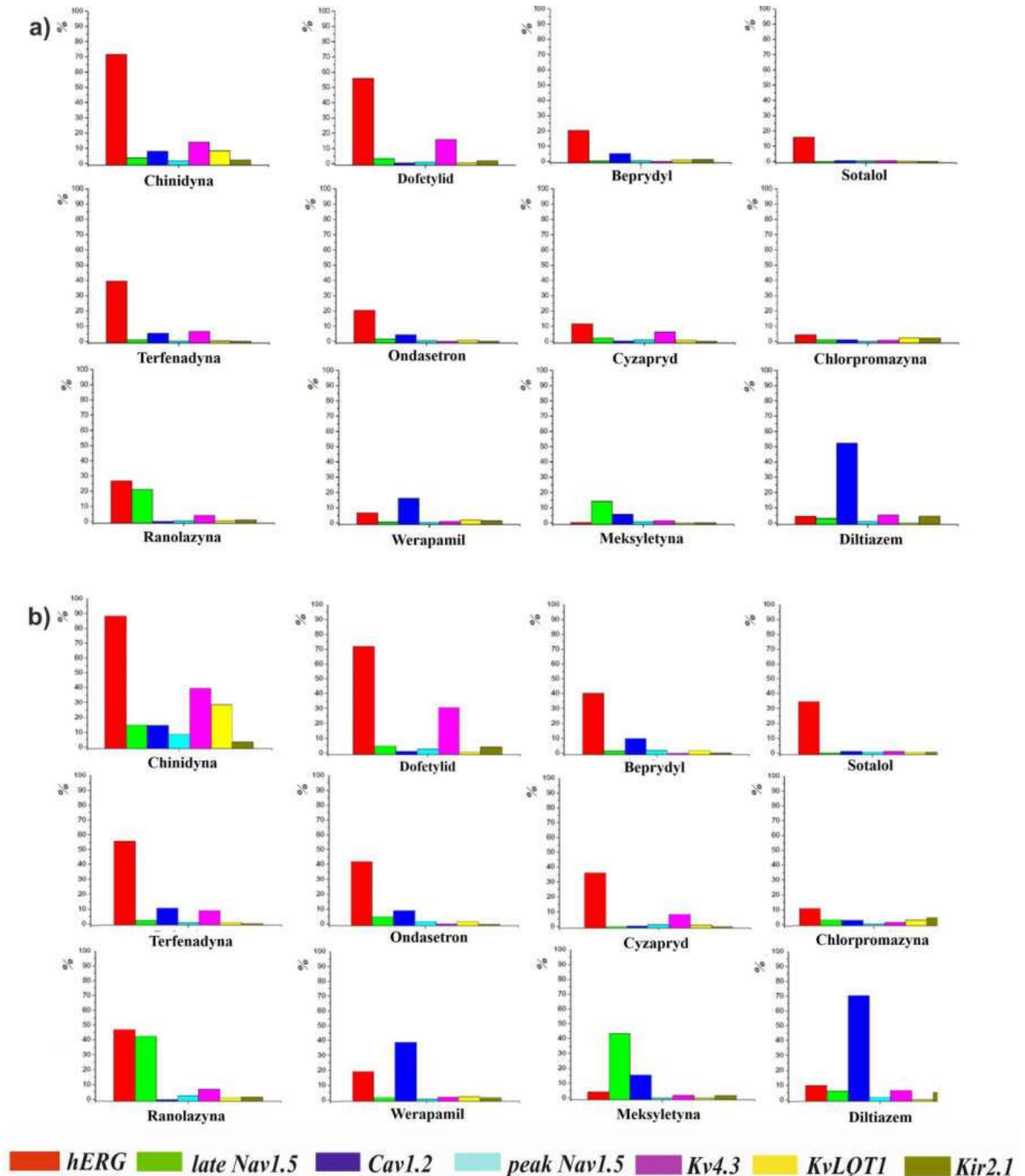
5. NOWE WYTYCZNE OCENY KARDIOTOKSYCZNOŚCI

Pomimo ciągłego rozwoju technik badania leków nadal ogromny problem współczesnej medycyny stanowi konieczność wycofania z obrotu leków ze względu na ryzyko wywoływania toksyczności. Wg danych zgromadzonych przez Program Międzynarodowego Monitorowania Leków WHO (*Program for International Drug Monitoring of the WHO*) w latach 1999 – 2010 wycofano łącznie 133 leki na świecie, natomiast w Europie 104. Jednym z głównych powodów tego zjawiska było ryzyko kardiotoxyczności. Wykazano, że 25 ze 133 leków (m.in. astemizol, cisaprid czy pergolid) zostało wycofanych właśnie z tego powodu, co stanowiło 18,8% wszystkich decyzji [66].

Ryzyko wydłużenia odcinka QT potencjału czynnościowego serca stanowi jedną z najczęstszych przyczyn toksycznego działania leków na serce. Z tego względu w 2005 roku wprowadzono obowiązek testowania leków w fazie badań przedklinicznych w kierunku ryzyka wywoływania arytmii typu *torsade de points* (TpP). Zaobserwowano, iż działanie proarytmiczne leków jest najczęściej wywołane blokowaniem kanału Kv11.1, który kodowany jest przez gen hERG. Pomiar stężenia leku, który prowadzi do zmniejszenia o połowę prądu potasowego, był przez wiele lat podstawową determinantą podczas wydawania decyzji o zaprzestaniu bądź kontynuacji badań klinicznych [67]. Niemniej, po pewnym czasie okazało się, że zarówno wydłużenie odcinka QT jak i blokowanie hERG nie mogą być traktowane jako jedyny powód występowania zjawiska TdP [68]. Na ryc. 12 przedstawiono wpływ leków na kanały jonowe serca [69], które są potwierdzeniem, iż silne inhibitory genu hERG (np. werapamil) mogą być pozbawione komponenty proarytmicznej i odwrotnie – słabe inhibitory hERG (np. sotalol) mogą powodować poważne zaburzenia elektrycznej pracy serca.

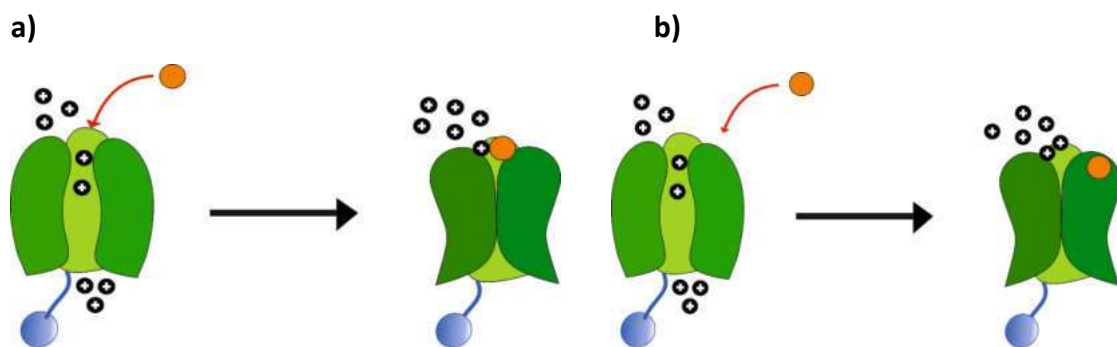
Udowodniono także, że inhibicja hERG może ulec nasileniu bądź osłabieniu przez działanie innych kanałów jonowych znajdujących się w sercu. Przyczyną wydłużenia repolaryzacji, który wynika ze zmniejszenia prądu odkomórkowego, jest zatem blokowanie jednocześnie innych kanałów. W związku z powyższym, w celu rzeczywistej oceny ryzyka proarytmicznego cząsteczek, w 2013 roku po raz pierwszy zastosowano nową strategię zaproponowaną przez *Comprehensive In Vitro Proarrhythmia Assay* (CiPA), która skupia się na interakcji cząsteczek z modelami kanałów jonowych. Inicjatywa CiPA służy ocenie kardiologicznego bezpieczeństwa stosowania leków w pierwszych etapach badań *in vitro* oraz *in silico*. Nowe wytyczne proponują grupę sześciu kanałów jonowych bramkowanych napięciem, mających kluczowe znaczenie w procesie wywoływania arytmii. Należą do nich:

Kv11.1, Nav1.5-late, Cav1.2, Kv4.3, KvLQT1/mink oraz Kir2.1. W badaniach udowodniono, że spośród nich trzy pierwsze ww. kanały są najistotniejsze w ocenie ryzyka proarytmicznego. W początkowych etapach badań nad lekiem wpływ kanałów jonowych na elektrofizjologię komórek sercowych określa się przy pomocy metod pozaustrojowych [13].



Ryc. 12. Wykres procentowego profilu blokowania kanałów jonowych w kategorii wysokiego (górny rząd), pośredniego (środkowy rząd) i niskiego (dolny rząd) kategorii ryzyka proarytmicznego CiPA. a) % inhibicji reprezentuje inhibicję przy 1 X C_{max} lub b) 3 X C_{max} wolnego osocza [70].

Ze względu na rozwój farmakologii bezpieczeństwa w kierunku nasercowych działań niepożądanych w niniejszej pracy zebrano najważniejsze informacje dotyczące kanałów jonowych, niezbędne w ocenie kardiotoxycznego działania leków. W pierwszym etapie rozważań dokonano przeglądu aktualnych wytycznych dotyczących kardiotoxyczności oraz ich rozwoju i zaostrzaniu na przestrzeni lat. Przeanalizowano oraz dokładnie omówiono budowę molekularną VGICs zlokalizowanych w sercu. Następnie scharakteryzowano rodziny kanałów potasowych, wapniowych oraz sodowych skupiając uwagę na ich podziale, budowie, lokalizacji oraz funkcji jakie pełnią w organizmie. Na ryc. 13 zaprezentowano w sposób graficzny omówione w pracy możliwe sposoby hamowania kanałów jonowych przez leki.



Ryc 13. Mechanizmy inhibicji kanałów jonowych: a) zatykanie porów, b) wiązanie allosteryczne.

Szczególną uwagę zwrócono na fakt, iż kanały jonowe nie tylko stanowią cel terapeutyczny wielu leków (np. leków antyarytmicznych III generacji), ale mogą stać się jednocześnie antycelem dla innych [25]. Wiele z nich zaburza fizjologiczne działanie VGICs, blokując przepływ jonów oraz przekazywanie informacji w obrębie komórki. Wnioski, które wyniknęły z przeprowadzonych analiz jednoznacznie wskazują, iż rozwój badań dotyczących bezpieczeństwa nasercowego stosowania leków powinien odbywać się wielokierunkowo, mając na względzie ocenę zarówno pożądanego miejsca działania leku jak również wpływ badanej substancji na możliwe antycele.



Review

K_V11.1, Na_V1.5, and Ca_V1.2 Transporter Proteins as Antitarget for Drug Cardiotoxicity

Magdalena Kowalska ¹, Jacek Nowaczyk ² and Alicja Nowaczyk ^{1,*}

¹ Department of Organic Chemistry, Faculty of Pharmacy, Collegium Medicum in Bydgoszcz, Nicolaus Copernicus University, 85-094 Bydgoszcz, Poland; magda.kowalska@doktorant.umk.pl

² Faculty of Chemistry, Nicolaus Copernicus University, 87-100 Toruń, Poland; jacek.nowaczyk@umk.pl

* Correspondence: alicja@cm.umk.pl

Received: 5 October 2020; Accepted: 27 October 2020; Published: 30 October 2020



Abstract: Safety assessment of pharmaceuticals is a rapidly developing area of pharmacy and medicine. The new advanced guidelines for testing the toxicity of compounds require specialized tools that provide information on the tested drug in a quick and reliable way. Ion channels represent the third-largest target. As mentioned in the literature, ion channels are an indispensable part of the heart's work. In this paper the most important information concerning the guidelines for cardiotoxicity testing and the way the tests are conducted has been collected. Attention has been focused on the role of selected ion channels in this process.

Keywords: antitarget; drug cardiotoxicity; ion transporter proteins

1. Introduction

Safety Pharmacology is one of the most dynamically developing disciplines, whose objective is to assess the potential risks of improperly conducted pharmacotherapy. Evaluation of the safety in the use of a substance is a key part of placing a new medicine on the market. The Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) has proposed a number of guidelines for drug safety testing [1,2]. However, the continuous development of medicine allows the extension and refinement of the test panel that a new molecule must undergo before it can be released for use by patients. Toxic effects of compounds on the most important organs is one of the frequent reasons for eliminating substances from further tests. Additionally, safety tests are also performed for medicines already approved for use. Such trials are required, e.g., to register new indications for “old” drugs.

All abovementioned activities require a suitable definition of the antitargets. They are defined as undesirable molecular targets that play an essential role in the proper functioning of cells. Down modulation of an antitarget results in clinically unacceptable side effects, initiation of disease, or deleterious alterations in disease progression. This results in shorter onset time of the disease, increased disease burden, poorer patient outcome, or decreased survival time.

The amphiphilic nature of lipid molecules, which contain both polar and hydrophobic parts, determines the weak permeability of lipid bilayers for broad range of substances and thus allows the membranes to perform barrier functions effectively in the cells. Since the lipid bilayer of cell membranes is almost impermeable to ions, their transport is possible through specialized transmembrane transport proteins called ion channels. These are defined as macromolecular pores made of many protein subunits through which ions can passively move through the cell membrane [3]. More than 650 types of human ion channels have been identified so far [4–6]. Additionally, scientists have proven that different types of ion channels make up about 1.5% of the human genome [7]. Ion channels are the third-largest target for existing drugs (after G-protein coupled and nuclear receptors). When the channel is open, there is little interaction between the channel protein and the types of ions that

pass through it, since the channel itself does not undergo conformational change to allow the ions to pass through [3]. It is the fastest type of transport protein, allowing movement at up to 10^8 ions per second, which is equal to electric current of a few picoamperes (10^{-12} A) generated by the ionic flow through a single open channel [8]. Commonly the magnitude of potential difference across the cell membrane of living cells is 10^{-3} V. This enables cells to communicate quickly and play a fundamental role, allowing vital functions, such as the brain receiving and processing information, the heart beating, and muscles working [7]. Therefore, ion channels play a crucial role in several important physiological and pathological processes.

Since many heart diseases result from disruption of the normal ion channel function, this work is devoted to reviewing selected antitargets for cardiotoxicity. This article reviews the transport proteins $K_V11.1$, $Na_V1.5$, and $Ca_V1.2$ as potential undesirable drug targets. Recent topics related to *in silico* cardiotoxicity studies are presented in a concise form. The review includes a historical overview of the cardiotoxicity of drugs, the functions, and the structure of $K_V11.1$, $Na_V1.5$, and $Ca_V1.2$. Considering the wide application of the molecular docking technique, the key properties of the structural subunits of the studied heart ion channels and a set of selected drugs inhibitory potencies values are gathered.

2. Historical Overview of Drug Cardiotoxicity

The statistics show that the risk of cardiotoxicity is one of the most common reasons for withholding or withdrawing drugs from the market [9,10]. This unwanted effect is shared by a large number of non-cardiovascular drugs. The statistics show that up to 70% of potential medicines are either not approved for further testing or their use is limited [11]. Additionally, it has been estimated that approximately 2–3% of all drug prescriptions involve medications that may unintentionally cause long QT syndrome [12]. The first drugs that were removed from clinical use due to cardiotoxicity were encainide (proarrhythmic effect) and terodiline (QT interval prolongation) (Figure 1) [13,14]. Terdynafine, cisaprid, astemizole, sertindol, thioridazine, grepafloxacin have been removed due to heart toxicity [15] (Figure 1). In 2020, there was information about QT prolongation for other drugs: osilodrostat, carbetocid, selpercatinib, and rucaparib [16]. In 2005, the Council on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use suggested principles for checking new molecules for the risk of inducing potentially fatal arrhythmias (e.g., torsades de pointes (TdP)) caused by blocking the human Ether-à-go-go-Related Gene (hERG, $K_V11.1$) [17,18]. The first antitarget in compound cardiotoxicity studies was thus defined [11]. This was based on the observed correlation between electrocardiogram QT prolongation and patients' risk of TdP arrhythmia. The preclinical and clinical studies proposed in S7B and E14 were implemented and are now widely used in the pharmaceutical industry and regulatory agencies [17,18]. These assumptions were accepted as the crucial elements of the compound cardiotoxicity assessment. However, subsequent years of research have demonstrated that proarrhythmic effect, QT prolongation, and hERG blocking cannot be treated as the only determinants of the occurrence of TdP [19]. Verapamil and ralonazine are examples of drugs that are strong inhibitors of the hERG channel and at the same time devoid of the risk of inducing arrhythmias and vice versa, serious disorders of cardiomyocyte electrophysiology caused by drugs that are weak hERG inhibitors (e.g., sotalol, alluzosin) [20,21]. Thus, it proves the insufficient specificity of the tests based only on the assessment of the hERG channel blocking potential [22]. The risk of drug-induced TdP is rather balanced by multiple internal cardiac ionic currents that define ventricular repolarization [23]. Thus, for the first time in 2013, a new strategy was applied for a real proarrhythmic risk assessment of molecules: Comprehensive In Vitro Proarrhythmia Assay (CiPA). CiPA is utilized in the first stages of drug research and focuses on the three most important areas. The first one is the assessment of the interaction of molecules with three ion channel models. In addition to studying the interaction of molecules with hERG, CiPA proposes two additional ion channels gated by voltage, which are essential for the development of arrhythmia: $Na_V1.5$, $Ca_V1.2$. The second area of CiPA concerns *in silico* simulations of action potential (AP) responsible for arrhythmia. The third

area of CiPA's research is advanced cellular testing using cardiomyocytes derived from pluripotent stem cells (iPSC-CM) [24].

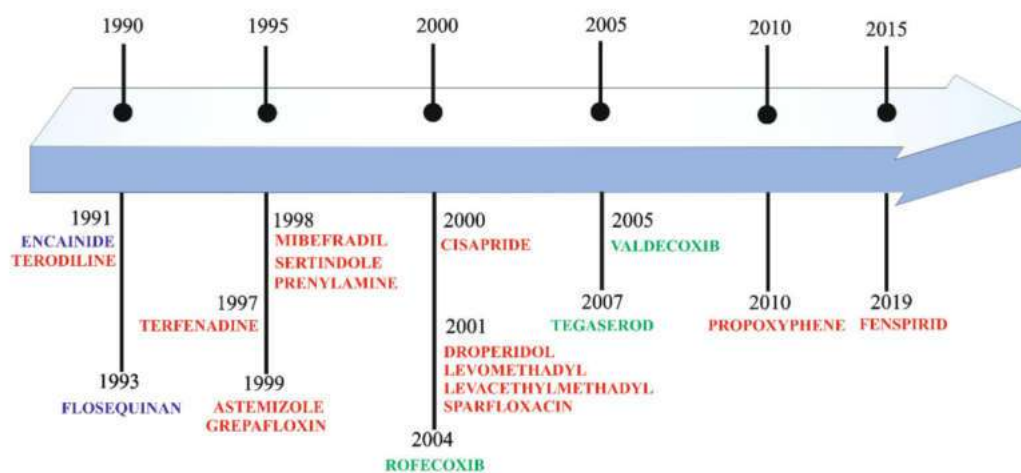


Figure 1. Drugs withdrawn from market due to proarrhythmic effect (purple), myocardial infarction (green), torsadogenic potential, i.e., QT interval prolongation and torsade the points (TdP) effect (red).

3. VGICs—Voltage-Gated Ion Channels

The mechanism of opening and closing of ion channels is referred to as gating. It is the progression of the channel through various conformational states. Channel activation is the transition from the rest (closed) state to the open state under the influence of a trigger stimulus (membrane depolarization or ligand binding). Permeation is the passage of ions through the open channel. Therefore, gating process control ion permeation [8] participating in cellular signaling is dependent on cation flow driven by electrochemical gradient. Voltage-gated Na^+ , Ca^{2+} , and K^+ channels share a common molecular architecture. They also possess the same set of three voltage-dependent functionally distinct states, i.e., closed (or resting), activated (or open), and inactive [12]. They are divided into two types: selective towards one type of ion (such as potassium, sodium, or calcium channel) and non-selective, which are capable of transporting any type of ion through the membrane (e.g., N-methyl-D-aspartate receptor) [25]. The important determinants of selectivity are size, valency, and hydration energy [5]. Under physiological conditions, the Na^+ and Ca^{2+} channels are inward cell currents and those flowing through the K^+ channels are outward currents. Besides the channels that open or close depending on the value of the cell transmembrane potential (so-called voltage-gated ion channels (VGICs)), there are also channels gating independently on transmembrane potential, controlled by other external or intracellular factors.

According to the research of International Union of Primary and Clinical Pharmacology and the British Pharmacological Society, ion channels are the third-largest target group for drugs [26,27]. They participate in controlling physiological and pathological processes in the body. VGICs take part in generating and transmitting information within the cells of the central and peripheral nervous and cardiovascular systems [25]. For example, it has been estimated that about 350 types of ion channels exist in the mammalian brain, including 145 VGICs [28]. At the root of certain diseases (e.g., neuropathic pain or epilepsy) is abnormal functioning of the channels [29,30]. In the recently proposed changes to the cardiovascular safety assessment paradigm (CiPA initiative), inter alia, by indicating the need to assess drug interactions with cardiac VGIC (such as: $\text{K}_V11.1$, $\text{Na}_V1.5$, and $\text{Ca}_V1.2$) and their impact on the electrophysiology of human ventricular cells using in silico and/or in vitro tests. It should be emphasized that these three classes of ion channels not only represent useful targets with potential therapeutic applications, but also indicate undesirable targets (also known as antitargets) to be avoided because of the side effects they cause when their function is altered [31].

4. VGICs—Structure

The molecular architecture of the voltage-gated ion channel families consists of four subunits arranged to form a common pore structural theme. Ion channels consist of pore-forming α -subunits (also called $\alpha 1$ -subunits) and accessory $\alpha 2$ -, β -, δ -, γ -subunits. The α -subunit is inserted into the lipid bilayer of the cellular membrane and constitutes the channel pore through which ions pass (Figure 2). Commonly, α -subunits and accessory subunits are members of large protein families that evolutionarily possess similar structural elements, i.e., comparable amino acid sequences. This is reflected in the names of the subunits and their genes. For example, the gene encoding the α -subunit of the cardiac Ca^{2+} channel is called CACNC1C: calcium channel, isoform 1, α -subunit. The α -subunit is termed $\text{Ca}_v1.2$: Ca^{2+} channel family, subfamily 1, member 2; the subscript “V” means that channel gating is regulated by transmembrane voltage changes (voltage dependent) [32].

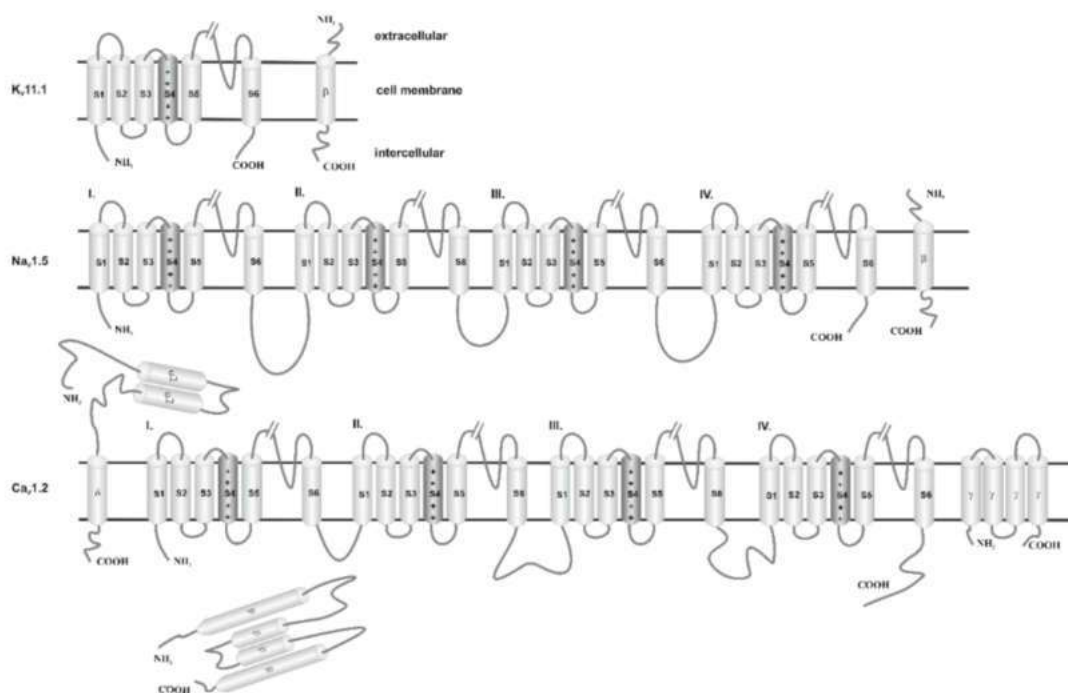


Figure 2. Schematic view of the structure's subunits of cardiac ion channels. $\alpha 1$ -subunits of K^+ channels consist of one single subunit (domain or core motif), while Na^+ channels and Ca^{2+} channels consist of four serially-linked homologous domains (I–IV). Each subunit contains six transmembrane segments (S1–S6). The S5 and S6 segments and the membrane-associated pore loop (often called the P loop or P segment or P region) between them form the central pore through which ions flow down their electrochemical gradient. The S4 transmembrane domain is the voltage-sensor (gating modifier). K^+ channel is a tetramer assembly of α subunits. While Na^+ and Ca^{2+} channels consist of four subunits co-assembled to form a single functional channel. The β , $\alpha 2\delta$, and γ subunits enhance cell surface expression and modulate the voltage dependence and gating kinetics of the $\alpha 1$ subunits and channel sensitivity to endogenous ligands and pharmacological agents. These accessory subunits determine ion channel tissue specificity.

4.1. Potassium Ion Channels

The largest and most diverse group of cationic ion channels is those transporting potassium ions. It has been established that K^+ channels occur in the plasma membrane of almost all animal cells. Due to this, they represent a large family of therapeutic targets/antitargets for drug development. According to the literature, the human genome encodes 40 voltage-gated potassium channels [7], which are involved in diverse physiological processes ranging from repolarization of neuronal or cardiac APs, over-regulating calcium signaling and cell volume, to driving cellular proliferation and migration.

This group includes 12 subfamilies, located in the brain, heart, and muscles (K_V1 – K_V12) [28,33]. The main building blocks of these proteins are α subunits, which contain pores selective in potassium ions. Both the amino terminus (N-terminus) and the C-terminus of α subunits are located on the intracellular side of the membrane (Figure 2 and Table 1). Interaction of $K_V11.1$ with its β -subunit, i.e., Mink-related peptide 1 (MiRP1, encoded by *KCNE2*) [34] induces earlier activation and accelerates deactivation. In this way the ancillary protein (UniProtKB references code: Q9Y6J6) [35] modulates the gating kinetics and enhances stability of the channel complex. It has a single transmembrane segment, a long extracellular N-terminus, and a short intracellular C-terminus [36] (Figure 2).

Table 1. Overview of the key properties of the structural subunits of cardiac ion channels [37].

Name	hK _V 11.1/KCNH2	hNa _V 1.5/SCN5A	hCa _V 1.2/CACNC1C
UniProtKB	Q12809	Q14524	Q13936
pore-forming	612–632: VTALYFTFSSLTSGVGFNVSP	884–904: FFHAFLIIFRILCGEWIETMW	694–715: QSLLTVFQILIGEDWNSVMYDG
ion selectivity sequence motif	GYG	DEKA	EEEE
cardiac disease	Long Qt Syndrome; Short Qt Syndrome	Atrial Fibrillation, Familial, Brugada Syndrome; Cardiomyopathy, Dilated; Long Qt Syndrome; Progressive Familial Heart Block (Type Ia); Sick Sinus Syndrome, Autosomal Recessive; Sudden Infant Death Syndrome; Ventricular Fibrillation During Myocardial Infarction, Susceptibility to acquired arrhythmia	Long QT, Brugada Syndrome, Timothy Syndrome
sequence identity ¹	88.66%	66.70%	70.3%

¹ Sequence identity between the template and the modeled sequence.

The $K_V11.1$ channel (encoded by the *hERG* gene) is the best-known potassium ion channel. Brief characteristic membrane topology and structural organization of the $K_V11.1$ subunit are presented in Figure 2 and Table 1. In the last decade of the twentieth century it was found that $K_V11.1$ plays a crucial role in cardiac repolarization, especially in the later phases of the AP based on its unique kinetics. *KCNH2* gene codes for the $K_V11.1$ channel, known as the human Ether-à-go-go-Related Gene (*hERG*), carries the delayed rectifier potassium current (IKr). IKr is a key component in repolarization of the myocardium [38]. Opening of the channel and rapid transport of potassium ions driven by the electrochemical potential gradient occur just after depolarization of the cell membrane, in the first stages of functional potential. Repolarization results in a reopening of the channel, resulting in the termination of the potential/excitation [39]. For this reason, the *hERG* current is the most common target for QT interval-prolonging drugs [40]. Drugs blocking the *hERG* potassium channels (referred to as “*hERG* inhibitors”) reduce the IKr and prolong cardiac repolarization, which appears as prolongation of the heart rate-corrected QT (QTc) interval on the electrocardiogram (ECG), and this predisposes arrhythmias [41]. Therefore, it is commonly well accepted as an antitarget in cardiac risk assessment. Moreover, these channels have also been identified in neurons, thus explaining the fact that a disruption of Kv activity may also lead to epilepsy [30,39]. The function of the *hERG* gene-coded channel can be impaired by a number of drugs. One of them is terfenadine (TNF), a second-generation antihistamine [42]. According to numerous studies, the combination of TNF with the protein encoded by the *hERG* gene is a direct cause of prolonged QT and thus strong ventricular arrhythmia [43]. Consequently, the use of TNF was abandoned in the USA in favor of its active metabolite, fexofenadine [44]. However, the strong interaction between TNF and $K_V11.1$ is a benchmark in testing the inhibitory power of the $K_V11.1$ channel relative to other drugs.

4.2. Calcium Ion Channels

The role of calcium in normal heart activity was first mentioned in 1883 [45]. In the 1990s, there was evidence of the effect of Ca^{2+} ions on muscle cells [46]. Nowadays, it is widely acknowledged that calcium is involved in many cellular processes. The Ca^{2+} channel family contains at least ten members that are distinguished by their structure, subunit composition, location, biophysical properties, and pharmacology. By controlling the entry of Ca^{2+} into cells, these proteins have a critical role in a broad range of cellular processes, such as neurotransmitter release, second messenger cascades, cardiac excitation and contraction, and gene regulation supporting learning and memory [47]. The studies indicate that calcium ion channels are involved in myocardial contraction, hormonal regulation, and nervous system function. Voltage-gated Calcium Channels (VGCCs) are complex proteins consisting of four or five subunits. The channel is built of one central pore-forming $\alpha 1$ subunit, five β subunits, four $\alpha 2\delta$ subunits, and five γ subunits [31]. The most important $\alpha 1$ subunit is responsible for the major biophysical and functional properties of the channel, while the auxiliary subunits $\alpha 2\delta$, β , and γ control channel expression, membrane incorporation. Those auxiliary subunits are also involved in the drug binding and gating characteristics of the central unit (Figure 2). Drugs that block Ca^{2+} channels are used in the treatment of epilepsy, chronic pain, and cardiovascular disorders (including hypertension, angina pectoris, and cardiac arrhythmias) [48]. The $\alpha 2$ subunit is completely extracellular, whereas the δ subunit has a single membrane-spanning segment with a very short intracellular part that anchors the $\alpha 2\delta$ subunit (encoded by CACNA2D1-4) complex to the $\alpha 1\text{C}$ subunit. Both $\alpha 2$ δ subunits are disulfide-linked proteins. The β subunit (Cav β 1- Cav β 4, encoded by the CACNB1-4 gene) is entirely intracellular and is tightly bound to a highly conserved motif in the cytoplasmic linker between domains I and II of the $\alpha 1\text{C}$ subunit [5]. The γ subunit is composed of four transmembrane segments and intracellular N- and C-termini (Figure 2).

The location of VGCCs in many different cells has resulted in the classification of the currents according to the rate of ion conduction within the channel. Long opening currents are observed after strong depolarization, mainly within muscle and hormone cells. They are inhibited by drugs such as dihydropyridine or benzodiazepines. They take part in the initiation of the neurotransmission. T-type currents are initiated when a slight depolarization occurs. These currents are short-term and resistant to the abovementioned blocking substitutions, while they are blocked by mibefradil (withdrawn from treatment for side effects, Figure 1) [49]. According to current differences three groups of ionic channels have been distinguished: Cav1 mediating the transfer of L-type currents, Cav2 mediating the transfer of N-, P/Q-, and R-type currents, Cav3 mediating the transfer of T-type currents. In cardiac muscle, two types of voltage-dependent Ca^{2+} channels, the L-type and the T-type, transport Ca^{2+} into the cells.

VGCCs can exist in a resting, open, or inactive form. The opening of the ion channel occurs during the depolarization of the cell membrane, which leads to an inflow of calcium ions into the cell and its excitation. Thus, depolarization leads to the transition from inactive to open state; however, it can be modified by the action of neurotransmitters or hormones [50,51].

The Cav1.2 channels dominate the functional activity in the working myocardium [51,52]. Additionally, Cav1.2 belong to the L-type Ca^{2+} channels and are critical to maintain the action potential plateau, to accelerate pacemaker activity in the sinoatrial node, and to support conduction through the atrioventricular node. Because of their importance in the normal cardiovascular function, screening of new drug candidates for their activity on Cav1.2 channels is considered an important safety measure in developing new pharmaceuticals which are devoid of undesirable cardiovascular side effects [53]. Malfunction or mutation of the gene encoding Cav1.2 can lead to the occurrence of diseases (e.g., Timothy syndrome), which are manifested by the QT- prolongation [54]. Moreover, a sustained increase in the inflow of ions to the cell due to channel hyperactivity leads to hypertrophy of the myocardium, which results in failure and hypertension. The Cav1.2 channels play a dominant role in peripheral vasoconstriction and are the target of Ca^{2+} channel blockers used to treat hypertension [40]. The studies conducted in 1960 resulted in the discovery of the VGCC blockade mechanism, allowing for the development of drugs inhibiting the flow of Ca^{2+} ions [55]. Three groups of drugs are commonly used

in the treatment: nifedipine, verapamil, and diltiazem. The mechanism of action of these drugs is based on the blocking of L-channels that lead to vasodilation [47].

4.3. Sodium Channels

Voltage-gated sodium channels (VGNaCs) were first described in the electric eel *Electrophorus electricus* in 1976 [56]. They became the model on which the whole group of ion channels was characterized. They initiate APs in nerves, muscles, and other electrically excitable cells [57]. Blocking VGNaCs makes these cells less excitable [58]. Eukaryotic VGNaCs are composed of α and β subunits. Subunit α contains pore-forming and voltage-sensing domains to control the penetration of Na^+ ions through the membrane. Subunits α are encoded by the SCNXA gene (where X = 1 – 9, depending on the ion channel type). Auxiliary subunits β modulate gating and regulate the channel expression [59]. So far, four subunits β ($\beta 1$ – $\beta 4$) have been identified [57,59]. β -Subunits have a single transmembrane segment, a long extracellular N-terminus, and a short intracellular C-terminus. Presently, there are nine different types of α subunits, from which individual ion channels ($\text{Na}_V 1.1$ – $\text{Na}_V 1.9$) have been isolated. So far, $\text{Na}_V 1.5$ is the best studied channel, which is the most common in myocardial cells.

VGNaCs are important targets for the development of drugs, because mutations in different human sodium channel isoforms have causal relationships with a range of neurological and cardiovascular diseases [60,61].

Depending on the location, the channels have different functions. $\text{Na}_V 1.1$ – $\text{Na}_V 1.3$ are most abundant in the Central Nervous System. They are the therapeutic target of several drugs in pain, stroke, or migraine ($\text{Na}_V 1.1$). This location also contains $\text{Na}_V 1.6$ channels, which are used to treat multiple sclerosis. The proper activity of the musculoskeletal system is regulated by the $\text{Na}_V 1.4$ channel. $\text{Na}_V 1.7$ – 1.9 function mainly in the peripheral nervous system, used to treat pain and nociceptive disorders [62].

Dysfunction of VGNaCs can lead to a number of problems. Until now, more than 1000 disturbances caused by mutations in the Na_V channels have been identified. It should be noted that about 400 diseases are caused by a mutation of the $\text{Na}_V 1.5$ gene [63]. Moreover, the channel $\text{Na}_V 1.5$ (next to $\text{Na}_V 1.2$) has the highest number of reported mutations among all nine Na_V channels. Mutations in $\text{Na}_V 1.5$ result in many cardiac channelopathies [64]. Mutations leading to a reduction of the sodium current can result in disorders such as Brugada syndrome, sick sinus syndrome, and cardiac conduction defect and others. Strengthening the function of the aforementioned channel is a leading cause of the occurrence of sudden infant death syndrome and stillbirth, whereas the reason for arrhythmias and prolonged QT can be both stimulating and inhibiting $\text{Na}_V 1.5$ activity [63,65]. Recent evidence suggests that a failure of the channels $\text{Na}_V 1.1$ – $\text{Na}_V 1.3$ and $\text{Na}_V 1.6$ can lead to epilepsy or maintenance of the epileptic state [60]. Current scientific papers emphasize that $\text{Na}_V 1.7$ overactivity can determine the pain sensation even when sympathetic neuronal excitability is reduced [66]. In turn, $\text{Na}_V 1.8$ and $\text{Na}_V 1.9$ take part in setting up inflammatory pain [67]. Nonetheless, there are a multitude of substances used to control VGNaCs activity by blocking the sodium channels. According to the above, abnormal inflow and load of Na^+ is associated with neuronal damage. Tetrodotoxin and batrachotoxin, which are naturally occurring toxins, strongly block the activity of sodium channels [60,68]. Therefore, drugs have been elaborated to treat diseases caused by overactivation of VGNaCs. The most commonly used drugs are first-generation antiarrhythmic medications and those used to treat epilepsy (e.g., lamotrigine, phenytoin, or carbamazepine) [69]. The drugs used in arrhythmia are listed in Figure 3 [70]. On the other hand, it is important to avoid interactions of potential non-cardiovascular drugs on $\text{Na}_V 1.5$, as well as hERG due to potential off-target activity [63].

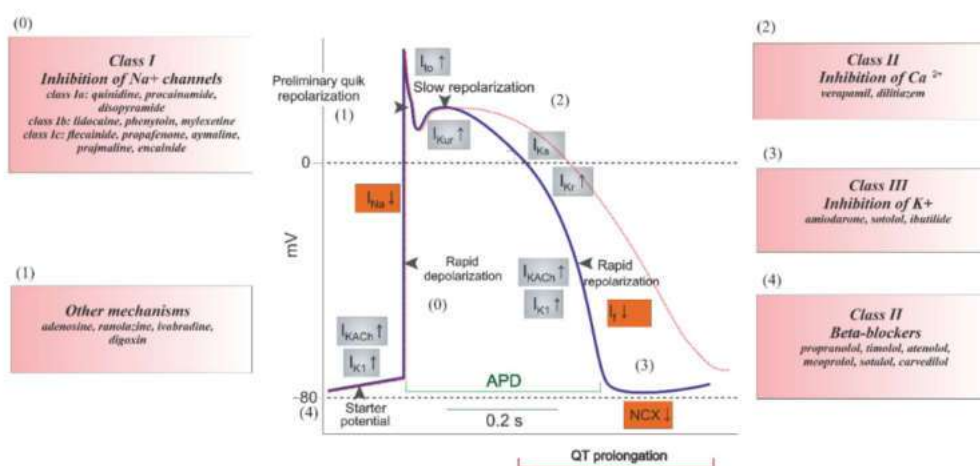


Figure 3. Classification of cardiac antiarrhythmic drugs.

5. Mechanism of Ion Channel Inhibition

Although the general mechanism of ion channel inhibition is well known, the detailed description is still unclear and controversial. Voltage-dependent gating can be triggered in a variety of ways, and the mechanisms of VGIC operation are important tools to understand the signaling behavior of the channel [71]. The mechanisms of ion channel inhibition can be categorized in two classes, i.e., pore plugging, and allosteric binding. The former includes inhibitors capable of binding in the pore region once they enter the channel; in consequence they physically block the pore disabling the ion transport. The latter group is inhibitors that require a specific binding site, the site is usually an extracellular side of the pore, but there are known exceptions. The allosteric inhibitor binds to the channel at the binding site causing conformational changes of the protein that prevents the normal function of the channel [12]. Table 1 summarizes the pore forming region in K_V11.1, Na_V1.5, and Ca_V1.2 channels.

6. In Silico Methods for Testing the Risk of Cardiotoxicity

One of the most popular and accurate in-silico methods is the molecular docking technique [72]. This method determines the affinity (the binding of compounds to the channel) and how a given drug binds to the active site of a protein (also known as binding modes/pose). It is a source of information about the physiological and pathological mechanism of action of many substances [73]. It should be mentioned here that channels K_V11.1, Na_V1.5, Ca_V1.2 can be treated in two ways. First, they are therapeutic targets for cardiac arrhythmia and hypertension. Secondly, they should be treated as antitargets in cardiac risk assessment. This entails the necessity of opposite approaches in interpretation of the channel's blocking effects. In the first case, research is conducted to search for molecules that bind to a specific therapeutic target (e.g., Class III antiarrhythmic drugs). In the second, research is focused on looking for molecules that avoid strong binding to the unwanted targets (i.e., many noncardiac drugs) [11,74]. Commonly, K_i is characterized by the dissociation constant of the complex, which is determined by competitive radioligand binding, and the blocking of the passage of ions through the channel. In the computational approach, K_i is determined in the computational process. In vivo desirable and undesirable effects of a drug are generally related to its concentration at the sites of action [75]. The passage of some ions through the channel is characterized by the IC₅₀ concentration, ensuring a 50% reduction in selected ion current, which is determined by electrophysiological methods in the channel-expressing cells. For the majority of compounds, only data obtained by one of experimental methods are available. It should be emphasized here that the values of these parameters are generally well correlated (IC₅₀ ≈ K_i). Based on the assumption that the calculated K_i reflects the drug binding affinity for a specific therapeutic target and the IC₅₀

(or pIC_{50}) more reflects the functional potency of the inhibitor for the drug, it is widely accepted that the use of calculated K_i (or pK_i) is helpful in determining the likelihood that a particular drug will inhibit a particular protein target and result in a clinically relevant drug interaction. For this we usually assume that the IC_{50} corresponds to the numerical value of K_i (or $pIC_{50} \approx pK_i$). By convention, a $pIC_{50} \leq 4$ (or pK_i) is commonly used as threshold and can be considered to be an inactive compound for the studied protein [76,77]. In Table 2, pIC_{50} of selected drugs and corresponding ion channels were collected. By matching the calculated K_i values with the corresponding data from Table 2, we are able to assess, for example, the cardiotoxicity of drugs by analyzing their interaction with ion channels [78]. From a safety pharmacological point of view, lower pIC_{50} (pK_i) value for channels $K_V11.1$, $Na_V1.5$, $Ca_V1.2$ are desirable.

Table 2. Comparison of pIC_{50} values (i.e., the negative logarithm of the IC_{50} value) of selected drugs.

Drug	hNav1.5	hCa _v 1.2	hK _v 11.1
ajmaline	5.09 [79]	4.15 [80]	5.98 [81]
amiodarone	5.32 [82]	5.57 [83]	7.52 [21]
amitriptyline	4.70 [84]	4.94 [85]	5.48 [86]
bepriidil	5.43 [21]	6.68 [21]	7.48 [87]
chlorpromazine	5.37 [88]	n/a [88]	5.83 [89]
cibenzoline	5.11 [90]	4.52 [91]	4.65 [92]
cisapride	4.83 [21]	n/a [21]	8.19 [93]
desipramine	5.82 [21]	5.77 [21]	5.86 [94]
diltiazem	5.05 [95]	6.35 [96]	4.76 [97]
diphenhydramine	4.39 [21]	3.64 [21]	5.28 [92]
dofetilide	3.52 [98]	4.22 [99]	8.30 [100]
fluvoxamine	4.40 [21]	5.31 [21]	5.51 [101]
haloperidol	5.15 [102]	5.77 [102]	7.57 [103]
imipramine	5.44 [88]	5.08 [89]	5.47 [101]
mexiletine	4.37 [104]	4.00 [105]	4.30 [106]
mibefradil	6.01 [107]	6.81 [108]	5.74 [92]
nifedipine	4.43 [88]	7.22 [109]	3.56 [110]
nitredypine	4.44 [88]	9.46 [111]	5.00 [101]
phenytoin	4.31 [21]	3.99 [21]	4.00 [101]
pimozide	7.27 [112]	6.79 [113]	7.70 [101]
prenylamine	5.60 [21]	5.91 [21]	7.19 [21]
propafenone	5.92 [21]	5.74 [21]	6.36 [114]
propranolol	5.68 [21]	4.74 [21]	5.55 [115]
quetiapine	4.77 [21]	4.98 [21]	5.24 [116]
quinidine	4.78 [21]	4.81 [21]	6.52 [117]
risperidone	3.99 [21]	4.14 [21]	6.82 [101]
sertindole	5.64 [118]	5.05 [118]	7.85 [101]
sotalol	n/a [119]	n/a [119]	7.07 [119]
tedisamil	4.70 [120]	n/a [121]	5.60 [101]
terfenadine	6.01 [21]	6.43 [21]	8.05 [115]
thioridazine	5.74 [21]	5.89 [21]	7.48 [101]
verapamil	4.38 [21]	7.00 [21]	6.84 [97]

7. Conclusions and Perspective

Despite the fact that the electrical excitability of nervous and muscle tissue has attracted the attention of scientists for three centuries, many issues remain unclear and controversial to this day. Of course, the substantial development in this area cannot be overlooked! It is worth emphasizing that since the mid-1990s, researchers have been addressing issues related to the cardiological safety of drugs that are being developed and already used. In the past 25 years, pro-arrhythmic risk testing has dominated the assessment of cardiovascular safety and the discipline of safety pharmacology. The regulatory guidelines (clinical and non-clinical) developed so far have focused mainly on inhibition of the human Ether-à-go-go-Related (hERG) gene and pulse-corrected QT prolongation (QTc). However,

in our opinion, the science of cardiac safety must evolve, and this evolution should be multidirectional. Undoubtedly, modern technology creates a multitude of different possibilities, the use of which should create conditions for a better understanding of the pharmacology of cardiac safety. Unquestionably, in silico tests based on the molecular docking technique are one such possibility. The key seems to be proper understanding and differentiation of concepts such as desirable and undesirable therapeutic goals. On the other hand, however, we should be aware that, under certain therapeutic conditions, our therapeutic targets become primary antitargets (i.e., undesirable targets) in drug development. Antitargets are molecular systems that play an essential role in the normal functioning of cells and tissues and their blockage causes potentially serious side effects. This results in poorer treatment outcomes or a shorter patient survival time. Since many drugs can bind to ion channels, block ion flow, and interfere with the regulation of the action potential, leading to drug-induced arrhythmias or “proarrhythmias”, these structures appear to be appropriate antitargets in assessing cardiac risk.

Author Contributions: Author Contributions: M.K., J.N. and A.N. conceived and directed the project, designed the study, collected the data, analyzed the data, interpreted the results, and wrote the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Conflicts of Interest: Declare conflicts of interest or state: The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations

VGICs	Voltage-Gated Ion Channels
VGKCs	Voltage-Gated Potassium Channels
VGNaCs	Voltage-Gated Sodium Channels
VGCaCs	Voltage-Gated Calcium Channels
hERG	Human Ether-à-go-go-Related Gene
TdP	Torsade the points
CiPA	Comprehensive In Vitro Proarrhythmia Assay
IC ₅₀	Inhibition potency
K _i	Binding affinity

References

1. OECD Test No. 453: Combined Chronic Toxicity/Carcinogenicity Studies, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. Available online: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-453-combined-chronic-toxicity-carcinogenicity-studies_9789264071223-en (accessed on 29 October 2020).
2. OECD, T.G.G. *The Organisation for Economic Co-operation and Development*; OEEC: Paris, France, 1960.
3. Raghavan, M.; Fee, D.; Barkhaus, P.E. Generation and propagation of the action potential. In *Neurology of Sexual and Bladder Disorders*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2019; Volume 160, pp. 3–22.
4. Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. *Molecular Biology of the Cell*, 4th ed.; Garland Science: New York, NY, USA, 2015.
5. Issa, Z.F.; Miller, J.M.; Zipes, D.P. *Clinical Arrhythmology and Electrophysiology: A Companion to Braunwald's Heart Disease. Clinical Arrhythmology and Electrophysiology: A Companion to Braunwald's Heart Disease*; Elsevier Health Sciences: Amsterdam, The Netherlands, 2019.
6. Giegel, D.; Lewis, A.; Worland, P. Diversity versus Focus in Choosing Targets and Therapeutic Areas. In *Comprehensive Medicinal Chemistry II*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2007; pp. 753–770.
7. Rubaiy, H.N. A Short Guide to Electrophysiology and Ion Channels. *J. Pharm. Pharm. Sci.* **2017**, *20*, 48. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Gingrich, K.J.; Yang, J. Molecular physiology. In *Foundations of Anesthesia: Basic Sciences for Clinical Practice*; Elsevier Health Sciences: Amsterdam, The Netherlands, 2006; 79p.
9. Kirsch, G.E.; Kramer, J.; Bruening-Wright, A.; Obejero-Paz, C.; Brown, A.M. *The Comprehensive In Vitro Proarrhythmia Assay (CiPA) Guide: A New Approach to Cardiac Risk Assessment*; Charles River Laboratories International: Wilmington, MA, USA, 2016.

10. Li, Z.; Ridder, B.J.; Han, X.; Wu, W.W.; Sheng, J.; Tran, P.N.; Wu, M.; Randolph, A.; Johnstone, R.H.; Mirams, G.R.; et al. Assessment of an In Silico Mechanistic Model for Proarrhythmia Risk Prediction Under the Ci PA Initiative. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2019**, *105*, 466–475. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Raschi, E.; Vasina, V.; Poluzzi, E.; de Ponti, F. The hERG K⁺ channel: Target and antitarget strategies in drug development. *Pharmacol. Res.* **2008**, *57*, 181–195. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Petkov, G.V. Ion channels. In *Pharmacology*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2009; pp. 387–427.
13. Cheung, S.; Parkinson, J.; Wählby-Hamrén, U.; Dota, C.D.; Kragh, A.M.; Bergenholm, L.; Vik, T.; Collins, T.; Arfvidsson, C.; Pollard, C.E.; et al. A tutorial on model informed approaches to cardiovascular safety with focus on cardiac repolarisation. *J. Pharmacokinet. Pharmacodyn.* **2018**, *45*, 365–381. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Sallam, K.; Li, Y.; Sager, P.T.; Houser, S.R.; Wu, J.C. Finding the Rhythm of Sudden Cardiac Death. *Circ. Res.* **2015**, *116*, 1989–2004. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Lee, H.-M.; Yu, M.-S.; Kazmi, S.R.; Oh, S.Y.; Rhee, K.-H.; Bae, M.-A.; Lee, B.H.; Shin, D.-S.; Oh, K.-S.; Ceong, H.; et al. Computational determination of hERG-related cardiotoxicity of drug candidates. *BMC Bioinform.* **2019**, *20*, 67–73. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Woosley, R.D.; Romero, K.; Heise, C.W.; Gallo, T.; Tate, J.; Woosley, R.L. Summary of Torsades de Pointes (TdP) Reports Associated with Intravenous Drug Formulations Containing the Preservative Chlorobutanol. *Drug Saf.* **2019**, *42*, 907–913. [[CrossRef](#)]
17. *Guidance for Industry: E14 Clinical Evaluation of QT/QTc Interval Prolongation and Proarrhythmic Potential for Non-Antiarrhythmic Drugs*; Food and Drug Administration: Rockville, MD, USA, 2005.
18. *ICH E14 Guideline: The Clinical Evaluation of QT/QTc Interval Prolongation and Proarrhythmic Potential for Non-Antiarrhythmic Drugs*; International Council for Harmonization of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use: Geneva, Switzerland, 2015.
19. Li, Z.; Dutta, S.; Sheng, J.; Tran, P.N.; Wu, W.; Chang, K.; Mdluli, T.; Strauss, D.G.; Colatsky, T. Improving the In Silico Assessment of Proarrhythmia Risk by Combining hERG (Human Ether-à-go-go-Related Gene) Channel–Drug Binding Kinetics and Multichannel Pharmacology. *Circ. Arrhythmia Electrophysiol.* **2017**, *10*, e004628. [[CrossRef](#)]
20. Hondeghem, L.; Carlsson, L.; Duker, G. Instability and Triangulation of the Action Potential Predict Serious Proarrhythmia, but Action Potential Duration Prolongation Is Antiarrhythmic. *Circulation* **2001**, *103*, 2004–2013. [[CrossRef](#)]
21. Mirams, G.R.; Cui, Y.; Sher, A.; Fink, M.; Cooper, J.; Heath, B.M.; McMahon, N.C.; Gavaghan, D.J.; Noble, D. Simulation of multiple ion channel block provides improved early prediction of compounds' clinical torsadogenic risk. *Cardiovasc. Res.* **2011**, *91*, 53–61. [[CrossRef](#)]
22. Martin, R.L.; McDermott, J.S.; Salmen, H.J.; Palmatier, J.; Cox, B.F.; Gintant, G.A. The Utility of hERG and Repolarization Assays in Evaluating Delayed Cardiac Repolarization: Influence of Multi-Channel Block. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **2004**, *43*, 369–379. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Blinova, K.; Stohlman, J.; Vicente, J.; Chan, D.; Johannesen, L.; Hortigon-Vinagre, M.P.; Zamora, V.; Smith, G.; Crumb, W.J.; Pang, L.; et al. Comprehensive Translational Assessment of Human-Induced Pluripotent Stem Cell Derived Cardiomyocytes for Evaluating Drug-Induced Arrhythmias. *Toxicol. Sci.* **2016**, *155*, 234–247. [[CrossRef](#)]
24. Sager, P.T.; Gintant, G.; Turner, J.R.; Pettit, S.; Stockbridge, N. Rechanneling the cardiac proarrhythmia safety paradigm: A meeting report from the Cardiac Safety Research Consortium. *Am. Hear. J.* **2014**, *167*, 292–300. [[CrossRef](#)]
25. Barker, B.S.; Young, G.T.; Soubrane, C.H.; Stephens, G.J.; Stevens, E.B.; Patel, M.K. Chapter 2—Ion Channels. In *Conn's Translational Neuroscience*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2017; pp. 11–43.
26. Dunlop, J.; Bowlby, M.R.; Peri, R.; Vasilyev, D.; Arias, R. High-throughput electrophysiology: An emerging paradigm for ion-channel screening and physiology. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2008**, *7*, 358–368. [[CrossRef](#)]
27. Harmar, A.J.; Hills, R.A.; Rosser, E.M.; Jones, M.; Buneman, O.P.; Dunbar, D.R.; Greenhill, S.D.; Hale, V.A.; Sharman, J.L.; Bonner, T.I.; et al. IUPHAR-DB: The IUPHAR database of G protein-coupled receptors and ion channels. *Nucleic Acids Res.* **2008**, *37*, D680–D685. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Eranjan, R.; Logette, E.; Marani, M.; Herzog, M.; Tâche, V.; Scantamburlo, E.; Buchillier, V.; Markram, H. A Kinetic Map of the Homomeric Voltage-Gated Potassium Channel (Kv) Family. *Front. Cell. Neurosci.* **2019**, *13*, 13.

29. Bennett, D.L.H.; Woods, C.G. Painful and painless channelopathies. *Lancet Neurol.* **2014**, *13*, 587–599. [[CrossRef](#)]
30. Allen, N.M.; Weckhuysen, S.; Gorman, K.; King, M.D.; Lerche, H. Genetic potassium channel-associated epilepsies: Clinical review of the Kv family. *Eur. J. Paediatr. Neurol.* **2020**, *24*, 105–116. [[CrossRef](#)]
31. Fernández-Ballester, G.; Fernández-Carvajal, A.; González-Ros, J.M.; Ferrer-Montiel, A. Ionic Channels as Targets for Drug Design: A Review on Computational Methods. *Pharmaceutics* **2011**, *3*, 932–953. [[CrossRef](#)]
32. Amin, A.S.; Tan, H.L.; Wilde, A.A. Cardiac ion channels in health and disease. *Heart Rhythm.* **2010**, *7*, 117–126. [[CrossRef](#)]
33. Wulff, H.; Castle, N.A.; Pardo, L.A. Voltage-gated potassium channels as therapeutic targets. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2009**, *8*, 982–1001. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Abbott, G.W.; Sesti, F.; Splawski, I.; Buck, M.; Lehmann, M.H.; Timothy, K.W.; Keating, M.T.; Goldstein, S.A. MiRP1 Forms I Kr Potassium Channels with HERG and is Associated with Cardiac Arrhythmia. *Cell* **1999**, *97*, 175–187. [[CrossRef](#)]
35. Isbrandt, D.; Friederich, P.; Solth, A.; Haverkamp, W.; Ebneith, A.; Borggreffe, M.; Funke, H.; Sauter, K.; Breithardt, G.; Pongs, O.; et al. Identification and functional characterization of a novel KCNE2 (MiRP1) mutation that alters HERG channel kinetics. *J. Mol. Med.* **2002**, *80*, 524–532. [[CrossRef](#)]
36. Hu, B.; Zeng, W.-P.; Li, X.; Al-Sheikh, U.; Chen, S.-Y.; Ding, J. A conserved arginine/lysine-based motif promotes ER export of KCNE1 and KCNE2 to regulate KCNQ1 channel activity. *Channels* **2019**, *13*, 483–497. [[CrossRef](#)]
37. Alexander, S.P.H.; Fabbro, D.; Kelly, E.; Mathie, A.; Peters, j.; Veale, E.L.; Armstrong, J.F.; Faccenda, E.; Harding, S.D.; Pawson, A.J.; et al. The Concise Guide to Pharmacology 2019/20: Enzymes. *Br. J. Pharmacol.* **2019**, *176*, S297–S396. [[PubMed](#)]
38. Huang, H.; Pugsley, M.K.; Fermini, B.; Curtis, M.J.; Koerner, J.; Accardi, M.; Authier, S. Cardiac voltage-gated ion channels in safety pharmacology: Review of the landscape leading to the CiPA initiative. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **2017**, *87*, 11–23. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Wang, W.; MacKinnon, R. Cryo-EM Structure of the Open Human Ether-à-go-go-Related K + Channel hERG. *Cell* **2017**, *169*, 422–430.e10. [[CrossRef](#)]
40. Mobasher, A.; Matta, C.; Uzielienė, I.; Budd, E.; Martín-Vasallo, P.; Bernotienė, E. The chondrocyte channelome: A narrative review. *Jt. Bone Spine* **2019**, *86*, 29–35. [[CrossRef](#)]
41. Vicente, J.; Zusterzeel, R.; Johannesen, L.; Mason, J.; Sager, P.; Patel, V.; Matta, M.K.; Philip, S.; Liu, J.; Garnett, C.; et al. Mechanistic Model-Informed Proarrhythmic Risk Assessment of Drugs: Review of the “CiPA” Initiative and Design of a Prospective Clinical Validation Study. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2017**, *103*, 54–66. [[CrossRef](#)]
42. Orvos, P.; Kohajda, Z.; Szlovák, J.; Gazdag, P.; Árpádfy-Lovas, T.; Tóth, D.; Geramipour, A.; Tólosi, L.; Jost, N.; Varró, A.; et al. Evaluation of Possible Proarrhythmic Potency: Comparison of the Effect of Dofetilide, Cisapride, Sotalol, Terfenadine, and Verapamil on hERG and Native IKr Currents and on Cardiac Action Potential. *Toxicol. Sci.* **2018**, *168*, 365–380. [[CrossRef](#)]
43. Ajayi, F.; Sun, H.; Perry, J. Adverse drug reactions: A review of relevant factors. *J. Clin. Pharm.* **2000**, *40*, 1093–1101.
44. Li, M.; Ramos, L.G. Drug-Induced QT Prolongation and Torsades de Pointes. *Pharm. Therap.* **2017**, *42*, 473–477.
45. Ringer, S. A further contribution regarding the influence of the different constituents of the blood on the contraction of the heart. *J. Physiol.* **1883**, *4*, 29–42. [[CrossRef](#)]
46. Heilbrunn, L.V.; Wiercinski, F.J. The action of various cations on muscle protoplasm. *J. Cell. Comp. Physiol.* **1947**, *29*, 15–32. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Cosconati, S.; Marinelli, L.; Lavecchia, A.; Novellino, E. Characterizing the 1,4-Dihydropyridines Binding Interactions in the L-Type Ca²⁺ Channel: Model Construction and Docking Calculations. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 1504–1513. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Zwanzger, P.; Eßer, D.; Nothdurfter, C.; Baghai, T.C.; Möller, H.-J.; Padberg, F.; Rupprecht, R. Effects of the GABA-reuptake Inhibitor Tiagabine on Panic and Anxiety in Patients with Panic Disorder. *Pharmacopsychiatry* **2009**, *42*, 266–269. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Li, P.; Rubaiy, H.N.; Chen, G.; Hallett, T.; Zaibi, N.; Zeng, B.; Saurabh, R.; Xu, S. T-type Ca²⁺ channel blocker mibefradil inhibits ORAI store-operated channels. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2020**, *140*, 26–27. [[CrossRef](#)]

50. García, A.G.; García-De-Diego, A.M.; Gandia, L.; Borges, R.; García-Sancho, J. Calcium Signaling and Exocytosis in Adrenal Chromaffin Cells. *Physiol. Rev.* **2006**, *86*, 1093–1131. [[CrossRef](#)]
51. Zamponi, G.W.; Striessnig, J.; Koschak, A.; Dolphin, A.C. The Physiology, Pathology, and Pharmacology of Voltage-Gated Calcium Channels and Their Future Therapeutic Potential. *Pharmacol. Rev.* **2015**, *67*, 821–870. [[CrossRef](#)]
52. Hofmann, E.; Flockerzi, V.; Kahl, S.; Wegener, J.W. L-Type CaV1.2 Calcium Channels: From In Vitro Findings to In Vivo Function. *Physiol. Rev.* **2014**, *94*, 303–326. [[CrossRef](#)]
53. Balasubramanian, B.; Imredy, J.P.; Kim, D.; Penniman, J.; Lagrutta, A.; Salata, J.J. Optimization of Cav1.2 screening with an automated planar patch clamp platform. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **2009**, *59*, 62–72. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Striessnig, J.; Pinggera, A.; Kaur, G.; Bock, G.; Tuluc, P. L-type Ca²⁺ channels in heart and brain. *Wiley Interdiscip. Rev. Membr. Transp. Signal.* **2014**, *3*, 15–38. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Théophile, G. Discovery and Development of Calcium Channel Blockers. *Front. Pharmacol.* **2017**, *8*, 1–25.
56. Reed, J.K.; Raftery, M.A. Properties of the tetrodotoxin binding component in plasma membranes isolated from *Electrophorus electricus*. *Biochemistry* **1976**, *15*, 944–953. [[CrossRef](#)]
57. Chahine, M. *Voltage-gated Sodium Channels: Structure, Function and Channelopathies*; Springer: Cham, Switzerland, 2018; Volume 246.
58. Wiffen, P.J.; Moore, R.A.; Aldington, D.; Cole, P.; Rice, A.S.; Lunn, M.P.; Hamunen, K.; Haanpää, M.; Kalso, E.; Derry, S. Antiepileptic drugs for neuropathic pain and fibromyalgia—An overview of Cochrane reviews. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2013**, *2013*, 11. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. de Marco, K.R.; Clancy, C.E. Cardiac Na Channels: Structure to Function. *Curr. Top. Membr.* **2016**, *78*, 287–311.
60. Mantegazza, M.; Curia, G.; Biagini, G.; Ragsdale, D.S.; Avoli, M. Voltage-gated sodium channels as therapeutic targets in epilepsy and other neurological disorders. *Lancet Neurol.* **2010**, *9*, 413–424. [[CrossRef](#)]
61. Bagnéris, C.; DeCaen, P.G.; Naylor, C.E.; Pryde, D.C.; Nobeli, I.; Clapham, D.E.; Wallace, B.A. Prokaryotic NavMs channel as a structural and functional model for eukaryotic sodium channel antagonism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 8428–8433. [[CrossRef](#)]
62. Yan, Z.; Zhou, Q.; Wang, L.; Wu, J.; Zhao, Y.; Huang, G.; Peng, W.; Shen, H.; Lei, J.; Yan, N. Structure of the Na v 1.4-β1 Complex from Electric Eel. *Cell* **2017**, *170*, 470–482. [[CrossRef](#)]
63. Li, Z.; Jin, X.; Huang, G.; Wu, K.; Lei, J.; Pan, X.; Yan, N. Structural basis for pore blockade of the human cardiac sodium channel Nav1.5 by tetrodotoxin and quinidine. *bioRxiv* **2019**, *2019*, 1–28.
64. Huang, W.; Liu, M.; Yan, S.F.; Yan, N. Structure-based assessment of disease-related mutations in human voltage-gated sodium channels. *Prot. Cell* **2017**, *8*, 401–438. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Loussouarn, G.; Sternberg, D.; Nicole, S.; Marionneau, C.; le Bouffant, F.; Toumaniantz, G.; Barc, J.; Malak, O.A.; Fressart, V.; Péreon, Y.; et al. Physiological and Pathophysiological Insights of Nav1.4 and Nav1.5 Comparison. *Front. Pharmacol.* **2016**, *6*, 1–26. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Dib-Hajj, S.D.; Yang, Y.; Black, J.A.; Waxman, S.G. The Nav1.7 sodium channel: From molecule to man. *Nat. Rev. Neurosci.* **2012**, *14*, 49–62. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Theile, J.W.; Cummins, T.R. Recent Developments Regarding Voltage-Gated Sodium Channel Blockers for the Treatment of Inherited and Acquired Neuropathic Pain Syndromes. *Front. Pharmacol.* **2011**, *2*, 54. [[CrossRef](#)]
68. Du, Y.; Garden, D.P.; Wang, L.; Zhorov, B.S.; Dong, K. Identification of New Batrachotoxin-sensing Residues in Segment IIIIS6 of the Sodium Channel. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 13151–13160. [[CrossRef](#)]
69. Želazny, P.; Uzdicki, A.; Awgul, S.; Pawlik, A. Kanały jonowe jako punkty uchwytu leków stosowanych w terapii padaczki. *Farm. Współczesna* **2018**, *11*, 201–206.
70. Lei, M.; Wu, L.; Terrar, D.A.; Huang, C.L.-H. Modernized Classification of Cardiac Antiarrhythmic Drugs. *Circulation* **2018**, *138*, 1879–1896. [[CrossRef](#)]
71. Yellen, G. The moving parts of voltage-gated ion channels. *Q. Rev. Biophys.* **1998**, *31*, 239–295. [[CrossRef](#)]
72. Chang, C.; Ray, A.; Swaan, P. In silico strategies for modeling membrane transporter function. *Drug Discov. Today* **2005**, *10*, 663–671. [[CrossRef](#)]
73. Radchenko, E.; Rulev, Y.A.; Safanyaev, A.Y.; Palyulin, V.; Zefirov, N. Computer-aided estimation of the hERG-mediated cardiotoxicity risk of potential drug components. *Dokl. Biochem. Biophys.* **2017**, *473*, 128–131. [[CrossRef](#)]

74. Recanatini, M.; Poluzzi, E.; Masetti, M.; Cavalli, A.; De Ponti, F. QT Prolongation Through hERG K⁺ Channel Blockade: Current Knowledge and Strategies for the Early Prediction During Drug Development. *Med. Res. Rev.* **2005**, *36*, 133–166. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Huang, S.-M.; Temple, R.; Throckmorton, D.C.; Lesko, L.J. Drug Interaction Studies: Study Design, Data Analysis, and Implications for Dosing and Labeling. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2007**, *81*, 298–304. [[CrossRef](#)]
76. Zareba, P.; Gryzlo, B.; Malawska, K.; Salat, K.; Höfner, G.C.; Nowaczyk, A.; Fijałowski, L.; Rapacz, A.; Podkowa, A.; Furgała, A.; et al. Novel GABA uptake inhibitors with enhanced inhibitory activity toward mGAT3/4 and their effect on pain threshold in mice. *EJMCh* **2020**, *188*, 111920. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Böck, M.C.; Höfner, G.; Wanner, K.T. N-Substituted Nipecotic Acids as (S)-SNAP-5114 Analogues with Modified Lipophilic Domains. *ChemMedChem* **2020**, *15*, 756–771. [[CrossRef](#)]
78. Nowaczyk, A.; Fijałkowski, L.; Zareba, P.; Salat, K. Selective neuronal and astrocytic inhibition of human GABA transporter isoform 1 (hGAT1) inhibitors in the mechanism of epilepsy and pain-molecular docking and pharmacodynamics studies, part I. *J. Mol. Graph. Model.* **2018**, *85*, 171–181. [[CrossRef](#)]
79. Bahnikova, M.; Matejovič, P.; Pasek, M.; Imurdová, M.; Imurda, J. Ajmaline-induced block of sodium current in rat ventricular myocytes. *Scr. Med.* **2002**, *75*, 169–177.
80. Bébarová, M.; Matejovic, P.; Pásek, M.; Simurdová, M.; Simurda, J. Effect of ajmaline on action potential and ionic currents in rat ventricular myocytes. *Gen. Physiol. Biophys.* **2005**, *24*, 311–325. [[PubMed](#)]
81. Kiesecker, C.; Zitron, E.; Bloehs, R.; Scholz, E.; Thomas, D.; Kreye, V.A.W.; Katus, H.A.; Schoels, W.; Karle, C.A.; Kiehn, J. Class Ia anti-arrhythmic drug ajmaline blocks HERG potassium channels: Mode of action. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **2004**, *370*, 423–435. [[CrossRef](#)]
82. Grima, M.; Schwartz, J.; Spach, M.; Velly, J. Anti-anginal arylalkylamines and sodium channels: [³H]-batrachotoxinin-A 20- α -benzoate and [³H]-tetracaine binding. *Br. J. Pharmacol.* **1986**, *89*, 641. [[CrossRef](#)]
83. Lubic, S.P.; Nguyen, K.P.; Dave, B.; Giacomini, J.C. Antiarrhythmic agent amiodarone possesses calcium channel blocker properties. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **1994**, *24*, 707–714. [[CrossRef](#)]
84. Leffler, A.; Reiprich, A.; Mohapatra, D.P.; Nau, C. Use-dependent block by lidocaine but not amitriptyline is more pronounced in tetrodotoxin (TTX)-Resistant Nav1. 8 than in TTX-sensitive Na⁺ channels. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2007**, *320*, 354–364. [[CrossRef](#)]
85. Zahradník, I.; Minarovič, I.; Zahradníková, A. Inhibition of the cardiac L-type calcium channel current by antidepressant drugs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2008**, *324*, 977–984. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Jo, S.H.; Youm, J.B.; Lee, C.O.; Earm, Y.E.; Ho, W.K. Blockade of the HERG human cardiac K⁺ channel by the antidepressant drug amitriptyline. *Br. J. Pharmacol.* **2000**, *129*, 1474–1480. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. Fossa, A.A.; de Pasquale, M.J.; Raunig, D.L.; Avery, M.J.; Leishman, D.J. The relationship of clinical QT prolongation to outcome in the conscious dog using a beat-to-beat QT-RR interval assessment. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2002**, *302*, 828–833. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
88. McNeal, E.T.; Lewandowski, G.A.; Daly, J.W.; Creveling, C. [³H] Batrachotoxinin A 20- α -benzoate binding to voltage-sensitive sodium channels: A rapid and quantitative assay for local anesthetic activity in a variety of drugs. *J. Med. Chem.* **1985**, *28*, 381–388. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
89. Testa, R.; Abbiati, G.; Ceserani, R.; Restelli, G.; Vanasia, A.; Barone, D.; Gobbi, M.; Mennini, T. Profile of in vitro binding affinities of neuroleptics at different rat brain receptors: Cluster analysis comparison with pharmacological and clinical profiles. *Pharm. Res.* **1989**, *6*, 571–577. [[CrossRef](#)]
90. Sato, T.; Wu, B.; Kiyosue, T.; Arita, M. Effects of cibenzoline, a new class Ia antiarrhythmic drug, on various membrane ionic currents and action potentials of guinea-pig ventricular cells. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **1994**, *350*, 167–173. [[CrossRef](#)]
91. Matsuoka, S.; Nawada, T.; Hisatome, I.; Miyamoto, J.; Hasegawa, J.; Kotake, H.; Mashiba, H. Comparison of Ca²⁺ channel inhibitory effects of cibenzoline with verapamil on guinea-pig heart. *Gen. Pharmacol. Vasc. Syst.* **1991**, *22*, 87–91. [[CrossRef](#)]
92. Männikkö, R.; Overend, G.; Perrey, C.; Gavaghan, C.; Valentin, J.P.; Morten, J.; Armstrong, M.; Pollard, C. Pharmacological and electrophysiological characterization of nine, single nucleotide polymorphisms of the hERG-encoded potassium channel. *Br. J. Pharmacol.* **2010**, *159*, 102–114. [[CrossRef](#)]
93. Mohammad, S.; Zhou, Z.; Gong, Q.; January, C.T. Blockage of the HERG human cardiac K⁺ channel by the gastrointestinal prokinetic agent cisapride. *Am. J. Physiol. Content* **1997**, *273*, H2534–H2538. [[CrossRef](#)]

94. Ekins, S.; Crumb, W.J.; Sarazan, R.D.; Wikel, J.H.; Wrighton, S.A. "Three dimensional quantitative structure activity relationship for the inhibition of the hERG (human ether-a-gogo related gene) potassium channel," *J. Pharmacol. Exp. Thera.* **2002**, *301*, 427–434. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Pauwels, P.J.; Laduron, P.M. TPP+ accumulation in rat brain synaptosomes as a probe for Na⁺ channels. *Eur. J. Pharmacol.* **1986**, *132*, 289–293. [[CrossRef](#)]
96. Campiani, G.; Fiorini, I.; de Filippis, M.P.; Ciani, S.M.; Garofalo, A.; Nacci, V.; Giorgi, G.; Sega, A.; Botta, M.; Chiarini, A. Cardiovascular characterization of pyrrolo [2, 1-d][1, 5] benzothiazepine derivatives binding selectively to the peripheral-type benzodiazepine receptor (PBR): From dual PBR affinity and calcium antagonist activity to novel and selective calcium entry blockers. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 2922–2938.
97. Zhang, S.; Zhou, Z.; Gong, Q.; Makielski, J.C.; January, C.T. Mechanism of block and identification of the verapamil binding domain to HERG potassium channels. *Circ. Res.* **1999**, *84*, 989–998. [[CrossRef](#)]
98. Johnson, R.E.; Silver, P.J.; Becker, R.; Birsnier, N.C.; Bohnet, E.A.; Briggs, G.M.; Busacca, C.A.; Canniff, P.; Carabateas, P.M.; D'Ambra, T. 4, 5-Dihydro-3-(methanesulfonamidophenyl)-1-phenyl-1H-2, 4-benzodiazepines: A novel class III antiarrhythmic agents. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 2551–2556. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
99. Chadwick, C.C.; Ezrin, A.M.; O'Connor, B.; Volberg, W.A.; Smith, D.I.; Wedge, K.J.; Hill, R.J.; Briggs, G.M.; Pagani, E.D.; Silver, P.J. Identification of a specific radioligand for the cardiac rapidly activating delayed rectifier K⁺ channel. *Circ. Res.* **1993**, *72*, 707–714. [[CrossRef](#)]
100. de Bruin, M.; Pettersson, M.; Meyboom, R.; Hoes, A.; Leufkens, H. Anti-HERG activity and the risk of drug-induced arrhythmias and sudden death. *Eur. Heart J.* **2005**, *26*, 590–597. [[CrossRef](#)]
101. Redfern, W.; Carlsson, L.; Davis, A.; Lynch, W.; MacKenzie, I.; Palethorpe, S.; Siegl, P.; Strang, I.; Sullivan, A.; Wallis, R. Relationships between preclinical cardiac electrophysiology, clinical QT interval prolongation and torsade de pointes for a broad range of drugs: Evidence for a provisional safety margin in drug development. *Cardiovasc. Res.* **2003**, *58*, 32–45. [[CrossRef](#)]
102. Schoemaker, H.; Claustre, Y.; Fage, D.; Rouquier, L.; Chergui, K.; Curet, O.; Oblin, A.; Gonon, F.; Carter, C.; Benavides, J. Neurochemical characteristics of amisulpride, an atypical dopamine D2/D3 receptor antagonist with both presynaptic and limbic selectivity. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* **1997**, *280*, 83–97.
103. Kirsch, G.E.; Trepakova, E.S.; Brimecombe, J.C.; Sidach, S.S.; Erickson, H.D.; Kochan, M.C.; Shyjka, L.M.; Lacerda, A.E.; Brown, A.M. Variability in the measurement of hERG potassium channel inhibition: Effects of temperature and stimulus pattern. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **2004**, *50*, 93–101. [[CrossRef](#)]
104. de Luca, A.; Talon, S.; De Bellis, M.; Desaphy, J.-F.; Franchini, C.; Lentini, G.; Catalano, A.; Corbo, F.; Tortorella, V.; Conte-Camerino, D. Inhibition of skeletal muscle sodium currents by mexiletine analogues: Specific hydrophobic interactions rather than lipophilia per se account for drug therapeutic profile. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **2003**, *367*, 318–327. [[CrossRef](#)]
105. Hu, X.; Qian, J. DDPH inhibited L-type calcium current and sodium current in single ventricular myocyte of guinea pig. *Acta Pharmacol. Sin.* **2001**, *22*, 415–419. [[PubMed](#)]
106. Roche, O.; Trube, G.; Zuegge, J.; Pflimlin, P.; Alanine, A.; Schneider, G. A virtual screening method for prediction of the HERG potassium channel liability of compound libraries. *ChemBioChem* **2002**, *3*, 455–459. [[CrossRef](#)]
107. Strege, P.R.; Bernard, C.E.; Ou, Y.; Gibbons, S.J.; Farrugia, G. Effect of mibefradil on sodium and calcium currents. *Am. J. Physiol. Liver Physiol.* **2005**, *289*, G249–G253. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
108. Huber, I.; Wappl, E.; Herzog, A.; Mitterdorfer, J.; Glossmann, H.; Langer, T.; Striessnig, J. Conserved Ca²⁺-antagonist-binding properties and putative folding structure of a recombinant high-affinity dihydropyridine-binding domain. *Biochem. J.* **2000**, *347*, 829–836. [[CrossRef](#)]
109. di Stilo, A.; Visentin, S.; Cena, C.; Gasco, A.M.; Ermondi, G.; Gasco, A. New 1, 4-dihydropyridines conjugated to furoxanyl moieties, endowed with both nitric oxide-like and calcium channel antagonist vasodilator activities. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 5393–5401. [[CrossRef](#)]
110. Zhabyeyev, P.; Missan, S.; Jones, S.E.; McDonald, T.F. Low-affinity block of cardiac K⁺ currents by nifedipine. *Eur. J. Pharmacol.* **2000**, *401*, 137–143. [[CrossRef](#)]
111. Ehlert, F.J.; Roeske, W.R.; Itoga, E.; Yamamura, H.I. The binding of [3H] nitrendipine to receptors for calcium channel antagonists in the heart, cerebral cortex, and ileum of rats. *Life Sci.* **1982**, *30*, 2191–2202. [[CrossRef](#)]

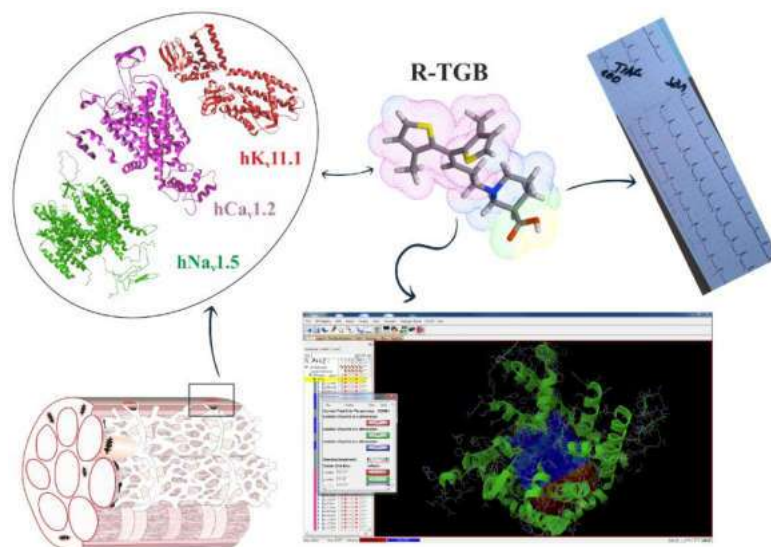
112. Pauwels, P.J.; Leysen, J.E.; Laduron, P.M. [3H] Batrachotoxinin A 20- α -benzoate binding to sodium channels in rat brain: Characterization and pharmacological significance. *Eur. J. Pharmacol.* **1986**, *124*, 291–298. [[CrossRef](#)]
113. Reynolds, I.; Snowman, A.M.; Snyder, S.H. (-)-[3H] desmethoxyverapamil labels multiple calcium channel modulator receptors in brain and skeletal muscle membranes: Differentiation by temperature and dihydropyridines. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1986**, *237*, 731–738.
114. Paul, A.A.; Witchel, H.J.; Hancox, J.C. Inhibition of the current of heterologously expressed HERG potassium channels by flecainide and comparison with quinidine, propafenone and lignocaine. *Br. J. Pharmacol.* **2002**, *136*, 717–729. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
115. Hanson, L.A.; Bass, A.S.; Gintant, G.; Mittelstadt, S.; Rampe, D.; Thomas, K. ILSI-HESI cardiovascular safety subcommittee initiative: Evaluation of three non-clinical models of QT prolongation. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **2006**, *54*, 116–129. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
116. Kongsamut, S.; Kang, J.; Chen, X.-L.; Roehr, J.; Rampe, D. A comparison of the receptor binding and HERG channel affinities for a series of antipsychotic drugs. *Eur. J. Pharmacol.* **2002**, *450*, 37–41. [[CrossRef](#)]
117. Po, S.; Wang, D.; Yang, I.C.-H.; Johnson, J.; Nie, L.; Bennett, P. Modulation of HERG potassium channels by extracellular magnesium and quinidine. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **1999**, *33*, 181–185. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
118. Thomsen, M.B.; Volders, P.G.; Stengl, M.; Späatjens, R.L.; Beekman, J.D.; Bischoff, U.; Kall, M.A.; Frederiksen, K.; Matz, J.; Vos, M.A. Electrophysiological safety of sertindole in dogs with normal and remodeled hearts. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2003**, *307*, 776–784. [[CrossRef](#)]
119. Kramer, J.; Obejero-Paz, C.A.; Myatt, G.; Kuryshv, Y.A.; Bruening-Wright, A.; Verducci, J.S.; Brown, A.M. MICE models: Superior to the HERG model in predicting Torsade de Pointes. *Sci. Rep.* **2013**, *3*, 2100. [[CrossRef](#)]
120. Faivre, J.F.; Gout, B.; Bril, A. Tedisamil. *Card. Drug Rev.* **1995**, *13*, 33–50. [[CrossRef](#)]
121. Jost, N.; Virág, L.; Hála, O.; Varro, A.; Thormahlen, D.; Papp, J.G. Effect of the antifibrillatory compound tedisamil (KC-8857) on transmembrane currents in mammalian ventricular myocytes. *Curr. Med. Chem.* **2004**, *11*, 3219–3228. [[CrossRef](#)]

Publisher’s Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

6. BADANIA W OPARCIU O METODY DOKOWANIA POTENCJALNEJ KARDIOTOKSYCZNOŚCI TIAGABINY



Ryc. 14. Graficzny schemat metodyki przeprowadzonych badań.

Najnowsze badania wskazują, iż pacjenci cierpiący na epilepsję mają zwiększone prawdopodobieństwo zapadania na choroby serca [71]. Zaobserwowano, iż terapia jednym ze stosowanych leków przeciwpadaczkowych, TGB, jest obciążona ryzykiem wystąpienia tachykardii (ryc. 1). Niemniej mechanizm występowania tego zjawiska nie został jeszcze jasno zdefiniowany [72].

Mając na uwadze fakt, iż anomalie pracy serca są najczęściej wynikiem zaburzonego funkcjonowania kanałów jonowych, przeprowadzono badania dokowania molekularnego cząsteczki TGB z wybranymi modelami ludzkich kanałów zaproponowanych przez CiPA: hK_v11.1, hNa_v1.5, hCa_v1.2. [73].

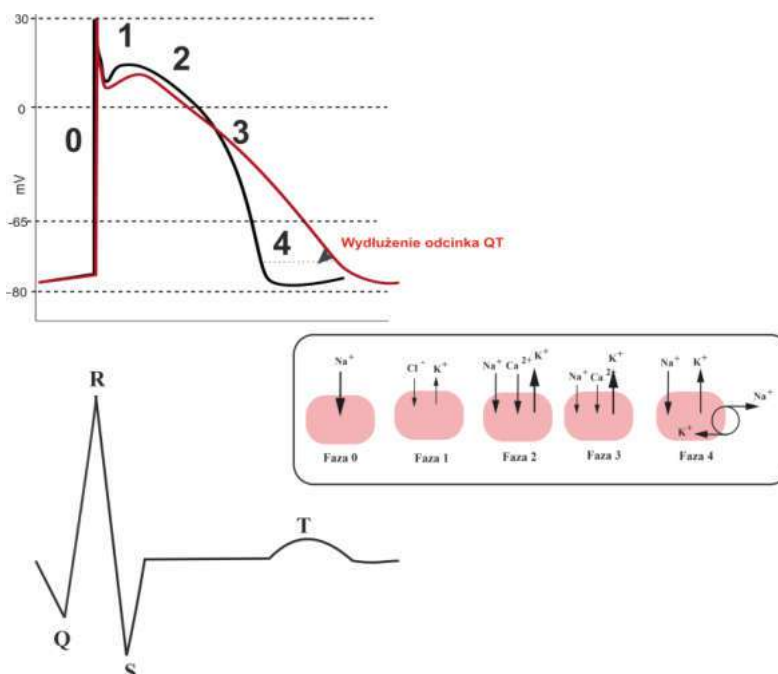
Procedura dokowania

Dokowanie molekularne przeprowadzono przy użyciu oprogramowania AutoDock 4.2 oraz AutoDockTools (ryc. 11). W badanych modelach białkowych wyznaczono pudło obliczeniowe o wymiarze 60 x 60 x 60 Å i rozmiarze kroku równym 0,375 Å. Wielkość pudła umożliwiła swobodną rotację liganda. Zostało ono umiejscowione w środku kieszeni wiążących badane VGICs. Modele 3D protein: hNav1.5, hCav1.2. uzyskano z bazy Swiss Model Repository (SMR), natomiast strukturę krystaliczną hK_v11.1 z Kolaboratorium badawczego w zakresie bioinformatyki strukturalnej (*Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB)*) Banku danych nt. białek (*Protein Data Bank (PDB)*). Struktury związków referencyjnych: TEF, BTX, NFD oraz TGB zostały pobrane z bazy ZINC.

Przeprowadzone analizy potwierdziły, iż oba enancjomery TEF tworzą najbardziej stabilne połączenia z hKv11.1, NFD z Cav1.2, natomiast BTX z Nav1.5. Potwierdzeniem stabilności badanych kompleksów są wartości liczbowe uzyskanych energii wiązania odpowiednich kompleksów: $EB_{(R/S-TEF-hKv11.1)} \approx -8,4$, $EB_{(NFD-hCav1.2)} \approx -10.71$ kcal/mol, $EB_{(BXT-hNav1.5)} \approx -9,01$. Dokowanie TGB do ww. antycelów potwierdziły dane piśmiennicze wskazujące, że enancjomer R-TGB wykazuje wyższą aktywność w porównaniu do S-TGB. Niemniej, wartość logarytmu stałej inhibicji (pKi) połączeń R/S-TGB ze wszystkimi testowanymi kanałami ma wartość poniżej przyjętego farmakologicznie istotnego progu inhibicji ($pKi \leq 4$), dlatego ligand ten można uznać za nieaktywny wobec badanych białek. Najbardziej optymalną wartość inhibicji posiada kompleks R-TGB – hKv11.1, co w niewielkim stopniu może tłumaczyć zaburzenia sercowe po podaniu TGB.

Testy farmakologiczne

Uzyskane w procesie *in silico* dane zweryfikowano badaniami farmakologicznymi. Test wpływu TGB na prawidłowość zapisu elektrokardiogramu (EKG) u szczurów dostarczył informacji na temat zaburzenia odcinków potencjału czynnościowego po podaniu TGB. Na ryc. 15 przedstawiono schemat obrazujący zmiany potencjału czynnościowego oraz wyodrębniono jony biorące udział w kontrolowaniu prawidłowego przebiegu każdej z faz pobudzenia.








Ryc. 15. Schemat obrazujący zmiany potencjału czynnościowego serca. Numerami 0 – 5 oznaczono fazy potencjału czynnościowego serca, różowym kolorem oznaczono schemat komórki; napływ jonów do komórki oznaczono strzałką skierowaną w dół, wypływ jonów z komórki oznaczoną strzałką skierowaną w górę.

Przeprowadzone badania potwierdziły, iż nawet wysokie dawki substancji nie mają wpływu na potasowy i sodowy kanał jonowy, a tym samym nie zmienia znacząco zapisu EKG. Drugi test skupił się na ocenie blokowania wpływu wapnia do komórki po podaniu TGB. Modelem wykorzystanym w badaniu była wyizolowana aorta szczura obkurczona roztworem chlorku potasu (KCl). Skurcz aorty wywołany napływem K^+ powodował depolaryzację błony komórkowej i napływ Ca^{2+} . Podanie związków referencyjnych (NFD oraz werapamilu) znosiło efekt wywołany KCl, natomiast TGB nie była w stanie spowodować rozkurczu naczynia. W ten sposób udowodniono, iż badany lek nie posiada właściwości inhibicji VGCaCs w badanym zakresie stężeń.

Przeprowadzone w ramach niniejszej pracy badania wykazały, iż efekt tachykardii obserwowany u 1% pacjentów leczonych TGB prawdopodobnie nie jest wynikiem blokowania kanałów jonowych zaproponowanych przez CiPA. Otrzymane wyniki są potwierdzeniem, iż blokowanie genu hERG nie może być jedyną przyczyną wydłużania odcinka QT potencjału czynnościowego. Konieczne wydaje się zatem kontynuowanie badań w tym kierunku oraz rozwój technik *in silico* w zakresie bezpieczeństwa kardiologicznego. Wnioski wyciągnięte po analizie wyników wskazują również na konieczność ulepszenia modelu farmakologicznego na którym prowadzone są badania, gdyż aktywność miocytów serca gryzoni i człowieka różni się w znaczący sposób.

Article

Antiepileptic Drug Tiagabine Does Not Directly Target Key Cardiac Ion Channels Kv11.1, Nav1.5 and Cav1.2

Magdalena Kowalska ¹, Łukasz Fijałkowski ¹ , Monika Kubacka ² , Kinga Salat ² , Grzegorz Grzešek ³, Jacek Nowaczyk ⁴  and Alicja Nowaczyk ^{1,*} 

¹ Department of Organic Chemistry, Faculty of Pharmacy, Ludwik Rydygier Collegium Medicum in Bydgoszcz, Nicolaus Copernicus University in Toruń, 87-100 Toruń, Poland; magda.kowalska@doktorant.umk.pl (M.K.); l.fijalkowski@cm.umk.pl (L.F.)

² Department of Pharmacodynamics, Chair of Pharmacodynamics, Jagiellonian University Medical College, 9 Medyczna St., 30-688 Krakow, Poland; monika.kubacka@uj.edu.pl (M.K.); kinga.salat@uj.edu.pl (K.S.)

³ Department of Cardiology and Clinical Pharmacology, Faculty of Health Sciences, Collegium Medicum in Bydgoszcz, Nicolaus Copernicus University, 75 Ujejskiego St., 85-168 Bydgoszcz, Poland; g.grzesk@cm.umk.pl

⁴ Physical Chemistry and Chemistry of Polymers, Faculty of Chemistry, Nicolaus Copernicus University, 7 Gagarina St., 87-100 Toruń, Poland; jacek.nowaczyk@umk.pl

* Correspondence: alicja@cm.umk.pl



Citation: Kowalska, M.; Fijałkowski, L.; Kubacka, M.; Salat, K.; Grzešek, G.; Nowaczyk, J.; Nowaczyk, A. Antiepileptic Drug Tiagabine Does Not Directly Target Key Cardiac Ion Channels Kv11.1, Nav1.5 and Cav1.2. *Molecules* **2021**, *26*, 3522. <https://doi.org/10.3390/molecules26123522>

Academic Editor: Diego Muñoz-Torrero

Received: 22 April 2021

Accepted: 8 June 2021

Published: 9 June 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Tiagabine is an antiepileptic drug used for the treatment of partial seizures in humans. Recently, this drug has been found useful in several non-epileptic conditions, including anxiety, chronic pain and sleep disorders. Since tachycardia—an impairment of cardiac rhythm due to cardiac ion channel dysfunction—is one of the most commonly reported non-neurological adverse effects of this drug, in the present paper we have undertaken pharmacological and numerical studies to assess a potential cardiovascular risk associated with the use of tiagabine. A chemical interaction of tiagabine with a model of human voltage-gated ion channels (VGICs) is described using the molecular docking method. The obtained in silico results imply that the adverse effects reported so far in the clinical cardiological of tiagabine could not be directly attributed to its interactions with VGICs. This is also confirmed by the results from the isolated organ studies (i.e., calcium entry blocking properties test) and in vivo (electrocardiogram study) assays of the present research. It was found that tachycardia and other tiagabine-induced cardiac complications are not due to a direct effect of this drug on ventricular depolarization and repolarization.

Keywords: tiagabine; cardiac voltage-gated ion channels; molecular modeling; ECG study

1. Introduction

Epidemiological studies have consistently shown that people with epilepsy have a higher prevalence of structural cardiac disease than those without it [1]. The functioning of neurons, muscles and cardiac myocytes is based on action potentials (APs) generated by transmutational ion currents mediated mainly by sodium, calcium and potassium [2,3]. According to the guidelines of the Comprehensive in vitro Proarrhythmia Assay (CiPA), a set of six ion channels has been selected for which currents are important for both the repolarization and depolarization of the cardiac action potential (AP) [4]. There is some evidence, based on the effect of clinical drugs on cardiac APs, indicating the classification of cardiac ion channels into two classes [5–7]. The first class contains the most important cardiac ion channels, such as $K_V11.1$, $Na_V1.5$ and $Ca_V1.2$. The second class comprises $K_V4.3$, $K_VLQT1/mink$ and $Kir2.1$ and is less critical for the assessment of all drugs under CiPA [7–9].

A common feature of both neurological disorders (e.g., epilepsy and chronic pain) and cardiac dysrhythmias is cell (neuronal cell and cardiac myocyte, respectively) hyperexcitability [2]. Therefore, drugs affecting cell excitability threshold within the nervous tissue

can also interact with cardiac cell APs and vice versa [10–12]. It has to be emphasized that this drug-induced effect might sometimes be harmful as it may lead to the occurrence of additional alterations in neuronal or cardiac cell reactivity, thus being a cause for additional drug-induced (iatrogenic) complications. From the safety pharmacology point of view, it is of key importance to recognize these potential risk factors as early as possible. The cardiac VGICs assay is an indispensable step and a high-quality assay must accompany any investigational new drug application. The *in silico* studies of drug binding to $K_v11.1$, $Na_v1.5$ and $Ca_v1.2$ may be valuable assays for drugs and drug candidates at present [13].

Currently, several antiepileptic drugs were reported to have cardiotoxic and metabolic adverse effects [1,14]. Tiagabine (TGB) is an anticonvulsant drug used to treat partial seizures in humans. Recent results of clinical trials and animal studies indicate that it might be also effective in patients suffering from pain, insomnia or mood disorders and these activities are attributed to its inhibitory effect on GABA uptake [15,16]. TGB is a 96% protein-bound molecule [17]. The drug is a potent inhibitor of [3H]GABA uptake into synaptosomal membranes ($IC_{50} = 67$ nM) or neurons ($IC_{50} = 446$ nM) and glial cells ($IC_{50} = 182$ nM) in primary cell cultures. The *in vivo* tests have shown that TGB neuronal inhibiting is 2.5-fold more potent than glial GABA uptake [18–20]. The enhancement of GABA neurotransmission due to GABA transporter subtype 1 (GAT-1) inhibition might also explain most of adverse effects of TGB, including drowsiness, confusion and dizziness [18,21]. However, some other TGB-induced complications do not be directly related to its influence on GABA concentration in the brain and other tissues.

Several recent reports have demonstrated that tachycardia is observed in about 1.0% of patients treated with TGB [18,22] but the mechanisms underlying this cardiotoxic effect are not known. In the literature there is a limited amount of data regarding the influence of TGB on cardiovascular functions and metabolism [23].

Since tachycardia is most frequently caused by impaired ion channel functions [24–27], in the *in silico* part of the present study a detailed analysis of the interactions between the human $K_v11.1$, $Na_v1.5$, $Ca_v1.2$ and TGB was performed. In order to compare the strength of TGB's binding to individual ion channels terfenadine (TEF) [28], batrachotoxin (BTX) [29,30] and nifedipine (NFD) [31] were selected as compounds strongly affecting these molecular targets.

In the course of present study, *in vivo* tests in rats were performed. The *in vivo* assay comprised the assessment of TGB's proarrhythmic potential and its effects on ECG components were studied; i.e., we conducted *in vivo* evaluation of TGB to assess its influence on PQ, QRS, QT and QTc intervals. Its effect on heart rate was also investigated. The relevant changes in PQ, QRS, QT and QTc intervals were interpreted as the effect of the test drug predominantly on Na_v , K_v and Ca_v channels. In contrast, the changes in heart rate were treated as a measure of the effect of the test compound, particularly, on the $Na_v1.5$ channel or autonomic system function. Calcium blocking properties of TGB were tested in the isolated rat aorta contracted with depolarizing KCl solution.

2. Results

2.1. Pharmacological Part

2.1.1. The Effect on Normal Electrocardiogram

In vivo ECG study showed that TGB marked no significant effect on PQ, QRS, QT and QTc intervals. TGB also did not influence the heart rate significantly. It decreased the heart rhythm maximally at 30 min (by 6.9%) but this result did not reach statistical significance (Table 1). What is most important to note is that TGB at a dose as high as 100 mg/kg *i.p.* did not prolong QT interval, which suggests that it did not prolong cardiac repolarization and probably did not block I_{KR} currents. Similar observations have also been made in the published studies [32,33]. We also did not observe the prolongation of PQ interval and QRS widening, which reflects the slowed conduction and disturbances in ventricular depolarization, usually due to the I_{Na} block. This is in line with the results obtained and

presented here from molecular docking studies, where we found that TGB did not bind to cardiac voltage-gated ion channels $K_v11.1$ (hERG) and $Na_v1.5$.

Table 1. Effects of TGB (100 mg/kg *i.p.*) on the heart rate and ECG intervals in anesthetized rat (thiopental 75 mg/kg *i.p.*).

Parameters	Time of Observation (min)							
	0	5	10	20	30	40	50	60
Beats/min	288.0 ± 5.4	275.6 ± 7.6	274.2 ± 7.7	269.5 ± 6.6	268.1 ± 3.0	276.7 ± 4.7	283.7 ± 7.0	289.5 ± 11.3
PQ (ms)	52.6 ± 2.0	56.2 ± 2.0	56.8 ± 2.1	56.6 ± 1.8	57.2 ± 1.3	55.2 ± 2.2	57.2 ± 1.2	56.8 ± 1.3
QRS (ms)	19.2 ± 0.5	18.4 ± 1.1	19.8 ± 0.9	19.4 ± 0.6	19.4 ± 0.9	19.8 ± 0.5	19.6 ± 0.4	19.0 ± 0.9
QT (ms)	61.0 ± 1.0	60.6 ± 0.4	62.6 ± 1.9	62.8 ± 1.8	60.8 ± 0.8	63.6 ± 1.8	61.2 ± 0.8	61.6 ± 0.9
QTc (ms)	113.8 ± 3.0	115.6 ± 1.5	119.9 ± 5.6	121.1 ± 3.8	117.4 ± 2.0	121.0 ± 3.8	115.0 ± 2.0	114.8 ± 3.0

The data are the means of five experiments ± S.E.M. Statistical analysis: one-way analysis of variance (ANOVA) with repeated measurements and followed by Dunnett's post hoc test.

2.1.2. Voltage-Dependent Calcium Channels

During the course of our study, we investigated the calcium entry blocking properties of TGB in vasculature by employing the isolated rat aorta contracted with depolarizing KCl solution. In this experiment, the KCl-induced contraction was caused by an increase in extracellular potassium that led to membrane depolarization, which increases calcium influx from extracellular sources involving voltage-dependent calcium channels [34] ($Ca_v1.2$). The reference compounds we used were verapamil [35] and NFD [36]. TGB was not able to relax KCl-precontracted aortic rings at the range of concentration 1–30 μ M (Figure 1). At a higher concentration, TGB was not tested as it precipitated in Krebs–Henseleit solution. NFD, verapamil and voltage-dependent calcium channel blockers relaxed KCl (60 mmol/L)-precontracted aortic rings in a dose-dependent manner (Figure 1) by 95–97%, with the IC_{50} values of 4.7 ± 0.2 nM and 32.9 ± 7.4 nM, respectively [35,36]. On the basis of these results, we may state that TGB does not possess voltage-dependent calcium channel blocking properties at the tested range of concentrations.

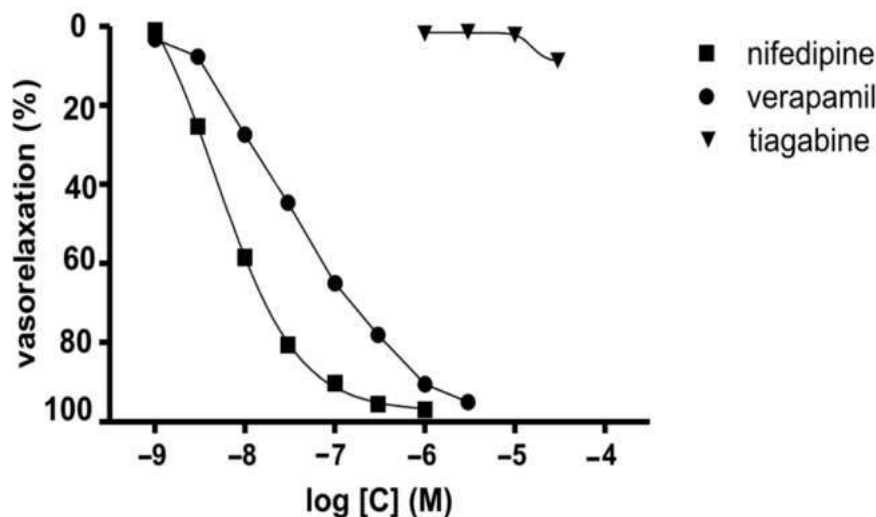


Figure 1. Inhibitory potencies of TGB and reference drugs (NFD and verapamil) on sustained contraction of aortic rings induced by KCl (60 mM).

2.2. Molecular Docking Studies

2.2.1. Terfenadine

TEF is (RS)-1-(4-tert-butylphenyl)-4-[4-[hydroxy(diphenyl)methyl]piperidin-1-yl]-butan-1-ol and, from a chemical point of view, belongs to piperidine derivatives (Figure 2).

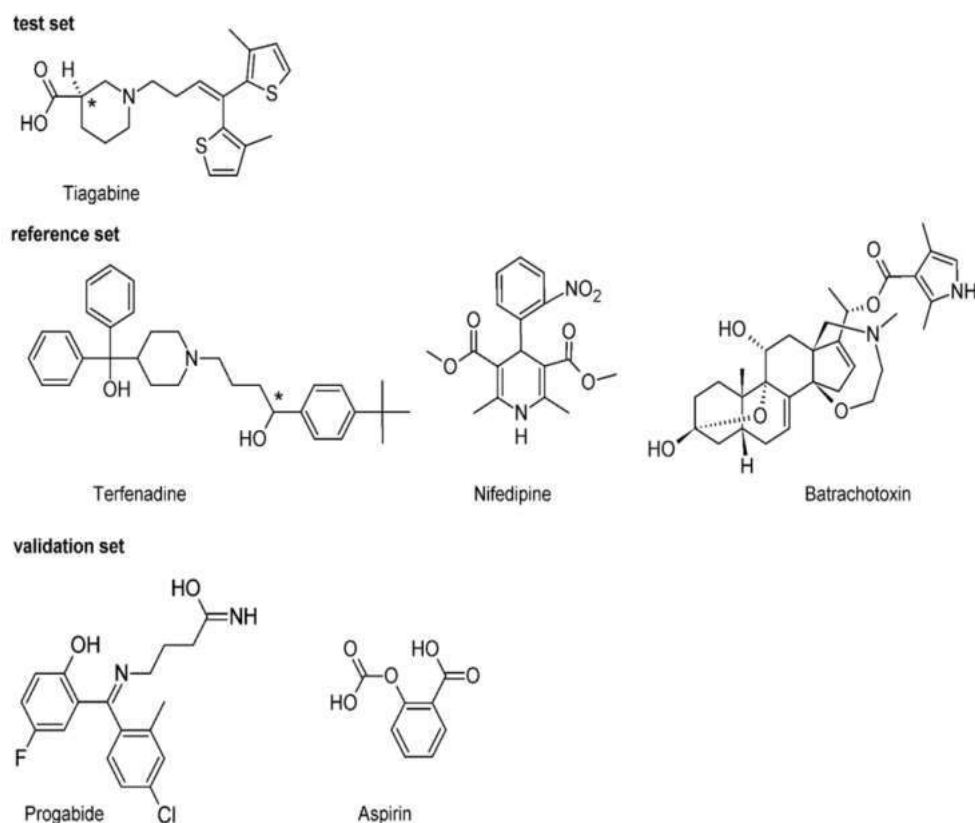


Figure 2. Chemical structure of the investigated compounds. Carbons at a tetrahedral stereogenic center are distinguished by *.

The obtained results from molecular docking confirmed the strongest blocking effects of TEF on the hK_v11.1 channel. R-TEF-hK_v11.1 is the most stable complex in the studied set. Comparison of the data (such as E_B and pK_i, Table 2) obtained for R-TEF and S-TEF complexes leads to the conclusion that there are significant stereoselective differences in the potential interaction for all studied channels. Docking experimentation predicted more effective potential interactions of all studied channels and S-TEF than its counterpart R-TEF (Table 2). Nevertheless, all calculated h-bonds formed are weak interactions. Moreover, obtained data suggests that R/S-TEF displays non inhibitory effects for hCa_v1.2. According to data in Table 2, pK_i < 3.5, while by convention pK_i ≤ 4 indicates the lack of a biological effect. Based on the CiPA studies, including the examination of the effect of 30 clinical drugs on the 7-ion channel [7], it can be concluded that the risk level of torsade de pointes (TdP) is correlated with the blocking effects of hK_v11.1, hNa_v1.5 and hCa_v1.2. Crumb et al. [7,37] in their research proposed a classification of drugs into three categories of TdP entry risk (high, medium and low). According to their studies, drugs belonging to the high and medium risk stand out with block hERG to a much greater extent than any other tested currents. The drugs belonging to the low risk category is distinct with the non-specific blocking of hK_v11.1, hNa_v1.5 and hCa_v1.2 channels (Figure S1). These results clearly indicate the need for testing drug candidates on the ion channel panel. In our study it was found, on the molecular level, that the high risk of TdP is a result of TEF's strong blocking effects on hERG. R-TEF-hK_v11.1 complex has one normal h-bond in which the hydroxyl group of the (4-tert-butylphenyl)methanol moieties of R-TEF donates energetically weak (−3.62 kcal/mol), short (2.12 Å) and almost linear interactions (158°) to Tyr652 (Figure S2). Regarding the interaction of R-TEF and S-TEF with the hNa_v1.5 channel, it should be noted that both enantiomers of TEF practically strongly interact with this protein (pK_i > 5, Table 2), which also indicates their arrhythmogenic effects through

the hNav_v1.5. This observation is also confirmed by previously presented pharmacological studies [38].

Table 2. The summary of hNav_v1.5, hCav_v1.2 and hK_v11.1 (hERG) channel docking experiment results.

Complex		E_B	pK_i	Amino Acid Residues	H_B		Angle	L_{HB}	E_{HB}
Protein	Ligand	kcal/mol			donor	acc	θ	Å	kcal/mol
hNav _v 1.5	R-TGB	−5.01	3.74	ASN927	#CONH ₂	%COO	153.33	2.17	−3.38
	S-TGB	−5.21	3.82	ASN927	#CONH ₂	%COO	171.54	2.23	−4.05
	NFD	−7.00	5.13	LEU409	%NOH	#CONH	146.945	1.987	−0.07
	R-TEF	−6.83	5.01			none			
	S-TEF	−7.45	5.46	LEU409	%OH	#CONH	163.079	2.014	−1.00
				GLU417	%OH	#COO	129.495	2.178	−0.04
BTX	−9.01	6.68	SER1458	%NH	#CONH	156.904	2.179	−3.43	
hCav _v 1.2	R-TGB	−5.05	3.70	THR1056	%NH	#OH	168.494	1.868	−7.33
				SER1132	#OH	%COO	176.604	2.116	−5.54
	S-TGB	−4.77	3.50	THR1056	%NH	#OH	150.676	2.155	−4.06
				SER1132	#OH	%COO	137.882	2.092	−0.01
	NFD	−10.71	7.85	THR1462	%NOH	#CONH	124.62	1.68	−3.13
				TYR1508	#PhOH	%NOH	141.07	1.92	−3.84
R-TEF	−4.16	3.05	THR1133	%OH	#CONH	137.428	2.021	−0.35	
S-TEF	−4.75	3.48	ALA1174	%OH	#CONH	128.006	1.901	−0.35	
			GLN1060	%OH	#CONH ₂	157.582	1.691	−0.37	
BTX	−7.17	5.25	SER1132	#OH	%OH	141.666	2.221	−3.23	
			MET1178	%NH-pyrrole	#CONH	156.864	2.028	−4.51	
R-TGB	−5.4	3.32	none						
S-TGB	−5.2	3.14	TYR652	%NH	#CONH	136.087	1.97	−2.86	
			SER660	#OH	%COO	128.896	2.145	−0.04	
hK _v 11.1	NFD	−4.42	3.24	ASN658	#CONH ₂	%NO	174.448	1.849	−7.63
	R-TEF	−8.4	6.27	TYR652	%OH	#PhOH	158.395	2.121	−3.63
	S-TEF	−8.4	6.56	none					
	BTX	−6.75	4.95	PHE551	%OH	#CONH	171.728	1.933	−0.28
THR623						140.298	1.933	−2.24	

Abbreviations in Table. Components of the investigated complexes: protein-hNav_v1.5, hCav_v1.2 and hK_v11.1 (hERG); and ligands, R/S-TGB (R/S-tiagabine), NFD (nifedipine), R/S-TEF (R/S-terfenadine), BTX (batrachotoxin). Other abbreviations: H_B —hydrogen bond. acc—hydrogen bond acceptor. Hydrogen bond components: from the ligand % and from the protein #. E_B —complex energy binding. θ —hydrogen bond angle. L_{HB} —hydrogen bond length. E_{HB} —hydrogen bond energy. pK_i was calculated from the AutoDock4 and estimated inhibition constant K_i , which is reported in the AutoDock4 output.

2.2.2. Nifedipine

NFD is a 3,5-dimethyl 2,6-dimethyl-4-(2-nitrophenyl)-1,4-dihydropyridine-3,5-dicarboxylate (Figure 2). It is classified as a dihydropyridine subclass compound. It is a highly apolar photosensitive compound. The NFD docking experiment revealed that this molecule can interact with an active site of all the studied proteins (Table 2). It can be set to the following descending order of binding energies $E_{B(NFD-hKv11.1)} \approx -4.42$, $E_{B(NFD-hNav1.5)} \approx -7.00$ and $E_{B(NFD-hCav1.2)} \approx -10.71$ kcal/mol, respectively. The binding energies obtained in the docking experiment show that NFD forms a more stable complex in the case of the hCav_v1.2 channel. The in silico data obtained for blocking of

hCa_v1.2 channel ($pK_i = 7.85$) are in line with data in the literature ($pIC_{50} = 7.48$) [35] and ($pK_i = 7.66$) [39]. Based on the predicted binding affinity, the highest affinity was observed with the hCa_v1.2 and NFD in all cases of studied channels. Additionally, the blocking effect of NFD with hNa_v1.5 was also proven (Table 2). It has to be highlighted that in NFD-hNa_v1.5 and NFD-hK_v11.1 complexes, NFD interacts via one normal h-bond. In contrast, the complex NFD-hCa_v1.2 shows two h-bonds, both of which are short (≈ 1.68 Å) and strong (≈ -3.8 kcal/mol) (Table 2). The assessment of the data obtained for the hydrogen bonds clearly leads to the conclusion that they all have incomparable energies and bond lengths. Interestingly, NFD forms the strongest h-bond with hK_v11.1 and the weakest one with hNa_v1.5 channel (Table 2, Figure S2). The h-bond with hCa_v1.2 is characterized by an indirect force of influence. However, taking into account the data from Table 2, there is no correlation between the binding affinities of NFD and h-bond energy. The obtained distribution of estimated pK_i measure shows that in case of the hK_v11.1 channel, NFD has no inhibitory effect for this channel ($pK_i < 4$, Table 2). These data prove that NFD has potency only in inhibiting the hCa_v1.2 and hNa_v1.5 channel, which is in agreement with the pharmacological data previously presented in pharmacological literature [40].

2.2.3. Batrachotoxin

BTX as a steroidal alkaloid belongs to class A channel opening toxins [41]. Its molecule contains an oxazepane ring with tertiary amine and an aromatic pyrrole ring connected to the rigid polycyclic steroidal core via the ester group (Figure 2). Its 3D structure adopts a horseshoe conformation [42,43]. The outer surface of the horseshoe is hydrophobic, while the inner one is rather hydrophilic and forms the oxygen triad (at C3, C9 and C11) [44,45]. The outer surface of the horseshoe is hydrophobic, while the inner one is rather hydrophilic and forms oxygen triad (at C3, C9 and C11) [44]. It was suggested in the literature that this oxygen triad forms a hydrophilic arc, which can be regarded as a chelating site attracting some cations [46]. In the preliminary analysis of the docking, it was observed that BTX interacts with the active site of all studied proteins (Figure S2). The achieved data demonstrated that Na_v1.5 forms one h-bond, while hCa_v1.2 and hK_v11.1 form two h-bonds. The energies obtained in the present in silico experiment show that hCa_v1.2 and hK_v11.1 form more and form stronger hydrogen bonds than the remaining one (hNa_v1.5). The predicted binding affinity can be arranged in the following increasing order: hK_v11.1 < hCa_v1.2 < hNa_v1.5 (Table 2). Obtained results revealed that BTX-hNa_v1.5 is an energetically more stable complex with a binding energy of -9.01 kcal/mol. The stability of the complex with the hCa_v1.2 and hK_v11.1 is slightly lower than that with hNa_v1.5 (i.e., $E_{B\ BTX-hCa_v1.2} = -7.17$ and $E_{B\ BTX-hK_v11.1} = -6.75$ kcal/mol, respectively). The calculated BTX affinity value of $pK_i = 6.68$ is consistent with the relevant inhibitory potential data known from the specialized literature ($pIC_{50} = 6.71$) [47]. The BTX-hNa_v1.5 complex is formed via a single key interaction with residues of hNa_v1.5. The hydroxyl group at position C-11 of the steroid skeleton donates one h-bond to the sulfur atom of Ser1458. This interaction is non-linear (157°) and with weak energy, i.e., -3.43 kcal/mol and a small bond length equal to 2.18 Å. This is in line with the literature data according to which the atom included in oxygen triad is responsible for the toxic interaction of BTX with its molecular target [44]. We can treat these data as a strong argument proving that BTX acts on the cytoplasmic side of the channel just as other Class A neurotoxic compounds do, as it is shown in Figure S2.

For hCa_v1.2 and hK_v11.1 channels, BTX has $pK_i \approx 5.2$, which suggests comparable blocking effects. The BTX-hCa_v1.2 complex is a more energetically stable form than the BTX-hNa_v1.5 complex (Table 2). This complex has one normal h-bond. In the bifurcated h-bond, the major component is Ser1132 and the minor component is Gln1060; the associated energies are weak ($E_{HB} = -0.37$ kcal/mol and -3.23 kcal/mol, respectively). The distances of the hydrogen bonds lay in the range from 1.69 to 2.22 Å and, due to this, the three-centered hydrogen bond is highly not symmetric. In the case of BTX-hCa_v1.2 complex, it is formed via one normal h-bond interaction (Table 2).

2.2.4. Tiagabine

As it can be seen from the data collected in Table 2, TGB complexes between hNav_v1.5, hCa_v1.2 and hK_v11.1 have a calculated pK_i ≤ 4, which is commonly used as a threshold and this drug can thus be considered as an inactive ligand for those proteins. These data refer to both R/S enantiomers of TGB (Figure 3). Docking TGB into the hNav_v1.5 channel showed the highest pK_i value in Table 2, however, the value is still below the activity threshold level of pK_i > 4. The lowest pK_i was observed for hK_v11.1. We can treat these data as a partial explanation of the reported adverse TGB interactions in the cardiovascular system. It also seems that a small percentage of the observed cardiac disorders can be attributed to the fact that TGB does not interact with hK_v11.1, for which inhibition is responsible for QT_c prolongation. In all analyzed cases, R-TGB shows slightly higher binding affinities than S-TGB. This observation is in line with many previous pharmacological studies indicating the greater biological activity of R enantiomers compared to the S ones [10–12]. It is also worth emphasizing that all h-bonds formed between hCa_v1.2 channels and R/S-TGB possess very favorable key interaction energy values ($E_{HB} \approx -7.32$ for hCa_v1.2-R-TGB and -5.54 kcal/mol for hCa_v1.2-S-TGB, Table 2) and geometrically nonlinear systems.

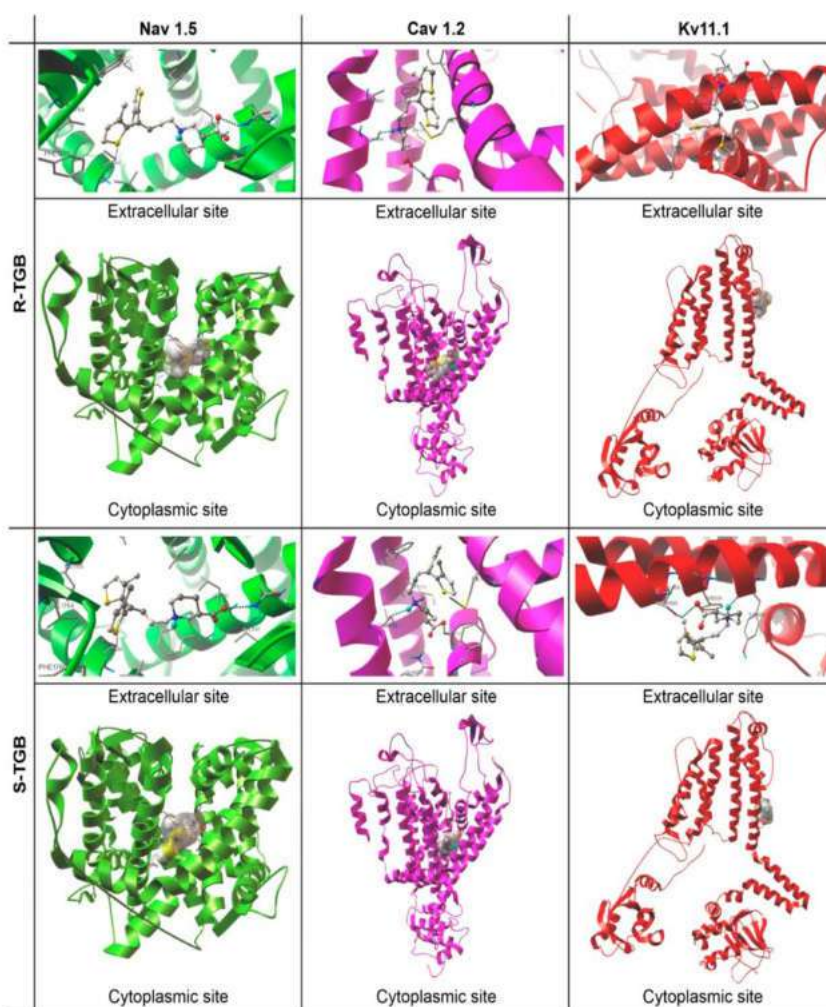


Figure 3. Pocket locations and binding modes of (R/S)-Tiagabine (R/S-TGB) and the investigated channels: hNav_v1.5, hCav1.2 and hKv11.1. Ligands (ball and stick model) and calculated hydrogen bonds (dashed green lines).

To sum up, the docking experiment revealed that R/S-TGB has lower intermolecular forces with all studied ion channels ($E_B \approx -5.30$ kcal/mol, Table 2). The combination

of the above-mentioned docking data with pharmacological as well as literature data regarding the risk for tachycardia due to TGB administration suggests that this adverse effect observed in humans is not likely to result from TGB interaction with molecular anti-targets (i.e., ion channels tested in this study) used for the cardiac risk assessment. The data obtained in this study allowed the supplementation of information on the impact of TGB on other than GAT-1 molecular targets. As is currently known, TGB has no significant affinity to other uptake systems, such as those for dopamine, noradrenaline, acetylcholine, adenosine, serotonin, histamine, opiate, glycine, glutamate or GABA [48,49]. It only has a weak affinity towards benzodiazepine receptors and does not affect K^+ and Ca^{2+} , while it slightly affects Na^+ and cardiovascular channel function [19].

2.3. Validation Experiment

The validation was carried out by the docking of molecules with no affinity to $hNa_v1.5$, $hCa_v1.2$ and $hK_v11.1$ channels, such as progabide (PRG) [50,51] and acetylsalicylic acid (ASA) [52]. This choice of PRG and ASA was made based on their chemical and biological similarity to TGB (ATC code: N03AG06 [53]). PRG (ATC code: N03AG05 [53]) is a first-generation antiepileptic drug without analgesic properties [12,54]. ASA (ATC code: N02BA01 [52]) is a classical and peripherally-acting nonsteroidal anti-inflammatory drug that is inactive at GAT and recommended for the prevention of several cardiovascular diseases due to its antiplatelet activity [52].

The results of the validation experiments, such as the complex binding energies, the specific hydrogen bond components and detailed data of the hydrogen bond features (energies, lengths and angles) are gathered in Table 3. The binding modes between $hNa_v1.5$, $hCa_v1.2$ and $hK_v11.1$; and the control compound are illustrated in Figure S3 in the supplementary file. As it can be observed from the data, all control complexes have a calculated $pK_i < 4$, which is commonly used as the threshold and therefore the test compounds can be considered to be inactive ligands for those proteins. In addition, all control complexes have higher binding energy values and lower hydrogen bond energy than the TGB-hVGICs complex.

Table 3. The summary of validation experiment results.

Complex		E_B	pKi	Amino Acid Residues	H_B		Angle	L_{HB}	E_{HB}	
Protein	Ligand				donor	acc	θ	Å	kcal/mol	
$hNa_v1.5$	PRG	−3.90	2.86	ASP945	%CONH1	#COO	157.949	1.998	−5.425	
				ASN1474	%CONH2	#CO	155.21	2.00	−5.04	
				ASN1474	#NH2	%CO	141.795	1.987	−2.731	
	ASA	−3.29	2.41	LYS1477	#NH1	%CO	159.455	1.905	−2.071	
				LYS1477	#NH2	%COO	157.938	1.737	−0.015	
				THR1056	%OH	#OH	163.88	1.99	−4.82	
$hCa_v1.2$	PRG	−3.29	2.41	SER1132	#OH	%CONH	156.74	1.94	−3.02	
				THR1056	#OH	%COO	159.14	1.84	−2.30	
				ASA	−2.41	1.77	SER1132	#OH	%CO	176.21
	$hK_v11.1$	PRG	−3.4	2.50	TYR652	%CONH2	#PhOH	139.884	1.902	−2.015
					TYR652	%NH	#PhOH	139.121	2.182	−1.695
					SER660	%OH	#OH	170.052	2.129	−0.893
ASA	−3.26	2.39	ASN658	#CONH2	%COO	167.92	1.78	−7.29		

Abbreviations in Table. Components of the investigated complexes: protein- $hNav1.5$, $hCav1.2$ and $hKv11.1$ (hERG); and ligands, ASA—acetylsalicylic acid, PRG—Progabide. Other abbreviations: H_B —hydrogen bond. acc—hydrogen bond acceptor. Hydrogen bond components: from the ligand % and from the protein #. E_B —complex energy binding. θ —hydrogen bond angle. L_{HB} —hydrogen bond length. E_{HB} —hydrogen bond energy. pKi was calculated from the AutoDock4 and estimated inhibition constant K_i , which is reported in the AutoDock4 output [55].

3. Discussion

Taking into consideration the new action profile of drugs already on the market, pharmacological safety is a particularly important issue. The main reason for this is the fact that for drugs with an extended therapeutic range (i.e., repurposed medications), the number of patients for whom a given drug is recommended will increase significantly. TGB discussed in this study belongs to this group of drugs. TGB is an anticonvulsant medication. It is also used in the treatment of anxiety-related disorders, as are a few other anticonvulsants [21]. In the case of this drug, the above mentioned point is particularly important because TGB was originally prescribed to a relatively small group of patients due to its narrow range of indicators (adjunctive treatment of partial seizures in adults and children 12 years of age and older) [56]. However, when we consider its analgesic and anxiolytic effects in our considerations, we include therapeutic indications for a significantly larger group of patients. Reports presented in the scientific literature indicate an approximate 70% increase in the number of patients on TGB therapy [57]. This is all the more important as the safety and efficacy of TGB have not been systematically evaluated for indications other than epilepsy.

Modern technology provides us with many different possibilities, the use of which should create the conditions to learn about safety pharmacology. Undoubtedly, *in silico* research is one of many possibilities for seeking answers in this regard. It seems to us that the research presented above makes some important contributions to this issue. The study tried to answer the question about the cardiovascular safety assessment of TGB. This is all the more important in the light of the recent expert discussions focused on extending the pharmacological profile of TGB. Many modern studies indicate that, in addition to the therapeutic use of TGB in epilepsy, we should strongly consider its utilization for non-epileptic indications. On the other hand, it is known that drugs that show this type of biological activity might have a strong effect on a heart. This, in turn, undoubtedly forces us to increase the effort focused on assessing cardiac safety. Considering the assessment of the effect of the compound on so-called anti-targets adopted from CiPA in the cardiac risk assessment, the TGB interaction was investigated with the following channels: hK_v11.1, hNa_v1.5 and hCa_v1.2. Drugs strongly affecting individual channels (such as TEF, BTX and NFD) were selected as reference compounds for this study. TEF is a prodrug metabolized by intestinal CYP3A4 to fexofenadine, the active form being a selective histamine H₁-receptor antagonist with antihistaminic and non-sedative effects. As it is well known, antihistamines may increase the rate of heart beat [58,59]. TEF causes prolonged repolarization, as is reflected in the broadening of the electrocardiographic QT interval, with the potential for serious ventricular arrhythmia and death [60–62]. Due to this, in the U.S. TEF was superseded by its active metabolite fexofenadine in the 1990s [59]. Numerous studies have proven that the ability of TEF to extend the QT interval depends on its binding to the Kv11.1 (Figure S1) protein encoded by hERG [63,64]. Nevertheless, TEF does not readily cross the blood–brain barrier and due to this its CNS depression is minimal. NFD is a calcium channel blocker, a specific antagonist of Cav1.2 channels [65]. It is used to treat hypertension and chronic stable angina. NFD binds directly to inactive calcium channels and stabilizes their inactive conformation. By inhibiting the influx of calcium in smooth muscle cells, NFD prevents calcium-dependent myocyte contraction and vasoconstriction [31,40]. BTX was chosen as a reference compound in our docking experiment study due to its extremely potent cardiotoxic and neurotoxic characteristics [29,42,46,47,66]. In animals, BTX inactivates sodium channels in nerve cells and muscle cells, thereby interfering with the electrical signals sent throughout the body and causing fibrillation, arrhythmias, cardiac failure and death [29]. It is worth emphasizing that the obtained data from molecular modeling confirmed the high selectivity of the reference compounds for the appropriate ion channels (Table 2). The response obtained from molecular studies also indicates that the mechanisms underlying tachycardia in patients treated with TGB appear to be unrelated to its effect on the hNa_v1.5, hCa_v1.2 and hK_v11.1 heart ion channels. Moreover, it is known that one of the most common mechanisms of drug-induced ventricular tachycardia is the blocking of

hERG channels [67,68]. For this reason, additional evidence supporting the conclusions of the *in silico* study appears to provide epidemiological data (pharmacological reports) in which tachycardia is noted in approximately 1.0% of patients treated with TGB. In light of these facts, if TGB-induced tachycardia contacts the hK_v11.1, hNa_v1.5 and hCa_v1.2 blocking mechanism, one would expect a higher rate of these side effects. In addition to the above-mentioned *in vivo* tests, as a part of safety pharmacology experiments, the TGB effects on PQ, QRS and QT intervals and the effects of TGB on heart rate were assessed. Many years of research have demonstrated that proarrhythmic effect, QT prolongation and hERG blocking cannot be treated as the only determinants of the occurrence of TdP. For instance, verapamil and ranolazines are examples of drugs that are strong inhibitors of the hERG channel and are simultaneously devoid of the risk of inducing arrhythmias and, vice versa, devoid of serious disorders of cardiomyocyte electrophysiology caused by drugs that are weak hERG inhibitors (e.g., sotalol and alfuzosin) [24,69]. Thus, this proves the insufficient specificity of the tests based only on the assessment of the hERG channel blocking potential. The risk of drug-induced TdP is rather balanced by multiple internal cardiac ionic currents that define ventricular repolarization. Therefore, studies that utilize the whole tissue seem to be a good option for the reflection of pharmacodynamics and potential adverse effects of a drug in a living organism. The *in vivo* results obtained from studies in rats showed that TGB did not prolong the QT interval or alter the QRS complex which suggests that it did not affect ventricular depolarization and repolarization. Taking into account that as in many other animal models of human diseases and also in this particular rat model, there might be basic translational problems. Some fundamental differences in the cardiac electrophysiology and myocyte calcium/potassium handling between rodents and humans have been suggested [70], but, nonetheless, the ECG in rats is still a widely applied experimental method in basic cardiovascular research. The technique of ECG recordings is simple; however, the interpretation of electrocardiographic parameters might be challenging. This is because the analysis may be biased by experimental settings, such as the type of anesthesia and the strain or age of animals. Furthermore, differences and similarities between rat and human ECG are frequently discussed in the context of translational cardiovascular research. Despite this, rat electrocardiography is an important investigational tool in experimental cardiology, even if the interpretation of electrocardiographic parameters is problematic [71]. In addition to this, a number of studies have shown that cardiotoxic drugs prolong QT interval in rodents and ECG recordings in rats have been used as a screening tool to assess the cardiotoxicity of various drugs. However, it needs to be stressed that the translation of the results of those studies to human application also possesses limitations. This is because rats' hearts do not express hERG, whereas the cardiotoxicity of drugs is strongly associated with the blockade of hERG-related potassium channels. However, rat hearts express a variant of Ether-à-go-go-Related Gene (rat ERG, also known as Kcnh2) [72,73], which may also play a key role in the assessment of drug-induced cardiotoxicity. Taken together, we are aware that extrapolating the results from our rat model to humans should be performed extremely cautiously and this, of course, should be regarded as the main limitation of our study. Therefore, one can assume that its direct interaction with heart sodium and potassium channels can be neglected. TGB also marks no significant effect on the PQ interval, which suggests that it does not influence the atrio-ventricular conduction time. Consequently, we can postulate that TGB has low pro-arrhythmic potential, at least, after a single administration. Given that tachycardia may result due to a number of different mechanisms and not all of them directly affect ion channels, it is also necessary to evaluate the effects of TGB on several neurotransmitters/neuromodulators and the activity of the autonomic nervous system. However, these effects were not investigated in the present research. Further studies are necessary to assess the effect of TGB on the cardiovascular system, especially after chronic administration. On the basis of our research, we can state that TGB did not bind to voltage-gated ion channels and did not affect them directly. Furthermore, the observed accidents of tachycardia are probably not due to the direct effect of TGB on voltage-gated ion channels.

4. Methods

4.1. Pharmacological Studies General Information

The experiments were carried out using male Wistar rats (Krf:(WI) (WU), 200–250 g). The animals were housed in constant temperature facilities exposed to 12:12 h light/dark cycles and were maintained on a standard pellet diet with tap water given ad libitum. All procedures were conducted according to guidelines of ICLAS (International Council on Laboratory Animal Science) and approved by the Second Local Ethics Committee in Krakow, Poland (resolution No. 106/2016, 14 June 2016).

4.1.1. Voltage-Dependent Calcium Channels—Functional Assays

In order to investigate the calcium entry blocking properties of TGB, it was tested on isolated rat aorta precontracted with KCl. Rats were anaesthetized with thiopental sodium (75 mg/kg, i.p., Rotexmedica, Germany) and the thoracic aorta was dissected, cleaned, denuded of endothelium, cut and mounted as described earlier [35]. Briefly, aorta rings were incubated in 30 mL chambers filled with a Krebs–Henseleit solution (NaCl 118 mM, KCl 4.7 mM, CaCl₂ 2.25 mM, MgSO₄ 1.64 mM, KH₂PO₄ 1.18 mM, NaHCO₃ 24.88 mM, glucose 10 mM, C₃H₃O₃Na 2.2 mM and EDTA 0.05 mM) at 37 °C and pH 7.4 with constant oxygenation (O₂/CO₂, 19:1) and connected to an isometric FDT10-A force displacement transducer (BIOPAC Systems, Inc., COMMAT Ltd., Ankara, Turkey). The aortic rings were stretched and maintained at an optimal tension of 2 g and permitted to equilibrate for 2 h. The aortic rings were contracted to submaximal tension with KCl (60 mmol/L). Once the plateau was attained, concentration-relaxation curves were obtained by the addition of cumulative doses of tiagabine to the precontracted preparations.

Concentration-response curves were analyzed using GraphPad Prism 5.0 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Relaxations are expressed as a percentage of inhibition of the maximal tension obtained with the contractile agent (E_{max} = 100%). Data are the means ± SEM of at least 4 separate experiments.

4.1.2. The Effect on Normal Electrocardiogram

In vivo electrocardiographic investigations were carried out using an ASPEL ASCARD B5 apparatus (Aspel, Poland), standard lead II and paper speed of 50 mm/s. The ECG was recorded just prior to and also at 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50 and 60 min following the i.p. administration of TGB at a dose of 100 mg/kg. The QT_c was calculated according to the formula of Bazett: $QT_c = QT / \sqrt{RR}$ [74]

4.2. In Silico Studies

The calculation procedures applied in the study are typical for the processing of docking studies.

4.2.1. Ligand Preparation

For the 3D molecular structure calculations, the Gaussian 09 (version D.01. for Unix/Linux) package was used [75]. The initial acceptable 3D structures of 6 studied compounds (Figure 2) were downloaded (as mol2 file) from ZINC [76]. Later, the GaussView [75,77] was applied for preparation of Gaussian input files. All the molecules were geometry-optimized in water as described by the PCM (polarizable continuum model). DFT/B3LYP level of theory 6311 + G(d, p) basis set was used. After geometrical optimization, (the root-mean-square gradient value smaller than 10⁻⁶ a.u.) compounds were saved as mol2 files using the GaussView. Subsequently, torsionals and the number of active torsions for ligands were defined and the Gasteiger charges were assigned to each compound via AutoDockTools (ADT) [78]. Finally, ligands prepared for docking were saved as pdbqt files.

4.2.2. Voltage-Gated Ion Channels Preparation

- hNa_v1.5 preparation:

The lack of crystal structure of hNav1.5 pore domain causes the need for preparing homology 3D models for this protein. For our research, the sequence for the hNav1.5 protein was gained from the Swiss Model Repository (SMR). SMR is a database which currently holds over 400,000 high quality 3D protein structure models generated by the automated SWISS-MODEL homology modeling pipeline [79]. The pdb file was downloaded from SWISS-MODEL SERVER (accession number Q14524) [80]. For this alignment, X-ray structure of human Nav1.2- β 2-KIIIA ternary complex (PDB entry 6J8E) was employed. Sequence identity between template and the monomer of sodium channel protein type 5 subunit α is 66.70%. Subsequently, the pdb file was opened in ADT [78]. ADT read coordinates, added charges, merged non-polar hydrogens and assigned appropriate atom types. Before formatting a molecule for AutoDock, we removed 9Z9 ((3 β ,14 β ,17 β ,25R)-3-[4-methoxy-3-(methoxymethyl)-butoxy]-spirost-5-en), which is irrelevant molecule in this experiment. Finally, the prepared protein was saved as a pdbqt file. In the computational part of the study, we pondered the interaction between the investigated ligands and the intracellular pore gate formed from the proper residues of chain A.

- hCa_v1.2 preparation

The dearth of a 3D structure of hCa_v1.2 proper region also causes need for preparing homology models of this protein. The sequence for the hCa_v1.2 was gained from the SMR as well (accession number Q13936). For this alignment, X-ray structures of nifedipine complex with rabbit Ca_v1.1 (PDB entry 6JP5) were employed. The sequence identity between template and isoform 4 of CAC1C_HUMAN Voltage-dependent L-type calcium channel subunit alpha-1C is 70.31% and, according to the best of our knowledge, this is one of the highest identities currently available. Subsequently, similar to the hNav1.5 protein, the pdb file was opened in ADT [58]. The next steps were also analogous. Before the docking experiment, we removed C8U (methyl (4-(S))-2,6-dimethyl-5-nitro-4-[2-(trifluoromethyl)phenyl]-1,4-dihydropyridine-3-carboxylate)), which is a pointless ligand in this case. The pore forming and dihydropyridine binding residues (from ARG1109 to LYS1198) were considered as the ligand binding site [81].

- hK_v11.1 preparation:

The sequence for the potassium voltage-gated channel subfamily H member 2 protein was downloaded from the Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB) Protein Data Bank (PDB entry 5va2) as the crystal structure [82]. As in previous proteins, the pdb file was opened in ADT, read coordinates, added charges, merged non-polar hydrogens and assigned the appropriate atom types. As usual, we also removed crystallographic waters from 5va2. The binding pocket of the studied molecule were composed of the pore forming segment H5 and transmembrane helical fragment-Segment S6 [83].

4.2.3. Molecular Docking

Molecular docking was performed using the AutoDockTools 4.2 suite of the program [55]. A grid box with a dimension of 60 × 60 × 60 Å³ and grid spacing of 0.375 Å, which is large enough for a free rotation of a ligands, was built in the middle of the binding pockets of the studied Voltage Gated Ion Channels (VGICs) channels, which are composed using the appropriate residues (Table 4).

Torsionals in the residuals of the binding pocket were not rotatable. The rigid docking was carried out using the Lamarckian genetic algorithm 4. The optimized docking parameters were set as default values, with the exception of the number of genetic algorithms run which was 100. Torsionals in the ligands were rotatable-6 active torsions in each ligand (except for terfenadine, where it was 11). A cluster analysis was performed using RMS tolerance of 2 Å. In each case, the best docking result was considered as the complex with the lowest binding energy. Interactions between ligands and the related channel models were analyzed using the AutoDockTools program (ADT. Version 1.5.4) [78].

Table 4. The composition of the binding pocket of the analyzed channel models: hNav1.5, hCav1.2 and hKv11.1.

Protein	Intramembrane Pore-Forming Region Sequences
hNav1.5	358–382 (Phe, Ala, Trp, Ala, Phe, Leu, Ala, Leu, Phe, Arg, Leu, Met, Thr, Gly, Leu, Ans, Asp, Cys, Trp, Glu, Arg, Leu, Tyr, Gly, Leu, Ans, Gly, Leu, Ans, Thr, Leu)
	884–904 (Phe, Phe, His, Ala, Phe, Leu, Ile, Ile, Phe, Arg, Ile, Leu, Cys, Gly, Glu, Trp, Ile, Glu, Thr, Met, Trp)
	1406–1427 (Gly, Ala, Gly, Tyr, Leu, Ala, Leu, Leu, Gly, Leu, Ans, Val, Ala, Thr, Phe, Lys, Gly, Trp, Met, Asp, Ile, Met, Tyr, Ala) 1697–1719 (Phe, Ala, Ans, Ser, Met, Leu, Cys, Leu, Phe, Gly, Leu, Ans, Ile, Thr, Thr, Ser, Ala, Gly, Trp, Asp, Gly, Leu, Leu, Ser, Pro) [84,85]
hCav1.2	351–372 (Phe, Ala, Met, Leu, Thr, Val, Phe, Gly, Leu, Ans, Cys, Ile, Thr, Met, Glu, Glu, Trp, Thr, Asp, Val, Leu, Tyr, Trp, Val)
	694–715 (Gly, Leu, Ans, Ser, Leu, Leu, Thr, Val, Phe, Gly, Leu, Ans, Ile, Leu, Thr, Gly, Glu, Asp, Trp, Ans, Ser, Val, Met, Tyr, Asp, Gly)
	1122–1142 (Leu, Ala, Ala, Met, Met, Ala, Leu, Phe, Thr, Val, Ser, Thr, Phe, Glu, Gly, Trp, Pro, Glu, Leu, Leu, Tyr) 1453–1471 (Ala, Val, Leu, Leu, Leu, Phe, Arg, Cys, Ala, Thr, Gly, Glu, Ala, Trp, Gly, Leu, Ans, Asp, Ile, Met, Leu) [86,87]
hKv11.1	612–632 (Val, Thr, Ala, Leu, Tyr, Phe, Tphe, Ser, Ser, Leu, Thr, Ser, Val, Gly, Phe, Gly, Ans, Vsp) [88,89]

Supplementary Materials: The following are available online, Figure S1: Model transport proteins selected for the study: hNav1.5, hCav1.2, Kv11.1. Figure S2: Figure S3: Binding modes between hNav1.5, hCav1.2 and Kv11.1 and the four tested compounds () and two validated compounds

Author Contributions: A.N. and M.K. (Magdalena Kowalska) conceived and directed the project. K.S., Ł.F., M.K. (Magdalena Kowalska) and A.N. designed the study. K.S., Ł.F., M.K. (Magdalena Kowalska), M.K. collected the data and carried out the experiments. K.S., Ł.F., M.K. (Magdalena Kowalska), M.K. and A.N. analyzed the data. A.N., M.K. (Magdalena Kowalska), Ł.F., M.K., G.G., J.N. and K.S. interpreted the results and wrote the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was supported by a research grant from the National Science Centre UMO-2015/17/B/NZ7/02937.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Institutional Review Board the Second Local Ethics Committee in Krakow, Poland (resolution No. 106/2016, 14 June 2016).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: None of the authors declare any conflicts of interest with respect to this study.

Sample Availability: Samples of the compounds are not available from the authors.

Abbreviations

AP	Cardiac action potential
(R/S)-TGB	(R/S)-Tiagabine
(R/S)-TEF	((R/S)-Terfenadine
NFD	Nifedipine
BTX	Batrachotoxin
#	Hydrogen bond components: from the protein
%	Hydrogen bond components: from the ligand
Acc	Hydrogen bond acceptor
EB	Complex energy binding
EHB	Hydrogen bond energy
θ	Hydrogen bond angle
VGICs	Voltage-Gated Ion Channels
VGKCs	Voltage-Gated Potassium. Channels
VGNaCs	Voltage-Gated Sodium Channels
VGCaCs	Voltage-Gated Calcium Channels
KV11.1 (hERG)	Cardiac Voltage-Gated Potassium Channels
NaV1.5	Cardiac Voltage-Gated Sodium Channels
CaV1.2	Cardiac Voltage-Gated Calcium Channels

References

- Shmueli, S.; Van der Lende, M.; Lamberts, R.J.; Sander, J.W.; Thijs, R.D. The heart of epilepsy: Current views and future concepts. *Seizure* **2017**, *44*, 176–183. [CrossRef]
- Shah, R.R. Cardiac Effects of Antiepileptic Drugs. In *Atlas of Epilepsies*; Springer: London, UK, 2010; pp. 1479–1486.
- Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. *Molecular Biology of the Cell*, 4th ed.; Garland Science: New York, NY, USA, 2015.
- Fermini, B.; Hancock, J.C.; Abi-Gerges, N.; Bridgland-Taylor, M.; Chaudhary, K.W.; Colatsky, T.; Correll, K.; Crumb, W.; Damiano, B.; Erdemli, G. A new perspective in the field of cardiac safety testing through the comprehensive in vitro proarrhythmia assay paradigm. *J. Biomol. Screen.* **2016**, *21*, 1–11. [CrossRef]
- Cheung, S.; Parkinson, J.; Wählby-Hamrén, U.; Dota, C.; Kragh, Å.; Bergenholm, L.; Vik, T.; Collins, T.; Arfvidsson, C.; Pollard, C. A tutorial on model informed approaches to cardiovascular safety with focus on cardiac repolarisation. *J. Pharmacokinet. Pharmacodyn.* **2018**, *45*, 365–381. [CrossRef]
- Obejero-Paz, C.A.; Bruening-Wright, A.; Kramer, J.; Hawryluk, P.; Tatalovic, M.; Dittrich, H.C.; Brown, A.M. Quantitative profiling of the effects of vanoxerine on human cardiac ion channels and its application to cardiac risk. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 1–15. [CrossRef]
- Crumb, W.J., Jr.; Vicente, J.; Johannesen, L.; Strauss, D.G. An evaluation of 30 clinical drugs against the comprehensive in vitro proarrhythmia assay (CiPA) proposed ion channel panel. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **2016**, *81*, 251–262. [CrossRef]
- Li, Z.; Dutta, S.; Sheng, J.; Tran, P.N.; Wu, W.; Chang, K.; Mdluli, T.; Strauss, D.G.; Colatsky, T. Improving the in silico assessment of proarrhythmia risk by combining hERG (human ether-à-go-go-related gene) channel–drug binding kinetics and multichannel pharmacology. *Circ. Arrhythmia Electrophysiol.* **2017**, *10*, e004628. [CrossRef] [PubMed]
- Kramer, J.; Obejero-Paz, C.A.; Myatt, G.; Kuryshev, Y.A.; Bruening-Wright, A.; Verducci, J.S.; Brown, A.M. MICE models: Superior to the HERG model in predicting Torsade de Pointes. *Sci. Rep.* **2013**, *3*, 2100. [CrossRef]
- Nowaczyk, A.; Fijałkowski, L.; Zareba, P.; Sałat, K. Selective neuronal and astrocytic inhibition of human GABA transporter isoform 1 (hGAT1) inhibitors in the mechanism of epilepsy and pain-molecular docking and pharmacodynamics studies, part I. *JMGM* **2018**, *85*, 171–181.
- Nowaczyk, A.; Fijałkowski, L.; Kowalska, M.; Podkova, A.; Sałat, K. Studies on the activity of selected highly lipophilic compounds toward hGAT1 inhibition: Part II. *ACS Chem. Neurosci.* **2019**, *10*, 337–347. [CrossRef] [PubMed]
- Fijałkowski, L.; Sałat, K.; Podkova, A.; Zareba, P.; Nowaczyk, A. Potential role of selected antiepileptics used in neuropathic pain as human GABA transporter isoform 1 (GAT1) inhibitors—Molecular docking and pharmacodynamic studies. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2017**, *96*, 362–372. [CrossRef]
- Kirsch, G.E.; Kramer, J.; Bruening-Wright, A.; Obejero-Paz, C.; Brown, A.M. *The Comprehensive In Vitro Proarrhythmia Assay (CiPA) Guide: A New Approach to Cardiac Risk Assessment*; Charles River Laboratories International: Wilmington, MA, USA, 2016.
- Raj, S.R.; Stein, C.M.; Saavedra, P.J.; Roden, D.M. Cardiovascular effects of noncardiovascular drugs. *Circulation* **2009**, *120*, 1123–1132. [CrossRef]
- Schwartz, T.L.; Nihalani, N. Tiagabine in anxiety disorders. *Expert Opin. Pharmacother.* **2006**, *7*, 1977–1987. [CrossRef]
- Sałat, K.; Podkova, A.; Kowalczyk, P.; Kulig, K.; Dziubina, A.; Filippek, B.; Librowski, T. Anticonvulsant active inhibitor of GABA transporter subtype 1, tiagabine, with activity in mouse models of anxiety, pain and depression. *Pharmacol. Rep.* **2015**, *67*, 465–472. [CrossRef] [PubMed]
- Brodie, M.J. Tiagabine pharmacology in profile. *Epilepsia* **1995**, *36*, S7–S9. [CrossRef] [PubMed]
- Spiller, H.; Wiles, D.; Russell, J.; Casavant, M. Review of toxicity and trends in the use of tiagabine as reported to US poison centers from 2000 to 2012. *Hum. Exp. Toxicol.* **2016**, *35*, 109–113. [CrossRef] [PubMed]
- Schachter, S.C. Tiagabine. In *Antiepileptic Drugs Pharmacology and Therapeutics*; Springer: New York, NY, USA, 1999; pp. 447–463.
- Braestrup, C.; Nielsen, E.B.; Sonnewald, U.; Knutsen, L.J.; Andersen, K.E.; Jansen, J.A.; Frederiksen, K.; Andersen, P.H.; Mortensen, A.; Suzdak, P.D. (R)-N-[4, 4-bis (3-methyl-2-thienyl) but-3-en-1-yl] nipecotic acid binds with high affinity to the brain γ -aminobutyric acid uptake carrier. *J. Neurochem.* **1990**, *54*, 639–647. [CrossRef] [PubMed]
- Khouzam, H.R. A Review of Anticonvulsants use in Psychiatric Conditions. *EC Neurol.* **2019**, *11*, 579–591.
- Spiller, H.A.; Winter, M.L.; Ryan, M.; Krenzelok, E.P.; Anderson, D.L.; Thompson, M.; Kumar, S. Retrospective evaluation of tiagabine overdose. *Clin. Toxicol.* **2005**, *43*, 855–859. [CrossRef]
- Jankovic, S.M.; Dostic, M. Choice of antiepileptic drugs for the elderly: Possible drug interactions and adverse effects. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2012**, *8*, 81–91. [CrossRef] [PubMed]
- Kowalska, M.; Nowaczyk, J.; Nowaczyk, A. KV11.1, NaV1.5 and CaV1.2 transporter proteins as antitarget for drug cardiotoxicity. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 8099. [CrossRef]
- Passman, R.; Kadish, A. Polymorphic ventricular tachycardia, long QT syndrome and torsades de pointes. *Med. Clin. N. Am.* **2001**, *85*, 321–341. [CrossRef]
- Rosso, R.; Hochstadt, A.; Viskin, D.; Chorin, E.; Schwartz, A.L.; Tovia-Brodie, O.; Laish-Farkash, A.; Havakuk, O.; Gepstein, L.; Banai, S. Polymorphic ventricular tachycardia, ischaemic ventricular fibrillation, and torsade de pointes: Importance of the QT and the coupling interval in the differential diagnosis. *Eur. Heart J.* **2021**. [CrossRef] [PubMed]
- Rahm, A.-K.; Lugenbiel, P.; Schweizer, P.A.; Katus, H.A.; Thomas, D. Role of ion channels in heart failure and channelopathies. *Biophys. Rev.* **2018**, *10*, 1097–1106. [CrossRef]
- Triggle, D.; Janis, R. Calcium channel ligands. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1987**, *27*, 347–369. [CrossRef]

29. Albuquerque, E.; Daly, J.; Witkop, B. Batrachotoxin: Chemistry and pharmacology. *Science* **1971**, *172*, 995–1002. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Gilchrist, J.; Olivera, B.M.; Bosmans, F. Animal toxins influence voltage-gated sodium channel function. *Volt. Gated Sodium Channels* **2014**, *221*, 203–229.
31. Sorkin, E.; Clissold, S.; Brogden, R. Nifedipine. *Drugs* **1985**, *30*, 182–274. [[CrossRef](#)]
32. Pensel, M.C.; Nass, R.D.; Taubøll, E.; Aurlien, D.; Surges, R. Prevention of sudden unexpected death in epilepsy: Current status and future perspectives. *Expert Rev. Neurother.* **2020**, *20*, 497–508. [[CrossRef](#)]
33. Goodnick, P.J.; Parra, F.; Jerry, J. Psychotropic drugs and the ECG: Focus on the QTc interval. *Expert Opin. Pharmacother.* **2002**, *3*, 479–498. [[CrossRef](#)]
34. Godfraind, T.; Miller, R.; Wibo, M. Calcium antagonism and calcium entry blockade. *Pharmacol. Rev.* **1986**, *38*, 321–416.
35. Kubacka, M.; Szkaradek, N.; Mogilski, S.; Pańczyk, K.; Siwek, A.; Gryboś, A.; Filipek, B.; Żmudzki, P.; Marona, H.; Waszkielewicz, A.M. Design, synthesis and cardiovascular evaluation of some aminoisopropanoloxo derivatives of xanthone. *Bioorganic Med. Chem.* **2018**, *26*, 3773–3784. [[CrossRef](#)]
36. Kubacka, M.; Mogilski, S.; Filipek, B.; Marona, H. The hypotensive activity and alpha1-adrenoceptor antagonistic properties of some aroxyalkyl derivatives of 2-methoxyphenylpiperazine. *Eur. J. Pharmacol.* **2013**, *698*, 335–344. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Strauss, D.G.; Gintant, G.; Li, Z.; Wu, W.; Blinova, K.; Vicente, J.; Turner, J.R.; Sager, P.T. Comprehensive in vitro proarrhythmia assay (CiPA) update from a cardiac safety research consortium/health and environmental sciences institute/FDA Meeting. *Ther. Innov. Regul. Sci.* **2019**, *53*, 519–525. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Orvos, P.; Kohajda, Z.; Szlovák, J.; Gazdag, P.; Árpádfy-Lovas, T.; Tóth, D.; Geramipour, A.; Tálósi, L.; Jost, N.; Varró, A. Evaluation of Possible Proarrhythmic Potency: Comparison of the Effect of Dofetilide, Cisapride, Sotalol, Terfenadine, and Verapamil on hERG and Native I Kr Currents and on Cardiac Action Potential. *Toxicol. Sci.* **2019**, *168*, 365–380. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Balasubramanian, B.; Imredy, J.P.; Kim, D.; Penniman, J.; Lagrutta, A.; Salata, J.J. Optimization of Cav1.2 screening with an automated planar patch clamp platform. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **2009**, *59*, 62–72. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Khan, K.M.; Schaefer, T.J. Nifedipine. In *StatPearls [Internet]*; StatPearls Publishing: Treasure Island, FL, USA, 2019. Available online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537052/> (accessed on 22 April 2019).
41. Kosower, E.M. A hypothesis for the mechanism of sodium channel opening by batrachotoxin and related toxins. *FEBS Lett.* **1983**, *163*, 161–164. [[CrossRef](#)]
42. Du, Y.; Garden, D.P.; Wang, L.; Zhorov, B.S.; Dong, K. Identification of New Batrachotoxin-sensing Residues in Segment IIIIS6 of the Sodium Channel. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 13151–13160. [[CrossRef](#)]
43. Tokuyama, T.; Daly, J.; Witkop, B.; Karle, I.L.; Karle, J. The structure of batrachotoxinin A, a novel steroidal alkaloid from the Columbian arrow poison frog, *Phyllobates aurotaenia*. *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 1917–1918. [[CrossRef](#)]
44. Khodorov, B.I.; Yelin, E.A.; Zaborovskaya, L.D.; Maksudov, M.Z.; Tikhomirova, O.B.; Leonov, V.N. Comparative analysis of the effects of synthetic derivatives of batrachotoxin on sodium currents in frog node of Ranvier. *Cell. Mol. Neurobiol.* **1992**, *12*, 59–81. [[CrossRef](#)]
45. Tikhonov, D.B.; Zhorov, B.S. Sodium channel activators: Model of binding inside the pore and a possible mechanism of action. *FEBS Lett.* **2005**, *579*, 4207–4212. [[CrossRef](#)]
46. Wang, S.-Y.; Tikhonov, D.B.; Mitchell, J.; Zhorov, B.; Wang, G.K. Irreversible block of cardiac mutant Na⁺ channels by batrachotoxin. *Channels* **2007**, *1*, 179–188. [[CrossRef](#)]
47. Toma, T.; Logan, M.M.; Menard, F.; Devlin, A.S.; Du Bois, J. Inhibition of sodium ion channel function with truncated forms of batrachotoxin. *ACS Chem. Neurosci.* **2016**, *7*, 1463–1468. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Vossler, D.G.; Morris, G.L.; Harden, C.L.; Montouris, G.; Faight, E.; Kanner, A.M.; Fix, A.; French, J.A. The Postmarketing Antiepileptic Drug Survey (PADS) group study investigators. Tiagabine in clinical practice: Effects on seizure control and behavior. *Epilepsy Behav.* **2013**, *28*, 211–216. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Masuda, N.; Peng, Q.; Li, Q.; Jiang, M.; Liang, Y.; Wang, X.; Zhao, M.; Wang, W.; Ross, C.A.; Duan, W. Tiagabine is neuroprotective in the N171-82Q and R6/2 mouse models of Huntington’s disease. *Neurobiol. Dis.* **2008**, *30*, 293–302. [[CrossRef](#)]
50. Davydov, O. Antiepileptic Drugs Beyond Epilepsy (use of anticonvulsants in the treatment of pain syndromes). *Neurosci. Behav. Physiol.* **2014**, *44*, 772–778. [[CrossRef](#)]
51. Pack, A.M. Epilepsy Overview and Revised Classification of Seizures and Epilepsies. *Contin. Lifelong Learn. Neurol.* **2016**, *25*, 306–321. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Desborough, M.J.; Keeling, D.M. The aspirin story—from willow to wonder drug. *Br. J. Haematol.* **2017**, *177*, 674–683. [[CrossRef](#)]
53. ATC Anatomical Therapeutic Chemical Classification System. Available online: <http://www.atccode.com/> (accessed on 22 April 2019).
54. Asif, M. A review on antiepileptic drug and their uses, mechanism of actions, adverse effects and drug interaction. *Curr. Sci. Perspect.* **2016**, *2*, 19–38.
55. Morris, G.M.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M.F.; Belew, R.K.; Goodsell, D.S.; Olson, A.J. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J. Comput. Chem* **2009**, *30*, 2785–2791. [[CrossRef](#)]
56. Meldrum, B.S.; Chapman, A.G. Basic Mechanisms of Gabitril (Tiagabine) and Future Potential Developments. *Epilepsia* **1999**, *40* (Suppl. 9), S2–S6. [[CrossRef](#)]

57. Flowers, C.M.; Racoosin, J.A.; Kortepeter, C. Seizure activity and off-label use of tiagabine. *N. Engl. J. Med.* **2006**, *354*, 773–774. [[CrossRef](#)]
58. Yarborough, M.; Johnson, J.G. Histamine Modulators. In *Essentials of Pharmacology for Anesthesia, Pain Medicine, and Critical Care*; Springer: New York, NY, USA, 2015; pp. 365–379.
59. Li, M.; Ramos, L.G. Drug-induced QT prolongation and torsades de pointes. *Pharm. Ther.* **2017**, *42*, 473–477.
60. Woosley, R.L.; Chen, Y.; Freiman, J.P.; Gillis, R.A. Mechanism of the cardiotoxic actions of terfenadine. *JAMA* **1993**, *269*, 1532–1536. [[CrossRef](#)]
61. Sorokin, E.; Heel, R. Terfenadine A review of its pharmacodynamic properties and therapeutic efficiency. *Drugs* **1985**, *29*, 34–56. [[CrossRef](#)]
62. Ajayi, F.O.; Sun, H.; Perry, J. Adverse drug reactions: A review of relevant factors. *J. Clin. Pharmacol.* **2000**, *40*, 1093–1101.
63. Koch, E.; Plassmann, S. Critical Aspects of Integrated Nonclinical Drug Development: Concepts, Strategies, and Potential Pitfalls. In *A Comprehensive Guide to Toxicology in Nonclinical Drug Development*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2017; pp. 7–38.
64. Roy, M.-L.; Dumaine, R.; Brown, A.M. HERG, a primary human ventricular target of the nonsedating antihistamine terfenadine. *Circulation* **1996**, *94*, 817–823. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Pratt, P.F.; Bonnet, S.; Ludwig, L.M.; Bonnet, P.; Rusch, N.J. Upregulation of L-type Ca²⁺ channels in mesenteric and skeletal arteries of SHR. *Hypertension* **2002**, *40*, 214–219. [[CrossRef](#)]
66. Worley, J.; French, R.J.; Krueger, B.K. Trimethylxonium modification of single batrachotoxin-activated sodium channels in planar bilayers. Changes in unit conductance and in block by saxitoxin and calcium. *J. Gen. Physiol.* **1986**, *87*, 327–349. [[CrossRef](#)]
67. Yap, Y.G.; Camm, A.J. Drug induced QT prolongation and torsades de pointes. *Heart* **2003**, *89*, 1363–1372. [[CrossRef](#)]
68. Huang, H.; Pugsley, M.K.; Fermini, B.; Curtis, M.J.; Koerner, J.; Accardi, M.; Authier, S. Cardiac voltage-gated ion channels in safety pharmacology: Review of the landscape leading to the CiPA initiative. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **2017**, *87*, 11–23. [[CrossRef](#)]
69. Mirams, G.R.; Cui, Y.; Sher, A.; Fink, M.; Cooper, J.; Heath, B.M.; McMahon, N.C.; Gavaghan, D.J.; Noble, D. Simulation of multiple ion channel block provides improved early prediction of compounds' clinical torsadogenic risk. *Cardiovasc. Res.* **2011**, *91*, 53–61. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Zhang, X.; Ai, X.; Nakayama, H.; Chen, B.; Harris, D.M.; Tang, M.; Xie, Y.; Szeto, C.; Li, Y.; Li, Y. Persistent increases in Ca²⁺ influx through Cav1.2 shortens action potential and causes Ca²⁺ overload-induced afterdepolarizations and arrhythmias. *Basic Res. Cardiol.* **2016**, *111*, 1–16. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
71. Konopelski, P.; Ufnal, M. Electrocardiography in rats: A comparison to human. *Physiol. Res.* **2016**, *65*, 717–725. [[CrossRef](#)]
72. Chun, K.; Koenen, M.; Katus, H.A.; Zehelein, J. Expression of the IKr components KCNH2 (rERG) and KCNE2 (rMiRP1) during late rat heart development. *Exp. Mol. Med.* **2004**, *36*, 367–371. [[CrossRef](#)]
73. Matus, M.; Kucerova, D.; Kruzliak, P.; Adameova, A.; Doka, G.; Turcekova, K.; Kmecova, J.; Kyselovic, J.; Krenek, P.; Kirchhefer, U. Upregulation of SERCA2a following short-term ACE inhibition (by enalaprilat) alters contractile performance and arrhythmogenicity of healthy myocardium in rat. *Mol. Cell. Biochem.* **2015**, *403*, 199–208. [[CrossRef](#)]
74. De Clerck, F.; Van de Water, A.; D'Aubioul, J.; Lu, H.R.; Van Rossem, K.; Hermans, A.; Van Ammel, K. In vivo measurement of QT prolongation, dispersion and arrhythmogenesis: Application to the preclinical cardiovascular safety pharmacology of a new chemical entity. *Fundam. Clin. Pharmacol.* **2002**, *16*, 125–140. [[CrossRef](#)]
75. Frisch, M.J.; Trucks, G.W.; Schlegel, H.B.; Scuseria, G.E.; Robb, M.A.; Cheeseman, J.R.; Zakrzewski, V.G.; Montgomery, J.A.; Stratmann, R.E.; Burant, S.; et al. *Gaussian 09*; Revision D.01; Gaussian, Inc.: Wallingford, CT, USA, 2009.
76. Irwin, J.J.; Sterling, T.; Mysinger, M.M.; Bolstad, E.S.; Coleman, R.G. ZINC: A free tool to discover chemistry for biology. *J. Chem. Inf. Model.* **2012**, *52*, 1757–1768. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Dennington, R.; Keith, T.; Millam, J. *GaussView, Version 5*; Semichem Inc.: Shawnee Mission, KS, USA, 2009.
78. Morris, G.M.; Goodsell, D.S.; Halliday, R.S.; Huey, R.; Hart, W.E.; Belew, R.K.; Olson, A.J. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *J. Comput. Chem.* **1998**, *19*, 1639–1662. [[CrossRef](#)]
79. Waterhouse, A.; Bertoni, M.; Bienert, S.; Studer, G.; Tauriello, G.; Gumienny, R.; Heer, F.T.; de Beer, T.A.P.; Rempfer, C.; Bordoli, L. SWISS-MODEL: Homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, W296–W303. [[CrossRef](#)]
80. Bienert, S.; Waterhouse, A.; de Beer, T.A.; Tauriello, G.; Studer, G.; Bordoli, L.; Schwede, T. The SWISS-MODEL Repository—New features and functionality. *Nucleic Acids Res.* **2017**, *45*, D313–D319. [[CrossRef](#)]
81. Schultz, D.; Mikala, G.; Yatani, A.; Engle, D.B.; Iles, D.E.; Segers, B.; Sinke, R.J.; Weghuis, D.O.; Klockner, U.; Wakamori, M.; et al. Cloning, chromosomal localization, and functional expression of the alpha 1 subunit of the L-type voltage-dependent calcium channel from normal human heart. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 6228–6232. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Cabral, J.H.M.; Lee, A.; Cohen, S.L.; Chait, B.T.; Li, M.; Mackinnon, R. Crystal Structure and Functional Analysis of the HERG Potassium Channel N Terminus: A Eukaryotic PAS Domain. *Cell* **1998**, *95*, 649–655. [[CrossRef](#)]
83. Morais-Cabral, J.H.; Robertson, G.A. The enigmatic cytoplasmic regions of KCNH channels. *J. Mol. Biol.* **2015**, *427*, 67–76. [[CrossRef](#)]
84. Rayevsky, A.; Samofalova, D.O.; Maximyuk, O.; Platonov, M.; Hurmach, V.; Ryabukhin, S.; Volochnyuk, D. Modelling of an autonomous Nav1.5 channel system as a part of in silico pharmacology study. *J. Mol. Model.* **2021**, *27*, 1–9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Ahmed, M.; Hasani, H.J.; Ganesan, A.; Houghton, M.; Barakat, K. Modeling the human Nav1.5 sodium channel: Structural and mechanistic insights of ion permeation and drug blockade. *Drug Des. Dev. Ther.* **2017**, *11*, 2301. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

86. Hering, S.; Zangerl-Plessl, E.-M.; Beyl, S.; Hohaus, A.; Andranovits, S.; Timin, E. Calcium channel gating. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* **2018**, *470*, 1291–1309. [[CrossRef](#)]
87. Findeisen, F.; Minor, J.; Daniel, L. Progress in the structural understanding of voltage-gated calcium channel (CaV) function and modulation. *Channels* **2010**, *4*, 459–474. [[CrossRef](#)]
88. Al-Owais, M.; Brace, K.; Wray, D. Role of intracellular domains in the function of the hERG potassium channel. *Eur. Biophys. J.* **2009**, *38*, 569–576. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
89. Stansfeld, P.J.; Gedeck, P.; Gosling, M.; Cox, B.; Mitcheson, J.S.; Sutcliffe, M.J. Drug block of the hERG potassium channel: Insight from modeling. *Proteins Struct. Funct. Bioinform.* **2007**, *68*, 568–580. [[CrossRef](#)]

Supplementary Material

Type of the Paper (Article)

Antiepileptic Drug Tiagabine Does Not Directly Target Key Cardiac Ion Channels Kv11.1, Nav1.5 and Cav1.2

Magdalena Kowalska¹, Łukasz Fijałkowski¹, Monika Kubacka², Kinga Sałat², Grzegorz Grzešek³, Jacek Nowaczyk⁴, Alicja Nowaczyk^{1*}

- ¹ Department of Organic Chemistry, Faculty of Pharmacy, Ludwik Rydygier Collegium Medicum in Bydgoszcz, Nicolaus Copernicus University in Toruń, Poland; M.K.: magda.kowalska@doktorant.umk.pl ; Ł.F.: l.fijalkowski@cm.umk.pl ; A.N.: alicja@cm.umk.pl
- ² Department of Pharmacodynamics, Chair of Pharmacodynamics, Jagiellonian University Medical College, 9 Medyczna St., 30 - 688 Krakow, Poland; K.S. kinga.salat@uj.edu.pl, M.K. monika.kubacka@uj.edu.pl
- ³ Department of Cardiology and Clinical Pharmacology, Faculty of Health Sciences, Ludwik Rydygier Collegium Medicum in Bydgoszcz, Nicolaus Copernicus University, 75 Ujejskiego St., 85-168 Bydgoszcz, Poland; G.G. g.grzesk@cm.umk.pl
- ⁴ Chair of Physical Chemistry and Chemistry of Polymers, Faculty of Chemistry, Nicolaus Copernicus University, 7 Gagarina St, 87-100 Toruń, Poland; J.N. jacek.nowaczyk@umk.pl

* Correspondence: alicja@cm.umk.pl, ORCID: 0000-0003-4945-2369;

E-mail address and ORCID for all of the co-authors :

Magdalena Kowalska: magda.kowalska@doktorant.umk.pl ORCID: 0000-0001-7950-5543

Łukasz Fijałkowski: l.fijalkowski@cm.umk.pl ORCID: 0000-0001-6778-8259

Monika Kubacka: monika.kubacka@uj.edu.pl ORCID: 0000-0003-4878-0723

Kinga Sałat: kinga.salat@uj.edu.pl ORCID: 0000-0003-0614-5393

Grzegorz Grzešek: g.grzesk@cm.umk.pl ORCID : 0000-0001-6669-5931

Jacek Nowaczyk: jacek.nowaczyk@umk.pl ORCID: 0000-0003-4521-8065

Alicja Nowaczyk: alicja@cm.umk.pl ORCID: 0000-0003-4945-2369

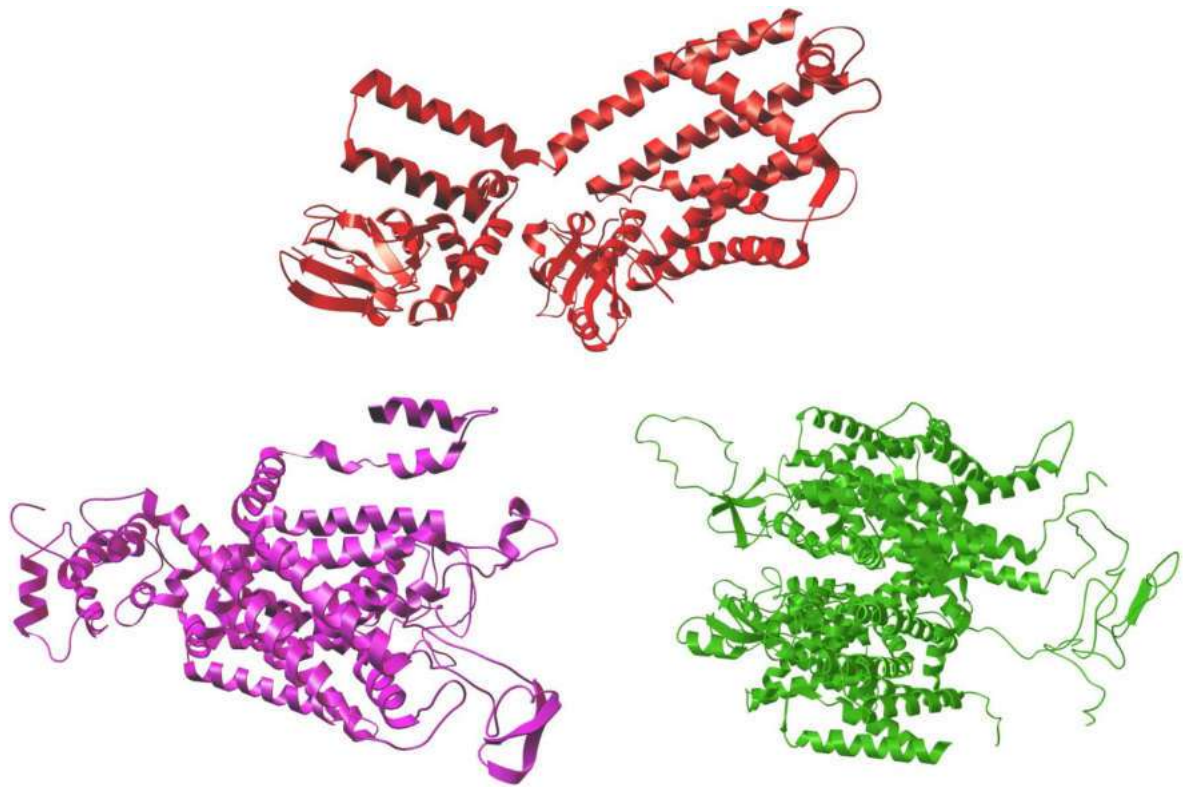


Figure 1S. Protein models used in docking experiments: Na_v1.5 (green), Ca_v1.2 (purple), K_v11.1 (red)

Figure 2S. Molecular docking experiment: Binding modes of (S)-Tiagabine ((R/S)-TGB). (R/S)-TEF ((R/S)-Terfenadine). NFD (Nifedipine). BTX (Batrachotoxin) to hNav1.5, hCav1.2 and hKv11.1 channels; Ligands (ball and stick model), calculated hydrogen bonds (dashed green lines).

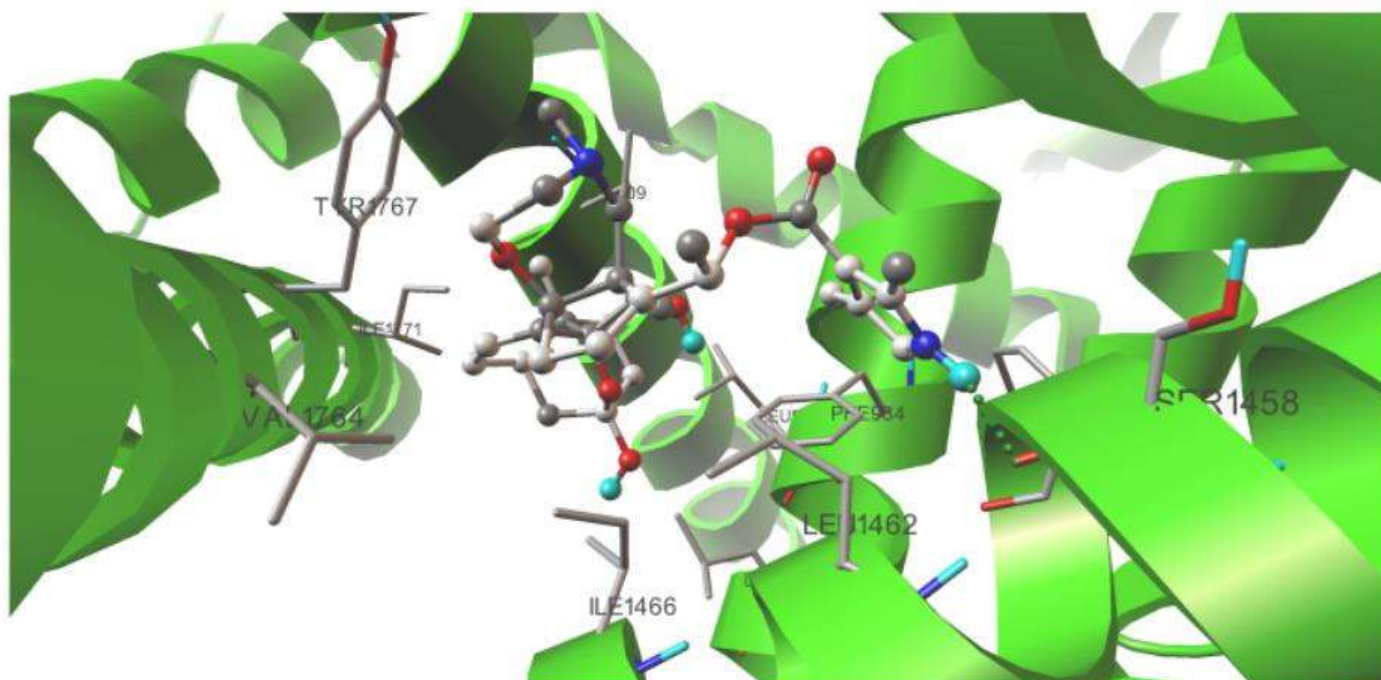


Figure 2S. Binding modes between BTX (Batrachotoxin) to hNav1.5. Ligands (ball and stick model), calculated hydrogen bonds (dashed green lines).

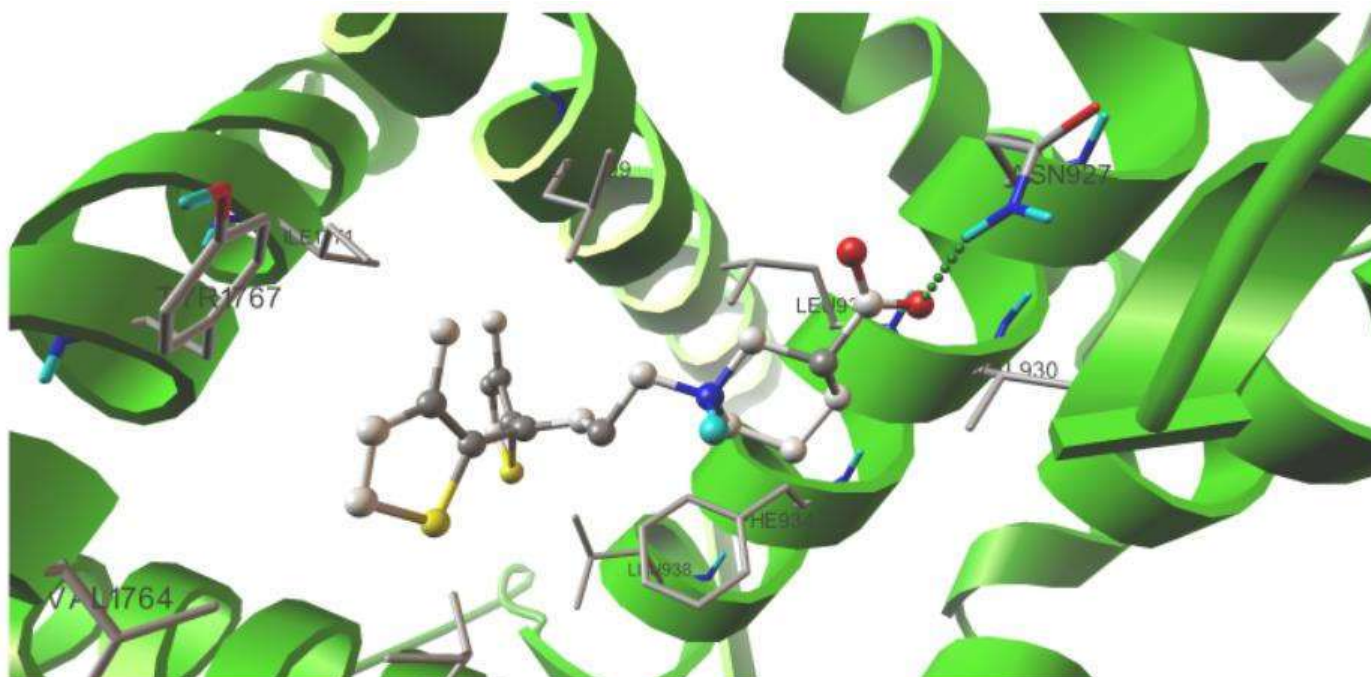


Figure 2S. Binding modes between (R)-Tiagabine ((R)-TGB) to hNav1.5. Ligands (ball and stick model), calculated hydrogen bonds (dashed green lines).

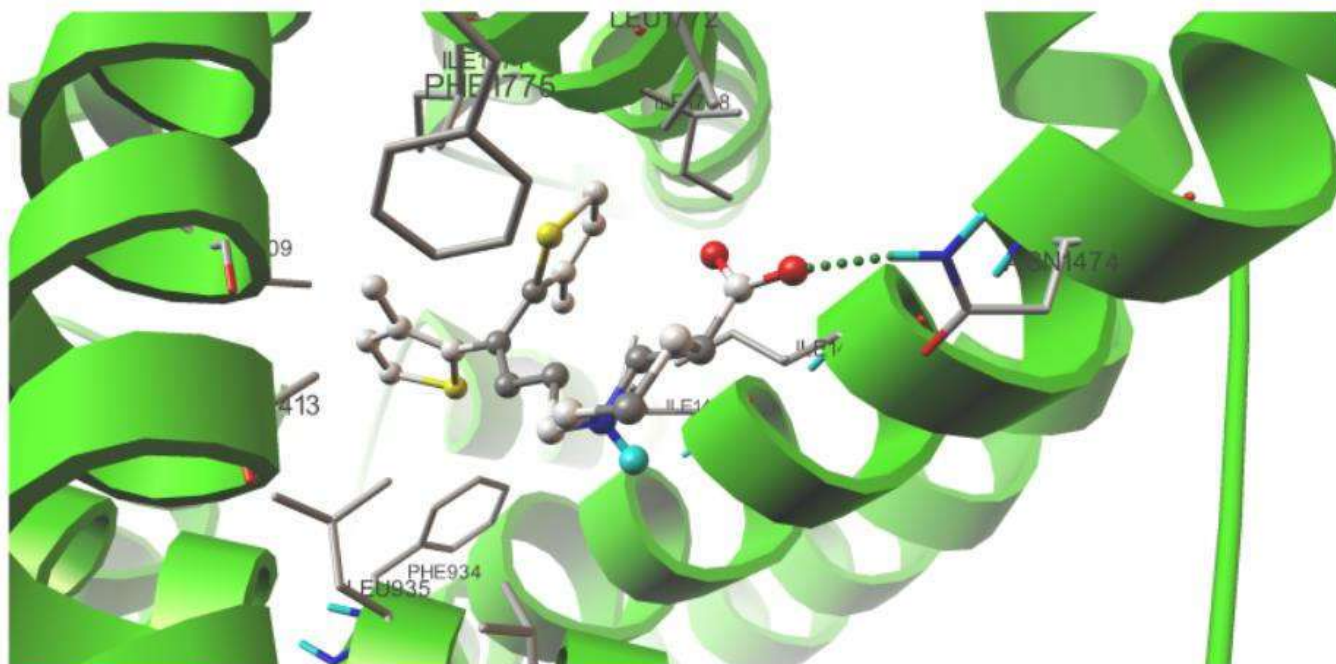


Figure 2S. Binding modes between (S)-Tiagabine ((S)-TGB) to hNav1.5. Ligands (ball and stick model), calculated hydrogen bonds (dashed green lines).

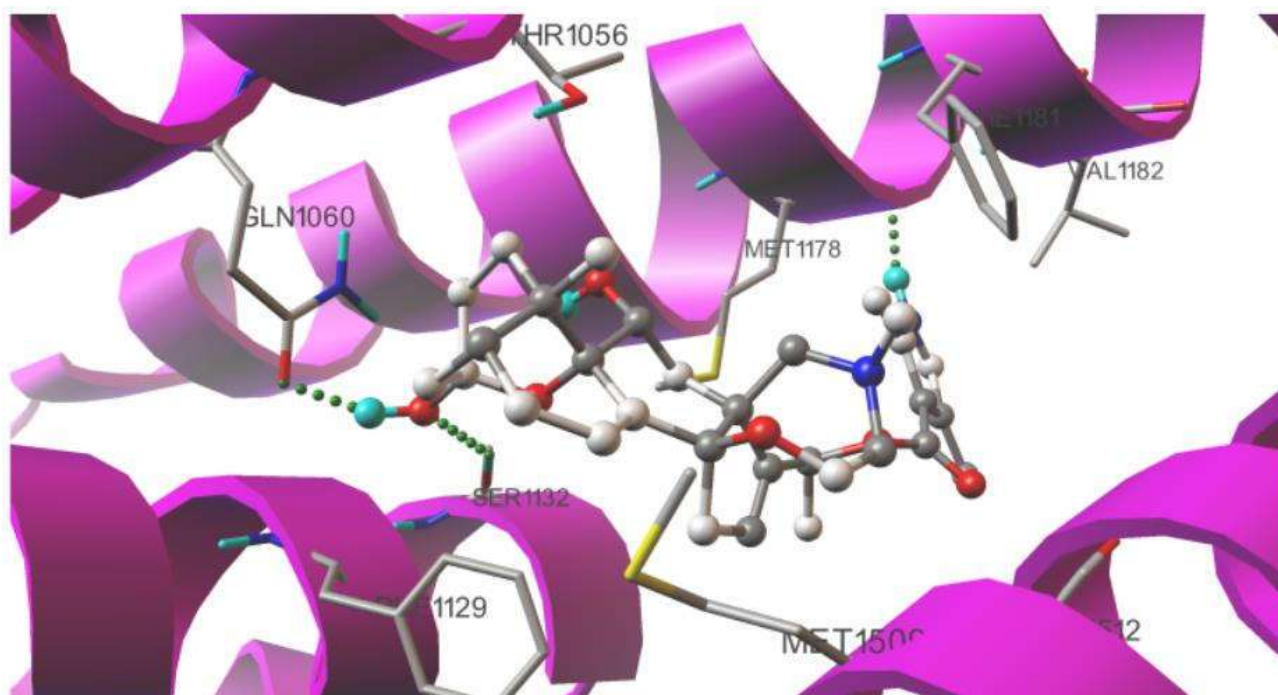


Figure 2S. Binding modes between BTX (Batrachotoxin) to hCav1.2. Ligands (ball and stick model), calculated hydrogen bonds (dashed green lines).

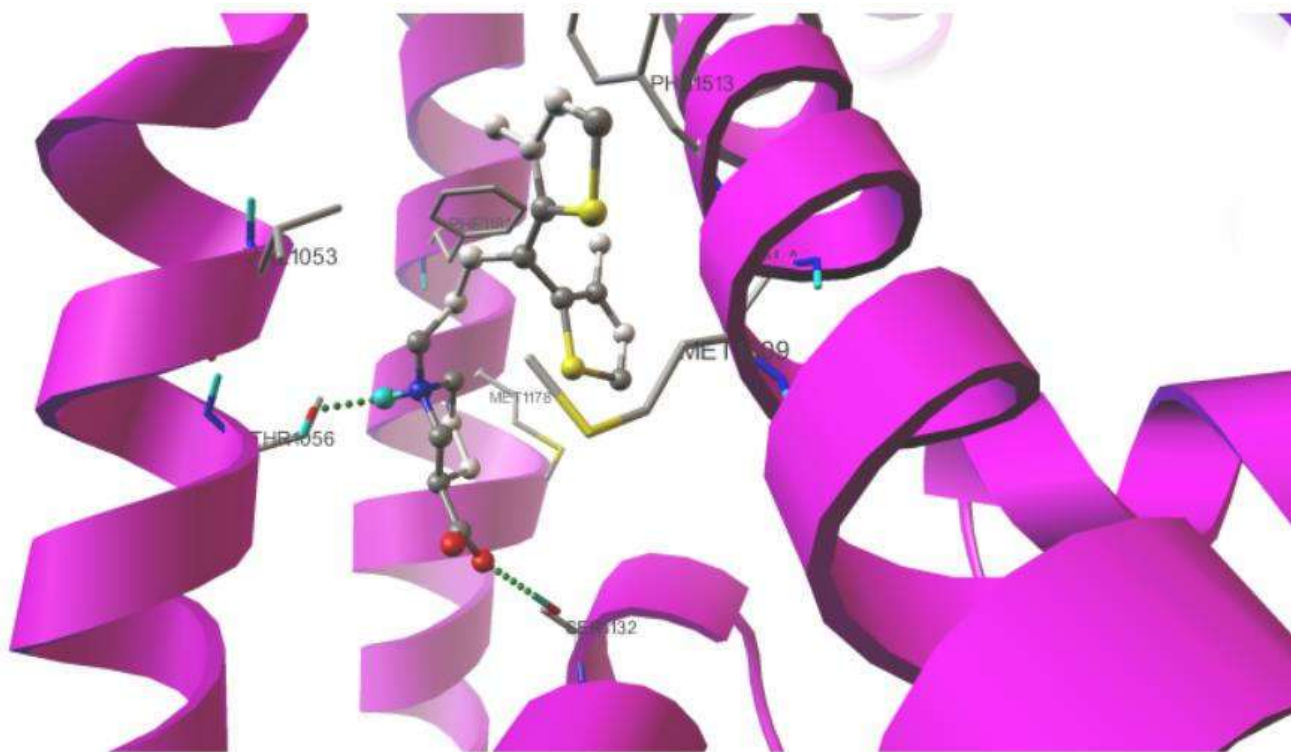


Figure 2S. Binding modes between (R)-Tiagabine ((R)-TGB) to hCav1.2. Ligands (ball and stick model), calculated hydrogen bonds (dashed green lines).

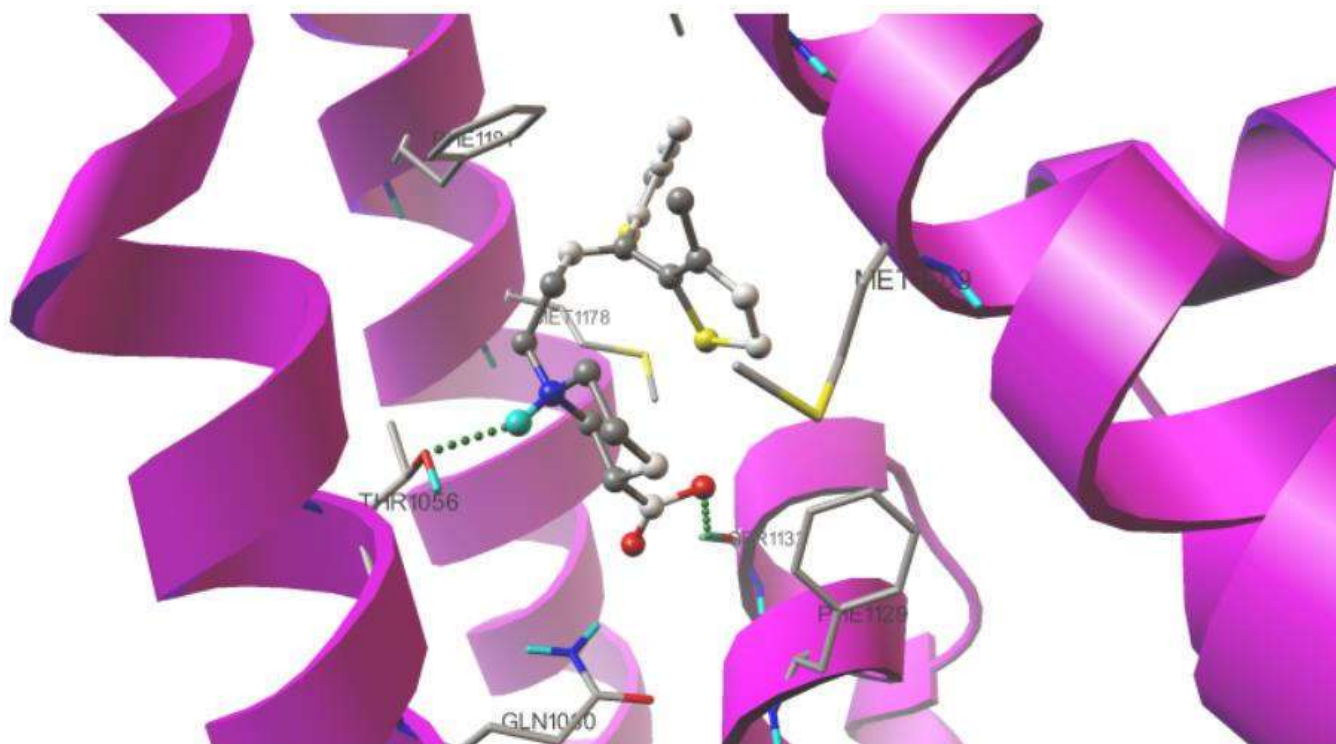


Figure 2S. Binding modes between (S)-Tiagabine ((S)-TGB) to hCav1.2. Ligands (ball and stick model), calculated hydrogen bonds (dashed green lines).

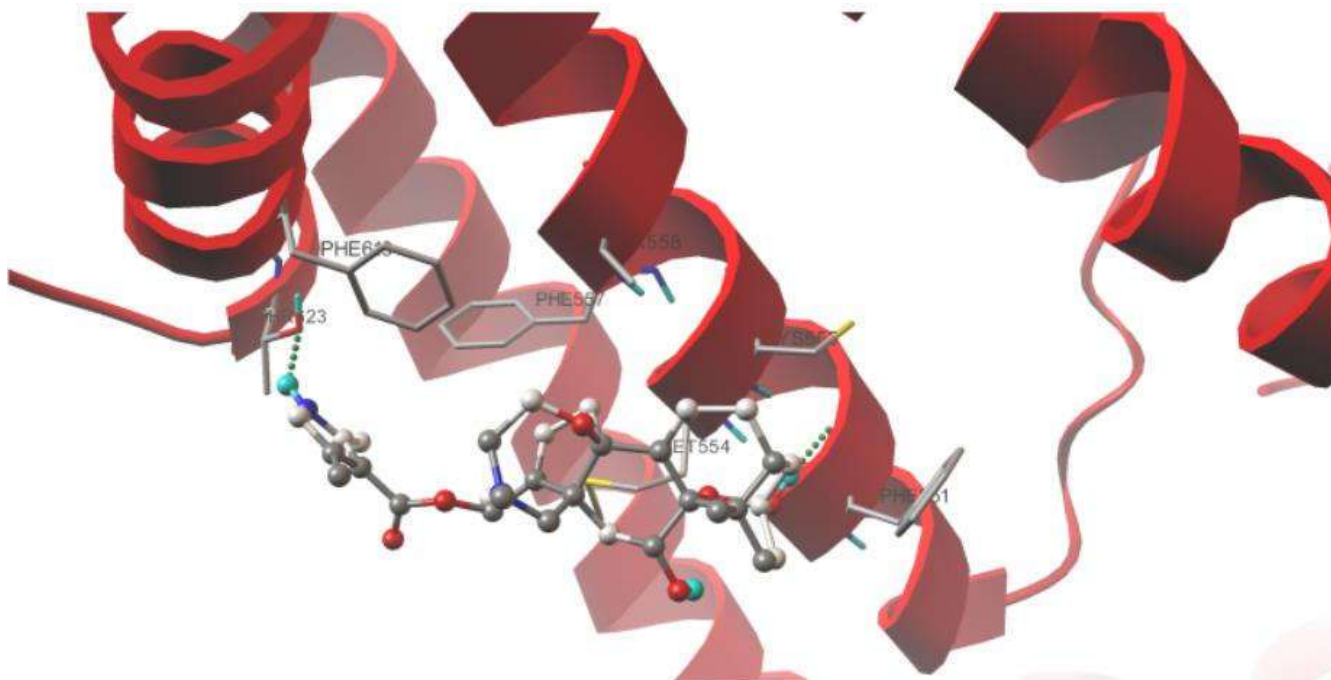


Figure 2S. Binding modes between BTX (Batrachotoxin) to hKv11.1. Ligands (ball and stick model), calculated hydrogen bonds (dashed green lines).

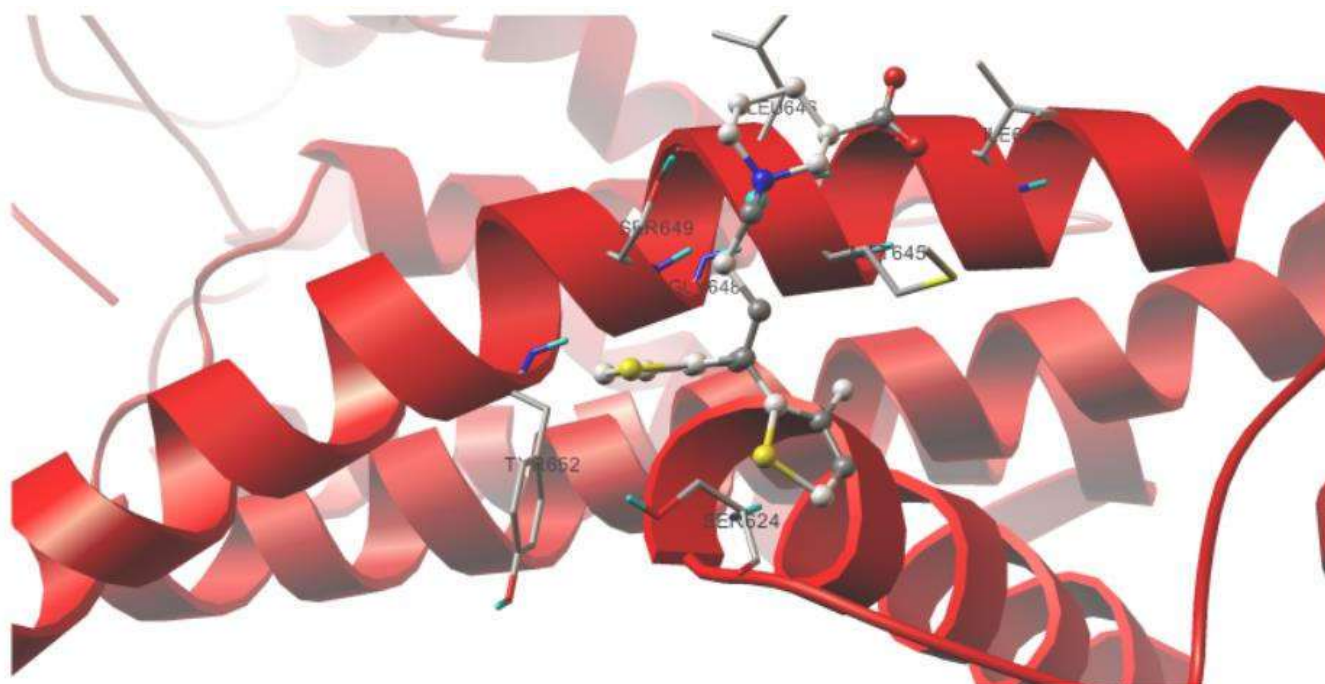


Figure 2S. Binding modes between (R)-Tiagabine ((R)-TGB) to hKv11.1. Ligands (ball and stick model), calculated hydrogen bonds (dashed green lines).

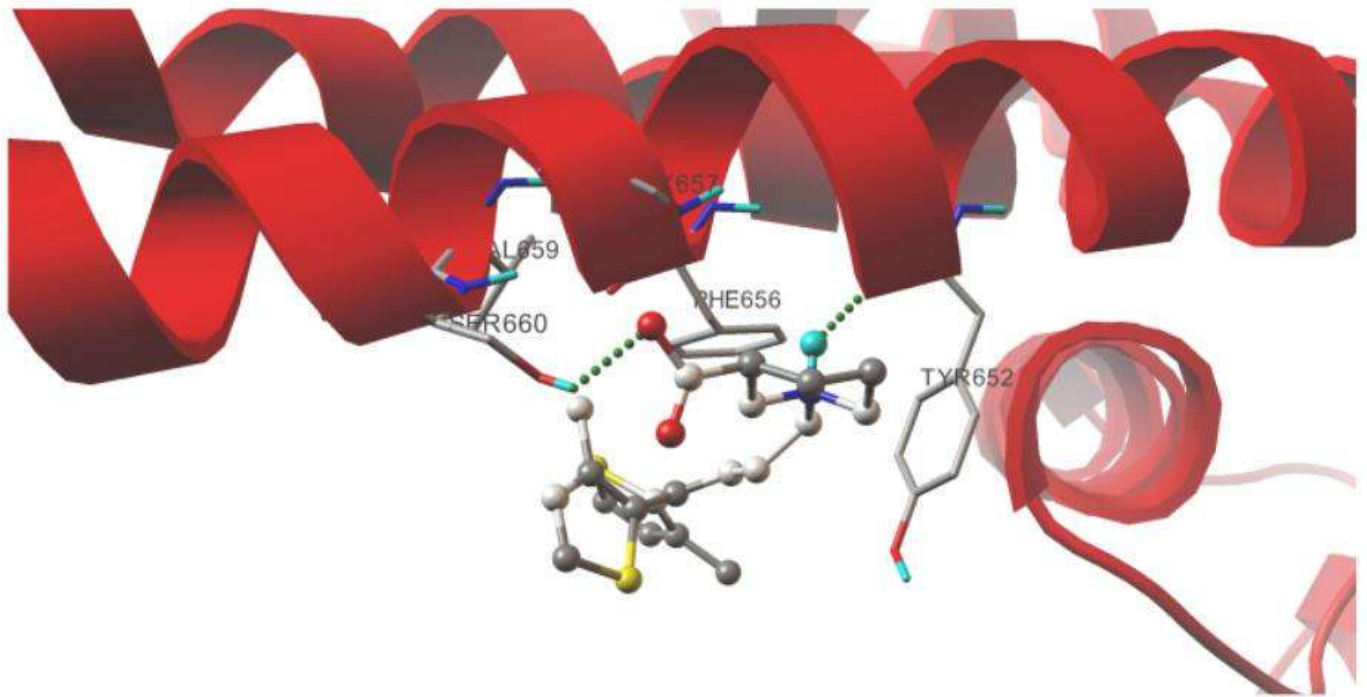


Figure 2S. Binding modes between (S)-Tiagabine ((S)-TGB) to hKv11.1. Ligands (ball and stick model), calculated hydrogen bonds (dashed green lines).

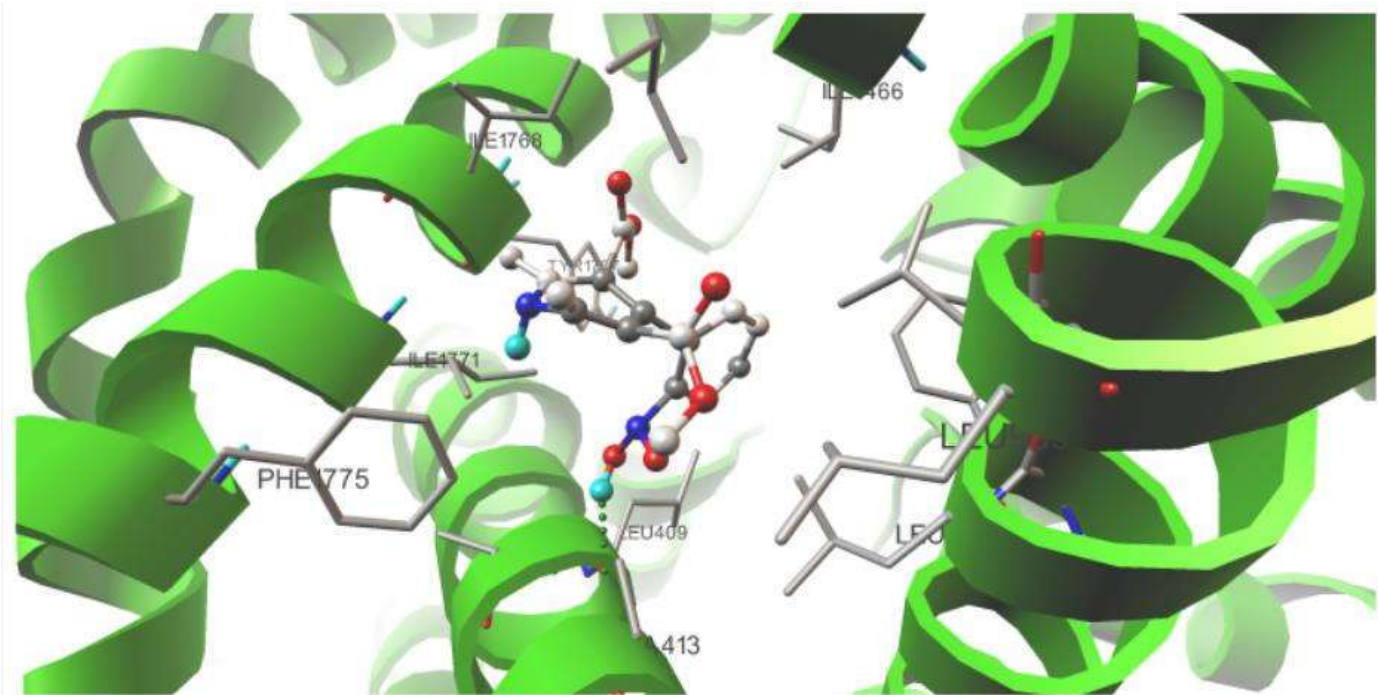


Figure 2S. Binding modes between NFD (Nifedipine) to hNav1.5. Ligands (ball and stick model), calculated hydrogen bonds (dashed green lines).

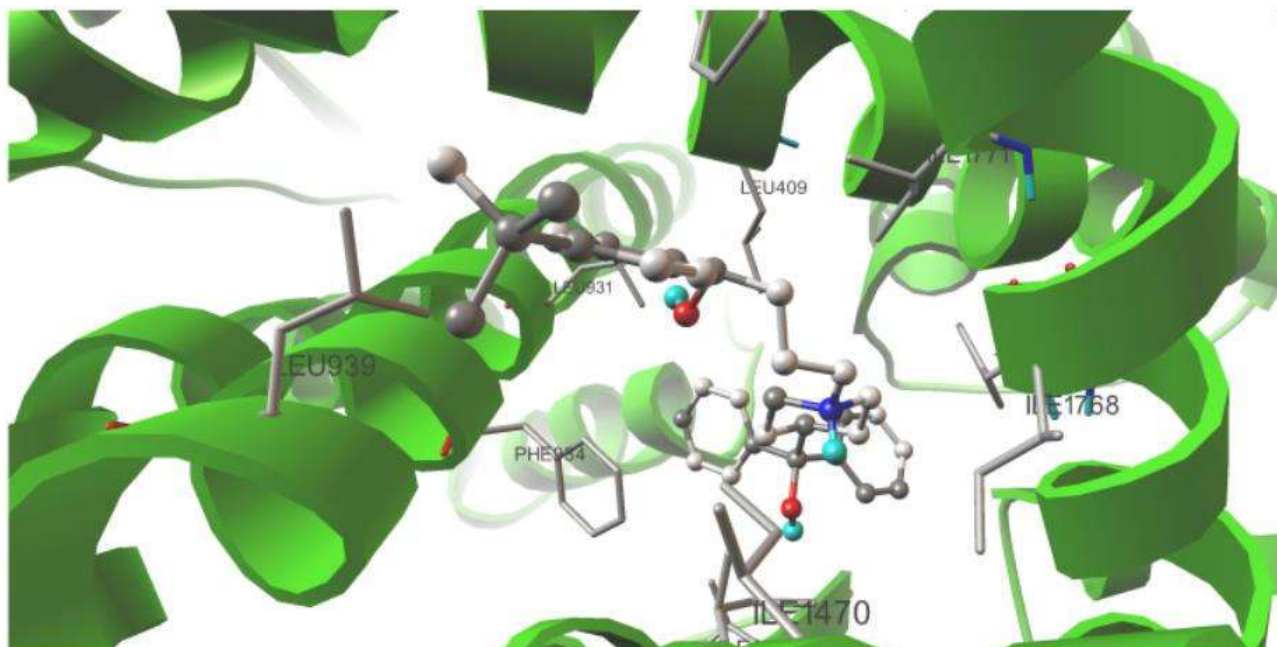


Figure 2S. Binding modes between (R)-TEF ((R)-Terfenadine) to hNav1.5. Ligands (ball and stick model), calculated hydrogen bonds (dashed green lines).

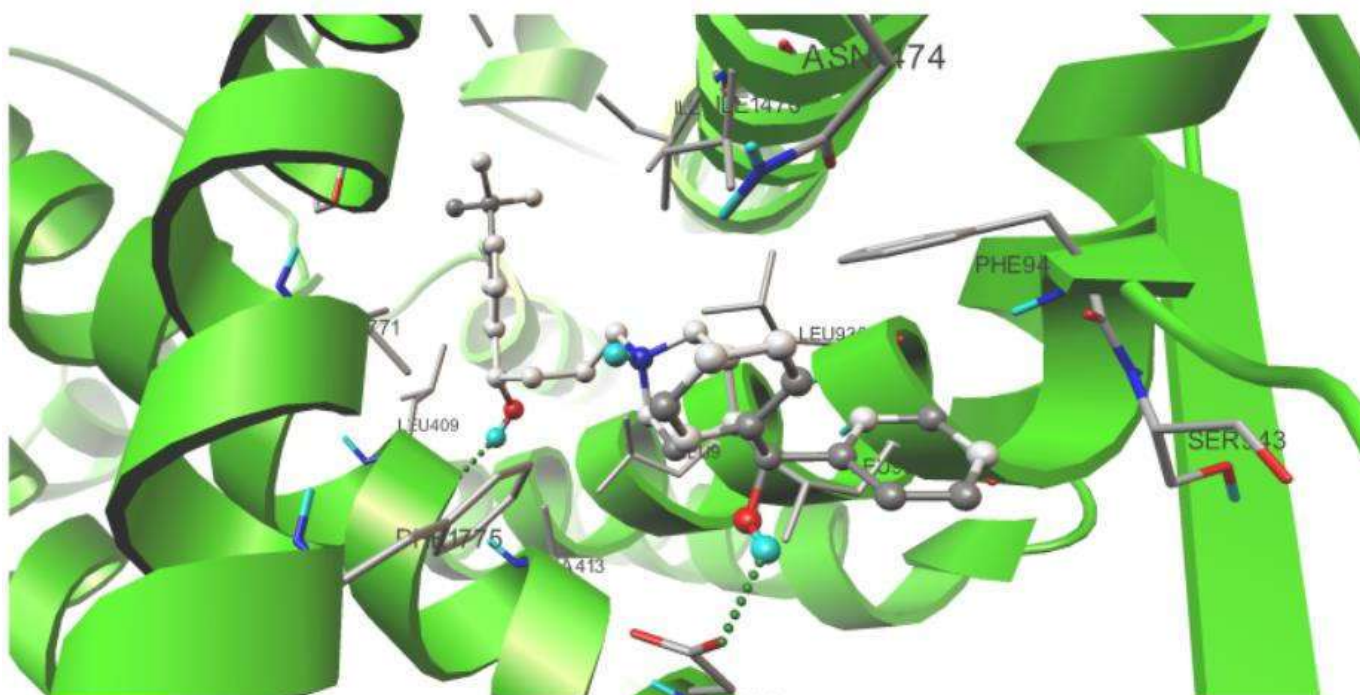


Figure 2S. Binding modes between (S)-TEF ((S)-Terfenadine) to hNav1.5. Ligands (ball and stick model), calculated hydrogen bonds (dashed green lines).

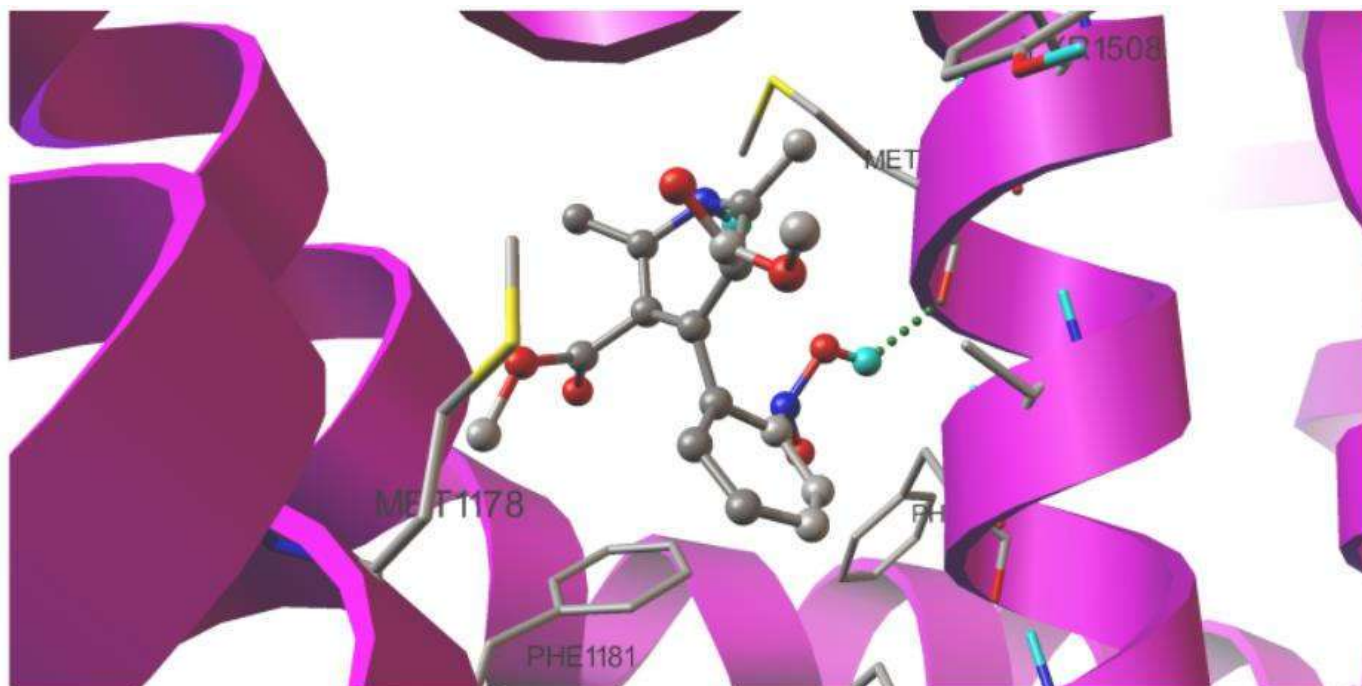


Figure 2S. Binding modes between NFD (Nifedipine) to hCav1.2. Ligands (ball and stick model), calculated hydrogen bonds (dashed green lines).

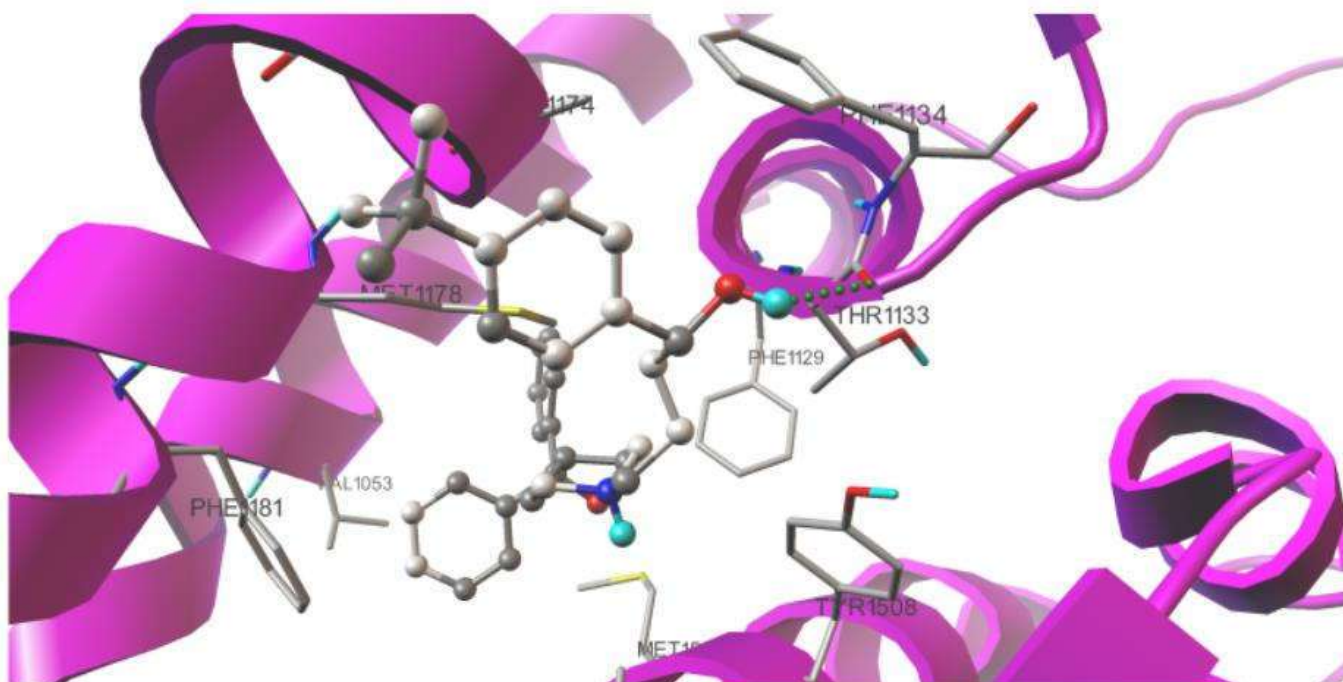


Figure 2S. Binding modes between (R)-TEF ((R)-Terfenadine) to hCav1.2. Ligands (ball and stick model), calculated hydrogen bonds (dashed green lines).

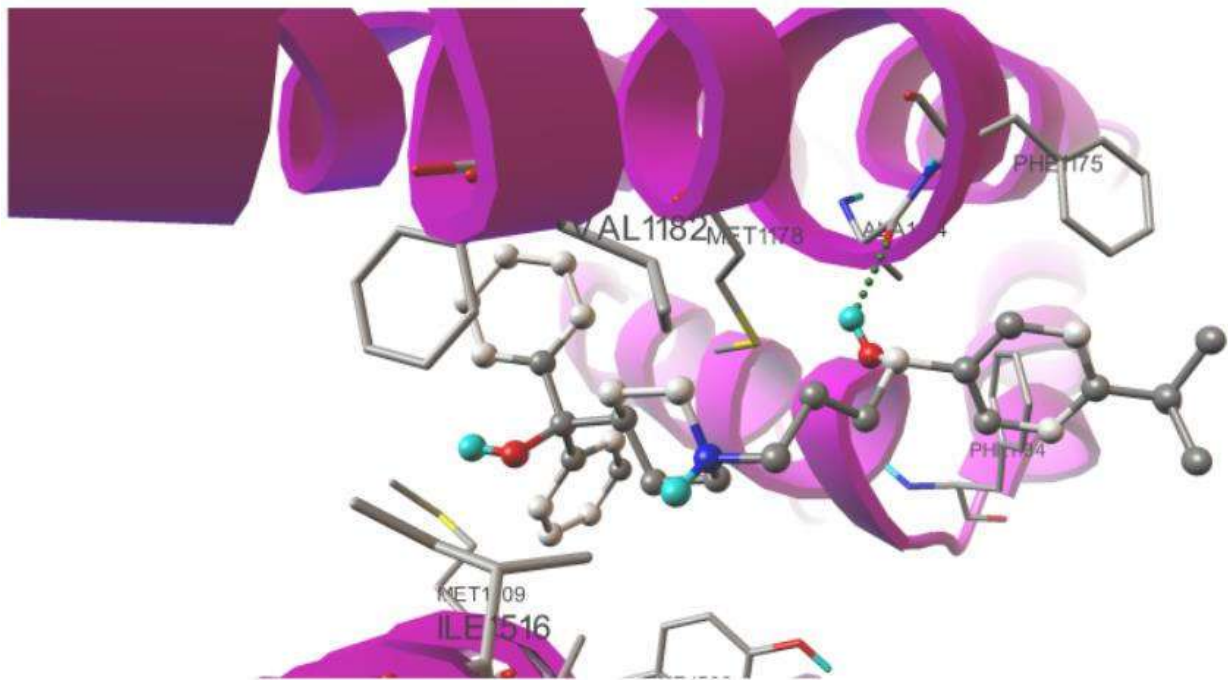


Figure 2S. Binding modes between (S)-TEF ((S)-Terfenadine) to hCav1.2. Ligands (ball and stick model), calculated hydrogen bonds (dashed green lines).

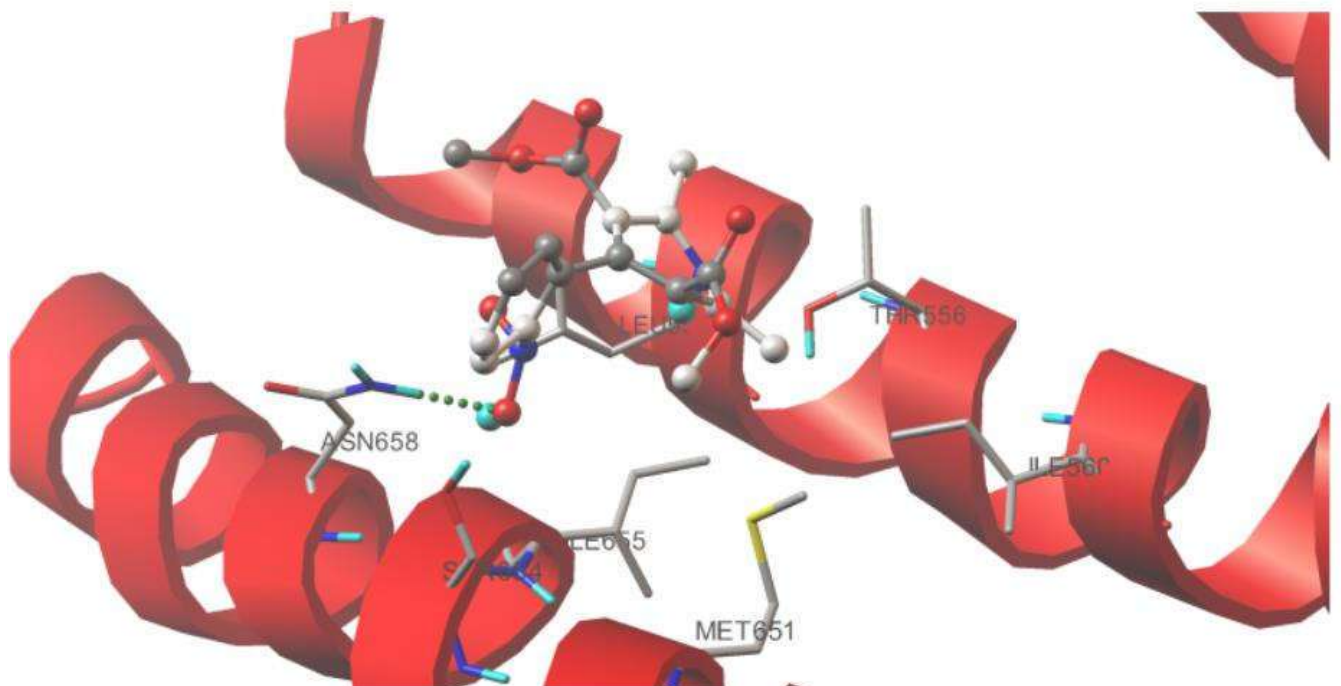


Figure 2S. Binding modes between NFD (Nifedipine) to hKv11.1. Ligands (ball and stick model), calculated hydrogen bonds (dashed green lines).

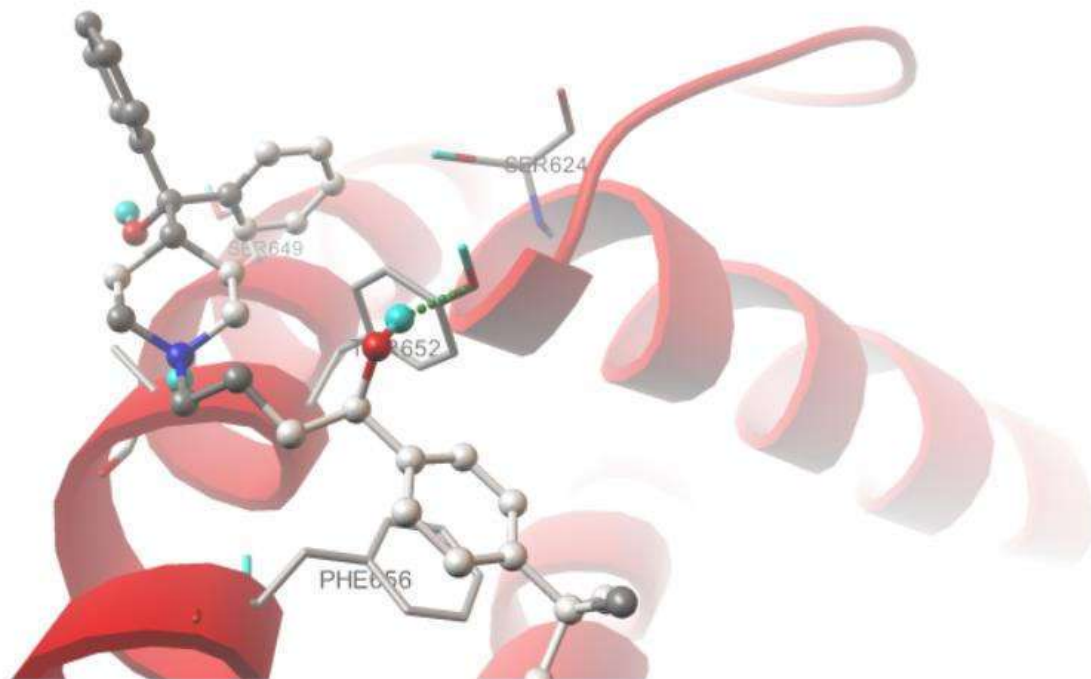


Figure 2S. Binding modes between (R)-TEF ((R)-Terfenadine) to hKv11.1. Ligands (ball and stick model), calculated hydrogen bonds (dashed green lines).

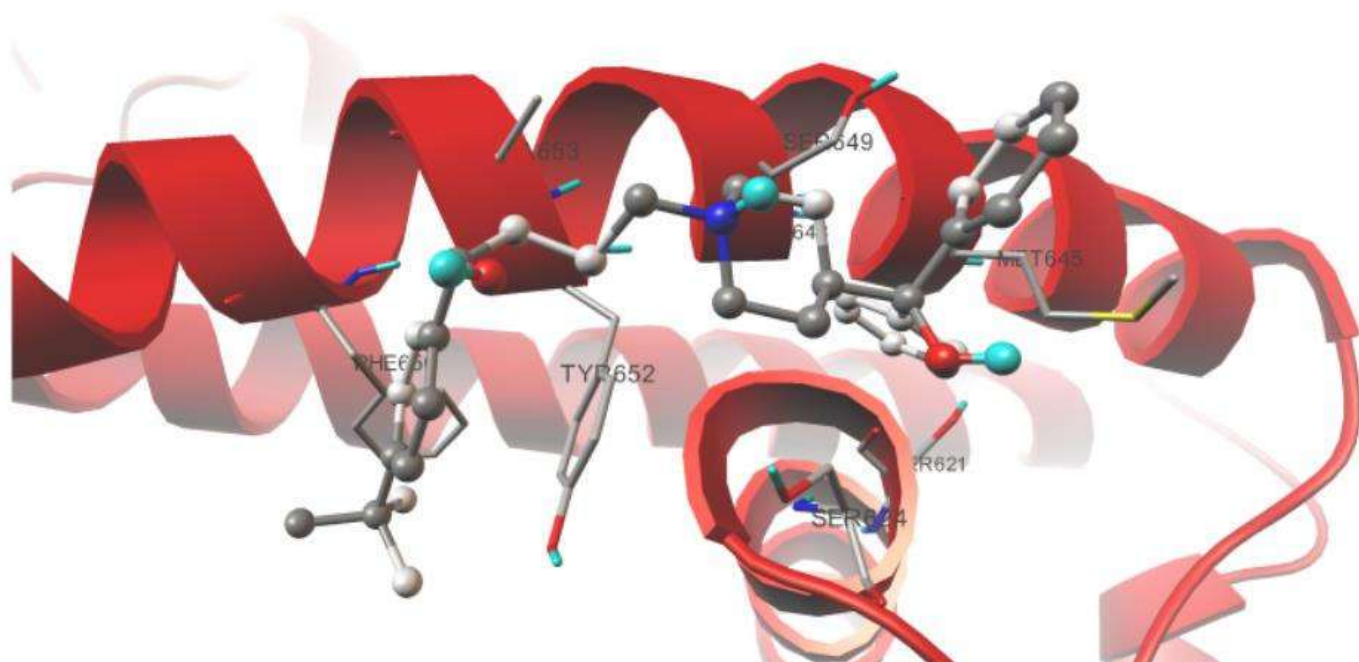


Figure 2S. Binding modes between (S)-TEF ((S)-Terfenadine) to hKv11.1. Ligands (ball and stick model), calculated hydrogen bonds (dashed green lines).

Figure 3S. Validation experiment: Binding modes of Progabide (PRG), Aspirin (ASA) to hNav1.5, hCav1.2 and hKv11.1 channels; Ligands (ball and stick model), calculated hydrogen bond (

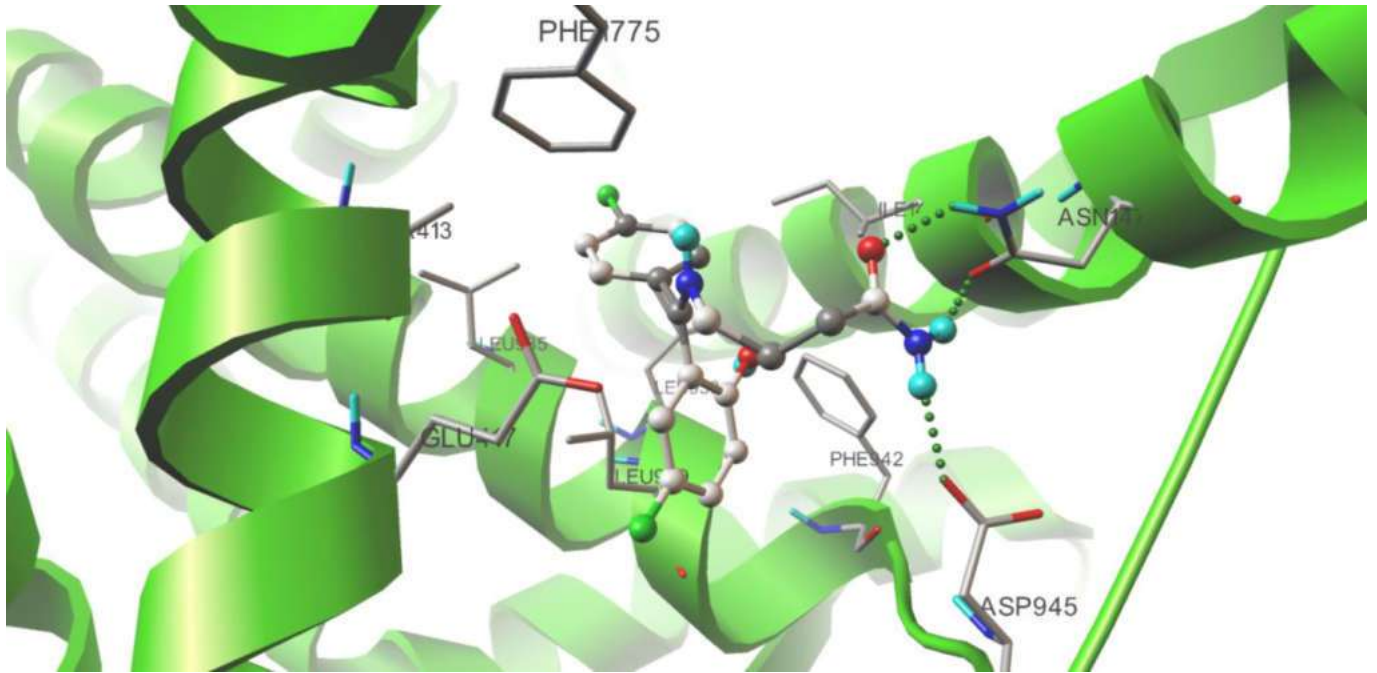


Figure 3S. Binding modes between Progabide (PRG) to hNav1.5. Ligands (ball and stick model), calculated hydrogen bonds (dashed green lines).

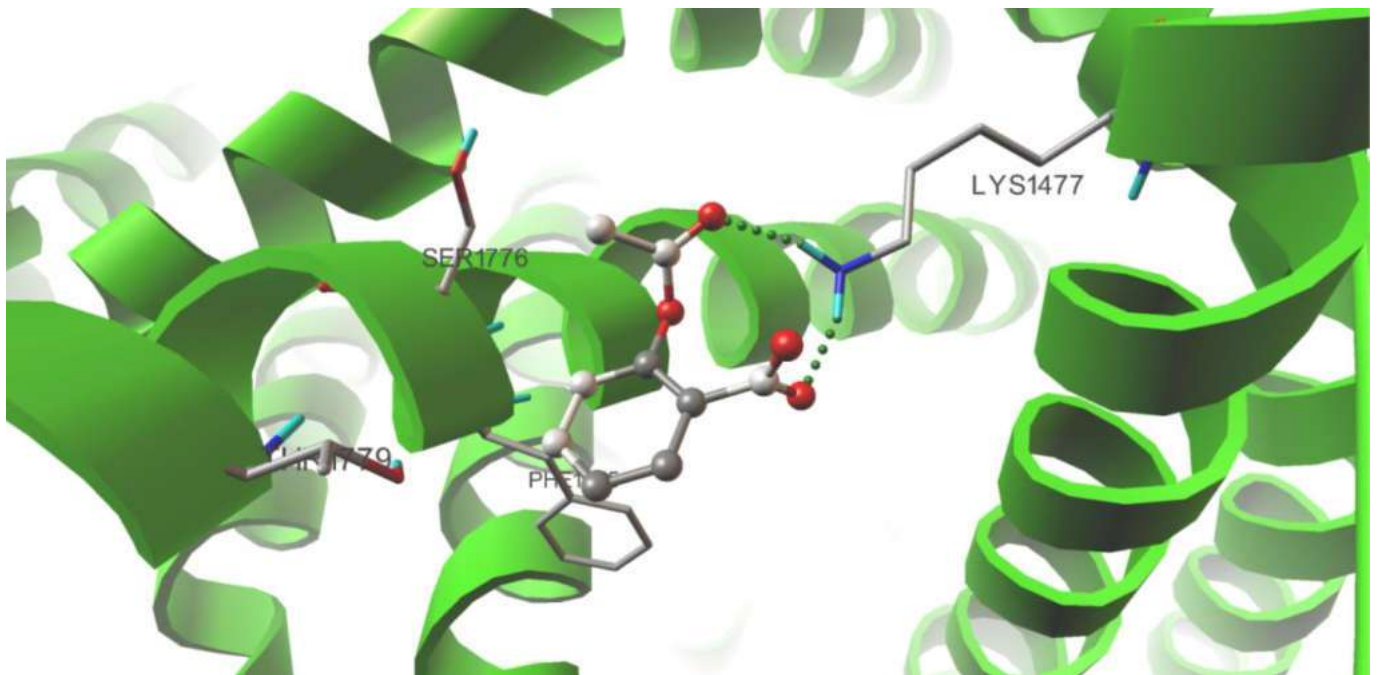


Figure 3S. Binding modes between Aspirin (ASA) to hNav1.5. Ligands (ball and stick model), calculated hydrogen bonds (dashed green lines).

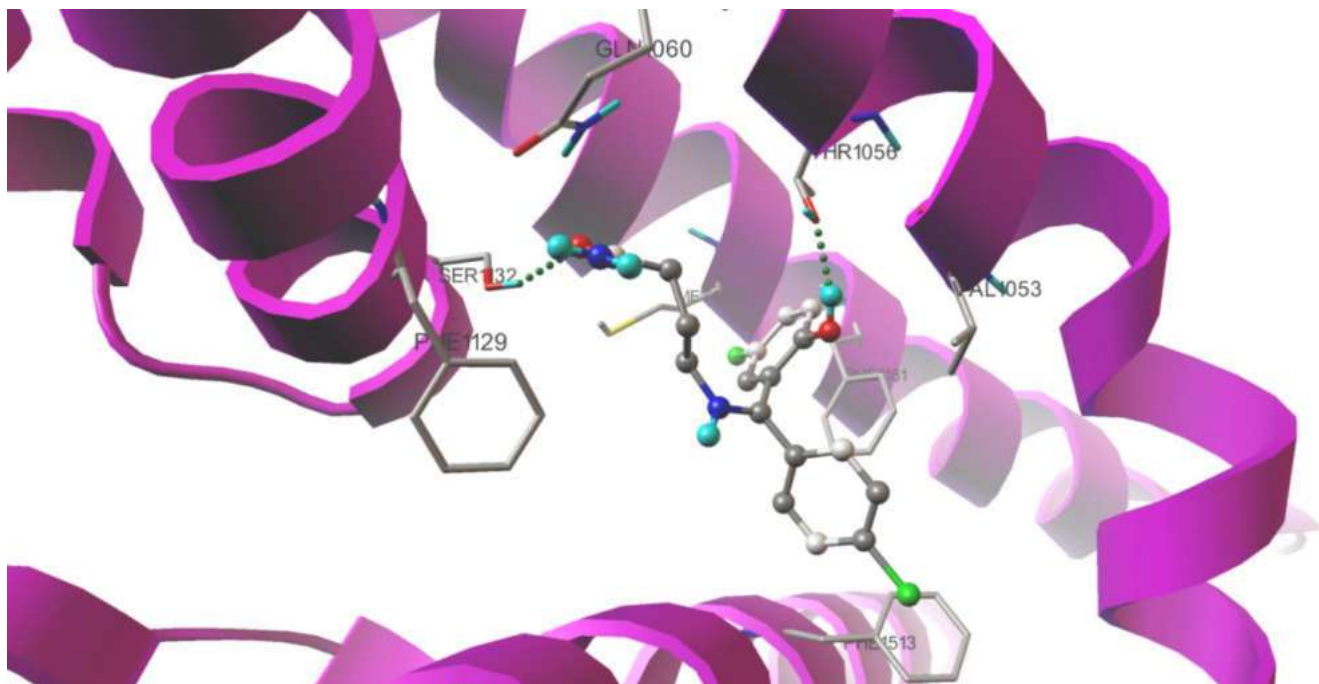


Figure 3S. Binding modes between Progabide (PRG) to hCav1.2. Ligands (ball and stick model), calculated hydrogen bonds (dashed green lines).

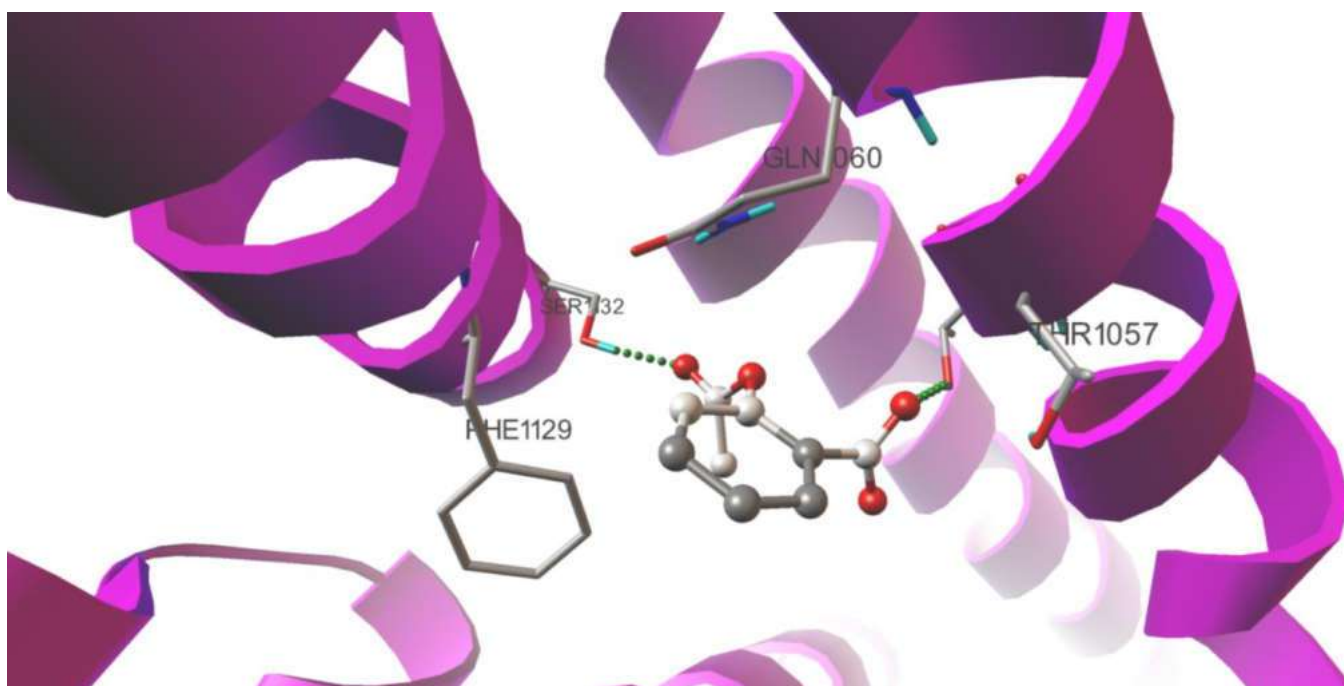


Figure 3S. Binding modes between Aspirin (ASA) to hCav1.2. Ligands (ball and stick model), calculated hydrogen bonds (dashed green lines).

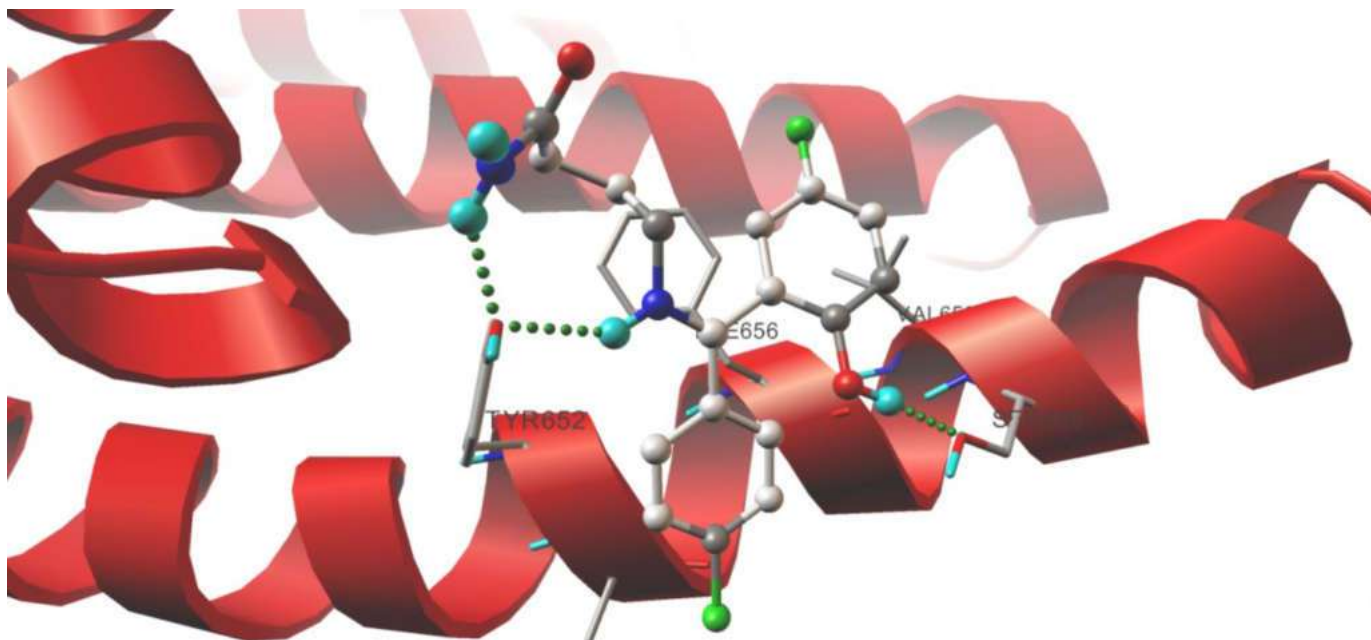


Figure 3S. Binding modes between Progabide (PRG) to hKv11.1. Ligands (ball and stick model), calculated hydrogen bonds (dashed green lines).

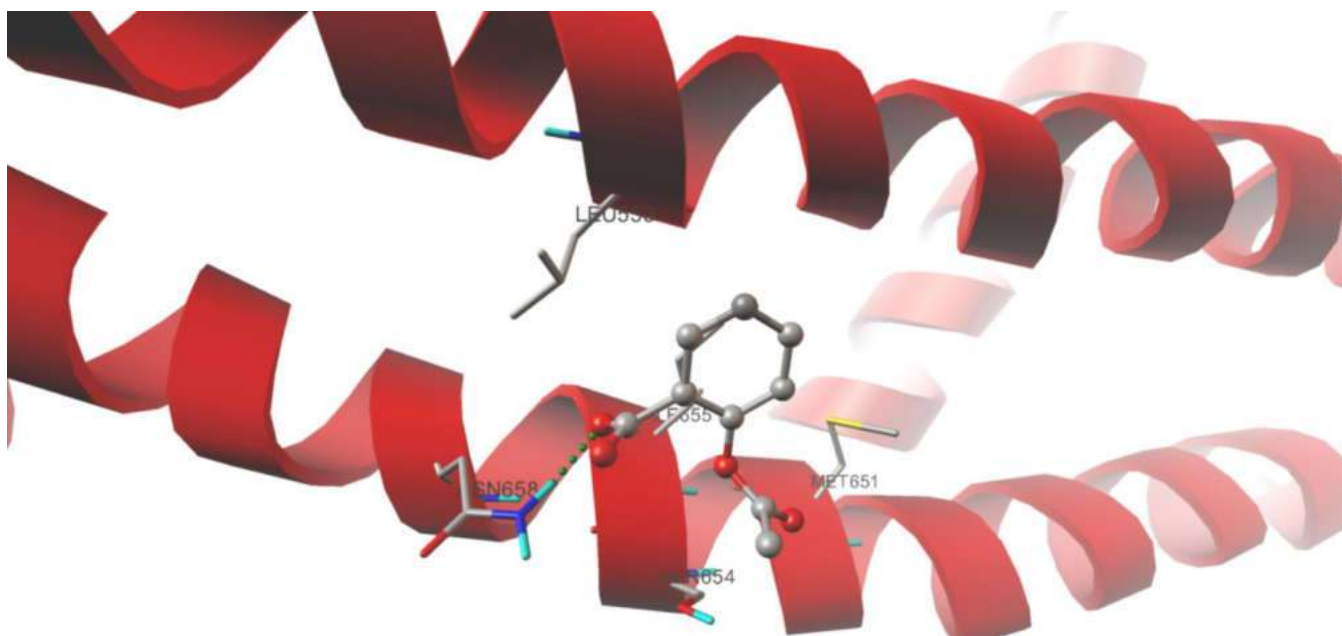


Figure 3S. Binding modes between Aspirin (ASA) to hKv11.1. Ligands (ball and stick model), calculated hydrogen bonds (dashed green lines).

7. PAROSKETYNA W FARMAKOTERAPII DEPRESJI

7.1. Depresja – zespół depresyjny

Wg danych WHO z 2021 roku 3.8% populacji (co stanowi około 280 mln ludzi na świecie) zmaga się z problemem depresji. Depresja (ICD-10-CM code: F32.0 – F33.3) jest zaburzeniem psychicznym, stanowiącym jeden z rodzajów zaburzeń lękowych (*Anxiety disorders*, ADs). Wieloletnie obserwacje wskazują, iż przyczyną depresji mogą być: stresujące sytuacje, zaburzenie funkcjonowania osi podwzgórze–przysadka–nadnercza, nieprawidłowości genetyczne. Istotną rolę w patogenezie depresji odgrywają również czynniki biologiczne, tj. niewłaściwe wydzielanie neuroprzekaźników CSN [74]. Zaburzenia depresyjne charakteryzują czynniki społeczne oraz psychologiczne takie jak: obniżenie nastroju, zaburzenie łaknienia oraz spadek masy ciała, problemy z koncentracją, spadek poczucia własnej wartości. Przyczyny depresji obejmują złożone interakcje pomiędzy czynnikami społecznymi, psychologicznymi i biologicznymi. Objawy depresji mogą być długotrwałe i nawracające.

Obecnie depresję łączy się z wieloma innymi schorzeniami. Udowodniono, iż choroba ta przyspiesza biologiczne starzenie się organizmu, powodując skrócenie telomerów, co skutkuje m.in. starzeniem się mózgu [75]. Wyniki badań przeprowadzonych w 2011 roku sugerują, iż osoby z depresją są w 45% bardziej narażone na udar mózgu w porównaniu do osób zdrowych [76]. Otyłość, cukrzyca oraz choroby układu sercowo–naczyniowego również łącznie są z występowaniem depresji [77].

Istnieją psychologiczne i farmakologiczne metody leczenia depresji. Zastosowanie obu form terapii jest najskuteczniejszym sposobem walki z chorobą. Najcięższe postaci depresji leczone są terapią elektrowstrząsową czy pozaczaszkową stymulacją magnetyczną [78].

7.2. Leki antydepresyjne

Podjęto wiele prób klasyfikacji leków przeciwdepresyjnych, biorąc pod uwagę różne kryteria. Wśród nich wyróżnić można m.in. klasyfikację w zależności od struktury chemicznej leków. Niemniej, podział na podstawie farmakologicznego mechanizmu działania jest najbardziej dopracowany i użyteczny. Sposób działania leków przeciwdepresyjnych opiera się na hamowaniu transporterów wychwytu zwrotnego neuroprzekaźników ze szczeliny synaptycznej. Monoaminoergiczna teoria depresji zakłada, iż niedobór limbicznych bądź korowych biogennych monoamin – SER, NE, DA odpowiedzialny jest za zapoczątkowanie

i rozwój choroby. Ostatnio także zaobserwowano, że podczas depresji w układzie nerwowym pacjenta występuje również obniżenie ilości GABA [78]. Obecnie wyróżniono 13 grup leków przeciwdepresyjnych. Wśród nich 11 grup osiąga swoje działania farmakologiczne poprzez blokowanie jednej lub kilku pomp transportera wychwyty zwrotnego i/lub receptorów dla monoaminergicznych neuroprzekazników. Prowadzi to do zwiększenia dostępności synaptycznej SER, NE i/lub DA. Dwie pozostałe grupy wywierają efekt terapeutyczny poprzez hamowanie enzymu oksydazy monoaminowej oraz blokowaniu receptora NMDA-glutamatergicznego. Grupy leków, mechanizmy działania oraz przykłady leków należących do każdej z nich przedstawiono w tabeli 1 [79].

Tabela 1. Grupy leków antydepresyjnych.

Grupy leków antydepresyjnych	Mechanizm działania	Przykłady leków
TCAs	blokowanie pomp wychwyty zwrotnego NA i 5-HT, przy niewielkim wpływie na pompy wychwyty zwrotnego DA	amitryptylina, clomipramina, doksepina
MAOIs	hamowanie aktywności jednego lub obu enzymów monoaminooksydazy: MAO-A i MAO-B.	moklobemid, pirlindol, selegilina
SSRIs	hamowanie SERT	paroksetyna, sertralina, citalopram
SNRIs	małe i średnie dawki: hamowanie wychwyty zwrotnego NA i 5-HT; wysokie dawki: hamowanie wychwyty zwrotnego DA	wenlafaksyna, duloksetyna
NDRIs	selektywne hamowanie transportera NET i DAT	bupropion
Selektywne NRIs	selektywne hamowanie transportera NET	reboksetyna

SARI	antagonizm receptora(ów) serotoniny przy słabym hamowaniu SERT	trazodon, nefazodon
SPARI	Hamowanie wychwytu zwrotnego serotoniny (SERT; IC ₅₀ = 0,5 nM) oraz częściowe działanie agonistyczne wobec hamującego syntezę i sekrecję serotoniny autoreceptora 5-HT _{1A}	wilazodon
NASSA	hamowanie receptorów: α ₂ -adrenergicznych, serotoninergicznych, histaminowych	mianseryna, mirtazapina
NRISA	silna inhibicja NET, antagonizm H ₁ ; umiarkowany antagonizm: 5-HT ₂ , 5-HT ₇ i α ₁	maprotylina
SNRISA	umiarkowana inhibicja SERT, silne hamowanie NET, blokada receptorów: 5-HT ₂ , 5-HT ₇ , D ₂ -D ₄ , α ₁ -adrenergiczny, 5-HT ₃ , H ₁ , 5-HT ₆	amoksapina
Atypowe leki przeciwpsychotyczne	silna blokada receptora 5-HT ₂ , słaby antagonizm receptora D ₂ ; najczęściej wpływ również na inne receptory histaminowe	olanzapina, kwetiapina, risperidon, aripiprazol
Antagonista/odwrotny agonista/częściowy agonista NMDA-glutaminergicznego jonoceptora	nieselektywny antagonist podjednostek NR ₂ receptora NMDA-glutaminergicznego	ketamina

Oznaczenia skrótów: trójcykliczne leki przeciwdepresyjne (*Tricyclic Antidepressants*, TCAs), inhibitory monoaminooksydazy (*Monoamine Oxidase Inhibitors*, MAOIs) monoaminooksydaza A (MAOA), monoaminooksydaza B (MAOB), inhibitory wychwytu zwrotnego SER (*Selective Serotonin Reuptake Inhibitors*, SSRIs), inhibitory wychwytu zwrotnego SER i NA (*Serotonin-Norepinephrine Reuptake Inhibitors*, SNRIs), inhibitory wychwytu zwrotnego NA i DA (*Norepinephrine - Dopamine Reuptake Inhibitors*, NDRIs), selektywne inhibitory zwrotnego wychwytu noradrenaliny (*Selective Norepinephrine Reuptake Inhibitors*, NRIs), (*Serotonin Receptors Antagonist With Serotonin Reuptake Inhibition*, SARI), (*Serotonin 5-HT_{1a} Autoreceptor Partial Agonist With Serotonin Reuptake*

Inhibition, SPARI), (Noradrenergic α receptor-2 Antagonist with Specific Serotonergic receptors-2 and-3 Antagonism (NASSA), (Norepinephrine reuptake inhibitor With Serotonin receptors antagonism, NRISA), Serotonin-Norepinephrine Reuptake Inhibitors and Serotonin receptors antagonism antidepressant With potent antipsychotic d2 receptor blockade/antagonism, SNRISA) [78].

7.3. Paroksetyna

Jednym z najczęściej stosowanych leków należących do grupy SSRI jest PRX (ATC code: N06AB). Z chemicznego punktu widzenia lek ten jest pochodną fenylopiperydyny. Po raz pierwszy pojawiła się na rynku w US w 1992 pod nazwą handlową *Paxtil* [80]. Ze względu na swoje wielokierunkowe działanie, PRX zajmuje szczególne miejsce we współczesnej farmakoterapii. PRX znalazła się na liście leków podstawowych (*Model List of Essential Medicines and Model List of Essential Medicines for Children*), opublikowanych przez WHO 21.09.2021r. Leki podstawowe definiowane są jako substancje priorytetowe dla utrzymania zdrowia populacji. Lista aktualizowana jest co dwa lata, natomiast kryterium jej tworzenia stanowi: bezpieczeństwo oraz skuteczność działania [81].

PRX została zarejestrowana w terapii zaburzeń: lękowych, obsesyjno-kompulsywnych, depresyjnych, a także w terapii stresu pourazowego oraz objawów naczynioruchowych. Należy wspomnieć, iż PRX nie została dopuszczona do stosowania u dzieci i młodzieży, niemniej z dużym powodzeniem włączana jest do leczenia poza wskazaniem terapeutycznym (*off-label*) u najmłodszych pacjentów [82].

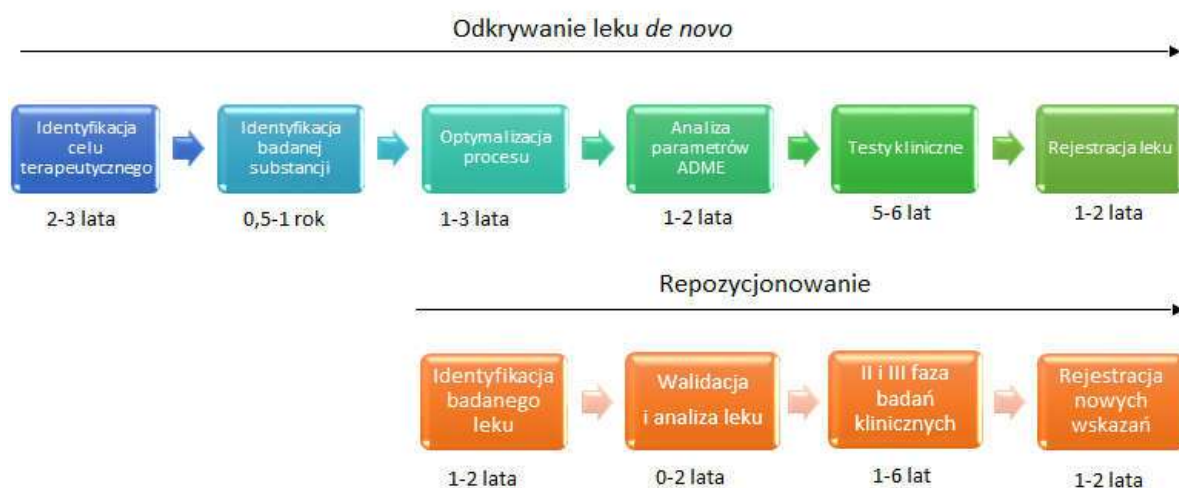
PRX wykazuje wysokie powinowactwo do wiązania się z SERT. Inhibicja SERT zwiększa zewnątrzkomórkowe stężenie SE, znosząc objawy depresji. W wysokich dawkach (> 40 mg/dzień lub wyższych) PRX wchodzi w interakcję z innymi MATs, m.in. z transporterem NET. Analiza piśmiennictwa na temat możliwych mechanizmów działania PRX w organizmie została przedstawiona w publikacji przeglądowej mojego współautorstwa [83].

7.4. Paroksetyna a repozycjonowanie leków

Proces odkrywania i rejestracji nowego leku jest czasochłonny i niezwykle kosztowny. Szacuje się, iż czas badań może wynieść nawet 17 lat, co pochłania około 3 miliardów dolarów [84]. Niemniej, tylko około 2% kandydatów na leki zostaje dopuszczonych do stosowania, natomiast większość badanych substancji nie jest w stanie sprostać wysokim wymaganiom stawianym lekom [85]. Naukowcy stoją przed trudnym wyzwaniem związanym z wydajnością i rozwojem badań, które skutecznie pozwolą opracować nowe schematy leczenia. Wśród nich coraz większe znaczenie ma proces repozycjonowania leku (znany

również jako: zmiana przeznaczenia leku, zmiana profilu leku, przekierowanie leku, i zmiana terapii lekowej) z definicji jest strategią identyfikowania nowych zastosowań zatwierdzonych lub badanych leków, które są poza zakresem ich pierwotnego wskazania medycznego. Repozycjonowanie leku może odnosić się do opracowania istniejącego leku w nowych populacjach pacjentów lub na nowe choroby, nowe postacie dawkowania, drogi podawania lub linię leczenia [85]. Poszukiwanie nowych wskazań dla zarejestrowanych leków jest wysoce skuteczne i mniej ryzykowne w porównaniu z odkrywaniem leku *de novo*.

Jak pokazano na ryc. 16 proces badań nowego leku składa się z pięciu etapów. Zastosowanie procesu repozycjonowania skróciło czas trwania tego procesu do maksymalnie 12 lat, poprzez wyeliminowanie fazy odkrywania leków i badań przedklinicznych. Istotnym jest fakt, iż badany lek ma przeprowadzone wszelkie testy bezpieczeństwa stosowania, co ogranicza możliwość wystąpienia groźnych dla życia działań niepożądanych. Co więcej, najczęściej znane są również odległe w czasie, niezamierzone skutki uboczne stosowania leku, które nie zawsze da się przewidzieć podczas tradycyjnego opracowywania nowego leku [84].



Ryc. 16. Porównanie szacunkowego czasu procesu odkrywania nowego leku z szacunkowym czasem procesu repozycjonowania.

Wśród leków, dla których został przeprowadzony proces repozycjonowania znalazły się również leki przeciwdepresyjne. Duloksetyna, będąca inhibitorem SER i NE, wykorzystywana jest w schorzeniach urologicznych, dzięki właściwościom zmniejszającym aktywność mięśnia wypieracza pęcherza moczowego. Kolejnym przykładem jest bupropion, który okazał się skutecznym środkiem pomagającym w zaprzestaniu palenia, dlatego w 1996 roku został zarejestrowany w tym wskazaniu pod nazwą handlową Wellbutrin. W 2000 roku

w USA do stosowania w przedmiesiączkowych zaburzeniach dysforycznych zarejestrowano jeden z najczęściej stosowanych SSRI – fluoksetynę [86]. Ze względu na swoje wielokierunkowe działanie PRX również poddawana jest badaniom, których wyniki wydają się być obiecujące w leczeniu wielu schorzeń. Oprócz przeciwdepresyjnych właściwości PRX przynosi wymierne korzyści w leczeniu niewydolności serca, gdyż jest inhibitorem kinazy receptora sprzężonego z białkiem G (GRK2), której wysoki poziom odgrywa kluczową rolę w progresji choroby [87]. Proces potencjalnego reopozycjonowania PRX wskazuje również na przeciwpasożytnicze działanie leku [88]. Ponadto przeprowadzone badania [89] dla PRX oraz fluoksetyny dowiodły przeciwbakteryjnego działania obu leków na wybrane szczepy. Niemniej PRX nie została jeszcze zarejestrowana w innych schorzeniach niż zaburzenia funkcji układu nerwowego. Godnym uwagi jest również fakt, iż ze względu na niską toksyczność, lekarze chętnie włączają do terapii młodych pacjentów PRX poza wskazaniami *off-label*. Wyniki przeprowadzonych badań [90] jednoznacznie wskazują, iż wydaje się uzasadnionym rozważenie reopozycjonowania PRX w grupie młodych pacjentów.

7.5. Budowa chemiczna, cele terapeutyczne oraz potencjalne mechanizmy działania paroksetyny

Ze względu na mnogość korzyści wynikających ze stosowania PRX, badania własne skupiły się na analizie cząsteczki leku pod względem możliwych jej mechanizmów działania. W pracy przeglądowej mojego współautorstwa przedstawiono najważniejsze dane dotyczące PRX: jej budowę chemiczną, zastosowanie w lecznictwie oraz farmakodynamiczną analizę bazującą na molekularnym mechanizmie interakcji PRX z różnymi celami terapeutycznymi [83].

Analiza struktur krystalograficznych kompleksów z PRX została przedstawiona m.in. w kontekście inhibicji cytochromu P450 (CYP450). Badania kliniczne interakcji lekowych wykazują, że PRX może hamować metabolizm leków rozkładanych przez CYP2D6, takich jak: desipramina czy risperidon. Analiza krystalograficzna wykazała również inhibicję innych cytochromów: CYP2B6, CYP2B4.

Inhibicja SERT przez PRX została omówiona jak również zaprezentowana w sposób graficzny. Wyszczególniono wiązania oraz odległości międzyatomowe otrzymanego kompleksu SERT-PPX. Ponadto analiza interakcji innych MATs z PRX wykazała, iż lek może posiadać działanie antycholinergiczne, ponieważ posiada niewielkie powinowactwo do receptorów dopaminowych, alfa1-, alfa2-, beta-adrenergicznych, muskarynowych i histaminowych (H1) [91].

Nadekspresja GRK2 jest silnie związana zarówno ze zdrowym, jak i niewydolnym sercem co od dawna uważane jest za cel terapeutyczny w leczeniu chorób układu krążenia [87]. Chlorowodorek paroksetyny, został zidentyfikowany jako umiarkowany inhibitor GRK2 z IC_{50} wynoszącym 1,4 μ M [92]. Badania udowodniły, iż PRX mogłaby znaleźć zastosowanie w leczeniu niewydolności serca.

PRX może wpływać również na komórki nowotworowe, w tym guza mózgu, raka jelita grubego czy raka piersi [93]. Mechanizm inhibicji wynika z blokowania niektórych szlaków sygnalizacyjnych kinazy białkowej zaangażowanych w nowotworzenie.

Omówienie interakcji PRX z celami molekularnymi dostarczyło wiedzy na temat celi terapeutycznych leku, ale również wyjaśniło przyczynę działań niepożądanych jakie może wywoływać.

Review

Paroxetine - overview of the molecular mechanisms of action

Magdalena Kowalska¹, Jacek Nowaczyk², Łukasz Fijałkowski^{1*}, Alicja Nowaczyk^{1*}

¹ Department of Organic Chemistry, Faculty of Pharmacy, Ludwik Rydygier Collegium Medicum in Bydgoszcz, Nicolaus Copernicus University in Toruń, 2 dr. A. Jurasza St., 85-094 Bydgoszcz, Poland; magda.kowalska@doktorant.umk.pl (M.K.), l.fijalkowski@cm.umk.pl (Ł.F.) alicja@cm.umk.pl (A.N.)

² Faculty of Chemistry, Nicolaus Copernicus University in Toruń, 7 Gagarina Str., 87-100 Torun, Poland; jacek.nowaczyk@umk.pl (J.N.)

* Correspondence: alicja@cm.umk.pl; l.fijalkowski@cm.umk.pl Tel.: +(48)(52) 5853904; Department of Organic Chemistry, Faculty of Pharmacy, Ludwik Rydygier Collegium Medicum in Bydgoszcz, Nicolaus Copernicus University in Toruń, 2 dr. A. Jurasza St., 85-094 Bydgoszcz, Poland; ORCID: 0000-0003-4945-2369

Received: date; Accepted: date; Published: date

Abstract: In the 21st century and especially during a pandemic, the diagnosis and treatment of depression is an essential part of the daily practice of many family doctors. It mainly affects patients in the age category 15 – 44 years regardless of gender. Anxiety disorders are often diagnosed in children and adolescents. Social phobias can account for up to 13% of these diagnoses. Social anxiety manifests itself in fear of negative social assessment and humiliation, which disrupts the quality of social functioning. Treatment of the above-mentioned disorders is based on psychotherapy and pharmacotherapy. Serious side effects or mortality from antidepressant drug overdose are currently rare. Recent studies indicate that paroxetine (ATC code: N06AB), belonging to the selective serotonin reuptake inhibitors, has promising therapeutic effects and is used off-label in children and adolescents. The purpose of this review is to describe the interaction of paroxetine with several molecular targets in various points of view including the basic chemical and pharmaceutical properties. The central point of the review is focused on the pharmacodynamic analysis based on the molecular mechanism of binding paroxetine to various therapeutic targets.

Keywords: Paroxetine, CYP, MAT, GRK2, EBOV.

1. Introduction

Anxiety is an emotional state characterized by feelings of unreasonable fears, feelings of danger, and may have different severity and duration. Once anxiety exceeds personal adaptive abilities, its intensity and duration may be disproportional in relation to the stimulus that has triggered it. This sense of fear is modulated by some regions of the brain such as amygdala, hippocampus and prefrontal cortex. Incorrect adjustments in the tuning of specific circuit components, including deficiencies in the dampening of amygdala stress responses by prefrontal regions are involved in alterations in fear response. Clinical anxiety often causes intense need to escape which may result in immediate relief from symptoms. Such avoidance is so reinforcing that it can quickly become a habit that creates increasingly impaired functioning. Fear is associated with the occurrence of somatization symptoms (rapid heart rate, sweating, tremor, dyspnea, fast breathing) due to vegetative imbalance leading to significant decline in daily functioning [1].

Anxiety disorders (ADs, ICD-10-CM code: F40-F48, [2]) are reported to be the most common mental disorders worldwide. In the USA, they affect 18 percent of the general population, which is more than twice as much as mood disorders (including recurrent depression and bipolar disorder) and twenty-

fold more than schizophrenia [3]. The prevalence of ADs in children and adolescents is estimated to be in range from 6 to 20%, placing these diseases among the most common mental disorder/illnesses in the developed countries. According to the American Society of Anxiety and Depression (ADAA) estimates, only a third of patients suffering from AD receive adequate help and treatment, despite the fact that ADs are highly treatable. In children, before the age of 12, separation anxiety is the most common and its occurrence decreases with age [3, 4]. On the contrary, the most common AD among adolescents is social anxiety disorder (SAD, ICD-10-CM code: F40.1, F40.10, F40.11 [5]) (0.3 – 13.1%), the spread of which increases with age. The peak incidence occurs at adolescence and early adulthood. Throughout the lifespan female are more likely to suffer from AD (9.5%) than male (4.9%) [4].

The SAD, also called social phobia, is the second most common AD and is characterized by fear of public assessment and humiliation. The disorder leads to significant disturbances in social functioning of a patient [6]. Despite the availability of effective treatments fewer than 5% of people suffering from SAD seek for professional help during the first year after initial onset [3, 7, 8].

Treatment of the above-mentioned disorders is based on psychotherapy and pharmacotherapy. In case of child and adolescent patients only the former is approved as the first line. However, recently often happens that pharmacotherapy is introduced using some substances unapproved. Prescription outside the indications occurs when a child receives a drug that has not been approved by the appropriate agency (e.g. FDA or EMA) for a given diagnosis or child patient age. This so-called off-label prescribing frequently occurs despite the lack of information on medication safety, efficacy, and proper use in children (eg, dosing, interactions). Furthermore, off-label prescribing has been associated with adverse drug events [9].

Paroxetine (ATC code: N06AB [10]; DrugBank ID: DB00715 [11]) belongs to the SSRI group (Selective Serotonin Retake Inhibitors,) and according to the literature it one of the most common off-label drug used in daily clinical practice [12]. The plethora of publications devoted to the drug deliver a variety of information concerning different aspects of the drug use and moods of action. Nevertheless, there is a lack of papers devoted to explanation of the paroxetine mechanism of action on specific targets based on the X-ray supported structural studies. Unapproved prescription of medicines to children has been rated to fall in the range between 11 and 79% worldwide. Serious side effects or mortality from antidepressant drugs overdose are currently rare [13]. Paroxetine was estimated to be among the 5 most commonly used drugs for depression in children [14]. Recent studies indicate that paroxetine has promising therapeutic effects and is used off-label in children and adolescents [15]. In a natural way, these facts clearly indicate the need to discuss the possibility of using paroxetine as indicated for young patients. For this reason, the main issue of this work is the presentation of data related to the description of paroxetine activities tested at the molecular level based on the collected crystallographic data.

The purpose of this review is focused on description of the interaction of paroxetine with several molecular targets from various perspectives. In the paper the basic chemical and pharmaceutical properties of paroxetine are discussed to provide a proper foundation for the further discussion. Later, in the text detailed pharmacodynamic analyses are drawn based on the molecular mechanism of paroxetine binding to all available therapeutic targets that have structure confirmed by X-ray studies. Binding of a ligand to a specific target protein requires a specific arrangement of both the ligand and binding site in the protein. The attractive interactions between ligand and target usually have the nature of non-carbonated contacts (hydrogen bonding, Van der Waals interactions and so on). Detailed characterization of the interaction patterns between paroxetine and analyzed proteins was carried out in the course of this study. For each biological activity discussed here, a detailed 2D representation of protein-ligand interactions is presented using LigPlot+ software [16]. A uniform method of visualization was adopted to better represent the interaction for all the therapeutic targets analyzed.

2. Paroxetine - general information and history

Paroxetine is a drug indicated for the treatment of variety of anxiety disorders including: generalized anxiety disorder (GAD, ICD-10-CM code: F41.1 [17]), obsessive-compulsive disorder (OCD, ICD-10-CM code: F42.3, F42.2, F42.9, F42.8 [18]), major depressive disorder (MDD, ICD-10-CM

code: F32, F33 [19]), premenstrual dysphoric disorder (PDD, ICD-10-CM code: F32.81 [20]), post-traumatic stress disorder (PTSD, ICD-10-CM code:F43.1 [21]), panic disorder (PD, ICD-10-CM code: F41.0 [22]), social anxiety disorder (SAD, ICD-10-CM code: F40.1, F40.10, F40.11 [5]) and vasomotor symptoms [23-26]. It is worth emphasizing that, in the treatment of PTSD there are only two approved pharmacotherapies based on SSRIs including Paxil (paroxetine hydrochloride). In all of the above disorders, pharmacotherapy is used in children and adolescents with off-label markings. First line treatments for depression among children are non-pharmacological approaches [13, 27].

Preliminary evidence indicates better therapeutic efficacy of paroxetine in children and adolescents with OCD, social phobia or depression compared to adults [28]. However, there have been reports in the literature indicating influence of paroxetine therapy in children and adolescents suffering from severe depressive disorders on the increase of suicidal tendencies, as compared to placebo [29-37]. For this reason, none of the antidepressants, including paroxetine, is contraindicated in children [34, 38, 39]. Antidepressants are used to treat depression and prevent disease-induced suicide, the possibility that drug-induced suicide can appear as side effect is a serious issue that need to be thoroughly investigated [27, 38-41]. Existing studies on the link between suicide and antidepressants vary with different results and continue to cause a lot of controversy [32-36]. In addition, it is estimated that the risk of negative effects of untreated or undertreated depression is usually higher than the risk of drug-induced suicide [27, 41].

Paroxetine is an active substance of drugs known by the trade names Aropax, Paxil, Pexeva, Seroxat, Sereupin and Brisdelle. It was first marketed in the U.S. in 1992 as under the proprietary name Paxil [42]. It is administered orally as a solid dose tablet, oral suspension, or controlled-release tablet [43]. In the clinical efficacy paroxetine can be compared with the tricyclic antidepressants; however, it is safer and has greater acceptance by the patients [44, 45]. According to the information provided by the Paxil manufacturer GlaxoSmithKline and approved by the FDA, the effectiveness of this drug in MMD has been proven by six placebo-controlled clinical trials. For a panic disorder, three 10-12-week studies indicated paroxetine superiority to placebo. Similarly, three 12-week trials for adult outpatients with social anxiety disorder demonstrated better response to paroxetine than to placebo [46-48]. It has also been used in the treatment of diabetic neuropathy, vasovagal syncope and chronic headache [49]. Paroxetine also has proven effective in the treatment of vasomotor symptoms (e.g., hot flashes, night sweats) in women undergoing menopausal transition and in patients receiving antiestrogenic cancer therapy [50]. Paroxetine is also used as a veterinarian medicine. It has been proven useful in the treatment of canine aggression and stereotyped or another OCD behavior. It has also been used in cats from time to time [51].

In pharmacological studies, various tests were conducted to confirm the expected biological activity e.g. for SERT inhibition or to test a specific mechanism of action as is the case in EBOV studies. There has also been an accidental discovery of unexpected activity towards disorders in the circulatory system. Table 1 summarizes results of the paroxetine crystallographic studies from different perspectives.

Table 1. The list of the crystal structure of target bounded Paroxetine.

<i>PDB ID</i>	<i>Target</i>	<i>Resolution</i>	<i>Organism</i>	<i>Reference</i>
5I6X, 5I6Z,	SERT	3.14 Å, 4.53 Å	Homo sapiens, Mus musculus	[52]
6AWN	SERT	3.62 Å	Homo sapiens, Mus musculus	[53]
6VRH	SERT	3.30 Å	Homo sapiens, Mus musculus	[54]
4JLT	P450 2B4	2.14 Å	Oryctolagus cuniculus	[55]
4L9I	GRK1	2.32 Å	Bos taurus	[56]
3V5W	GRK2	2.07 Å	Bos taurus, Homo sapiens	[57]
4MM4	LeuBAT	2.89 Å	Aquifex aeolicus VF5	[58]
6F6I	EBOV GP	2.40 Å	Ebola virus	[59]

Facts related to therapeutic costs cannot be ignored as well. According to GlobalData Projects Drug estimates increase of sales for PTSD in the seven major markets (7MM: the US, France, Germany, Italy, Spain, the UK, and Japan) from \$211.4 million in 2018 to \$1.2 billion in 2028, at a CAGR of 18.7% [60]. The cited data demonstrate the scale of this issue. Nevertheless, this thread is beyond the scope of the presented review.

3. Paroxetine – chemistry

Paroxetine is a phenylpiperidine derivative. It is composed of a secondary amine residing in the piperidine ring, which in turn is connected to benzodioxol and fluorophenyl groups [54] (Figure 1). From the chemical point of view paroxetine is enantiomerically pure, (-)-(3S,4R)-3-[(2H-1,3-benzodioxol-5-yloxy)methyl]-4-(4-fluorophenyl)piperidine hydrochloride hemihydrate with empirical formula of $C_{19}H_{20}FNO_3 \cdot HCl \cdot \frac{1}{2}H_2O$ (PubChem CID: 43815 [61]). It is an odorless, off-white powder, having a melting point ranging between 120° and 138°C. Particularly, paroxetine is a relatively small molecule with the molecular weight = 374.8 g/mol (329.4 g/mol as free base). [47]. In addition to hydrochloride, paroxetine mesylate is also available [23]. It can be concluded that nowadays the structure of paroxetine is well researched and understood (Figure 1). The compound exists in two crystal forms i.e., a stable hemihydrate referred to as form I and the anhydrous form called as form II (CCDC DN: 125003 [62]) [63, 64]. Spectroscopic data are available in the literature and databases: FTIR (SpectraBase Compound ID: 31iWZ0aC88k [65]) NMR ([66]) MS (accession: AU152606 [67]). These data clearly show that each of the three rings present in the paroxetine structure is located on a different plane, so the structure of this compound is a highly non-planar molecule as is depicted in Figure 1.

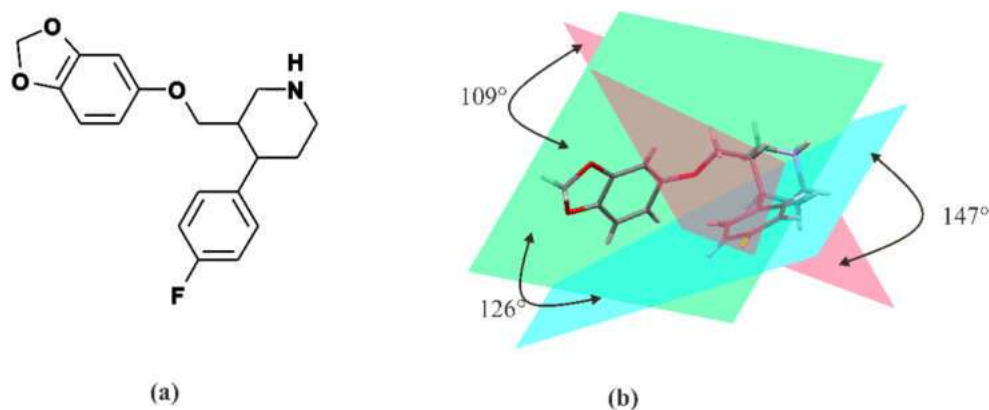


Figure 1. Molecular structure of paroxetine: 2D semi-structural scheme (a) and 3D stick representation with indicated planes of rings (b). Pink plane corresponds to the piperidine ring, green one to the benzodioxol ring and blue one to the fluorophenyl ring.

It's a lipophilic base amine with both hydrophobic and hydrophilic moieties, (pKa is 9.9 and the partition coefficient of paroxetine ($\log P_{o/w} = 3.95$) [44]. It is slightly soluble in H_2O (5.4 mg/mL), sparingly soluble in Me_2Cl_2 and EtOH (96%) but entirely soluble in MeOH. The chemical properties of this compound make it easy to modify and preserve drug-like properties [43].

4. Paroxetine - pharmacodynamics pharmacokinetics and metabolism

Paroxetine hydrochloride salt ingested orally is almost completely absorbed, with only 2 % of dose recovered in feces. Biological availability of commercially available paroxetine as a controlled - release formulation (CR) is distinct. Absorption of paroxetine was found to be an insusceptible influence of food or concomitant antacid treatment. Saturation during pass through liver leads to greater bioavailability. With repeated administration the steady - state concentration of drug is achieved within 4 to 14 days. There is no further accumulation of the compound. The distribution of paroxetine in the

body is extensive and consistent with its lipophilic amine character, with only 1% of the drug remaining in the systemic circulation [68, 69].

The volume of distribution varies from 3,1 to 28,0 L/kg (after intravenous administration). The mean elimination half - life appears is estimated to be about 21 hours. Almost two - thirds of the drug is eliminated through the kidneys [43, 70]. Paroxetine interacts with both Cytochrome P450 Family 2 Subfamily C Member 19 (CYP2C19) and Cytochrome P450 Family 3 Subfamily A Member 4 (CYP3A4). It is also one of the most potent inhibitors of Cytochrome P450 Family 2 Subfamily B and D Member 6 CYP2D6 and CYP2B6 among SSRIs [50]. Up to 95% of the drug is bound to proteins, mainly P-glycoprotein (P-gp), which is involved in transport through blood - brain barrier (BBB). It is worth emphasizing that paroxetine is both a substrate and inhibitor of P-gp [50, 69]. Comprehensive information about human paroxetine metabolites can be found in the Human Metabolome Database [71] under the acronym HMDB0014853 [72] and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes [73] under the entry D02362 [74].

4.1. Paroxetine as P450 inhibitors

Cytochromes P450 (CYPs) form the main family of enzymes capable of catalyzing oxidative biotransformation of most clinically available drugs (approx. 70-80%), hormones and other lipophilic xenobiotics. For this reason, they are of particular importance for clinical pharmacology. It is widely accepted that there are 57 functional human CYPs, of which about a dozen enzymes are responsible for the biotransformation of most xenobiotics [75, 76]. By far the most important are: CYP3A4/5, CYP2D6, CYP2C9, CYP1A2 and CYP2B6, which metabolize 30.2%, 20%, 12.8%, 8.9 and 7.2% of currently used drugs, respectively. It has been proven that despite the wide and overlapping substrate specificity of these enzymes, many drugs are metabolized at clinically relevant concentrations by only one or more enzymes, which limits the significant redundancy of the oxidation drugs system of phase I [77]. Many issues of great importance in drug treatment determine the metabolism of drugs such as: pharmacokinetics, interindividual variability and drug interactions [78]. Inhibition of metabolism, mediated by P450 cytochromes, often occurs as a result of interactions between different drugs. A compound that inhibits an enzyme involved in the metabolism of another drug can reduce metabolic excretion of this drug leading to elevation of the drug concentration in the blood, which can cause adverse effects or enhanced therapeutic effect [79]. Paroxetine is almost completely metabolized in animals and the human system [80]. Paroxetine is well absorbed orally and undergoes extensive first pass metabolism that is partially saturable [43]. Its metabolites are pharmacologically inactive *in vivo* [81]. Paroxetine metabolism is mediated in part by CYP2D6, CYP2B6 [55, 82].

Numerous crystal structures have shown that all P450s share a common protein fold consisting of a large triangular prism divided into two domains. The α -helical domain (the helices are labeled in the literature A–L) with most of the helices clustered together. The smaller β -sheet domain (the sheets are labeled in the literature 1–4) (Figure 2) [83]. The first structure of a mammalian P450 was determined in the 2000 [84]. According to X-ray crystal structure measurements some P450s adopt multiple conformations, whereas other P450s appear in single conformation. Consequently, it is difficult to predict how P450s will behave in contact with a new compound [75, 76]. Active site of all P450s forms a cavity concealed within the protein molecule [85] (Figure 2). A heme coordination bond is also characteristic of each P450, combining a positively charged iron ion with a negatively charged thioplane sulphur atom [86] (Figure 2). This iron-cysteine bond is the basis of redox states in which iron ion can access during P450 catalysis, resulting in a complex catalytic cycle of P450 enzymes. In each P450, two highly synchronized electron transfer steps are required to enable the P450 catalytic cycle to reach the production stage [87] (Figure 2).

The structural studies available in the literature, reveals that in the structure of paroxetine are two possible pharmacophore points for interaction with P450: methylenedioxy moiety and secondary amine moiety of piperidine. Therefore, two possible routes of P450 inactivation by paroxetine are allowed. One involves the hydroxylation of C-H at the site of methylenedioxy moiety and the second is N-H

hydroxylation. Both C-H and N-H hydroxylation reaction can proceed via oxygen rearrangement or hydrogen atom transfer [88].

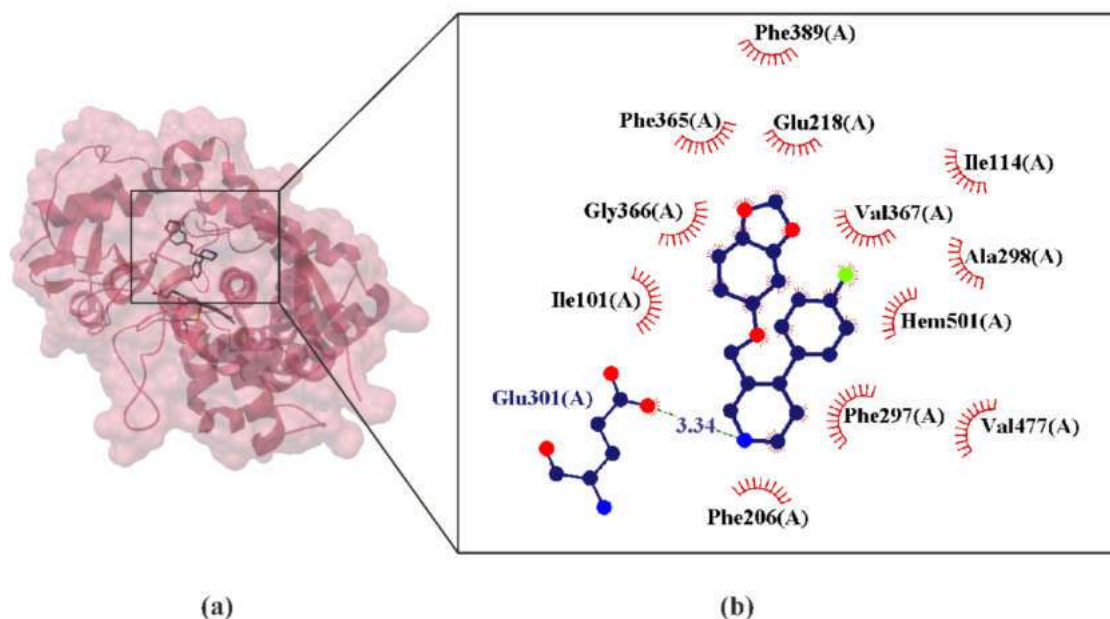


Figure 2. X-ray structure of paroxetine (8PR505) bind in the active site cavity of the CYP2B4 crystal (a) with the enlarged area showing the structural elements around the ligand-binding site (PDB ID: 4JLT, 2.14 Å) [55]. Residues that form hydrogen bonds (dashed lines) with paroxetine are shown in ball-and-stick representation with the interatomic distances shown in Å. Residues forming van der Waals interactions with paroxetine are shown as labeled arcs with radial spokes that point toward the ligand atoms (b).

4.1.1 Paroxetine as CYP2D6 inhibitors

The CYP2D6 isoenzyme is highly polymorphic and inhibited by several small molecules and clinically important pharmaceuticals [89, 90]. The CYP2D6 metabolizes antidepressants, antipsychotics, analgesics, β -blockers, antiarrhythmics. Paroxetine is both a substrate and an inhibitor of cytochrome isoenzyme CYP2D6 [81]. CYP2D6 metabolized paroxetine via demethylation of the methylenedioxy group of methylenedioxyphenol. This reaction involves oxidation of the methylene bridge to a species that forms a tight, but reversible, complex with the heme iron atom [91]. Paroxetine also has the highest inhibitory constant for CYP2D6 of all antidepressants ($K_i = 0.065$) [89]. Clinical drug interaction studies show that paroxetine can inhibit the metabolism of drugs metabolized by CYP2D6 such as: desipramine, risperidone, and atomoxetine [92]. This extremely high inhibitory binding constant or affinity explains paroxetine's high interaction profile with substrates for CYP2D6 [93].

Multiple drug therapy is a common therapeutic practice, particularly in patients with several diseases or conditions. Breast cancer is highly associated with depression and therefore requires antidepressant therapy. In animal studies, antidepressants were observed to increase the incidence and growth of breast cancer in mice. It was suggested then that it is related to the inhibition of enzymes involved in the metabolism of carcinogens and estrogens. The inhibition of the isoenzyme CYP2D6 leads to an increase in their concentrations and serum levels, which increases the risk of breast cancer [42]. Since the early 1990s, many epidemiological studies have been carried out involving women who have been using antidepressants and have been diagnosed with breast cancer. The results obtained were interpreted differently, some studies concluded that there is no association between antidepressant use and breast cancer, while others came to the entirely opposite conclusion [94]. So far, no unequivocal position has been established. Paroxetine has been shown to have estrogenic effects (mimicking estrogen at the estrogen receptors) which may potentially affect the endocrine system and the

development of breast tumors in women. Nevertheless, there is no clinically valid evidence for this [95, 96].

The crystal structure of CYP2D6 was resolved in 2006 at 3 Å resolution [97]. The structure of CYP2D6 has a well-defined active site cavity above the hem, the shape of which is compared in the literature to the shape of the "right foot". The "heel" of the foot-shaped cavity lies above the heme, the foot "arch" is formed by the Phe-120 side chain, while the "ball" is bordered by residues from the B'-C loop and the N-terminal end of the I helix. Such detailed information makes it possible to use computational modelling techniques e.g. docking in the development of drugs involving these CYPs [97].

4.1.2 Paroxetine as CYP2B6 inhibitors

The CYP2B6 participates in the metabolism of a wide range of drug classes including antiretrovirals, antidepressants, anesthetics, anticancer agents and antismoking agents. There is some evidence that its substrates generally contain a basic N atom and planar aromatic ring [83]. A good example includes bupropion, cyclophosphamide, ifosfamide, pethidine, ketamine and propofol [89]. This is because this enzyme metabolizes a number of drug substrates, which are usually non-planar, neutral or weakly basic, with one or two hydrogen bonding acceptors [98]. Paroxetine also has the highest inhibitory constant for CYP2B6 of all antidepressants ($K_i = 1.03 \mu\text{M}$). The inhibitory constant for CYP2D6, on the other hand, is lower compared to CYP2B6, but it is still high [93]. These high inhibitory binding constants explain paroxetine's high interaction profile with substrates for CYP2D6 and CYP2B6 [83].

Paroxetine is also a potent inhibitor of CYP3A4 with multiple CYP3A4 substrate interactions. [42, 99]. In humans, secondary amine xenobiotics are catalytically metabolized by P450s leading to the formation of hydroxylamines [88].

4.1.3 Paroxetine as CYP2B4 inhibitors

No crystalline structure of paroxetine binds with human's CYP2D6 and CYP2B6 has been obtained so far [55]. However, in the Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB) base is deposited the crystal of the paroxetine complex with CYB2B4 [83]. The CYP2B4 catalyst has extremely similar structure to CYP2B6 with the only difference in residue 363, which is Leu in CYP2B6 and Ile in CYP2B4. In particular, the CYP2B4 tertiary structure is the most plastic (i.e. the largest degree of structural flexibility) of any P450 studied by X-ray crystallography [100]. Since the crystal of the paroxetine complex is deposited in the RCSB base with CYB2B4, it seems reasonable to treat it as an appropriate approximation of the interaction of paroxetine with CYP2B4 as well as with CYP2B6 (Figure 2).

5. Paroxetine as MAT inhibitions

Selective serotonin reuptake inhibitors (SSRI) are clinically prescribed antidepressants that act by increasing the local concentration of neurotransmitter at synapses and in extracellular spaces via blockade of the serotonin transporter (SERT) [53]. SERT is a member of the neurotransmitter sodium symporter (NSS) family of transporters. The NSS also includes two more catecholamine transporters such as: the dopamine (DAT) and norepinephrine (NET) transporters [101] and some amino acid transporters such as: glycine transporter (GlyT), and γ -aminobutyric acid (GABA), transporter (GAT), leucine transporter (LeuT) and osmolytes such as: betaine, creatine [102, 103]. Inhibitors of the three monoamine transporters (MATs) increase the extracellular concentration of monoamines, and are widely used in the treatment of psychiatric diseases and as illicit psychostimulant drugs [104].

Paroxetine is an SSRI that exhibits the highest known binding affinity for the central site of SERT (for SERT $\approx 70.2 \pm 0.6 \text{ pM}$, for DAT $\approx 490 \pm 20.0 \text{ nM}$, for NET $\approx 40 \pm 0.2 \text{ nM}$) [105]) compared to any other currently prescribed antidepressants [54]. The selectivity profile of MAT inhibitors across NET, DAT and SERT is critical for their therapeutic profile and/or abuse potential. Binding studies have

demonstrated that antidepressants are from 300 to 3,500 times more selective for SERT over NET, and generally have low affinity for DAT (from 7800 to 0 times) [106]. Paroxetine acts as a dual serotonin / norepinephrine uptake inhibitor in higher doses (40 mg/day or more) [46]. Furthermore, there is evidence that paroxetine can also operate as an allosteric modulator of SERT, although not as effectively as escitalopram [107]. In vitro studies in animals suggest that it has weak effects on dopamine neuronal reuptake. It may contribute to emotional flattening, apathy and cognitive slowing in some patients. In vitro radioligand binding studies report that paroxetine has minor affinity for dopamine, α 1-, α 2-, beta-adrenergic-, muscarinic and histamine (H1) receptors [108, 109]. Due to mild anticholinergic actions of paroxetine, the drug may cause the rapid onset of hypnotic and anxiolytic efficacy as well as the occurrence of side effects. Weak antimuscarinic properties may cause sedation, constipation and dry mouth.

The primary target of paroxetine and other SSRI medications is the SERT, which is a type of monoamine transporters serotonin from the synaptic cleft back to the presynaptic neuron [70]. SERT as a target of many psychoactive agents have importance to the etiology of affective disorders [52]. SERT belongs to the solute carrier 6 family of transporters (SLC6) [110]. It is an integral membrane protein that exploits preexisting sodium-, chloride-, and potassium ion gradients to catalyze the thermodynamically unfavorable movement of synaptic serotonin into the presynaptic neuron. The Protein Data Bank provides X-ray structures of the leucine transporter aLeuT (*Aquifex aeolicus* LeuT) [103] and monoamine transporters (MATs): dDAT (*Drosophila* DAT) [111] and hSERT (human SERT) [52] crystallized in 2005, 2013, and 2016. The human NET (hNET) crystal structure has not been obtained yet. The SERT co-transport molecules of serotonin with one Na^+ and Cl^- ions, while in the opposite direction a single potassium K^+ ion is moved. Importantly, hSERT was crystallized in complex with the two prototypical SSRIs, escitalopram and paroxetine [52] (Figure 3).

Analysis of the crystalized data amino acid sequences provided evidence for 12 transmembrane segments (TM1-TM12), with the amino and carboxy terminal end located in the extracellular vestibule. Due to high similarities to architecture of LeuT this TM1-12 arranged often is so-called LeuT-like structural fold. This pattern is characterized by two inverted 5-TM repeats. The location of drug binding sites in crystallized MATs is determined according to the scheme originally determined for LeuT by Sørensen et al. [112] in two separate regions. They are marked as S1 and S2 pockets. The former is located approximately halfway across the membrane bilayer and the latter is located in the extracellular vestibule. The S1 site is the central substrate binding pocket which defines the primary binding region in NSSs, while the S2 is an allosteric site approximately 13 Å from the S1. The S1 is composed of three subsites: formally called A, B, C (Figure 3) [54]. From a chemical point of view all these subsites represent different nature: A is a polar region surrounding Asp98 (side chains from TMs 1, 6, and 8), whereas subsites B and C are largely hydrophobic regions. B regions are located opposite to subsites C. B regions are formed by residues from TMs 3 and 8. Subsite C is formed by TMs 3, 6 and 10 [113]. In the early 2016s the binding mode of paroxetine at the S1 SERT site was investigated simultaneously by two teams: Coleman et al. [52, 53] (Figure 3) and Davis et al. [70]. The data obtained from these studies are inconclusive, the binding site and orientation of paroxetine in SERT remain controversial.

The non-planar structure of the ligand (as in the case of paroxetine, Figure 1) causes the differences between binding pose of ligand at the binding site obtained by different methods [114]. The piperidine, benzodioxol, and fluorophenyl substituents of paroxetine were present by [52, 53] reside in subsites A, B, and C of the S1 site, respectively – a pose commonly denote by many authors as ABC (Figure 3). While in the homology studies conducted by Davis et al. has proposed an orientation “flipped” from that in the ABC pose i.e. the piperidine, benzodioxol, and fluorophenyl substituents of paroxetine reside in subsites A, C, and B of the S1 site, respectively (often donated ACB) [70]. Additionally, a combination of the pharmacological, biochemical and mutagenesis data suggest that amino acids implicated in high-affinity paroxetine binding may not overlap with those thought to be involved in recognizing other inhibitors [70, 102].

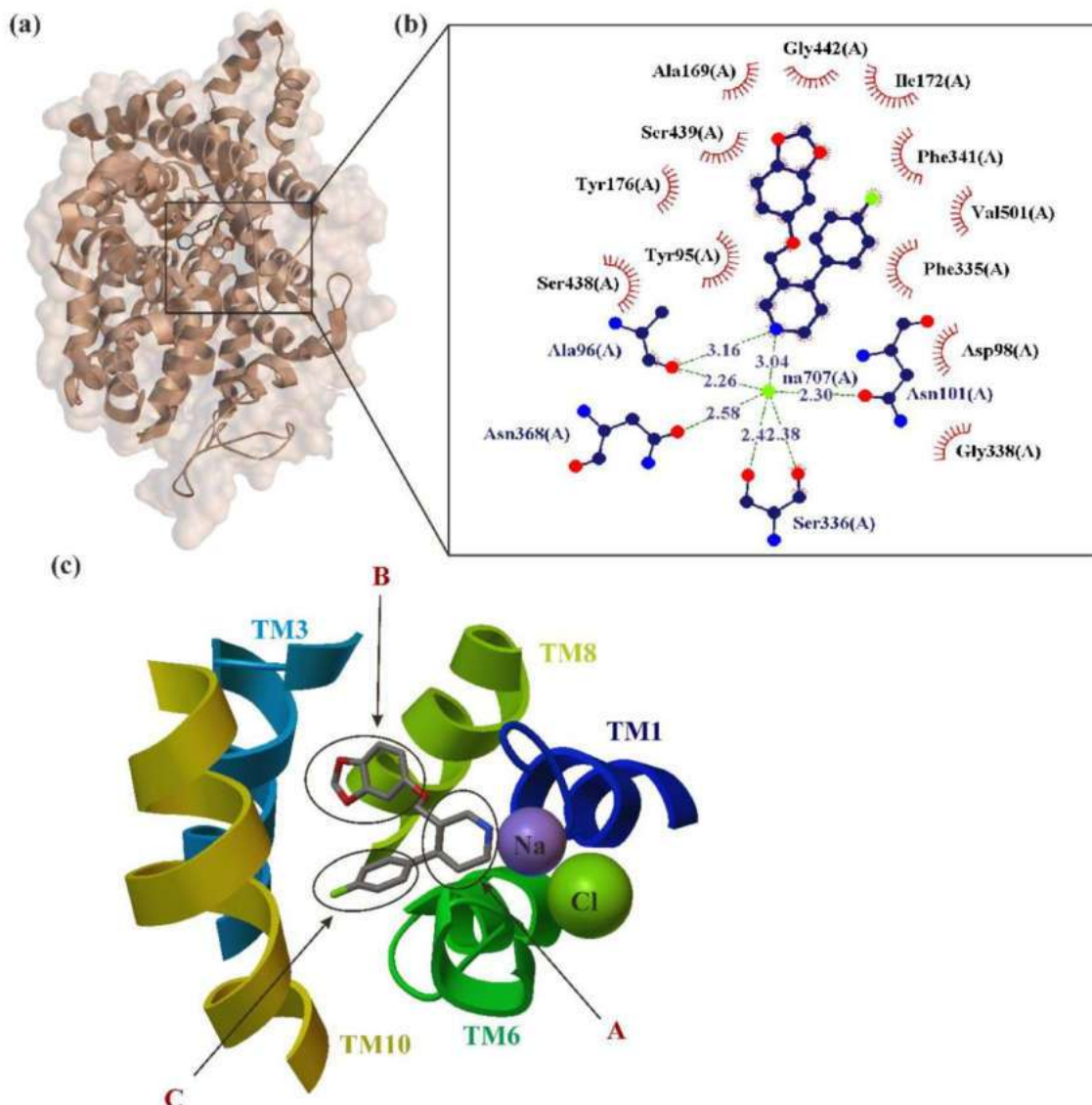


Figure 3. X-ray structure of paroxetine bind in the binding site of the SERT crystal (a) with the enlarged area showing the structural elements around the ligand-binding site (PDB ID: 5i6x, 3.14 Å) [52]. Residues that form hydrogen bonds (dashed lines) with paroxetine are shown in ball-and-stick representation with the interatomic distances shown in Å. Residues forming van der Waals interactions with paroxetine are shown as labeled arcs with radial spokes that point toward the ligand atoms (b). Schematic representation of drug interactions in the primary binding pocket of SERT (c) [54].

6. Paroxetine as kinase GRK2 inhibitors

Currently, there are five main protein families, which are key therapeutic targets for most drugs available on the world market. G-protein-coupled receptors (GPCRs) are integral membrane proteins that relay external signals into the cytoplasm of the cell. GPCRs are estimated to be the main therapeutic target for about a third of prescription drugs [115, 116]. They are key regulators of cell physiology and control processes ranging from glucose homeostasis to contractility of the heart. A major mechanism for the desensitization of activated GPCRs is their phosphorylation by GPCR kinases (GRKs). Overexpression of G-protein coupled receptor kinase 2 (GRK2) is strongly linked to both the healthy and failing heart, and it has long been considered a therapeutic target for the treatment of cardiovascular disease [117]. The GRK2 originally known as β -adrenergic receptor kinase 1 (β ARK-1), is the first GRK cytoplasmic protein identified in the heart [118]. It belongs to a group of serine/threonine kinases that

have a relevant role in the identification and phosphorylation of activated GPCRs [119]. Accordingly, inhibition of GRK2 is considered an important drug target in the treatment of heart failure [120].

From a physiological point of view, the autonomic nervous system affects the frequency of heart contractions: the sympathetic system accelerates heart function while the parasympathetic system decelerates it. In response to a failing heart, the sympathetic nervous system increases the level of circulating catecholamines (norepinephrine and adrenaline). The work of the heart is also affected by β adrenergic receptors (β AR) [121]. There are four types of action β receptors on myocardial cells. These include the following effects: inotropic, chronotropic, bathmotropic, dromotropic. The first two determine the strength and frequency of myocardial contraction, the third affects the threshold of excitability of myocardial cells and the latter is responsible for the rate of conduction in the heart muscle [122]. Binding catecholamines in cardiomyocytes initiates downstream signaling to increase the contraction force of the heart muscle (i.e. inducing a positive inotropic effect) [123]. In the failing heart, activation of β ARs also leads to (upregulation) increase in the number of GRK2 and GRK5, which in turn leads to uncoupling of the β ARs from G proteins, decreased β ARs at the cellular membrane, and decreased cardiac output in response to hormonal stimulation [124–126]. Studies of animal models have shown that reducing GRK2 levels is beneficial in preventing heart failure by renormalizing catecholamine and β AR levels of cell surfaces and improving heart function [127, 128].

Paroxetine exhibits 50/60-fold higher selectivity for GRK2 versus other GRKs (such as GRK1 and GRK5) [56]. Paroxetine hydrochloride, was identified as a modest GRK2 inhibitor with an IC_{50} of 1.4 μ M [118, 127]. It is worth emphasizing that other compounds from the SSRI group have shown no effect in *in vitro* kinase tests or *ex vivo* or *in vivo* myocyte contractility [57]. Due to this paroxetine (or a paroxetine derivative) in the future could be used in heart failure treatment.

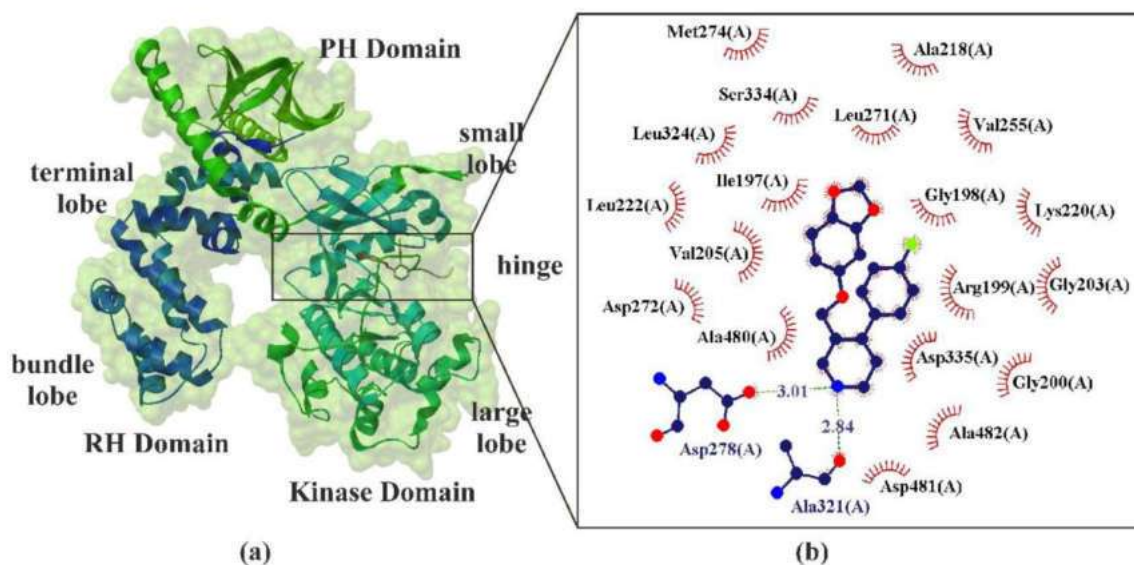


Figure 4. X-ray structure of paroxetine bind in the hinge region of the GRK2 (a) with the enlarged area showing the structural elements around the ligand-binding site (PDB ID: 3V5W, 2.07 Å) [56, 57]. Residues that form hydrogen bonds (dashed lines) with paroxetine are shown in ball-and-stick representation with the interatomic distances shown in Å. Residues forming van der Waals interactions with paroxetine are shown as labeled arcs with radial spokes that point toward the ligand atoms (b).

The GRK2 is a multidomain protein organized in several domains and regions (Figure 4). It consists of three distinct domains: an RGS homology i.e. RH domain, a protein kinase domain, and a pleckstrin homology i.e. PH domain. The RH domain has two subdomains often referred to as the terminal and bundle lobes, whereas the kinase domain is composed of small and large lobes. The terminal lobe of the RH domain also forms an extensive hydrophobic interface with the PH domain. The RH domain is the protein region through which GRK2 binds $G\beta\gamma$. The RH domain participates in interactions with both

the kinase and the PH domains, thus playing an important role in the regulation of protein activity. The kinase domains containing the ATP-binding pocket, consist of: a β -sheet included in small-terminal lobe (also called N-lobe), and an α -helix dominating the large-terminal lobe (also called C-lobe). Both lobes regions are connected via flexible hinge region [129, 130]. Most small molecule kinase inhibitors target the ATP-binding site (Figure 4). The crystal structure of the GRK2-paroxetine-G $\beta\gamma$ complex, revealed that paroxetine binds in the active site of GRK2 (Figure 4) and stabilizes the kinase domain in a novel conformation in which a unique regulatory loop forms part of the ligand binding site. It was found that paroxetine inhibiting GRK2 increases contractility in isolated cardiomyocytes as well as in myocardial β AR inotropic reserve in living mice [57].

7. Paroxetine as Ebolavirus inhibitors

Ebolavirus (EBOV) belong to the family Filoviridae and cause severe, often fatal, diseases e.g. Ebola hemorrhagic fever (EHF) in humans and other mammals, also known as Ebola virus disease (EVD, ICD-10-CM code: A98.4 [131]). EHF is characterized by rapid disease progression and high risk of death, killing between 25 and 90 % of those infected, with an average of about 50 % [132]. EBOV has caused the majority of human deaths from EVD, and was the cause of the 2013–2016 epidemic in western Africa [133], which resulted in at least 28,646 suspected cases and 11,323 confirmed deaths [132]. There are currently no approved therapeutic drugs or vaccines for the disease [134].

EBOV contains single-stranded negative RNA linear genome, about 18-19 kb in size and encode 7 genes such as: nucleoprotein (NP), viral protein 35 (VP35), viral protein 40 VP40, viral protein 30 VP30, viral protein 24 (VP24), polymerase (L), and glycoprotein (GP). Fatal human cases of EHF are exemplified by very high viral titers in the blood, liver, and spleen as well as profound immunosuppression [135].

The mechanism of EBOV inhibition is largely unknown. EBOV has a membrane envelope decorated by trimers of a glycoprotein (GP, cleaved by furin to form GP1 and GP2 subunits, Figure 2), which is solely responsible for host cell attachment, endosomal entry and membrane fusion. The trimeric transmembrane GP spike, each approximately 7-10 nm long and spaced at approximately 10 nm intervals, are presented on the surface of the virion and are accountable for cellular attachment and entry. EBOV entry into the cells is initiated by the interaction of the viral GP with receptors on the surface of host cells, and then internalized via macropinocytosis pathway [136]. GP is thus a primary target for the development of antiviral drugs. Crystallographic studies have shown that five chemically divergent EBOV inhibitors, such as ibuprofen (pKi \approx 2.22) [137], benztropine (pKi \approx 2.89), bepridil (pKi \approx 3.54), paroxetine (pKi \approx 3.19, Figure 2) and sertraline (pKi \approx 3.02), interact directly with the Ebolavirus glycoprotein [59]. Binding of these drugs destabilizes the protein, suggesting that it may be an inhibitory mechanism. The study of toremifene (anticancer drug) revealed the binding affinities (pKi \approx 4.80, determined by thermal shift assay) correlate with the protein–inhibitor interactions as well as with the antiviral activities determined by virus cell entry assays, supporting the hypothesis that these drugs inhibit viral entry by binding the GP and destabilizing the prefusion conformation [137].

The crystal structure of paroxetine-EBOV GP complex was determined at 2.4 Å resolution, with good R-factors and stereochemistry. GP1 has three distinct domains: ●) the receptor binding domain (RBD); ●) the glycan cap; and ●) the heavily O-linked glycosylated mucin-like domain (MLD). It is predominantly composed of β -strands, forming a large semi-circular groove at the centre of the subunit. EBOV-GP forms GP-containing microvesicles, so-called virosomes, which are secreted from GP-expressing cells. However, determinants of GP-virosome release and their functionality are poorly understood. RBD promote GP-virosome secretion, while tetherin suppresses GP-virosomes by interactions involving the GP-transmembrane domain [138]. RBD is responsible for interacting with one or more cellular receptors. It is proof that EBOV-GP-virosomes is immunomodulatory and act as decoys for EBOV-neutralizing antibodies. The glycan cap could protect the receptor binding sites from antibodies, and interacts with the internal fusion loop of GP2 which is critical for membrane fusion. In

the fusion process, GP2 undergoes conformational changes. Paroxetine binds to GP with its benzodioxol group Figure 5 and builds interactions with not only the side-chains of Val66,

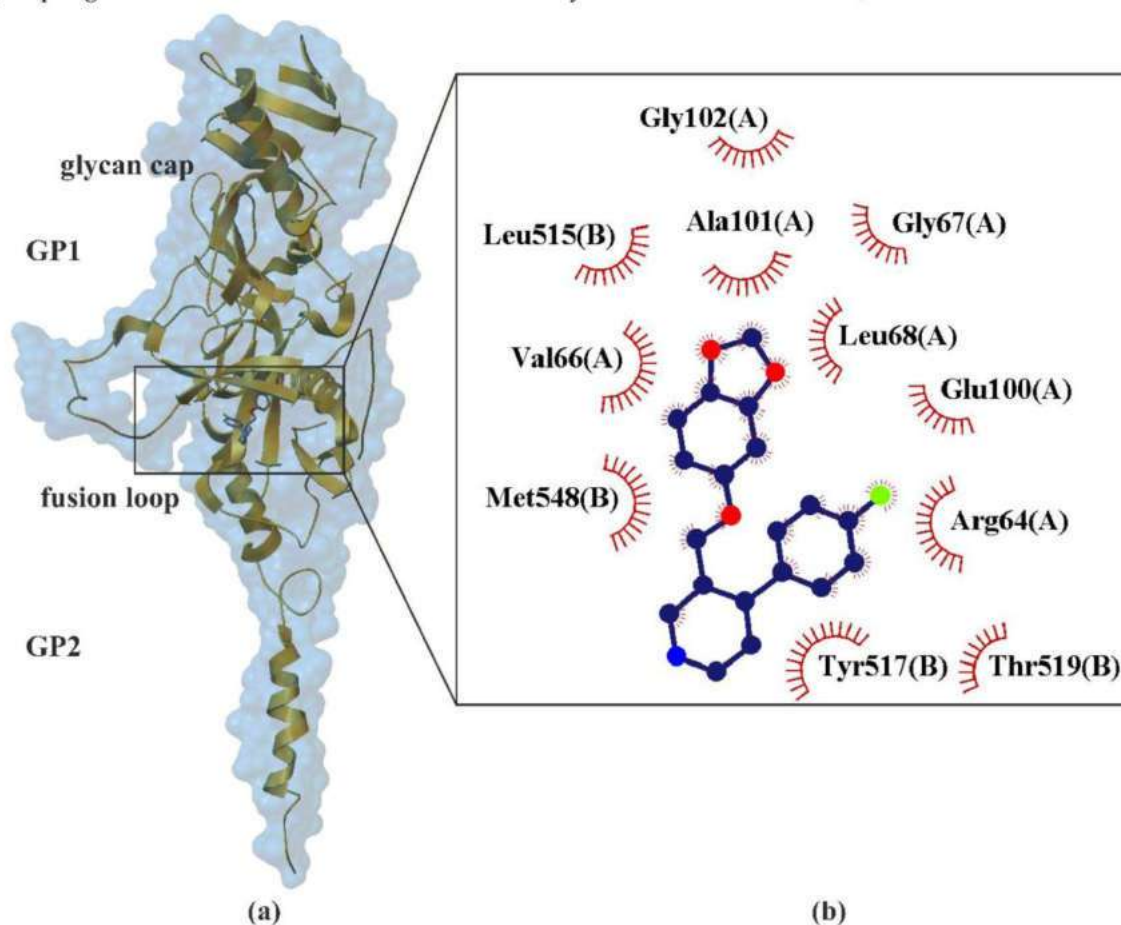


Figure 5. X-ray structure of paroxetine bind in the hinge region of the EBOV GP (a) with the enlarged area showing the structural elements around the ligand-binding site (PDB ID: 6F6L, 2.40 Å) [59]. Residues that form hydrogen bonds (dashed lines) with paroxetine are shown in ball-and-stick representation with the interatomic distances shown in Å. Residues forming van der Waals interactions with paroxetine are shown as labeled arcs with radial spokes that point toward the ligand atoms (b).

Ala101, Leu515, Tyr517, and Met548 but also with the main-chains of Gly67 and Gly102 and side-chain of Leu68 Figure 5 [59]. These results suggest that inhibitor binding destabilizes GP and triggers premature release of GP2, thereby preventing fusion between the viral and endosome membranes. This is an analogous way of binding paroxetine from EBOV GP to previously confirmed for other compounds including toremifene and ibuprofen which provides additional confirmation of the EBOV GP inhibition mechanism [137]. Given the weak inhibitory properties (low pKi) of the medicines tested so far, they are not suitable for reducing EBOV infection. Nevertheless, studies on the structures of the acquired complexes reveal the inhibition mechanism and can guide the development of more powerful anti-EBOV drugs.

8. Paroxetine as KIT and JAK inhibitors

Paroxetine can influence a variety of cancers including brain tumor [139], colon cancer [140], and breast cancer [141] by blocking some protein kinase signaling pathways involved in the tumorigenesis [142].

It has been clinically observed that paroxetine has strong cytotoxicity on human tumor cell lines. This is kinase pathways involved in tumorigenesis. Many studies have established that this is due to

the structural similarities (size, shape, physicochemical properties, Figure 6) of paroxetine with many known kinase inhibitors. Consequently, it is not surprising that paroxetine is very compatible with the kinase active site [142]. A good example of paroxetine's similarity are sunitinib, approved a multitargeted tyrosine-kinase inhibitor (KIT inhibitor) [143, 144] and tofacitinib (approved Janus kinase inhibitor (JAK inhibitor)) [145] (Figure 6). Sunitinib (ATC code: L01XE04 [146]), a multitargeted tyrosine-kinase inhibitor, which is approved by both US and EU regulatory agencies for clinical use, extends survival of patients with metastatic renal-cell carcinoma and gastrointestinal stromal tumors, but concerns have arisen about its cardiac safety [143, 147, 148]. Tofacitinib (ATC code: L04AA29 [146]) is a Janus kinase inhibitor currently approved for the treatment of rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis, and ulcerative colitis [145, 149, 150].

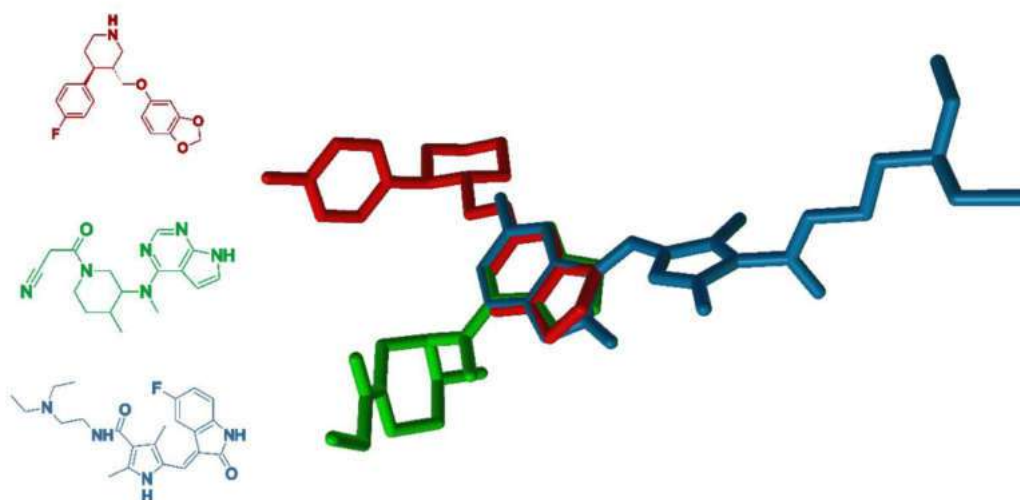


Figure 6. Superimposing of the paroxetine with selected KIT and JAK structure inhibitors: paroxetine (ATC code: N06AB05 [146], SSRI inhibitor, red), sunitinib (ATC code: L01XE04; [146] KIT inhibitor, blue) and tofacitinib (ATC code: L04AA29 [146], JAK inhibitor, green).

Tyrosine kinase proteins are a class of proteins with tyrosine kinase activity that catalyzes the transfer of phosphate groups to ATP to the residues of tyrosine of many important proteins, forming protein phosphorylation and then transmitting a signal regulating cell growth, differentiation, death and a number of physiological and biochemical processes [151]. Paroxetine can interact with these kinases in two so-called binding modes: class I and class II [142]. Five kinases in the C-Src ABL, SRC, KIT, MET and FYN family were identified as targets for paroxetine kinase, which can be inhibited strongly or moderately at IC_{50} values at the nanomolar or micromolar level. Binding modelling analysis has shown that paroxetine ligands can adopt class I binding modes to interact with KIT, MET, FYN, and class II when interacting with ABL and SRC kinases. This is possible by creating an intensive network of molecular forces: specific (i.e. hydrogen bonds and π - π /cation- π stackings) and non-specific forces (such as hydrophobic and van der Waals) [152] in complex kinase-inhibitor interfaces. The division into classes of bonding modes is due to the location of piperidine moieties of paroxetine at the place of active kinase. In class I piperidine moieties of paroxetine is packed against active site kinase. While in class II the same molecular fragment of paroxetine adopts the opposite binding mode. It seems noteworthy that paroxetine class I binding mode shows much higher inhibition potential than that of class II [142].

9. Conclusions and Perspective

Recently, there has been a steadily and rapidly increasing number of prescriptions for approved and unapproved drugs for depression. This is a particularly important issue when it concerns children and young people [9]. This provides the basis for extensive research. In our opinion, we should constantly discuss and analyze current reports on drugs that are used in daily clinical practice as off-

label drugs much more often than others. Indisputable paroxetine belongs to this group of drugs. It is important to be aware that the use of off-label medicines is a multidirectional issue. Sometimes off-label use means a change in the repurpose of the drug e.g. finding novel therapeutic indications different from the ones for which a drug was already approved [153]. This may also mean unusual use of the drug. This includes, in particular, the use of a different dose, duration of use, frequency of dosing, use of another method of administration (e.g. orally instead of intravenously) or use by another group of patients (e.g. children instead of adults) [15].

Modern scientific research in the medical and health sciences is largely based on the results of research related to the achievements of recent decades and in particular the knowledge of the genomes of both the patient and pathogens. The extraordinary dynamics of the development of this knowledge necessitate the presentation of collective reviews of recent achievements. As we have tried to show in our work, understanding the molecular aspects not only allows for a better understanding of the mechanisms of action of drugs, but also contributes to the creation of new research directions. The presented analysis of molecular studies of paroxetine based on X-ray methods seems to confirm its special place in modern pharmacotherapy. The presented results of paroxetine studies are associated with every possible aspect of studies on the use of off-label procedures. It is to be hoped that the uniqueness of the structure of paroxetine will allow the development of a new drug in heart failure. Which we think would be a very valuable achievement. A number of studies of paroxetine on the human cell lines of the tumor confirmed its strong cytotoxicity, which generates new opportunities for the search for more drugs in oncology. On the other hand, studies on the EBOV virus indicate the possibility of paroxetine activity among these types of pathogens. Considering the confirmed effect of paroxetine on the nervous system makes it clear that the pharmacological profile of this drug coincides with the key issues of modern medicine. All this creates promising prospects.

Funding: This study was supported by the research grant from the EIRU programme at the NCU entitled EI DEBUTS "Finding and understanding mechanisms of action of selected compounds active on central nervous system monoamine transporters".

Author Contributions: M.K., J.N., L.F., A.N. conceived and directed the project, designed the study, collected the data, analyzed the data, interpreted the results and wrote the manuscript.

Institutional Review Board Statement: No applicable

Informed Consent Statement: No applicable

Data Availability Statement: No applicable

Conflicts of Interest: Declare conflicts of interest or state: The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations

AD	Anxiety Disorders
ADAA	American Society Of Anxiety And Depression
ABL	Abl Tyrosine Kinases
aLeuT	<i>Aquifex Aeolicus</i> Leucine Transporter
ATC code	Anatomical Therapeutic Chemical Classification System
ATP	Adenosine Triphosphate
BBB	Blood Brain Barrier
C-Src ABL	Src Tyrosine Kinases
CYP	Cytochromes P450
CYP1A2	Cytochrome P450 Family 1 Subfamily A Member 2
CYP2B4	Cytochrome P450 Family 2 Subfamily B Member 4
CYP2B6	Cytochrome P450 Family 2 Subfamily B Member 6
CYP2C19	Cytochrome P450 Family 2 Subfamily C Member 19
CYP2C19	Cytochrome P450 Family 2 Subfamily C Member 19
CYP2D6	Cytochrome P450 Family 2 Subfamily D Member 6
CYP3A4	Cytochrome P450 Family 3 Subfamily A Member 4
CYP3A5	Cytochrome P450 Family 3 Subfamily A Member 5
DAT	Dopamine Transporter
dDAT	Drosophila Dopamine Transporter
EBOV GP	Ebolavirus Glycoprotein
EHF	Ebola Hemorrhagic Fever
EVD	Ebola Virus Disease
FDA	Food And Drug Administration
FYN	Fyn Proto-Oncogene, Non-Receptor Tyrosine Kinase
GABA	γ -Aminobutyric Acid
GAD	Generalized Anxiety Disorder
GAT	γ -Aminobutyric Acid Transporter
GlyT	Glycine Transporter
GP	Glycoprotein
GPCR	G-Protein-Coupled Receptors
GRK	G-Protein-Coupled Receptors Kinase
GRK1	G-Protein Coupled Receptor Kinase 1
GRK2	G-Protein Coupled Receptor Kinase 2
GRK5	G-Protein Coupled Receptor Kinase 5
hDAT	Human Dopamine Transporter
HEM	Hemeproteins
hNET	Human Norepinephrine Transporter

hSERT	Human Serotonin Transporter
ICD-10-CM	International Classification Of Diseases, Tenth Revision, Clinical Modification
JAK	Janus Kinase
Ki	Binding Affinity
KIT	Tyrosine-Kinase Inhibitor
L	Polymerase
LeuT	Leucine Transporter
MAT	Monoamine Transporters
MDD	Major Depressive Disorder
MDL	O-linked glycosylated mucin-like domain
MET	Met Proto-Oncogene, Non-Receptor Tyrosine Kinase
NET	Norepinephrine Transporter
NP	Nucleoprotein
NSS	Neurotransmitter Sodium Symporter
OCD	Obsessive-Compulsive Disorder
PD	Panic Disorder
PDB ID	Protein Data Bank Identifier
PDD	Premenstrual Dysphoric Disorder
P-gl	P-Glycoprotein
PTSD	Posttraumatic Stress Disorder
RBD	Receptor Binding Domain
RCSB	Research Collaboratory For Structural Bioinformatics
SAD	Social Anxiety Disorder
SERT	Serotonin Transporter
SLC6	Solute Carrier 6 Family Of Transporters
SRC	Src Proto-Oncogene, Non-Receptor Tyrosine Kinase
SSRI	Selective Serotonin Reuptake Inhibitors
TM	Transmembrane Segment
VP24	Viral Protein 24
VP30	Viral Protein 30
VP35	Viral Protein 35
VP40	Viral Protein 40
βARK-1	β-Adrenergic Receptor Kinase 1

References

- Gmitrowicz, A.; Janas-Kozik, M., *Zaburzenia psychiczne dzieci i młodzieży*. Medical Tribune Polska: Warszawa, 2018; p 87-101.
- https://www.unboundmedicine.com/icd/view/ICD-10-CM/934326/all/F40_F48__Anxiety_dissociative_stress_related_somatoform_and_other_nonpsychotic_mental_disorders Accessed 30 January 2021.
- Rockhill, C., Kodish, I., DiBattisto, C., Macias, M., Varley, C. & Ryan, S., Anxiety Disorders in Children and Adolescents. *Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care* **2010**, 40, 66-99.
- Adaa.org Understand the Facts Anxiety and Depression Association of America. <https://adaa.org/understanding-anxiety> (29 February),
- https://www.unboundmedicine.com/icd/view/ICD-10-CM/943473/all/F40_11__Social_phobia_generalized?q=anxiety+disorder+social Accessed 30 January 2021.
- West, K. B.; Wilbanks, J.; Suveg, C., *Exposure therapy for separation anxiety disorder. Exposure Therapy for Children with Anxiety and OCD: Clinician's Guide to Integrated Treatment*. Academic Press: London, 2020; p 143-153.
- Knappe, S., Beesdo-Baum, K., Fehm, L., Lieb, R. & Wittchen, H., Characterizing the association between parenting and adolescent social phobia. *Journal of Anxiety Disorders*. *Journal of Anxiety Disorders* **2012**, 26, 608-616.
- Heimberg, R., Hofmann, S., Liebowitz, M., Schneier, F., Smits, J., Stein, M., Hinton, D. & Craske, M., Social anxiety disorder in DSM-5. *Depression and Anxiety*. *Depression and Anxiety* **2014**, (6), 472 - 479.
- Bazzano, A. T.; Mangione-Smith, R.; Schonlau, M.; Suttrop, M. J.; Brook, R. H., Off-label prescribing to children in the United States outpatient setting. *Academic Pediatrics* **2009**, 9, (2), 81-88.
- Anatomical Therapeutic Chemical Classification System. <http://www.atccode.com/> Accessed 30 January 2021.
- <https://go.drugbank.com/drugs/DB00715> Accessed 30 January 2021.
- Sharma, S.; Dang, S., Paroxetine loaded PLGA nanoparticles. *Materials Today: Proceedings* **2020**, 28,205-210.
- Tang, S. W.; Helmeste, D., Paroxetine. *Expert opinion on pharmacotherapy* **2008**, 9, (5), 787-794.
- Stone, K. J.; Viera, A. J.; Parman, C. L., Off-label applications for SSRIs. *American Family Physician* **2003**, 68, (3), 498-504.
- Skånland, S. S.; Cieślak-Pobuda, A., Off-label uses of drugs for depression. *European Journal of Pharmacology* **2019**, 865, 172732.
- Laskowski, R. A.; Swindells, M. B., LigPlot+: multiple ligand–protein interaction diagrams for drug discovery. *J. Chem. Inf. Model.* **2011**, 51, 2778–2786.
- https://www.unboundmedicine.com/icd/view/ICD-10-CM/905183/all/F41_1__Generalized_anxiety_disorder?q=300.02 Accessed 30 January 2021.
- <https://www.unboundmedicine.com/icd/search?st=OSS&q=300.3> Accessed 30 January 2021.
- https://www.unboundmedicine.com/icd/view/ICD-10-CM/930155/all/F33__Major_depressive_disorder_recurrent?q=depressive+disorder+major Accessed 30 January 2021.
- https://www.unboundmedicine.com/icd/view/ICD-10-CM/968287/all/F32_81__Premenstrual_dysphoric_disorder?q=disorder+dysphoric+premenstrual Accessed 30 January 2021.
- https://www.unboundmedicine.com/icd/view/ICD-10-CM/929135/all/F43_1__Post_traumatic_stress_disorder_PTSD_?q=f43.1 Accessed 30 January 2021.
- https://www.unboundmedicine.com/icd/view/ICD-10-CM/915404/all/F41_0__Panic_disorder_episodic_paroxysmal_anxiety?q=anxiety+disorder+generalized Accessed 30 January 2021.
- Liu, X.; Li, X.; Zhang, C.; Sun, M.; Sun, Z.; Xu, Y.; Tian, X., Efficacy and tolerability of fluvoxamine in adults with social anxiety disorder: A meta-analysis. *Medicine* **2018**, 97, (28).
- Bandelow, B., Sher, L., Bunevicius, R., Hollander, E., Kasper, S., Zohar, J. & Möller, H., Guidelines for the pharmacological treatment of anxiety disorders, obsessive–compulsive disorder and posttraumatic stress disorder in primary care. *International Journal of Psychiatry in Clinical Practice* **2012**, 16, (77-84).
- Baldwin DS; Anderson IM; Nutt DJ; Bandelow B; Bond A; Davidson JR; den Boer JA; Fineberg NA; Knapp M, S. J.; HU, W., Evidence-based guidelines for the pharmacological treatment of anxiety disorders: recommendations from the British Association for Psychopharmacology. *Journal of Psychopharmacology* **2005**, 19, (6), 567-596

26. Yonkers, K. A.; Gullion, C.; Williams, A.; Novak, K.; Rush, A. J., Paroxetine as a treatment for premenstrual dysphoric disorder. *Journal of Clinical Psychopharmacology* **1996**, *16*, (1), 3-8.
27. Aghakhani K, S. S., Farhidnia N, Fallah F, Successful Suicide in a Child: Depression-Related or ParoxetineInduced? *International Journal of Medical Toxicology and Forensic Medicine* **2016**, *6* (4), 242-6.
28. Lenox R.H., Frazer A., *Neuropsychopharmacology:the fifth generation of progress* Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia **2010**, pp. 1139-1163.
29. Schneeweiss, S.; Patrick, A. R.; Solomon, D. H.; Dormuth, C. R.; Miller, M.; Mehta, J.; Lee, J. C.; Wang, P. S., Comparative safety of antidepressant agents for children and adolescents regarding suicidal acts. *Pediatrics* **2010**, *125*, (5), 876-888.
30. Teicher, M. H.; Glod, C.; Cole, J. O., Emergence of intense suicidal preoccupation during fluoxetine treatment. *The American Journal of Psychiatry* **1990**.
31. Hetrick, S. E.; McKenzie, J. E.; Cox, G. R.; Simmons, M. B.; Merry, S. N., Newer generation antidepressants for depressive disorders in children and adolescents. *Cochrane Database of Systematic Reviews* **2012**, (11).
32. Pozzi, M.; Radice, S.; Clementi, E.; Molteni, M.; Nobile, M., Antidepressants and, suicide and self-injury: causal or casual association? *International Journal of Psychiatry in Clinical Practice* **2016**, *20*, (1), 47-51.
33. Morrison, J.; Schwartz, T. L., Adolescent angst or true intent? Suicidal behavior, risk, and neurobiological mechanisms in depressed children and teenagers taking antidepressants. *Int J Emerg Ment Health* **2014**, *16*, (1), 247-50.
34. Giner, L.; Nichols, C. M.; Zalsman, G.; Oquendo, M. A., Selective serotonin reuptake inhibitors and the risk for suicidality in adolescents: an update. In De Gruyter: 2005.
35. McKeown, R. E.; Cuffe, S. P.; Schulz, R. M., US suicide rates by age group, 1970–2002: an examination of recent trends. *American Journal of Public Health* **2006**, *96*, (10), 1744-1751.
36. Hjalmarsson, L.; Corcos, M.; Jeammet, P., Selective serotonin reuptake inhibitors in major depressive disorder in children and adolescents (ratio of benefits/risks). *L'Encephale* **2005**, *31*, (3), 309-316.
37. Hammad, T. A.; Laughren, T.; Racoosin, J., Suicidality in pediatric patients treated with antidepressant drugs. *Archives of General Psychiatry* **2006**, *63*, (3), 332-339.
38. Termorshuizen, F.; Palmen, S. J.; Heerdink, E. R., Suicide behavior before and after the start with antidepressants: a high persistent risk in the first month of treatment among the young. *International Journal of Neuropsychopharmacology* **2016**, *19*, (2).
39. Wise, J., Antidepressants may double risk of suicide and aggression in children, study finds. *BMJ* **2016**, *352*, i545.
40. Thomsen, P. H., The treatment of child and adolescent depression: a matter of concern? *Acta Psychiatrica Scandinavica* **2007**, *115*, (3), 169-170.
41. Li, X.; Hou, Y.; Su, Y.; Liu, H.; Zhang, B.; Fang, S., Efficacy and tolerability of paroxetine in adults with social anxiety disorder: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Medicine* **2020**, *99*, (14), e19573.
42. Nevels, R. M.; Gontkovsky, S. T.; Williams, B. E., Paroxetine—the antidepressant from hell? Probably not, but caution required. *Psychopharmacology Bulletin* **2016**, *46*, (1), 77.
43. Germann, D., Ma, G., Han, F., & Tikhomirova, A., Paroxetine Hydrochloride. Profiles of Drug Substances. *Excipients and Related Methodology* **2013**, 367-406.
44. Agrawal, N.; Marco-Peiró, S.; Esteve-Romero, J.; Durgbanshi, A.; Bose, D.; Peris-Vicente, J.; Carda-Broch, S., Determination of paroxetine in blood and urine using micellar liquid chromatography with electrochemical detection. *Journal of Chromatographic Science* **2014**, *52*, (10), 1217-1223.
45. Pae, C.-U.; Patkar, A. A., Paroxetine: current status in psychiatry. *Expert Review of Neurotherapeutics* **2007**, *7*, (2), 107-120.
46. Green, B., Focus on paroxetine. *Current Medical Research and Opinion* **2003**, *19*, (1), 13-21.
47. GlaxoSmithKline PAXIL (paroxetine hydrochloride) Tablets and Oral Suspension: PRESCRIBING INFORMATION. <https://www.baumhedlundlaw.com/documents/pdf/dolin-trial-exhibits/JX-3-2007-Paxil-label-prescribing-information.pdf>
48. PAXIL - product monograph. *Compendium of pharmaceuticals and specialties*. Ottawa: Canadian Pharmacists Association **2014**, 1255-60.
49. Patetsos, E.; Horjales-Araujo, E., Treating Chronic Pain with SSRIs: What Do We Know? *Pain Research and Management* **2016**, 1-17.
50. Uttamsingh, V.; Gallegos, R.; Liu, J. F.; Harbeson, S. L.; Bridson, G. W.; Cheng, C.; Wells, D. S.; Graham, P. B.; Zelle, R.; Tung, R., Altering Metabolic Profiles of Drugs by Precision Deuteration: Reducing Mechanism-Based Inhibition of CYP2D6 by Paroxetines. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2015**, *354*, 43–54.

51. Ogata, N.; de Souza Dantas, L. M.; Crowell-Davis, S. L., Selective serotonin reuptake inhibitors. *Veterinary psychopharmacology* **2019**, 103-128.
52. Coleman, J. A.; Green, E. M.; Gouaux, E., X-ray structures and mechanism of the human serotonin transporter. *Nature* **2016**, 532, (7599), 334-339.
53. Coleman, J. A.; Gouaux, E., Structural basis for recognition of diverse antidepressants by the human serotonin transporter. *Nature structural & molecular biology* **2018**, 25, (2), 170-175.
54. Coleman, J. A.; Navratna, V.; Antermite, D.; Yang, D.; Bull, J. A.; Gouaux, E., Chemical and structural investigation of the paroxetine-human serotonin transporter complex. *eLife* **2020**, 9, e56427.
55. Shah, M. B.; Kufareva, I.; Pascual, J.; Zhang, Q.; Stout, C. D.; Halpert, J. R., A structural snapshot of CYP2B4 in complex with paroxetine provides insights into ligand binding and clusters of conformational states. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2013**, 346, (1), 113-120.
56. Homan, K. T.; Wu, E.; Wilson, M. W.; Singh, P.; Larsen, S. D.; Tesmer, J. J., Structural and functional analysis of G protein-coupled receptor kinase inhibition by paroxetine and a rationally designed analog. *Molecular Pharmacology* **2014**, 85, (2), 237-248.
57. Thal, D. M.; Homan, K. T.; Chen, J.; Wu, E. K.; Hinkle, P. M.; Huang, Z. M.; Chuprun, J. K.; Song, J.; Gao, E.; Cheung, J. Y., Paroxetine is a direct inhibitor of g protein-coupled receptor kinase 2 and increases myocardial contractility. *ACS Chemical Biology* **2012**, 7, (11), 1830-1839.
58. Wang, H.; Goehring, A.; Wang, K. H.; Penmatsa, A.; Ressler, R.; Gouaux, E., Structural basis for action by diverse antidepressants on biogenic amine transporters. *Nature* **2013**, 503, (7474), 141-145.
59. Ren, J.; Zhao, Y.; Fry, E. E.; Stuart, D. L., Target identification and mode of action of four chemically divergent drugs against Ebola virus infection. *Journal of Medicinal Chemistry* **2018**, 61, (3), 724-733.
60. GlobalData UK Ltd Post-Traumatic Stress Disorder (PTSD) – Opportunity Analysis and Forecasts to 2028. https://store.globaldata.com/report/gdhc095poa--post-traumatic-stress-disorder-ptsd-opportunity-analysis-and-forecasts-to-2028/?utm_source=pharma&utm_medium=Research%20Reports&utm_campaign=RSReportPage?utm_source=pharma&utm_campaign=RSHomepage
61. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/43815> Accessed 30 January 2021.
62. <https://www.ccdc.cam.ac.uk/structures/> Accessed 30 January 2021.
63. Pina, M. F. t.; Pinto, J. o. F.; Sousa, J. o. J.; Fábíán, L. s.; Zhao, M.; Craig, D. Q., Identification and characterization of stoichiometric and nonstoichiometric hydrate forms of paroxetine HCl: Reversible changes in crystal dimensions as a function of water absorption. *Molecular Pharmaceutics* **2012**, 9, (12), 3515-3525.
64. Yokota, M.; Uekusa, H.; Ohashi, Y., Structure analyses of two crystal forms of paroxetine hydrochloride. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* **1999**, 72, (8), 1731-1736.
65. <https://spectrabase.com/spectrum/3GQhXHaQFxC> Accessed 30 January 2021.
66. Salsbury, J. S.; Isbester, P. K., Quantitative ¹H NMR method for the routine spectroscopic determination of enantiomeric purity of active pharmaceutical ingredients fenfluramine, sertraline, and paroxetine. *Magnetic Resonance in Chemistry* **2005**, 43, (11), 910-917.
67. <https://mona.fiehnlab.ucdavis.edu/spectra/display/AU152606> Accessed 30 January 2021.
68. Schropp, A., Mory, C., Duflo, T., Pereira, T., Imbert, L. & Lamoureux, F., The right blood collection tube for therapeutic drug monitoring and toxicology screening procedures: Standard tubes, gel or mechanical separator? *Clinica Chimica Acta* **2018**, 488, 196-201.
69. Kaye, C. M.; Haddock, R. E.; Langley, P. F.; Mellows, G.; Tasker, T. C. G.; Zussman, B. D.; Greb, W. H., A review of the metabolism and pharmacokinetics of paroxetine in man. *Acta Psychiatrica Scandinavica* **1989**, 80.
70. Davis, B., Nagarajan, A., Forrest, L., & Singh, S., Mechanism of Paroxetine (Paxil) Inhibition of the Serotonin Transporter. *Scientific Reports* **2016**, 6, 1-13.
71. Wishart, D. S.; Feunang, Y. D.; Marcu, A.; Guo, A. C.; Liang, K.; Vázquez-Fresno, R.; Sajed, T.; Johnson, D.; Li, C.; Karu, N., HMDB 4.0: the human metabolome database for 2018. *Nucleic Acids Research* **2018**, 46, (D1), D608-D617.
72. <https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0014853#identification> Accessed 30 January 2021.
73. Kanehisa, M.; Goto, S., KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Research* **2000**, 28, (1), 27-30.
74. https://www.kegg.jp/dbget-bin/www_bget?dr:D02362 Accessed 30 January 2021.
75. <https://drnelson.uthsc.edu/human.P450.table.html> Accessed 30 January 2021.
76. <https://webchemdev.ncbr.muni.cz/ChannelsDB/> Accessed 30 January 2021.

77. Zanger, U. M.; Schwab, M., Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacology & therapeutics* **2013**, *138*, (1), 103-141.
78. Pelkonen, O.; Mäenpää, J.; Taavitsainen, P.; Rautio, A.; Raunio, H., Inhibition and induction of human cytochrome P450 (CYP) enzymes. *Xenobiotica* **1998**, *28*, (12), 1203-1253.
79. Lin, J. H.; Lu, A. Y., Inhibition and induction of cytochrome P450 and the clinical implications. *Clinical Pharmacokinetics* **1998**, *35*, (5), 361-390.
80. Haddock, R.; Johnson, A.; Langley, P.; Nelson, D.; Pope, J.; Thomas, D.; Woods, F., Metabolic pathway of paroxetine in animals and man and the comparative pharmacological properties of its metabolites. *Acta Psychiatrica Scandinavica* **1989**, *80*, (S350), 24-26.
81. Bourin, M.; Chue, P.; Guillon, Y., Paroxetine: a review. *CNS Drug Reviews* **2001**, *7*, (1), 25-47.
82. Taylor, C.; Crosby, I.; Yip, V.; Maguire, P.; Pirmohamed, M.; Turner, R. M., A Review of the Important Role of CYP2D6 in Pharmacogenomics. *Genes* **2020**, *11*, (11), 1295.
83. Gay, S. C.; Roberts, A. G.; Halpert, J. R., Structural features of cytochromes P450 and ligands that affect drug metabolism as revealed by X-ray crystallography and NMR. *Future Medicinal Chemistry* **2010**, *2*, (9), 1451-1468.
84. Urban, P.; Lautier, T.; Pompon, D.; Truan, G., Ligand access channels in cytochrome P450 enzymes: A review. *International Journal of Molecular Sciences* **2018**, *19*, (6), 1617.
85. Poulos, T. L., Cytochrome P450: molecular architecture, mechanism, and prospects for rational inhibitor design. *Pharmaceutical Research* **1988**, *5*, (2), 67-75.
86. Yosca, T. H.; Ledray, A. P.; Ngo, J.; Green, M. T., A new look at the role of thiolate ligation in cytochrome P450. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry* **2017**, *22*, (2-3), 209-220.
87. Ortiz de Montellano, P. R.; De Voss, J. J., Oxidizing species in the mechanism of cytochrome P450. *Natural Product Reports* **2002**, *19*, (4), 477-493.
88. Kamel, E. M.; Lamsabhi, A. M., The quasi-irreversible inactivation of cytochrome P450 enzymes by paroxetine: a computational approach. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2020**, *18*, (17), 3334-3345.
89. Turpeinen, M.; Zanger, U. M., Cytochrome P450 2B6: function, genetics, and clinical relevance. *Drug Metabolism and Personalized Therapy* **2012**, *27*, (4), 185-197.
90. Wang, H.; Tompkins, L. M., CYP2B6: new insights into a historically overlooked cytochrome P450 isozyme. *Current Drug Metabolism* **2008**, *9*, (7), 598-610.
91. Correia, M. A.; de Montellano, P. R. O., Inhibition of cytochrome P450 enzymes. In *Cytochrome P450*, Springer: 2005; pp 247-322.
92. Stahl, S. M., *Essential psychopharmacology: Neuroscientific basis and practical applications*. Cambridge university press: 2000.
93. Walsky, R. L.; Astuccio, A. V.; Obach, R. S., Evaluation of 227 Drugs for In Vitro Inhibition of Cytochrome P450 2B6. *Drug Metabolism* **2006**, *7*, (7), 705-714.
94. Cho, Y.-W.; Kim, E.-J.; Nyiramana, M. M.; Shin, E.-J.; Jin, H.; Ryu, J. H.; Kang, K. R.; Lee, G.-W.; Kim, H. J.; Han, J., Paroxetine induces apoptosis of human breast cancer mcf-7 cells through ca²⁺-and p38 map kinase-dependent ros generation. *Cancers* **2019**, *11*, (1), 64.
95. Chen, S.; Hsieh, J.-H.; Huang, R.; Sakamuru, S.; Hsin, L.-Y.; Xia, M.; Shockley, K. R.; Auerbach, S.; Kanaya, N.; Lu, H., Cell-based high-throughput screening for aromatase inhibitors in the Tox21 10K library. *Toxicological Sciences* **2015**, *147*, (2), 446-457.
96. Chen, S.; Zhou, D.; Hsin, L.-Y.; Kanaya, N.; Wong, C.; Yip, R.; Sakamuru, S.; Xia, M.; Yuan, Y.-C.; Witt, K., AroER tri-screen is a biologically relevant assay for endocrine disrupting chemicals modulating the activity of aromatase and/or the estrogen receptor. *Toxicological Sciences* **2014**, *139*, (1), 198-209.
97. Rowland, P.; Blaney, F. E.; Smyth, M. G.; Jones, J. J.; Leydon, V. R.; Oxbrow, A. K.; Lewis, C. J.; Tennant, M. G.; Modi, S.; Eggleston, D. S., Crystal structure of human cytochrome P450 2D6. *Journal of Biological Chemistry* **2006**, *281*, (11), 7614-7622.
98. Turpeinen, M.; Raunio, H.; Pelkonen, O., The functional role of CYP2B6 in human drug metabolism: substrates and inhibitors in vitro, in vivo and in silico. *Current Drug Metabolism* **2006**, *7*, (7), 705-714.
99. Zhou, S.-F., Drugs behave as substrates, inhibitors and inducers of human cytochrome P450 3A4. *Current Drug Metabolism* **2008**, *9*, (4), 310-322.
100. Wilderman, R. P.; Halpert, R. J., Plasticity of CYP2B enzymes: structural and solution biophysical methods. *Current drug metabolism* **2012**, *13*, (2), 167-176.
101. Ravna, A. W.; Sylte, I.; Dahl, S. G., Structure and localisation of drug binding sites on neurotransmitter transporters. *Journal of Molecular Modeling* **2009**, *15*, (10), 1155-1164.
102. Navratna, V.; Gouaux, E., Insights into the mechanism and pharmacology of neurotransmitter sodium symporters. *Current Opinion in Structural Biology* **2019**, *54*, 161-170.

103. Yamashita, A.; Singh, S. K.; Kawate, T.; Jin, Y.; Gouaux, E., Crystal structure of a bacterial homologue of Na⁺/Cl⁻-dependent neurotransmitter transporters. *Nature* **2005**, *437*, (7056), 215-223.
104. Andersen, J.; Ringsted, K. B.; Bang-Andersen, B.; Strømgaard, K.; Kristensen, A. S., Binding site residues control inhibitor selectivity in the human norepinephrine transporter but not in the human dopamine transporter. *Scientific Reports* **2015**, *5*, 15650.
105. Cool, D. R.; Leibach, F. H.; Ganapathy, V., High-affinity paroxetine binding to the human placental serotonin transporter. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **1990**, *259*, (2), C196-C204.
106. Tatsumi, M.; Groshan, K.; Blakely, R. D.; Richelson, E., Pharmacological profile of antidepressants and related compounds at human monoamine transporters. *European Journal of Pharmacology* **1997**, *340*, (2-3), 249-258.
107. Hoehn-Saric, R.; Merchant, A.F.; Keyser, M.L., et al Effects of Clonidine on Anxiety Disorders. *Archives of General Psychiatry* **1981**, *38*.
108. Eeke C. M. Leerssen, R. O. T. a. J. M. P. J. B., Severe transient neonatal long QT syndrome due to maternal paroxetine usage: a case report. *Cardiology in the Young* **2019**, 1-2.
109. Patel, N., Wiśniowska, B., Jamei, M., & Polak, S., Real Patient and its Virtual Twin: Application of Quantitative Systems Toxicology Modelling in the Cardiac Safety Assessment of Citalopram. *The AAPS Journal* **2018**, *20*, 6.
110. Rannversson, H.; Andersen, J.; Bang-Andersen, B.; Strømgaard, K., Mapping the binding site for escitalopram and paroxetine in the human serotonin transporter using genetically encoded photo-cross-linkers. *ACS Chemical Biology* **2017**, *12*, (10), 2558-2562.
111. Penmatsa, A.; Wang, K. H.; Gouaux, E., X-ray structure of dopamine transporter elucidates antidepressant mechanism. *Nature* **2013**, *503*, (7474), 85-90.
112. Sørensen, L.; Andersen, J.; Thomsen, M.; Hansen, S. M.; Zhao, X.; Sandelin, A.; Strømgaard, K.; Kristensen, A. S., Interaction of Antidepressants with the Serotonin and Norepinephrine Transporters mutational studies of the S1 substrate binding pocket. *Journal of Biological Chemistry* **2012**, *287*, (52), 43694-43707.
113. Abramyan, A. M.; Slack, R. D.; Meena, S.; Davis, B. A.; Newman, A. H.; Singh, S. K.; Shi, L., Computation-guided analysis of paroxetine binding to hSERT reveals functionally important structural elements and dynamics. *Neuropharmacology* **2019**, *161*, 107411.
114. Kolb, P.; Irwin, J. J., Docking screens: right for the right reasons? *Current Topics in Medicinal Chemistry* **2009**, *9*, (9), 755-770.
115. Hauser, A. S.; Attwood, M. M.; Rask-Andersen, M.; Schiöth, H. B.; Gloriam, D. E., Trends in GPCR drug discovery: new agents, targets and indications. *Nature Reviews Drug Discovery* **2017**, *16*, (12), 829-842.
116. Sriram, K.; Insel, P. A., G protein-coupled receptors as targets for approved drugs: how many targets and how many drugs? *Molecular Pharmacology* **2018**, *93*, (4), 251-258.
117. Dorn, G. W., GRK mythology: G-protein receptor kinases in cardiovascular disease. *Journal of Molecular Medicine* **2009**, *87*, (5), 455-463.
118. Thal, D. M.; Yeow, R. Y.; Schoenau, C.; Huber, J.; Tesmer, J. J., Molecular mechanism of selectivity among G protein-coupled receptor kinase 2 inhibitors. *Molecular Pharmacology* **2011**, *80*, (2), 294-303.
119. Cannavo, A.; Komici, K.; Bencivenga, L.; D'amico, M. L.; Gambino, G.; Liccardo, D.; Ferrara, N.; Rengo, G., GRK2 as a therapeutic target for heart failure. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* **2018**, *22*, (1), 75-83.
120. Keretsu, S.; Bhujbal, S. P.; Cho, S. J., Computational study of paroxetine-like inhibitors reveals new molecular insight to inhibit GRK2 with selectivity over ROCK1. *Scientific Reports* **2019**, *9*, (1), 1-14.
121. Port, J. D.; Bristow, M. R., Altered beta-adrenergic receptor gene regulation and signaling in chronic heart failure. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **2001**, *33*, 887-905.
122. Gordan, R.; Gwathmey, J. K.; Xie, L.-H., Autonomic and endocrine control of cardiovascular function. *World Journal of Cardiology* **2015**, *7*, (4), 204.
123. Sutherland, E. W.; Robison, G. A.; Butcher, R. W., Some aspects of the biological role of adenosine 3', 5'-monophosphate (cyclic AMP). *Circulation* **1968**, *37*, (2), 279-306.
124. Rockman, H. A.; Koch, W. J.; Lefkowitz, R. J., Seven-transmembrane-spanning receptors and heart function. *Nature* **2002**, *415*, (6868), 206-212.
125. Hullmann, J.; Traynham, C. J.; Coleman, R. C.; Koch, W. J., The expanding GRK interactome: Implications in cardiovascular disease and potential for therapeutic development. *Pharmacological Research* **2016**, *110*, 52-64.
126. Lymperopoulos, A.; Rengo, G.; Funakoshi, H.; Eckhart, A. D.; Koch, W. J., Adrenal GRK2 upregulation mediates sympathetic overdrive in heart failure. *Nature Medicine* **2007**, *13*, (3), 315-323.
127. Waldschmidt, H. V.; Homan, K. T.; Cato, M. C.; Cruz-Rodríguez, O.; Cannavo, A.; Wilson, M. W.; Song, J.; Cheung, J. Y.; Koch, W. J.; Tesmer, J. J., Structure-based design of highly selective and potent G protein-

- coupled receptor kinase 2 inhibitors based on paroxetine. *Journal of Medicinal Chemistry* **2017**, *60*, (7), 3052-3069.
128. Raake, P. W.; Vinge, L. E.; Gao, E.; Boucher, M.; Rengo, G.; Chen, X.; DeGeorge Jr, B. R.; Matkovich, S.; Houser, S. R.; Most, P., G protein-coupled receptor kinase 2 ablation in cardiac myocytes before or after myocardial infarction prevents heart failure. *Circulation Research* **2008**, *103*, (4), 413-422.
129. Lodowski, D. T.; Barnhill, J. F.; Pyskadlo, R. M.; Ghirlando, R.; Sterne-Marr, R.; Tesmer, J. J., The role of G $\beta\gamma$ and domain interfaces in the activation of G protein-coupled receptor kinase 2. *Biochemistry* **2005**, *44*, (18), 6958-6970.
130. Murga, C.; Arcones, A. C.; Cruces-Sande, M.; Briones, A. M.; Salaiques, M.; Mayor Jr, F., G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) as a potential therapeutic target in cardiovascular and metabolic diseases. *Frontiers in Pharmacology* **2019**, *10*, 112.
131. [https://www.unboundmedicine.com/icd/view/ICD-10-CM/888247/all/Ebola%20\(virus\)](https://www.unboundmedicine.com/icd/view/ICD-10-CM/888247/all/Ebola%20(virus)) Accessed 30 January 2021.
132. Ebola virus disease World Health Organization. Raprot Retrieved 6 June 2019. <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/ebola-virus-disease> Accessed 30 January 2021.
133. Na, W.; Park, N.; Yeom, M.; Song, D., Ebola outbreak in Western Africa 2014: what is going on with Ebola virus? *Clinical and Experimental Vaccine Research* **2015**, *4*, (1), 17.
134. Jagga, S.; Sharma, A. R.; Chakraborty, C.; Lee, S.-S., Ebola virus disease: Recent advances in diagnostics and therapeutics. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* **2019**, *12*, (9), 385.
135. Hartman, A. L.; Bird, B. H.; Towner, J. S.; Antoniadou, Z.-A.; Zaki, S. R.; Nichol, S. T., Inhibition of IRF-3 activation by VP35 is critical for the high level of virulence of ebola virus. *Journal of Virology* **2008**, *82*, (6), 2699-2704.
136. Yu, D.-S.; Weng, T.-H.; Wu, X.-X.; Wang, F. X.; Lu, X.-Y.; Wu, H.-B.; Wu, N.-P.; Li, L.-J.; Yao, H.-P., The lifecycle of the Ebola virus in host cells. *Oncotarget* **2017**, *8*, (33), 55750.
137. Zhao, Y.; Ren, J.; Harlos, K.; Jones, D. M.; Zeltina, A.; Bowden, T. A.; Padilla-Parra, S.; Fry, E. E.; Stuart, D. I., Toremifene interacts with and destabilizes the Ebola virus glycoprotein. *Nature* **2016**, *535*, (7610), 169-172.
138. Nehls, J.; Businger, R.; Hoffmann, M.; Brinkmann, C.; Fehrenbacher, B.; Schaller, M.; Maurer, B.; Schönfeld, C.; Kramer, D.; Hailfinger, S., Release of immunomodulatory Ebola virus glycoprotein-containing microvesicles is suppressed by tetherin in a species-specific manner. *Cell Reports* **2019**, *26*, (7), 1841-1853. e6.
139. Rooney, A.; Grant, R., Pharmacological treatment of depression in patients with a primary brain tumour. *Cochrane Database of Systematic Reviews* **2010**, (3).
140. Jang, W. J.; Jung, S. K.; Vo, T. T. L.; Jeong, C. H., Anticancer activity of paroxetine in human colon cancer cells: Involvement of MET and ERBB3. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* **2019**, *23*, (2), 1106-1115.
141. Ciccarelli, M.; Sorriento, D.; Fiordelisi, A.; Gambardella, J.; Franco, A.; del Giudice, C.; Oliveti, M., Pharmacological inhibition of GRK2 improves cardiac metabolism and function in experimental heart failure. *Esc Heart Failure* **2020**, *7*, 1571-1584.
142. Zhou, W.; Yang, H.; Wang, H., Inverse in silico-in vitro fishing of unexpected paroxetine kinase targets from tumor druggable kinome. *Journal of Molecular Modeling* **2020**, *26*, (8), 1-9.
143. Hao, Z.; Sadek, I., Sunitinib: the antiangiogenic effects and beyond. *OncoTargets and Therapy* **2016**, *9*, 5495.
144. Faivre, S.; Demetri, G.; Sargent, W.; Raymond, E., Molecular basis for sunitinib efficacy and future clinical development. *Nature reviews Drug Discovery* **2007**, *6*, (9), 734-745.
145. Plante, J.; Eason, C.; Snyder, A.; Elston, D., Tofacitinib in the treatment of lichen planopilaris: A retrospective review. *Journal of the American Academy of Dermatology* **2020**, *83*, (5), 1487-1489.
146. FDA Drug Approval Package. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/99/20-936_Paxil.cfm Accessed 30 January 2021.
147. Chow, L. Q.; Eckhardt, S. G., Sunitinib: from rational design to clinical efficacy. *Journal of Clinical Oncology* **2007**, *25*, (7), 884-896.
148. Wang, D.; Xiao, F.; Feng, Z.; Li, M.; Kong, L.; Huang, L.; Li, H.; Liu, F.; Zhang, H.; Zhang, W., Sunitinib facilitates metastatic breast cancer spreading by inducing endothelial cell senescence. *Breast Cancer Research* **2020**, *22*, (1), 1-13.
149. Kaur, K.; Kalra, S.; Kaushal, S., Systematic review of tofacitinib: a new drug for the management of rheumatoid arthritis. *Clinical Therapeutics* **2014**, *36*, (7), 1074-1086.
150. Dhillon, S., Tofacitinib: a review in rheumatoid arthritis. *Drugs* **2017**, *77*, (18), 1987-2001.
151. Jiao, Q.; Bi, L.; Ren, Y.; Song, S.; Wang, Q.; Wang, Y.-s., Advances in studies of tyrosine kinase inhibitors and their acquired resistance. *Molecular Cancer* **2018**, *17*, (1), 1-12.

152. Ren, Y.; Chen, X.; Feng, M.; Wang, Q.; Zhou, P., Gaussian process: a promising approach for the modeling and prediction of peptide binding affinity to MHC proteins. *Protein and Peptide Letters* **2011**, *18*, (7), 670-678.
153. Oprea, T.; Mestres, J., Drug repurposing: far beyond new targets for old drugs. *The AAPS Journal* **2012**, *14*, (4), 759-763.

8. BADANIA MOŻLIWOŚCI INDUKCJI NEUROGENEZY PRZEZ INTERAKCJĘ PAROKSETYNY Z TRANSPORTERAMI MONOAMIN ORAZ KWASU γ -AMINOMASŁOWEGO W OPARCIU O METODY CHEMII OBLICZENIOWEJ

8.1. Możliwe przyczyny depresji

Istnieje wiele hipotez opisujących możliwą przyczynę depresji. Wśród nich wyróżniono: hipotezę monoaminową, hipotezę neurogenezy, hipotezę neurobiologiczną oraz hipotezę zapalenia i hipotezę stresu. Przeprowadzone badania wskazują, iż pierwsza z nich jest najbardziej prawdopodobna. Spadek stężenia neurotransmiterów może wiązać się z występowaniem objawów depresji. Oprócz wcześniej wspomnianych monoamin, biorących udział w zapoczątkowaniu i progresji choroby (SER, NA, DA), najnowsze badania wskazują na ogromną rolę kwasu γ -aminomasłowego (GABA) [94].

Hipoteza neurobiologicznego związana jest z założeniem, że leki przeciwdepresyjne mogą wchodzić w interakcje z różnymi białkami istotnymi w procesach neuropsychologicznych co skutkuje modyfikacją stanu emocjonalnego pacjenta. Harmer wraz ze współpracownikami [95] powiązał działanie leków z odpowiednim procesem neuropsychologicznym [96]. Teorie na temat wpływu stresu oraz stanu zapalnego w procesie indukcji depresji są ze sobą powiązane. Przewlekły stres aktywuje oś podwzgórze-przysadka-nadnercza oraz układ współczulny (*sympathetic nervous system, SNS*) z jednoczesnym obniżeniem napięcia błędnika. Ta nierównowaga przyczynia się do powstania stanu zapalnego w depresji. Stymulacja SNS wywołuje uwalnianie katecholamin w jądrze pnia mózgu i rdzeniu nadnerczy, co prowadzi do nasilenia sygnalizacji prozapalnej. Aktywacja SNS wywołana stresem indukuje reakcje prozapalne, natomiast uwolniona noradrenalina moduluje transkrypcję cytokin poprzez stymulację receptorów β -adrenergicznych. Zaburzenia równowagi w funkcjonowaniu SNS, zwłaszcza jeśli są długotrwałe, tak jak ma to miejsce w przypadku zaburzeń psychicznych, mają głęboki wpływ na układ odpornościowy [97].

Jedna z najnowszych teorii, oparta o neurogeny mechanizm, zakłada, iż skuteczność działania leków przeciwdepresyjnych uzależnione jest od ich zdolności do aktywacji tworzenia neuronów hipokampa. Pierwsze badania na temat zjawiska o tworzenia nowych neuronów w mózgu zostały przeprowadzone na szczurach przez Josepha Altmana w 1960 roku [98]. Niemniej brakowało wówczas silnych dowodów na potwierdzenie naukowe tego faktu. Spowodowane było to brakiem wiedzy potwierdzającej istnienie w mózgu

neuralnych komórek macierzystych. Dopiero w 1980 roku Fernando Nottebohm dostarczył dowodów na występowanie zjawiska neurogenezy u dorosłych ptaków [99]. Przełomowym okazał się natomiast rok 1998, w którym Eriksson i współpracownicy [100] odkryli neurogenezę w mózgu dorosłego człowieka. Szybko wykazano, iż neuroprzekaźniki odgrywają istotną rolę w przetwarzaniu informacji neuronalnej i regulacji neurogenezy (m.in. w proliferacji, różnicowaniu, migracji neuronalnych komórek macierzystych, przetwarzaniu nowych neuronów oraz włączaniu ich do istniejących obwodów neuronalnych) [101].

Potwierdzono, że w mózgu dorosłego człowieka istnieją dwa regiony, w których zachodzi aktywny i ciągły proces neurogenezy, pozwalający na stworzenie nowych neuronów. Są to zakręt zębaty hipokampa i opuszki węchowe (ryc. 2.). Zasugerowano również, że utrzymywanie się neuronalnych komórek macierzystych zachodzi przez całe życie. Co zapewnia możliwość tworzenia nowych neuronów nie tylko w wieku prenatalnym (wiek embrionalny), ale również w wieku postprenatalnym (wiek dorosły).

Jak dotąd żadna pojedyncza hipoteza nie jest w stanie w sposób zadowalający wyjaśnić etiopatologii, początku, progresji oraz remisji depresji. Niemniej, dążenie do lepszego zrozumienia molekularnych podstaw tej choroby stanowi istotny krok w identyfikacji skutecznych strategii terapeutycznych, które mogłyby być ukierunkowane na przyczynowe mechanizmy biologiczne choroby depresyjnej.

8.2. Badanie mechanizmu neurogenego działania paroksetyny

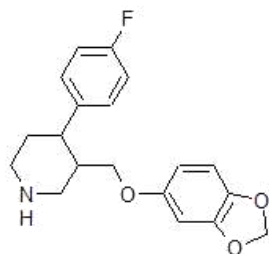
W ostatnich latach hipoteza dotycząca neurogenego działania leków przeciwdepresyjnych jest wnikliwie analizowana. Zauważono, iż depresja może być spowodowana zaburzeniem połączeń neuronalnych [102]. Dowodem na to jest fakt, iż pierwsze efekty stosowania leków przeciwdepresyjnych obserwowane są dopiero po pewnym czasie np. po kilku tygodniach farmakoterapii. Wykazano również, iż długotrwałe leczenie farmakologiczne może wpływać na zmianę ekspresji genów i translacji białek, będące powodem zmian funkcjonalnych i strukturalnych neuronów. Dane zebrane w pracy *Paroxetine – overview of the molecular mechanisms of action* były wstępem do próby wyjaśnienia możliwości działania PRX w mechanizmie neurogenym [83].

Przeanalizowano interakcje pomiędzy PRX a ludzkimi MATs (hMAT: hSERT, hDAT, hNET) oraz ludzkimi GATs (hGAT: hGAT1-3, hBGT1). Przeprowadzone testy obejmowały badania *in silico*, zweryfikowane następnie badaniami farmakologicznymi.

- *Badania przeprowadzone technikami obliczeniowymi*

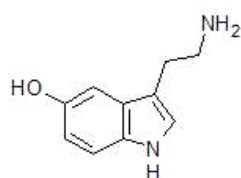
Badania *in silico* przeprowadzono dwukierunkowo. Badane struktury 3D ligandów (ryc. 14) pobranych z bazy ZINC [103] a do ich przygotowania i optymalizacji wykorzystano pakiet oprogramowania Gaussian 09 [104].

związek testowany

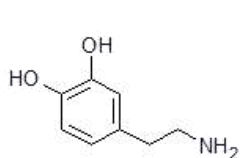


paroksetyna (PRX)

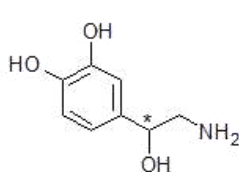
związki referencyjne



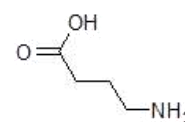
serotonina (SER)



dopamina (DA)



norepinefryna (NE)



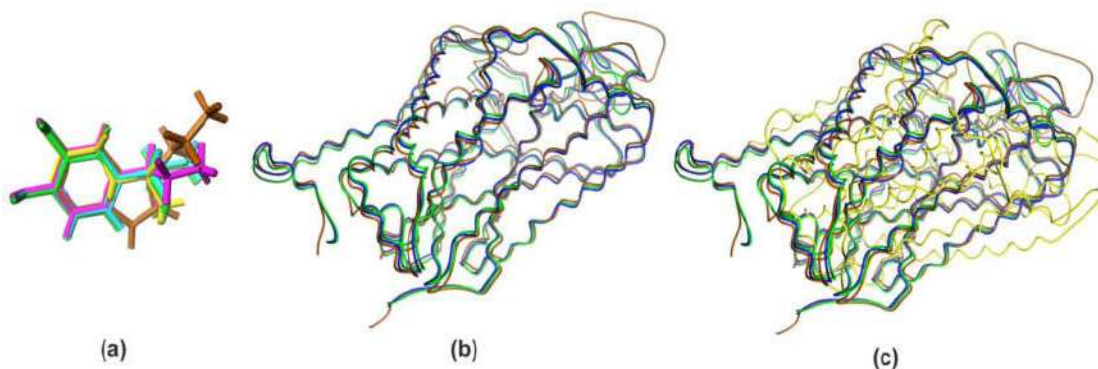
kwasy γ-aminobutanowy (GABA)

Ryc. 17. Zestawienie struktur 2D badanych ligandów.

Geometria badanych cząsteczek została zoptymalizowana za pomocą metody DFT/B3LYP w bazie 6-311+G(d,p), z wodą jako rozpuszczalnikiem w modelu PCM. Otrzymane wyniki były zapisywane w formacie mol2 adekwatnym do przeprowadzenia eksperymentu dokowania. Następnie w oprogramowaniu ADT określono charakter i ilość wiązań rotacyjnych oraz całościowy ładunek Gasteigera w cząsteczkach badanych ligandów. Tak przygotowane struktury zapisywano w formacie pdbqt.

Modele białkowych transporterów uzyskano z ogólnodostępnych baz naukowych. Dokładną strukturę białka hSERT otrzymaną metodą krystalografii rentgenowskiej pobrano z RCSB Protein Data Bank [105]. W przypadku hDAT, hNET i hGAT1 nie są dostępne dokładne struktury krystaliczne białek, tak więc skorzystano z homologicznych modeli białek dostępnych w bazie Swiss-Prot [106]. Przed rozpoczęciem procedury dokowania dokonano porównania budowy neuroprzekaźników w procesie nakładania na siebie modeli struktur badanych związków (*Superimposition Procedures*). Do oceny podobieństwa 2D badanych cząsteczek zastosowano współczynnik podobieństwa Tanimoto (*Tanimoto Similarity Coefficient, Tsc*), którego wartości mieszczą się w zakresie od 0.00 (całkowicie różne) do 1.00

(identyczne cząsteczki) [107]. Wyniki przeprowadzonych analiz wskazują, iż DA wykazuje wysokie podobieństwo strukturalne do NE oraz SER, o czym świadczą następujące dane: $T_{SCDA/NE} = 0.59$ oraz $T_{SCSER/DA} = 0.46$. Wyznaczono również podobieństwo 3D struktur transporterów hSERT, hNET, hDAT, hGAT1 w procesie nakładania cząsteczek, wyznaczając błąd dopasowania RMS. Wyniki pokazują, że wszystkie cztery związki przyjmują podobne konformacje w miejscu aktywnym białka (zakres wartości RMS mieści się w przedziale 0.1–1.5). Ustalono, że najniższa procentowa wartość podobieństwa 3D obserwowana jest dla hGAT1 w porównaniu z badanymi strukturami MAT.



Ryc. 18. Graficzne przedstawienie wyników porównania badanych 3D struktur: (a) porównanie badanych ligandów, (b) porównanie struktur badanych MAT, (c) porównanie struktur badanych MAT i hGAT1.

Następnie przeprowadzono proces dokowania badanych ligandów do celów terapeutycznych. Proces dokowania molekularnego przeprowadzono przy pomocy pakietu oprogramowania ADT [64].

Otrzymane wyniki wskazują, iż powinowactwo PRX ma najwyższą wartość stałej inhibicji dla transportera hSERT, $pK_{i_{hSERT}} \approx 10.20$. Porównanie wartości E_B wiązania SERT ze znanymi SSRI dowodzi, iż PRX jest najsilniejszym znanym inhibitorem tego transportera. Udowodniono, iż PRX wchodzi w interakcję również z pozostałymi transporterami, niemniej są to połączenia mniej stabilne.

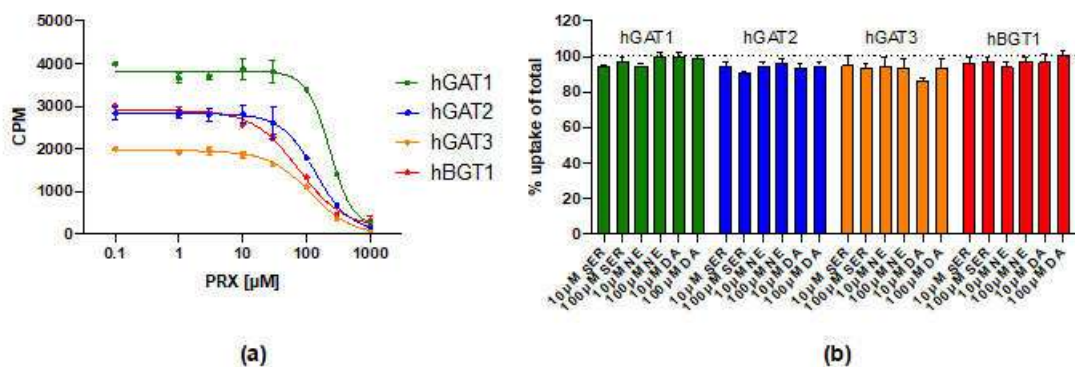
Przeprowadzone analizy sugerują, że PRX indukuje neurogenezę, to potencjalnie jest to związane z hamowaniem hSERT ze względu na znacznie wyższą wartość siły inhibicji i powinowactwa wiążącego w porównaniu z innymi MATs. Z tego względu wydaje się uzasadnionym rozważenie repozycjonowania PRX dla szerszej grupy pacjentów, która objęłaby osoby młode.

W świetle zgromadzonych danych godnym uwagi wydaje się również fakt, iż PRX oddziałuje z hGATs. Jednak niska siła hamująca PRX na hGAT1 i hGAT3 poddaje wątpliwości

inicjacji procesu neurogenezy w mózgu przez inhibicję tych transporterów. Niemniej godnym podkreślenia jest fakt, że zaobserwowane interakcje PRX z hGAT stwarzają potencjalnie duże możliwości poszukiwania nowych pochodnych tego leku, które tworzyłyby silniejsze połączenia z GATs i wzmacniały proces neurogenezy.

- *Badania farmakologiczne*

Testy farmakologiczne przeprowadzono w celu zweryfikowania inhibicji wychwytu zwrotnego GABA ze szczeliny synaptycznej. Zostały one przeprowadzone na liniach komórkowych jajnika chomika chińskiego, wykazujących wysoką ekspresję hGATs. Wykonano test kompetycyjnego wychwytu GABA. Aktywność hamująca PRX w hGAT1-3 i hBGT1 wyrażana została jako wartość IC_{50} , przy czym najwyższe wartości otrzymano dla transporterów hGAT1 i hGAT2, których największe stężenia zlokalizowane są poza CSN. Otrzymane wyniki badań *in vitro* potwierdziły wyniki badań uzyskanych technikami obliczeniowymi.



Ryc. 19. Wyniki badań farmakologicznych



Article

Assessment of Paroxetine Molecular Interactions with Selected Monoamine and γ -Aminobutyric Acid Transporters

Magdalena Kowalska , Łukasz Fijałkowski and Alicja Nowaczyk *

Department of Organic Chemistry, Faculty of Pharmacy, Collegium Medicum in Bydgoszcz, Nicolaus Copernicus University, 2 dr. A. Jurasza St., 85-094 Bydgoszcz, Poland; magda.kowalska@doktorant.umk.pl (M.K.); lfijalkowski@cm.umk.pl (Ł.F.)

* Correspondence: alicja@cm.umk.pl; Tel.: +48-52-585-3904

Abstract: Thus far, many hypotheses have been proposed explaining the cause of depression. Among the most popular of these are: monoamine, neurogenesis, neurobiology, inflammation and stress hypotheses. Many studies have proven that neurogenesis in the brains of adult mammals occurs throughout life. The generation of new neurons persists throughout adulthood in the mammalian brain due to the proliferation and differentiation of adult neural stem cells. For this reason, the search for drugs acting in this mechanism seems to be a priority for modern pharmacotherapy. Paroxetine is one of the most commonly used antidepressants. However, the exact mechanism of its action is not fully understood. The fact that the therapeutic effect after the administration of paroxetine occurs after a few weeks, even if the levels of monoamine are rapidly increased (within a few minutes), allows us to assume a neurogenic mechanism of action. Due to the confirmed dependence of depression on serotonin, norepinephrine, dopamine and γ -aminobutyric acid levels, studies have been undertaken into paroxetine interactions with these primary neurotransmitters using in silico and in vitro methods. We confirmed that paroxetine interacts most strongly with monoamine transporters and shows some interaction with γ -aminobutyric acid transporters. However, studies of the potency inhibitors and binding affinity values indicate that the neurogenic mechanism of paroxetine's action may be determined mainly by its interactions with serotonin transporters.

Keywords: paroxetine (PRX); antidepressant; monoamine transporters (MAT); γ -Aminobutyric acid transporter (GAT); neurogenesis; monoamine and GABA neurotransmitters



Citation: Kowalska, M.; Fijałkowski, Ł.; Nowaczyk, A. Assessment of Paroxetine Molecular Interactions with Selected Monoamine and γ -Aminobutyric Acid Transporters. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 6293. <https://doi.org/10.3390/ijms22126293>

Academic Editor: Philippe De Deurwaerdère

Received: 4 May 2021
Accepted: 10 June 2021
Published: 11 June 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Thus far, modern psychiatry classifies many types of depression including episodic, chronic, post-schizophrenic, endogenous, exogenous and other [1]. To explain the cause of depression a variety of hypotheses have been proposed. These include the monoamine hypothesis, neurogenesis hypothesis, neurobiology hypothesis, inflammation hypothesis, and the stress hypothesis [2–4]. The monoamine hypothesis suggests a relationship between a patient's depressed mood and a decrease in the level of selected neurotransmitters. Until now, over 100 different neurotransmitters have been discovered [5]. It is widely accepted that in depressive states the key neurotransmitters are serotonin (SER), noradrenaline (norepinephrine) (NE), dopamine (DA) [6–8] and γ -aminobutyric acid (GABA) [9–11]. SER, NE and DA contain a catechol moiety, and thus belong to catecholamines, known as excitatory neurotransmitters. GABA, on the other hand, belongs to the group of acidic neurotransmitters and is the main inhibitory neurotransmitter in the brain. The role of controlling neurotransmitter levels has been confirmed by the discovery of antidepressants such as tricyclic antidepressants (TCA's), selective serotonin reuptake inhibitors (SSRI's) and serotonin norepinephrine reuptake inhibitors (SNRI's) that increase serotonin levels in the brain [4]. Many of the modern generations of antidepressants act as inhibitors of one or several of the monoamine transporters (MATs) [12,13] and/or GABA transporters (GAT) [14]. The neurotransmitter transporter family dependent on sodium and chloride

(SLC6 transporters) and including norepinephrine transporter (NET), dopamine transporter (DAT), serotonin transporter (SERT) and GABA transporters (GATs), encoded by SLC6A1-4 genes in humans are specifically known to be important for efficient neuronal synaptic transmission, hence providing neurotransmitter homeostasis in the CNS [15]. Briefly, inhibition of MATs/GATs leads to reduced clearance of neurotransmitters after synaptic release, thus increasing the neuronal signal intensity [11,16,17]. The inhibitors act by increasing the amount of neurotransmitters in the synapse, and in consequence alleviate or subside symptoms of depression [18].

Currently, one of the most commonly used antidepressants is paroxetine (PRX, (3S,4R)-3-((benzo[d][1,3]dioxo-5-iloxy)metylo)-4-(4-fluorofenylo)piperidina), which belongs to the SSRI group [19]. It effectively increases the concentration of endogenous SER in the synaptic cleft [20–22]. It is noteworthy that it usually takes several weeks to achieve the desired antidepressant therapeutic effect of PRX. This therapeutic delay suggests that slow adaptive changes in the neural circuits during long-term pharmacological treatment possibly involve changes in gene expression and protein translation [23,24]. This in turn supports the hypothesis that depression is caused by disruption of functional and structural connections of the neural circuits that underlie the regulation of mood. However, the detailed molecular mechanisms of PRX have not been fully recognized and explained so far.

The studies presented in this publication are intended to answer the question about the possibility of PRX acting in the neurogenic mechanism. The primary purpose of this study is to analyze thoroughly the interactions between PRX and human MAT (hMAT: hSERT, hDAT, hNET), human GAT (hGAT: hGAT1-3, hBGT1). According to an extensive literature survey we have established that, however, the literature is replete with different studies concerning the four key transporter proteins, and there is a lack of pharmacological data on the molecular level. Therefore, we have undertaken the effort to fill this gap. In order to achieve the goal of this study we have conducted the *in silico* research involving dual directional analyses of the issue. The first mode of the analysis was designed to compare the analyzed ligand and protein structures by means of superimposition procedures. The results of this part of study delivered information about the structural similarities, which are often used in the pharmacological preliminary studies. The second part of analysis comprised a detailed inquiry of the intermolecular interactions present in the complexes especially hydrogen bonding. To compare the binding strength of PRX with individual transporters, the following reference compounds were selected, SER, DA, NE and GABA. The interactions were investigated by means of docking studies of selected antidepressant compounds performed on the crystal structure of hSERT [25] and on homology modeled hNET [26], hDAT [27] and hGAT1 [28]. It is noteworthy that the sequence identity between the template (i.e., sequences with known 3D structure) and the modeled sequence is 63.3% for hNET, 52% for hDAT [29], and 47% for hGAT1 and to the best of our knowledge this is the highest available identity. Reaching a general aim of the study requires also pharmacological investigation to provide the reader with experimental context. Even though the literature study shows that PRX–MAT interactions are extensively investigated by means of pharmacology, there are still gaps in the assessment of PRX–hGAT interactions. The pharmacological part of the present study includes the presentation of PRX–hGAT data that helps to understand and assess the neurogenesis hypothesis. This part of the study covers the investigation of the inhibitory effect of PRX, SER, NE and DA at the four hGATs (hGAT1-3, BGT1) using the [³H]GABA uptake assay.

2. Results

2.1. Molecular Docking Studies

2.1.1. Structural Similarity Studies for Neurotransmitters and Their Transporters

The Tanimoto similarity coefficient (Tsc) for pairwise comparison of molecules is probably the most widely used estimator of molecular similarity. This parameter by definition ranges from 0.0 (completely different) to 1.0 (equal molecules) [30]. Results of 2D similarity

tests can be arranged in descending order of the Tsc: $Tsc_{DA/NE} = 0.59$, $Tsc_{SER/DA} = 0.46$, $Tsc_{SER/NE} = 0.35$, $Tsc_{SER/GABA} = 0.25$, $Tsc_{DA/GABA} = 0.12$, $Tsc_{GABA/NE} = 0.05$. They show a large structural diversity of the studied neurotransmitters, among which the greatest similarity of DA was noted to NE and SER. To obtain additional information concerning the shape of the investigated neurotransmitters and transporters, the active conformations were chosen for superimposition. The atoms common to these molecules were selected for the fitting procedure. Their similarity was calculated as RMS fit. The RMS routine provided estimates of how closely molecules fit to each other. The lower the RMS value, the better the similarity. The docked structures of the studied molecules were compared by their superimposition using a least-squares algorithm that minimizes the distances between the corresponding non-hydrogen atoms as shown in Figure 1.

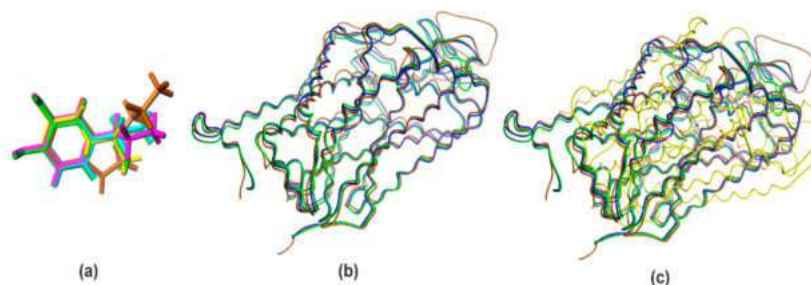


Figure 1. Superimposition of the investigated docked structures of neurotransmitters: serotonin (SER, brown), dopamine (DA; blue), noradrenaline (NE, green), γ -aminobutyric acid (GABA, yellow) (a), and human monoamine transporters: serotonin transporter (hSERT, brown), dopamine transporter (hDAT, blue), norepinephrine transporter (hNET, green) (b), human transporters: serotonin transporter (hSERT, brown), dopamine transporter (hDAT, blue), norepinephrine transporter (hNET, green), and γ -Aminobutyric acid transporters 1 (hGAT1, yellow) (c).

The analysis of similarity of obtained active structures shows that all four compounds adopt very similar conformations in the target site of the protein $RMS \approx 0.1$ – 1.5 . The only significant deviation of the structure concerns the alkyl regions.

Recent studies on the identification of homologous structures for the studied proteins indicate that the binding site of hSERT shares a sequence identity of 57% with hDAT and 68% with hNET. Additionally, the identity between hNET and hDAT is 86% [31]. The hDAT shows the greatest homology to hNET within the binding site with an amino acid sequence identity of 78% [32,33]. The homology for each human transporter related to the others was sequence identified is approximately hDAT/hNET = 67%, hDAT/hSERT = 50%, hNET/hSERT = 53%. The evidence from these studies presents the lower sequence similarity for hNET/hDAT = 58% [34] compared with hGAT1/dDAT = 66% [35] of identity. All these values are quite similar to the sequence of proteins in all the transporters analyzed. By definition the percentage of structurally equivalent positions was defined as the percentage of the two alpha carbon atoms in the shorter of the sequences that are less than 3.5 Å of the equivalent atoms in the superposed structure [36]. All these values indicate a significant similarity in the sequence of proteins in all transporters analyzed (Figure 1). However, the analysis of structural similarities counted as RMS (in Å) superimposition the structures of two proteins [37], with alpha carbons of corresponding amino acids being taken together [38,39], results for MAT as following data for hSERT: hSERT/hDAT = 5.70 Å, hSERT/hNET = 5.66 Å. These results indicate a comparable similarity of both studied pairs, with a slightly higher similarity between hSERT and hNET than hSERT and hDAT. On the contrary, the obtained RMS value for hSERT/hGAT1 = 19.62 Å pair clearly indicates a significantly different 3D structure of the protein analyses. Similar RMS values were observed for hGAT1 with the MAT structures studied: hGAT1/hSERT = 19.62 Å, hGAT1/hNET = 19.82 Å, hGAT1/hDAT = 19.6 Å. These data indicate a low probability of strong interactions between PRX and hGAT1, while

it is likely that a better interaction of PRX is seen with hNET and hDAT although hNET seems to have a slightly better interaction compared to hDAT. Furthermore, despite sharing high sequence identity and a similar MAT-structural fold (Figure 1), the pharmacology of neurotransmitter transporters is diverse, primarily because of the amino acid variations in the central binding site [40].

2.1.2. hSERT

Based on many pharmacological studies previously presented in the literature, PRX has been classified as an SSRI due to its very high inhibitory potencies for SERT. On the basis of predicted binding affinity, the highest value was observed with PRX (calculated $pK_{ihSERT} \approx 10.20$, Table 1) compared to all studied compounds and hSERT.

Table 1. The summary of hSERT, hDAT, hNET, hGAT1 and PRX, neurotransmitters docking experiment results.

Complex		E_B	pK_i	Amino Acid Residues	H_B		Angle	L_{HB}	E_{HB}
Protein	Ligand	kcal/mol			Donor	Acc	θ	Å	kcal/mol
hSERT	PRX	-13.92	10.20	ASP98	%NH2+	# COO	139.95	2.76	-1.68
	SER	-9.7	7.11	ALA96	%NH1+	# CONH	129.52	1.91	-0.27
				ASP98	%NH2+	# COO	132.83	1.78	-0.15
				SER336	%NH3+	# OH	164.35	1.86	-2.54
				SER438	%IndOH	# CONH	138.77	1.92	-0.27
	R-NE	-5.45	3.99	ASP98	%OH	# COO	134.19	1.81	-0.12
				PHE335	%NH3+	# CONH	174.95	2.09	-3.46
				GLU493	%m-Ph-OH	# COO	134.94	1.85	-0.05
	S-NE	-5.31	3.89	TYR95	# Ph-OH	%m-PH-OH	156.36	1.77	-5.21
				ASP98	%NH3+	# COO	147.64	1.81	-1.97
ASP98				%OH	# COO	141.19	1.64	-6.26	
DA	-5.45	3.99	PHE335	%NH3+	# CONH	159.93	2.11	-0.87	
			GLU493	%p-Ph-OH	# COO	154.89	1.96	-2.34	
GABA	-6.77	3.86	LYS490	%m-Ph-OH	# COO	155.26	2.01	-5.80	
hDAT/ cocaine	PRX	-8.35	6.12	ASP476	# NH1+	%COO1	150.89	1.68	-0.62
	SER	-7.77	5.70	LYS490	# NH2+	%COO2	126.72	2.24	-0.05
				ASP79	%NH2+	# COO	144.54	2.64	-0.02
				ASN157	%NH1+	# COO	142.74	1.99	-0.12
	R-NE	-6.01	4.40	SER422	%IndOH	# CONH2	120.70	2.17	-0.23
				PHE76	%NH2+	# CONH	135.29	2.03	-2.57
				ALA77	%OH	# CONH	154.98	2.12	-1.02
				ASP79	%NH3+	# CONH	139.52	1.85	-1.81
	S-NE	-6.01	4.41	ASP79	%NH3+	# COO	149.09	1.81	-0.38
				ASP476	%m-PH-OH	# COO	145.33	2.15	-1.00
ASP476				%p-PH-OH	# COO	168.08	1.89	-3.85	
ASP476				%m-PH-OH	# COO	153.47	1.73	-1.02	
ASP476				%OH	# COO	122.98	1.95	-0.26	
ASP476				%NH3+	# COO	127.31	2.12	-0.01	
DA	-7.22	5.29	ASP476	%NH3+	# COO	138.16	1.78	-0.12	
			ASP79	%NH1	# COO	131.46	2.12	-2.93	
			SER149	%p-Ph-OH	# CONH	158.76	2.19	-3.40	
GABA	-4.62	3.38	TYR156	%NH2	# Ph-OH	159.81	2.12	0.032	
hDAT/ clomipramine	PRX	-8.02	5.88	ASP79	%NH1+	# COO	144.11	1.74	-1.10
	SER	-7.05	5.17	ASP476	%NH2+	# COO	155.89	2.75	-0.04
				ASP476	%NH1+	# COO	124.04	2.19	-0.08
				ASP476	%NH2+	# COO	141.21	1.87	-0.51
	R-NE	-6.04	4.43	ASP476	%IndOH	# CONH	165.74	1.83	-4.42
				ASP385	%p-Ph-OH	# COO	159.51	1.77	-0.46
				ASP385	%m-PH-OH	# COO	171.74	1.96	-2.65
	S-NE	-6.07	4.45	ASP476	%OH	# COO	156.16	1.96	-1.07
				ASP385	%p-Ph-OH	# COO	160.65	1.83	-1.50
				ASP385	%m-PH-OH	# COO	158.36	2.11	-1.50
DA	-6.72	4.92	ASP476	%OH	# COO	168.50	1.84	-1.29	
			ASP385	%p-Ph-OH	# COO	156.93	1.87	-1.38	
			ASP385	%m-PH-OH	# COO	162.14	2.00	-4.85	
GABA	-4.34	3.18	ASP476	%NH3+	# COO	127.69	1.91	-0.10	
			ASN93	%NH1+	# CONH2	126.49	1.99	-0.85	
SER309	%NH2+	# OH	137.67	2.15	-2.84				

Table 1. Cont.

Complex		E_B kcal/mol	pK_i	Amino Acid Residues	H_B		Angle θ	L_{HB} Å	E_{HB} kcal/mol
Protein	Ligand				Donor	Acc			
hNET	PRX	−10.38	7.61	ALA73	%NH1+	# CONH	125.52	2.73	−1.06
				ASP75	%NH2+	# COO	162.17	2.74	−0.12
	SER	−5.91	4.33	PHE72	%NH1+	# CONH	152.37	2.18	−4.06
				ASP75	%NH2+	# COO	142.29	2.02	−0.04
				SER419	%NH3+	# OH	135.90	1.96	−2.85
				SER420	%IndOH	# OH	168.89	2.20	−4.18
	R-NE	−5.62	4.12	ASP75	%p-Ph-OH	# COO	170.95	1.72	−3.11
				ASP75	%m-PH-OH	# COO	153.61	1.74	−1.64
				ASP473	%OH	# COO	143.25	2.01	−0.01
	S-NE	−7.75	5.59	PHE72	%NH1+	# CONH	121.16	2.06	−0.56
ASP75				%NH2+	# COO	153.53	2.19	−0.53	
SER318				%OH	# CONH	135.06	1.94	−1.34	
LEU319				%m-PH-OH	# CONH	131.15	2.14	−0.61	
DA	−7.25	5.31	ASP75	%NH1+	# COO	121.36	1.99	−0.13	
			ALA145	%p-Ph-OH	# CONH	134.7	2.11	−0.93	
			TYR152	%NH2+	# Ph-OH	169.39	2.18	−3.64	
			SER419	%NH3+	# OH	139.35	2.25	−2.08	
GABA	−4.51	3.31	ASP75	%NH1+	# COO	151.09	1.81	−1.60	
hGATI	PRX	−5.93	4.35	ASP451	%NH2+	# CONH	151.56	2.91	−3.70
				ASP451	%NH2+	# COO	147.39	2.93	−3.13
	SER	−4.86	3.56	TYR139	%NH1	# Ph-OH	172.42	1.99	−5.78
				ASP451	%NH2	# COO	143.11	1.86	−2.83
				ASP451	%NH3	# CONH	122.09	1.87	0.023
				SER456	%m-PH-OH	# CONH	139.31	2.06	−2.94
				MET458	# CONH	%m-PH-OH	150.79	1.90	−4.45
				SER459	# CONH	%m-PH-OH	164.48	2.08	−5.04
	R-NE	−5.28	3.87	TYR139	%NH1	# Ph-OH	130.79	2.21	−1.60
				ASP451	%NH2	# CONH	148.66	1.85	−1.96
MET458				# CONH	%p-PH-OH	163.77	1.99	−5.67	
SER459				# CONH	%p-PH-OH	151.54	1.93	−4.51	
LEU460				# CONH	%m-PH-OH	151.03	2.24	−2.73	
S-NE	−5.28	3.86	ASP451	%NH1	# COO	135.12	1.76	−0.47	
			ASP451	%OH	# CONH	171.27	1.65	−2.93	
			SER456	%m-PH-OH	# CONH	152.49	2.06	−3.09	
			MET458	# CONH	%m-PH-OH	153.65	1.78	−4.80	
			SER459	# CONH	%m-PH-OH	162.42	2.005	−5.5	
DA	−4.85	3.55	ASP451	%NH1	# COO	123.39	1.941	−0.503	
			ASP451	%NH2	# CONH	127.83	2.017	−1.36	
			SER456	%m-PH-OH	# CONH	172.05	1.937	−4.819	
			MET458	# CONH	%m-PH-OH	151.59	2.026	−4.052	
			SER459	# CONH	%m-PH-OH	162.66	2.124	−4.493	
			LEU460	# CONH	%p-PH-OH	155.46	1.797	−5.329	
GABA	−6.24	4.49	ASP451	%NH1+	# COO	142.52	2.503	−0.026	
			ASP451	%NH2+	# CONH	156.84	2.451	−3.32	

H_B —hydrogen bond, Acc—hydrogen bond acceptor, Hydrogen bond components: from the ABX % and from the protein #, E_B —complex energy binding, θ —hydrogen bond angle, L_{HB} —hydrogen bond length, E_{HB} —hydrogen bond energy, pK_i —calculated binding affinity.

In various studies, pIC_{50SERT} was found to be between 8.96 and 10.40 [16,21,41–43]. This is in agreement with our docking results that shows that the most stable complex is for hSERT-PRX ($E_B \approx 13.92$ kcal/mol). The second strongest interaction with hSERT was SER (calculated $pK_{iSERT} \approx 7.11$, $E_B \approx 9.7$ kcal/mol, Table 1). The results of the present study demonstrate that DA, R/S-NE and GABA have low stability ($E_B \in (3.86; 3.99)$ kcal/mol). Other studied hSERT-neurotransmitters complexed have calculated pK_i value ≤ 4 indicating weak ligand/inhibitor binding affinity. Comparing these values to other currently used antidepressants ($pIC_{50SERT} \approx 9.10; 9.54; 8.05; 8.92$; for fluoxetine (Prozac) [41], sertraline (Zoloft) [16], citalopram (Celexa) and venlafaxine (Effexor) [16], respectively) confirm the fact that PRX is the strongest SERT inhibitor currently known. Additionally, it is stronger than SER ($pIC_{50SERT} \approx 7.00$ [21,43]). Given the extraordinary strength with which PRX inhibits hSERT, the study of molecular factors that influence the neurogenesis phenomenon seems warranted. It is worth highlighting that in the biological activity under consideration, hSERT is the only transporter studied whose crystallographic structure is known (PDB ID: 5i6x, 3.14 Å [25]). The localization of PRX binding sites in crystals is well understood and described [19]. It is a central substrate binding pocket,

commonly located approximately halfway across the membrane bilayer and marketed as S1 pocket (Table 2, Figure 2).

Table 2. The composition of the binding pocket of the analyzed channel models: hSERT, hDAT, hNET, hGAT1.

Protein	Residues
hSERT	Tyr95, Ala96, Asp98, Gly100, Ala169, Ile172, Ala173, Tyr176, Phe335, Ser336, Gly338, Phe341, Val343, Ser438, Thr439, Ala441, Gly442, Val489, Lys490, Glu493, Glu494, Thr497, Gly498, Pro499, Leu502 [6]
hNET	Ala145, Tyr151, Ile315, Phe316, Ser420, Ala426 [44].
hDAT	Ala81, Tyr88, Asp385, Asp385, Asp476, Ala480, Phe472, Thr473, Asp476, His477, Ala480, Gly481, Thr482, Leu485 [6]
hGAT1	Tyr60, Ala61, Gly63, Gly65, Leu136, Tyr140, Phe294, Ser295, Tyr296, Gly297, Leu300, Thr400 [45]

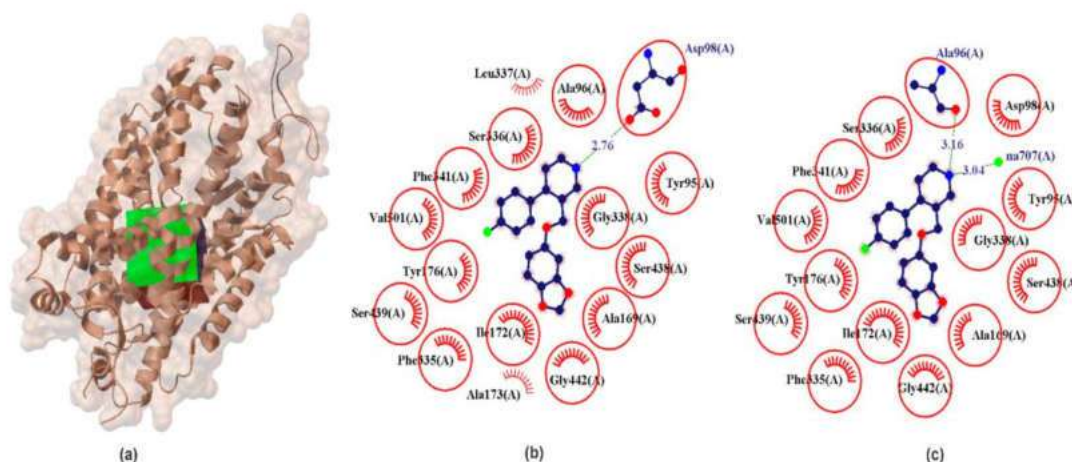


Figure 2. X-ray structure of the hSERT crystal (a) with the grid box showing the ligand-binding site (PDB ID: 5i6x, 3.14 Å). Comparison between calculated (b) and crystallographic data (c) for binding pocket in PRX–hSERT complex. The red circles and ellipses identify equivalent residues (in 3D superposition of structures).

From chemical point of view hSERT is composed of three different regions; A, B, C. Subsite A is defined by Tyr95, Ala96, Asp98, Gly100 from transmembrane segments helix 1 (TMH1), and Phe335, Ser336, Gly338, Phe341, Val343 from transmembrane segments helix 6 (TMH6) and Ser438, Thr439, Ala441, Gly442 from transmembrane segments helix 8 (TMH8) and is defined as a polar region surrounding Asp98. In crystallographic data it was found that regions A accommodates the polar, amine moiety of the PRX which form one hydrogen bond between NH₂ group and Ala96 (Figure 2). Subsite B is the groove delineated between Ser438, Thr439, Ala441, Gly442 (TMH8) and Ala169, Ile172, Ala173, Tyr176 from transmembrane segments helix 3 (TMH3). It has been confirmed by X-ray research that PRX locates a benzodioxol group in this groove. Subsite C is defined as a region between TMH6 and TMH10 (Val489, Lys490, Glu493, Glu494, Thr497, Gly498, Pro499, Leu502) and is located in the extracellular vestibule. Subsite C can interact with bulky drugs. Structurally B region is located opposite to subsite C and both are largely hydrophobic regions [46]. Commonly the pose obtained from X-ray diffraction is often denoted by many authors as ABC [22]. The results obtained in our PRX docking and validation experiments also remain to indicate PRX orientations in the ABC pose. In our experiment, the amine group of piperidine ring donates one hydrogen bond to the oxygen of the carboxylic moieties of Asp98 (Figure 2) with $E_{\text{HIB}} \approx -1.68$ kcal/mol and bond length of 2.76 Å. The docking experiment confirms that the PRX molecule has a hydrophobic effect with an identical set of amino acids compared to crystallographic data (Figure 2, red circles and ellipses identify equivalent residues (in 3D superposition of structures)).

All calculated molecular configurations indicate that the energy of the single hydrogen bond between studied compounds and the set of neurotransmitters is relatively low (Table 1). The highest hydrogen bond energy is found for the major hydrogen bond component of Gly65.

2.1.3. hDAT

hDAT is the major target of addictive psychostimulants such as cocaine, which bind to the active site and prevent the conformational transition of the transporter, thereby inhibiting the reuptake of dopamine [40]. DAT mediates reuptake of DA ($pIC_{50SERT} \ll 4$, $pIC_{50NET} \approx 5.28$, $pIC_{50DAT} \approx 5.06$ [21] – 5.61 [32]) from the synaptic cleft and thereby controls the termination of dopaminergic signaling.

The DAT structure distinguishes binding places defined as hDAT/cocaine (pocket 1) and hDAT/clomipramine (pocket 2) [6]. Cocaine is a high-potencies inhibitor of DAT ($pIC_{50SERT} \approx 6.54$, $pIC_{50NET} \approx 5.48$, $pIC_{50DAT} \approx 7.14$ [47]) and it is thought that its binding to DAT causes a rapid increase in extracellular dopamine levels [48] that produce the reinforcing effects leading to cocaine abuse. In addition, cocaine, despite the increase in DA in the synapse, does not act as an antidepressant. As confirmed in many studies, cocaine abuse and addiction are associated with an increased risk of depression [49]. Binding site for DA and cocaine in DAT overlap and are named by many authors as the central binding site, surrounded by TMs 1, 3, 6, 8 [33,50]. Clomipramine is a tertiary amine belonging to a dibenzazepine TCA [51]. Clomipramine has a stronger potency for the serotonin transporter ($pIC_{50SERT} \approx 9.52$, $pIC_{50NET} \approx 7.42$, $pIC_{50DAT} \approx 5.66$ [16]), compared to other TCAs [51]. Clomipramine binding site in hDAT protein is surrounded by TMs 1, 3, 6, 10 and 11 [6]. Thus, two binding pockets have particular interest for the design of novel DAT interacting ligands. As shown in Figure 3 in both pockets PRX forms a hydrogen bond with Asp476. Comparing hydrophobic interactions in the analyzed cases reveals partial interaction compatibility (Figure 3, red circles identify equivalent residua (in 3D superposition structures)) but it also points to other residua in both cases (Figure 3, red arcs identify residua in hDAT/cocaine and hDAT/clomipramine, respectively (in superposition 3D structures)). The resulting energy values (Table 1) indicate that PRX forms a more energy-stable complex in the cocaine pocket. It is noteworthy that all neurotransmitters analyzed interact with the hDAT transporter (Table 1). It seems somewhat astonishing that SER interacted more strongly with hDAT ($pIC_{50DAT} \approx 5.57$ [21]) than the DA itself ($pIC_{50DAT} \approx 5.06$ [21]). Racemate R/S-NE, on the other hand, has a potency of $pIC_{50DAT} \approx$ order of 4.28 [21]. However, this is confirmed by literature data.

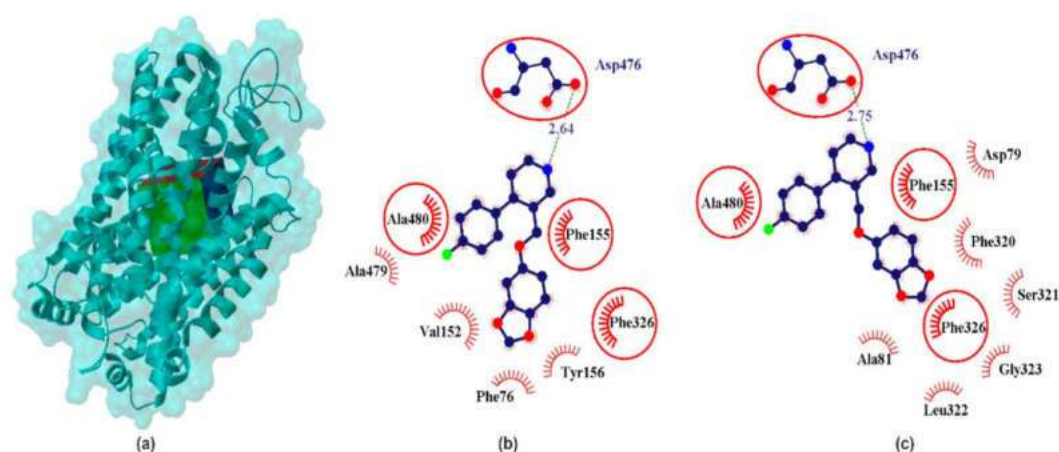


Figure 3. X-ray structure of the hDAT homology model (a) with the grid box showing the ligand-binding site (Swiss-Prot ID: Q01959) and calculated data for cocaine binding pocket (b) and clomipramine binding pocket in PRX-hNET complex (c). The red circles and ellipses identify equivalent residua (in 3D superposition of structures).

2.1.4. hNET

Norepinephrine (also called noradrenaline) is a neuromodulator that in multiple ways regulates the activity of neuronal and non-neuronal cells [52]. It was one of the first neurotransmitters to be discovered [53]. It was isolated in 1901 and is the first hormone obtained in the crystalline state [54]. The presence of norepinephrine in two main enantiomers (R/S-NE) was confirmed by structural (crystallographic and spectroscopic studies [54,55]). In crystallographic study it was proved that NE has a zwitterionic structure, formed by proton transfer from the meta phenolic hydroxyl group to the nitrogen atom ($^-\text{O}(\text{OH})\text{Ph}-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-\text{NH}_3^+$) [56]. It was founded approx. 6.5–7.7 Å due to separation of charged centers [55], which determines the molecule of the interaction with neurons [28]. These conformers are stabilized by intramolecular hydrogen bonds between the nitrogen atom of the amino group and hydrogen of hydroxyl group attached to an ethyl amine carbon atom [55]. NE is the second major biogenic amine that has been proposed to be causally involved in the pathophysiology of major depression and in the mechanism of antidepressant drug action. The norepinephrine transporter (NET) is a transmembrane protein responsible for transporting norepinephrine into the synaptic terminals of the central and peripheral nervous systems as well as neuroendocrine adrenal chromaffin cells [57]. The selective NE reuptake potencies inhibitor, reboxetine ($\text{pIC}_{50} \approx 8.96$ [16]), has demonstrated equivalent efficacy to the TCA in some studies and is approved as an antidepressant in Europe but not in the USA [58] (Figure 4).

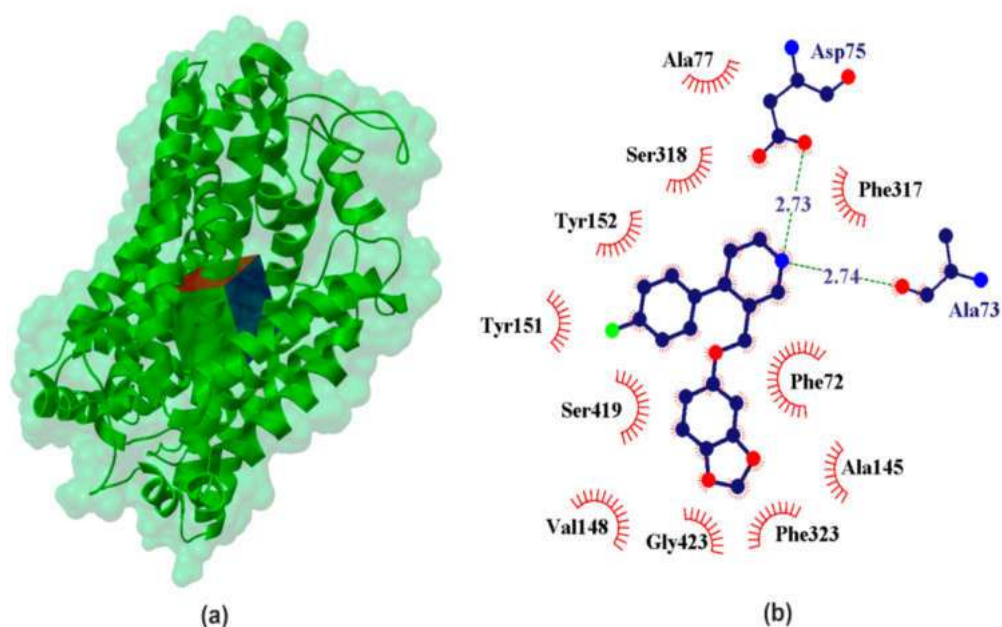


Figure 4. X-ray structure of the hNET homology model (a) with the grid box showing the ligand-binding site (Swiss-Prot ID: P23975) and calculated data (b) for binding pocket in PRX-hSERT complex.

The inhibitory potencies R/S-NE for its transporter lie in the range $\text{pIC}_{50\text{NET}} \in (6.17$ [32]; 5.06 [21]). Comparison of the data obtained for our docking experiment (Table 1) clearly leads to the conclusion that S-NE shows stronger binding affinity than the other studied neurotransmitters. It was found in our experiment that $\text{pK}_{\text{iNET}} \approx 5.59$ for S-NE and $\text{pK}_{\text{iNET}} \approx 4.12$ for R-NE. Another strength of the interacting neurotransmitter is DA (calculated $\text{pK}_{\text{iNET}} \approx 5.31$), which is confirmed by the literature data ($\text{pIC}_{50\text{NET}} \approx 5.28$ [21]). Among the studied catecholamines, serotonin is characterized by the weakest affinity for NE transporters (calculated $\text{pK}_{\text{iNET}} \approx 4.33$ and $\text{pIC}_{50\text{NET}} \approx 4.85$ [21]). Calculated binding

affinity $pK_{ihNET} \approx 3.31$ for GABA suggests interaction with hNET. These data confirm that NET has some selectivity relative to NE. When it comes to the effects of PRX on NET, it is much stronger (calculated $pK_{ihNET} \approx 7.61$ and $pIC_{50NET} \in 6.46$ [21] – 7.40 [16]) compared to all the neurotransmitters in the studied set.

2.1.5. hGAT1

In regions such as the cerebral cortex, hippocampus, thalamus, basal ganglia, cerebellum, hypothalamus, and brainstem, GABA represents about one-third of the synapses. GAT1 is the most copiously expressed GAT in the CNS and is mainly localized into the presynaptic axon terminal and into a few astrocytic structures [59]. The GABA chain is made of three single carbon-carbon bonds, thus its structure is highly flexible. This determines the ability to adapt various conformations that determine binding, as ligand, in the proteins with which it interacts. Crystallographic studies have shown that both crystal and aqueous solution of GABA occur in the form of a zwitterion, which in the body makes it a carrier of electric current and thus creates the possibility of carrying stimuli. It is widely accepted that distance between cationic and anionic center approx. A value of 5 Å determines the neuronal and glial blocking effect in selective inhibitors. Computational methods have shown that in an aqueous solution more than 94% of GABA molecules adapt a folded conformation with separation of charged centers below 5 Å [28]. GABA is transported by GAT in a somewhat folded conformation (Figure 5). This means GABA interacts with neuronal and astrocytic structures.

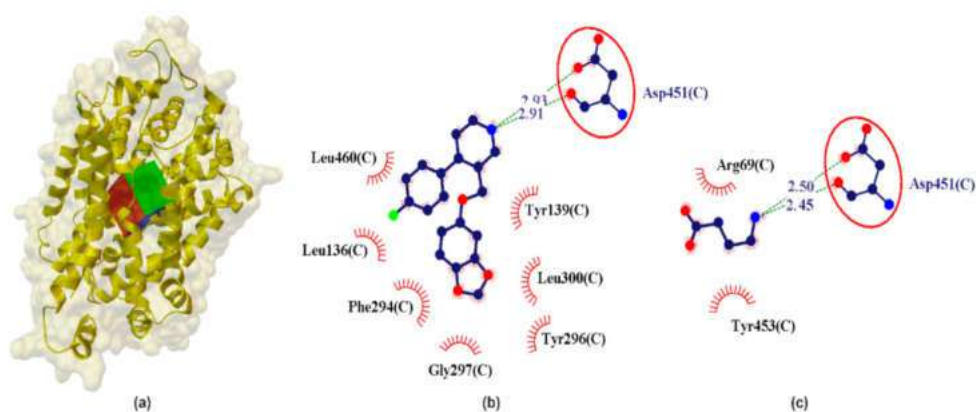


Figure 5. X-ray structure of the hGAT1 homology model (a) with the grid box showing the ligand-binding site (Swiss-Prot ID: P30531) and calculated data (b) for binding pocket in PRX-hGAT1 and (c) GABA-hGAT1 complex. The red circles and ellipses identify equivalent residues (in 3D superposition of structures).

In the preliminary analysis of the docking it was observed that GABA interacts with the active site of hGAT1 with calculated $pK_{ihGAT1} \approx 4.49$ and $[^3H]GABA pIC_{50hGAT1} \approx 5.00$ [60,61]. The studied catecholamines show significantly less interaction with hGAT1 as compared to GABA (Table 1). It is noteworthy that PRX shows the strongest interactions with hGAT1 (calculated $pK_{ihGAT1} \approx 4.35$) compared to SER, NE and DA. (Table 1). PRX creates a bifurcated hydrogen bond, similar to the GABA-hGAT1 complex, where NH_2 from PRX is involved in a $COO...NH_2...CONH$ incorporating the COO from Asp451 and the NHCO from Asp451 (Figure 5). From the data in Table 1 it can be seen that this bifurcated system is almost geometrically ($L_{HB} \approx 2.92$ Å) and energetically ($E_{HB} \approx -3.41$ kcal/mol) symmetric, where the major hydrogen bond component is fixed into the side-NH-CO of Asp451 and the minor involves the side-COO of Asp451 residue (Figure 5).

2.1.6. Validation Experiment

The re-docking method was applied to confirm legitimacy of the docking procedure [62] and was performed using Vina software [63]. Results of redocking in Vina

(optimal poses) were saved as pdbqt files. Subsequently, the AutoDock Tools (ADT) program was employed to calculate the superimposition of the ligand and protein complexes. The validation process indicates a high similarity of PRX corresponding poses obtained using AutoDock and Vina (Figure 6).

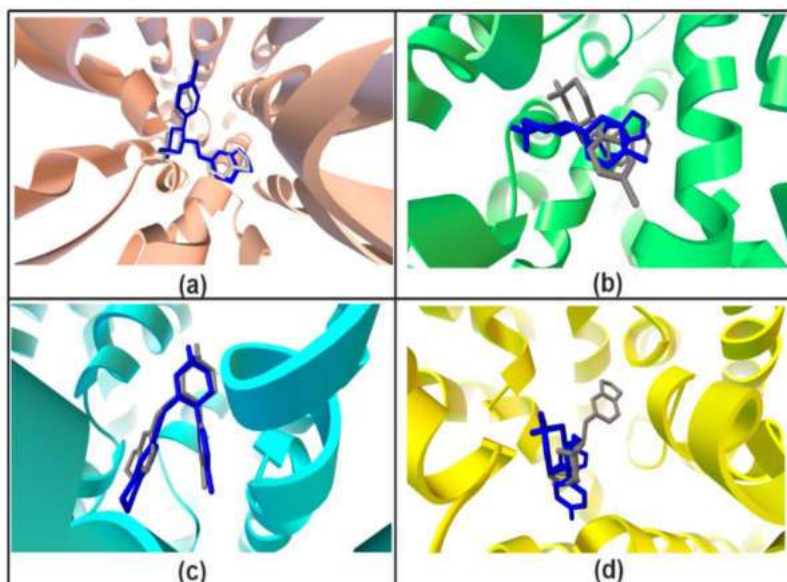


Figure 6. Validation redocking experiment. Docking results of the hSERT (a), hNET (b), hDAT/cocaine (c), hGAT1 (d) obtained using AutoDock (gray) and Vina (blue).

2.2. Inhibitory Activities of PRX, SER, NE and DA at hGATs

PRX concentration-dependently inhibits the [³H]GABA uptake mediated by all four hGATs with mid-high micromolar potency in the range of 85.6–256.1 μ M with the rank order: hBGT1 < hGAT3 \approx hGAT2 < hGAT1 (Figure 7a and Table 3).

Table 3. Inhibitory activity of PRX at hGAT1-3 and hBGT1 stably expressed in CHO cells using the [³H]GABA uptake assay.

	IC ₅₀ (pIC ₅₀ \pm S.E.M.) (μ M)			
	hGAT1	hGAT2	hGAT3	hBGT1
PRX	256.1 (3.6 \pm 0.03)	122.4 (3.9 \pm 0.08)	110.6 (4.0 \pm 0.04)	85.6 (4.1 \pm 0.05)

SER, NE and DA display limited inhibitory activities at hGAT1-3 and hBGT1 with less than 10% inhibition observed at compound concentrations up to 100 μ M (Figure 7b).

Structurally PRX can be thought of as a substituted derivative of piperidine where in position 3 there is a group of benzodioxol and in position 4 the fluorophenyl group. The closest to PRX active structure in hGAT is nipecotic acid, which belongs to the leading structures for the development of structural hGAT inhibitors and has the following inhibition potential: pIC₅₀hGAT1 \approx 4.7, pIC₅₀hGAT2 \approx 3.3, pIC₅₀hGAT3 \approx 4.0, pIC₅₀hBGT1 \approx 2.5 [61]. A comparison of the inhibition potential of PRX (Table 3) and nipecotic acid indicates that the replacement of the carboxyl group with benzodioxol and the addition of the fluorophenyl group change the activity profile from hGAT1 and hGAT3 to hGAT2, and hBGT1. Consequently, one can draw a preliminary conclusion that such a modification of the structure makes the molecule more susceptible to inhibition of hGAT located outside the CNS. Which in turn indicates that PRX has less influence on the neurogenesis process in the brain.

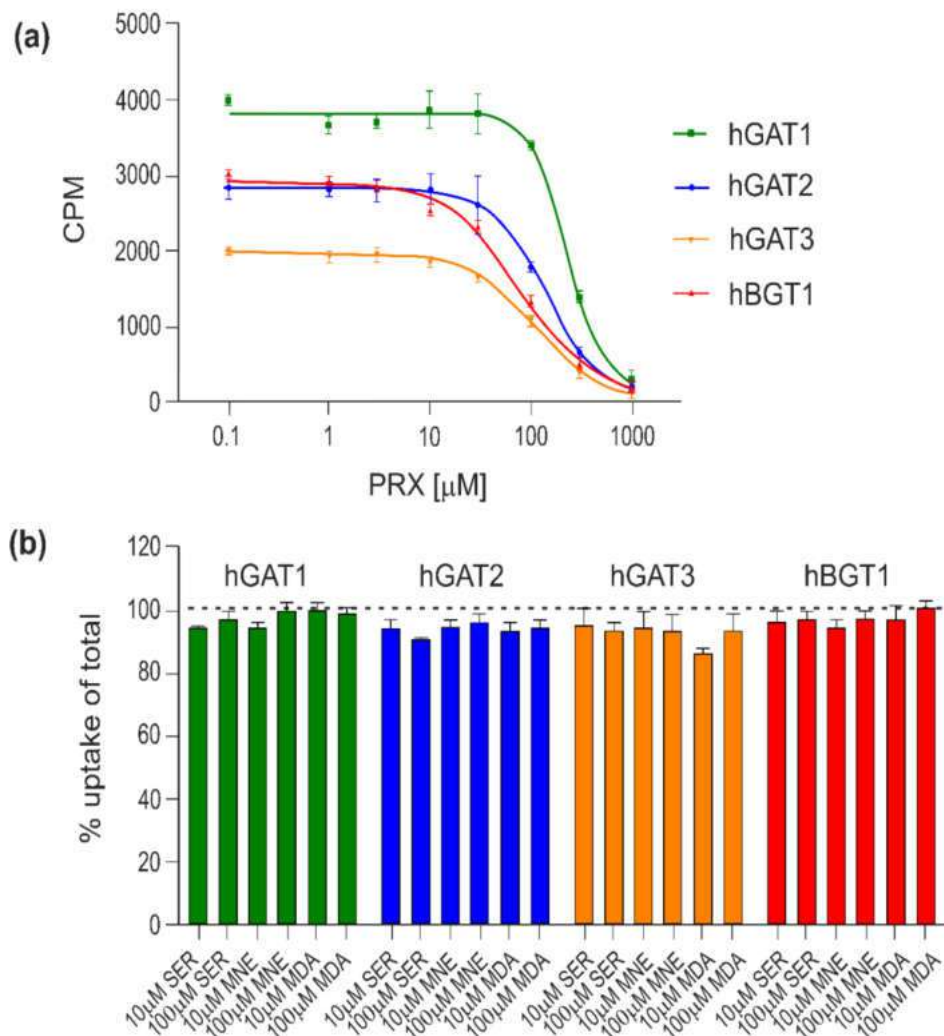


Figure 7. Inhibitory activity of PRX, SER, NE and DA at hGATs. The compounds were tested for their ability to inhibit the uptake of 30 nM [^3H]GABA for 3 min at all hGATs stably expressed in CHO cells. Representative concentration–response curves of PRX at hGAT1–3 and hBGT1 (a) and inhibitory activity of SER, NE and DA at hGAT1–3 and hBGT1 (b). All experiments were performed with technical replicates in three independent experiments and depicted as means \pm S.D in (a) or normalized means \pm S.E.M (b).

3. Discussion

Decreased amounts of SER, NE, DA and GABA have been observed in people with depression. Increasing SER in key CNS pathways and at desired serotonin receptor subtypes hypothetically mediates therapeutic actions in depression, and other diseases with similar symptoms such as OCD, PD and bulimia [64]. This is the result of the powerful influence of SER on emotionality that has been proven many times over [65]. SER and GABA are mainly, but not only, the basic inhibitory neurotransmitters in the CNS. They play an important role in processing neuronal information as well as regulating neurogenesis (proliferation, differentiation and migration of neural stem cells (NSC)) [66,67]. Numerous studies have shown that deficits in serotonin, norepinephrine and GABAergic neurotransmission and reduced neurogenesis are associated with the etiology of pathological anxiety and various mood disorders including depression [67–69]. Evidence of reduced neurogenesis has been observed in animal models of depression and in postmortem studies of individuals who had been diagnosed with major depressive disorder. However, the mechanisms driving these alterations in neurogenesis are not fully understood [70]. SER, NE and GABA have been

shown to regulate hippocampal neurogenesis and neuronal development in both children and adults [71,72]. In the adult brain, as in the embryonic nervous system, SER, NE and GABA depolarizes neural progenitors and immature neurons [73]. GABA also regulates quiescence of NSCs, differentiation of NSCs into neural progenitor cells (NPCs), maturation of NPCs into granule cells and synaptic integration of adult-born granule cells into the existing circuitry of the hippocampus [72]. A common feature of depression and anxiety disorders are SER, NE and GABA deficits resulting in emotional control disorders [65]. Recently, a direct link between chronic antidepressant treatment and an enhancement of SER, NE and GABA transmission were found [65,67]. This is in fact that SER, NE and GABA concentration are reduced in cortical brain and CSF in major depression, but its deficit can be reversed by chronic SSRI and electroconvulsive therapy [74,75].

PRX is an antidepressant drug known by the commercial names Aropax, Paxil, Pexeva, Seroxat, Sereupin and Brisdelle. It exhibits the highest known inhibitory potency for the active site of the hSERT (Table 1). A plethora of publications devoted to PRX (e.g., PubMed database 1992–2021 the word “paroxetine” indicates in about 6200 publications, Science Direct about 22000, Google Scholar about 54,500 works) proves the great importance of this drug in current medical therapies. These works provide a lot of information on the different aspects of taking this medicine and its mechanisms of action and it is clear that PRX is currently clinically approved for the treatment of numerous neurological disorders and not only depression [22].

After administration of PRX the level of SER rapidly increases (after a few minutes), while the antidepressant effect does not appear before after several weeks of chronic treatment [18,53,67,76]. This may indicate a possible different mechanism of action of PRX, and the most probable seems to be the neurogenic mechanism of action [77]. For this reason, we undertook studies of PRX interactions with four basic transporters, such as three MAT and GAT, the inhibition of which is crucial for increasing the level of basic neurotransmitters in the brain. At the beginning using the results of research based on molecular modeling techniques, the structural similarity of studied neurotransmitters: SER, NE, DA and GABA, as well as their respective targets, i.e., MAT and GAT1 transporters were analyzed. Using various techniques, such as the Tanimoto coefficient [30] and superimposition tests [63], it was shown that some structural similarities were found within the tested neurotransmitters as well as their transporters. Nevertheless, the analysis of structural similarities calculated as RMS determined by superimposing the structures of two proteins seems to be of key importance in understanding the interaction of various compounds with the analyzed objectives [37]. These results, in contrast to the data routinely presented in the literature based on the amino acid sequence identity technique [29,32–35], better highlight the structural differences of the analyzed transporters. These differences are of particular importance within the ligand binding site. The information obtained in this study indicates some unsimilarities between MAT and GAT1 (Figure 1), which may explain the low inhibitors of potency and binding affinity values of PRX for GAT1-3 and BGT1. On the other hand, a more detailed analysis of the literature data on the interactions of PRX and nipecotinic acid (as one of the leaders for the hGAT inhibitor family) provides information about the direction of interaction of these molecules as substituted piperidine derivatives. The data we obtained based on the *in silico* and *in vitro* methods indicate that PRX interacts with each monoamine transporter and shows some interactions with the hGATs (Tables 1 and 3, Figure 7). As shown in the Section 2, the obtained *in silico* data are confirmed by the relevant pharmacological studies for MAT previously published in the literature. It has recently been found that PRX may promote the proliferation of nerve cells *in vitro*, as well as hippocampal neurogenesis in human and animal models [78]. Nowadays it is well accepted that depletion of SER in the brain results in suppression of neurogenesis in the adult hippocampal. At the same time, raising levels of monoamine, serotonin and norepinephrine and GABA increases the rate of neurogenesis. Since PRX is the strongest known hSERT inhibitor, the study of the possible mechanism of antidepressant action clearly points to issues related to the phenomenon of neurogenesis. However,

the neurogenesis process itself is not yet sufficiently explained at the molecular level. Since this phenomenon is known to be linked to an increase in serotonin and norepinephrine and GABA levels within neurons, it seems that the potential for blocking suitable transporters is at the heart of this phenomenon.

It is important to emphasize that the interaction of PRX with the hGATs seem to be a more complex issue due to the multitude of different subtypes of hGAT. Hitherto four subtypes of plasma membrane human transporters for GABA (hGAT1–3 and hBGT1) have been identified [79–81], of which hGAT1 and hGAT3 have the highest expression levels in the mammalian central nervous system (CNS). hBGT1 is only found in scarce amounts and hGAT2 is not found in the brain parenchyma at all [82]. hGAT1 is predominantly located on GABAergic nerve terminals [35,59,83], while hGAT3 and hBGT1 are commonly associated with perisynaptic and distal astrocytic sites [28,60]. The location and level of individual transporters in CNS seem to be crucial in the neurogenesis process. Our experiments show that PRX interacts with all hGAT (Table 1 and 3 and Figure 7) to varying degrees. Interaction of PRX with individual hGATs can be arranged in descending order: $pIC_{50hBGT1} \approx 4.10$, $pIC_{50hGAT3} \approx 4.00$, $pIC_{50hGAT2} \approx 3.90$, $pIC_{50hGAT1} \approx 3.6$ (Table 3) and $pK_{ihGAT1} \approx 4.35$ (Table 1). In vitro data clearly confirm the strongest interaction with hBGT1. However, due to the very low level of BGT1 expression in the brain (about 100–1000 times lower than GAT1 [84]), BGT1 can at most be responsible for 0.1–1.0% of the GABA transport. In addition, neurotransmitters diffuse rapidly out of the synaptic cleft on a low microsecond time scale until they bind to transporters and are removed [85–87], hence BGT1's functional role in the neurogenesis process seems negligible. For these reasons and in light of the low inhibitory potency of PRX at hGAT1 and hGAT3, it appears that the interaction of PRX with the hGATs has little effect on the PRX induced neurogenesis process. Due to this analysis one can assume that if PRX induced neurogenesis it potentially connected with its inhibition to hSERT due to higher value inhibitory potency and binding affinity.

4. Materials and Methods

4.1. Pharmacological Studies

Flp-In Chinese hamster ovary (CHO) cell lines stably expressing hGATs (hGAT1-3 or hBGT1) used for the pharmacological studies have been described previously and were cultivated accordingly [88]. The [3 H]GABA competition uptake assay was performed exactly as previously described [61], and the [3 H]GABA uptake data were normalized to the percentage of total uptake in the individual experiments. Data presented are the pooled data of three independent experiments with three technical replicates. Concentration–response curves were fitted with GraphPad Prism (version 9.0.0, Yosemite, GraphPadSoftware, San Diego, CA, USA) as outlined previously [88].

4.2. In Silico Studies

4.2.1. Docking Study

The calculation procedures applied in the study are typical for processing of docking studies [63,89–91].

Ligand Preparation

For the 3D molecular structure calculations, the Gaussian 09 (version D.01. for Unix/Linux) package was used [92]. The initial acceptable 3D structures of 6 studied compounds were downloaded (as mol2 file) from ZINC [93]. Later, the GaussView [92,94] was applied for preparation of Gaussian input files. All the molecules were geometry-optimized in water described by the PCM (polarizable continuum model). DFT/B3LYP level of theory, 6-311 + G(d, p) basis set. After geometry optimization (the root-mean-square gradient value smaller than 10^{-6} a.u.) compounds were saved as mol2 files using the GaussView. Subsequently, torsionals and number of active torsions for ligands were defined and the Gasteiger charges were assigned to each compound via AutoDockTools (ADT) [95]. Finally, ligands prepared for docking were saved as pdbqt files.

Monoamine and γ -Aminobutyric Acid Transporters Preparation

Despite numerous protein sequences in RCSB Protein Data Bank, lack of three-dimensional structures of many important drug targets is still observed. As a consequence, homology modelling is the different option to construct an acceptable 3D model of the protein. Therefore, in this study docking experiments were mostly performed on the homology modeled proteins (hDAT, hNET and hGAT1), except hSERT, where the X-ray structure is available.

- hSERT

The structure of the ts3 hSERT was gained from the RCSB Protein Data Bank (5I6X pdb access code) [25]. First, the pdb structure was adapted for ADT software environment. Accordingly, one crystallographic water molecule and following ligands: dodecyl-beta-d-maltoside (LMT), cholesterol (CLR), Paroxetine (PRX), 2-acetamido-2-deoxy-beta-D-glucopyranose (NAG) were removed. Subsequently, missing hydrogen atoms were added and protein was saved in pdbqt format [96].

- hDAT, hNET hGAT1

As mentioned before, for hDAT, hNET and hGAT1 homology human protein sequences were obtained from the Swiss-Prot database (accession numbers: Q01959, P23975 and P30531, respectively). In this study the most actual homology modeled channels were used [6,26,44,97]. After that, pdb files were opened in ADT, which read coordinates. Subsequently, charges were added, correct atom types were assigned and nonpolar hydrogens were merged. Finally, according to the procedure the prepared protein was saved as a pdbqt file.

Molecular Docking

Preparation of the inputs for the modeling was carried out in full compliance with the applicable procedures. A grid box with a dimension of $60 \times 60 \times 60 \text{ \AA}^3$ and a grid spacing of 0.375 \AA was built in the middle of the pore forming sequences. In this *in silico* experiment we consider the interaction between ligands and intracellular pore gate formed from the transmembrane helices. For each model, drug-binding pockets in the cavity forming part of the substrate permeation pathway were identified (see Table 2). The rigid docking procedures were performed using the Lamarckian genetic algorithm of Autodock 4.2 software. The optimized docking parameters were set as default values, except the number of runs which was 100. Torsionals in the residuals of binding pockets were not rotatable. A cluster analysis was performed on the docked results using an RMS tolerance of 2 \AA . In each case the best docking result was considered as complex with the lowest binding energy. Hydrogen bindings between docked potent agents and related macromolecules were analyzed using ADT, the AutoDockTools program (ADT, Version 1.5.4) [95].

4.3. Similarity and Superimposition Study

The Tanimoto similarity coefficient (Tsc) for pairwise was computed as available on the ChemMine tools server (<http://chemminetools.ucr.edu/> (accessed on 1 June 2021)) [30]. To obtain additional information concerning the shape of the investigated drug, the active conformations were chosen for superimposition. The atoms (except hydrogen atoms) common to these molecules were selected for the fitting procedure using SCIGRESS software, version 3.4.4, www.scigress.com. Their similarity was calculated as RMS fit. The RMS routine provided estimates of how closely molecules fit with each other. The lower the RMS value, the better the similarity [37].

5. Conclusions and Perspectives

The mechanism of adult neurogenesis has not been fully understood and described so far. However, in light of current research, it has been found that it is initiated by an increase in the concentration of neurotransmitters in the brain. For this reason, it seems logical

to suppose that drugs used in the pharmacotherapy of diseases with etiology resulting from a decreased level of neurotransmission with the participation of basic mediators (SER, NE, DA, GABA) in the nervous system may potentially act in the neurogenic mechanism. Undoubtedly, depression is one of these diseases, and PRX, as the most widely used antidepressant, meets the requirements of the research assumption. It should be emphasized that PRX belongs to the group of the most studied molecules. For this reason, we have a lot of well-documented data that can be used in the context of analyzing new mechanisms of action.

The study presented in this publication predominantly was meant to answer the question about the possibility of PRX acting in the neurogenic mechanism. Data from molecular studies indicate a potential neurogenic effect of PRX, which may be mainly due to the strong inhibition of hSERT. In order to identify the causes of different values of the inhibition parameters (pK_i and pIC_{50}), it was reasonable to compare the structural similarity of the analyzed structures of the analyzed objects. First, the structural similarity of four basic neurotransmitters: SER, NE, DA and GABA and the corresponding targets, i.e., MAT and GAT1 transporters were analyzed, using the results of research based on molecular modeling techniques.

Using various techniques such as the Tanimoto test and overlap tests, it was shown that some structural similarities were found in the tested carriers and their transporters. Nevertheless, the analysis of structural similarities calculated as RMS determined by the superposition of the structures of two proteins considering the alpha carbon atoms of the respective amino acids seems to be crucial for understanding the interactions of various compounds with the analyzed targets. These results, in contrast to the data routinely presented in the literature, based on the amino acid sequence identification technique, highlight the structural differences of the analyzed transporters. These differences are of particular importance within the ligand binding site. The information obtained from this study indicates significant differences between MAT and GAT1, which may explain the low GAT1-3 and BGT1 inhibition values (potency and affinity, respectively) by PRX.

An additional, but very important, prospective achievement of the research carried out is the confirmation of some activity of PRX towards hGAT. This enables the development of research based on the modification of the PRX structure in order to increase the affinity for particular types of hGAT.

Author Contributions: M.K., L.F., A.N. conceived and directed the project, designed the study, collected the data, analyzed the data, interpreted the results and wrote the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was supported by the research grant from the EIRU program at the NCU entitled EI DEBUTS "Finding and understanding mechanisms of action of selected compounds active on central nervous system monoamine transporters".

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: The authors would like to thank Petrine Wellendorph and Maria E.K. Lie from the Department of Drug Design and Pharmacology, Faculty of Health and Medical Sciences, University of Copenhagen, Universitetsparken 2, 2100 Copenhagen, Denmark for conducting the in vitro part of this research. The authors would like to thank Wojciech Płonka from the Universität Hamburg, Center for Bioinformatics (ZBH), Hamburg, 20146, Germany and FQS Poland (Fujitsu Group), Parkowa 11, 30-538 Cracow, Poland for his technical support during superimposition part of this research.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Compliance with Ethical Standards: Not applicable.

Abbreviations

θ	hydrogen bond angle
#	hydrogen bond components: from the protein
%	hydrogen bond components: from the ligand
acc	hydrogen bond acceptor
ADT	AutoDockTools
CHO	Chinese hamster ovary
CNS	central nervous system
CSF	cerebrospinal fluid
DA	dopamine
DAT	proteins of dopamine transporter
E_B	complex energy binding
E_{HB}	hydrogen bond energy
GABA	γ -aminobutyric acid
GAT1	GABA transporter isoform 1
GAT2	GABA transporter isoform 2
GAT3	GABA transporter isoform 3
GDA	generalized anxiety disorder
hSERT	human proteins of serotonin transporter
hDAT	human proteins of dopamine transporter
hNET	human proteins of norepinephrine transporter
hGAT1	human GABA transporter isoform 1
hGAT2	human GABA transporter isoform 2
hGAT3	human GABA transporter isoform 3
hBGT1	human betaine/GABA transporter
L_{HB}	hydrogen bond length
MAT	monoamine transporters
MDD	major depressive disorder
NE	norepinephrine
NET	proteins of norepinephrine transporter
NPC	neural progenitor cells
NSC	neural stem cells
OCD	obsessive-compulsive disorder
PD	panic disorder
PDB ID	Protein Data Bank Identifier
pIC_{50xxx}	inhibitory potency of xxx transporters
pK_{ixxx}	binding affinity of xxx transporters
PMDD	premenstrual dysphoric disorder
PRX	paroxetine
PTSD	post traumatic stress disorder
R/S-NE	R/S enantiomers norepinephrine
RMS	root mean square
SAD	social anxiety disorder
SER	serotonin
SERT	proteins of serotonin transporter
SNRI	serotonin norepinephrine reuptake inhibitors
SSRI	selective serotonin reuptake inhibitors
TCA	tricyclic antidepressants
Tsc	Tanimoto similarity coefficient
TM	transmembrane segments
TMH	transmembrane segments helix

References

1. Rantala, M.J.; Luoto, S.; Krams, I.; Karlsson, H. Depression subtyping based on evolutionary psychiatry: Proximate mechanisms and ultimate functions. *Brain Behav. Immun.* **2018**, *69*, 603–617. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Butterweck, V. Mechanism of action of St John's wort in depression. *CNS Drugs* **2003**, *17*, 539–562. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

3. Walker, F.R. A critical review of the mechanism of action for the selective serotonin reuptake inhibitors: Do these drugs possess anti-inflammatory properties and how relevant is this in the treatment of depression? *Neuropharmacology* **2013**, *67*, 304–317. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Dean, J.; Keshavan, M. The neurobiology of depression: An integrated view. *Asian J. Psychiatry* **2017**, *27*, 101–111. [[CrossRef](#)]
5. Moon, J.-M.; Thapliyal, N.; Hussain, K.K.; Goyal, R.N.; Shim, Y.-B. Conducting polymer-based electrochemical biosensors for neurotransmitters: A review. *Biosens. Bioelectron.* **2018**, *102*, 540–552. [[CrossRef](#)]
6. Ravna, A.W.; Sylte, I.; Dahl, S.G. Structure and localisation of drug binding sites on neurotransmitter transporters. *J. Mol. Med.* **2009**, *15*, 1155–1164. [[CrossRef](#)]
7. Zangrossi, H., Jr.; Del Ben, C.M.; Graeff, F.G.; Guimarães, F.S. Serotonin in panic and anxiety disorders. In *Handbook of Behavioral Neuroscience*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2020; Volume 31, pp. 611–633.
8. Whitaker-Azmitia, P.M. The discovery of serotonin and its role in neuroscience. *Neuropsychopharmacology* **1999**, *21*, 2–8. [[CrossRef](#)]
9. Fijałkowski, L.; Sałat, K.; Podkowa, A.; Zaręba, P.; Nowaczyk, A. Potential role of selected antiepileptics used in neuropathic pain as human GABA transporter isoform 1 (GAT1) inhibitors—Molecular docking and pharmacodynamic studies. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2017**, *96*, 362–372. [[CrossRef](#)]
10. Monteleone, P.; Maj, M.; Iovino, M.; Steardo, L. GABA, depression and the mechanism of action of antidepressant drugs: A neuroendocrine approach. *J. Affect. Disord.* **1990**, *20*, 1–5. [[CrossRef](#)]
11. Schwartz, T.L.; Nihalani, N. Tiagabine in anxiety disorders. *Expert Opin. Pharmacother.* **2006**, *7*, 1977–1987. [[CrossRef](#)]
12. Iversen, L. Neurotransmitter transporters: Fruitful targets for CNS drug discovery. *Mol. Psychiatry* **2000**, *5*, 357–362. [[CrossRef](#)]
13. Racagni, G.; Brunello, N. Physiology to functionality: The brain and neurotransmitter activity. *Int. Clin. Psychopharmacol.* **1999**, *14*, S3–S7. [[CrossRef](#)]
14. Kalueff, A.V.; Nutt, D.J. Role of GABA in anxiety and depression. *Depress. Anxiety* **2007**, *24*, 495–517. [[CrossRef](#)]
15. Kristensen, A.S.; Andersen, J.; Jørgensen, T.N.; Sørensen, L.; Eriksen, J.; Loland, C.J.; Strømgaard, K.; Gether, U. SLC6 neurotransmitter transporters: Structure, function, and regulation. *Pharmacol. Rev.* **2011**, *63*, 585–640. [[CrossRef](#)]
16. Iversen, L. Neurotransmitter transporters and their impact on the development of psychopharmacology. *Br. J. Pharmacol.* **2006**, *147*, S82–S88. [[CrossRef](#)]
17. Tuma, A.H.; Maser, J.D. *Anxiety and the Anxiety Disorders*; Routledge: New York, NY, USA, 2019.
18. Boas, G.R.V.; de Lacerda, R.B.; Paes, M.M.; Gubert, P.; da Cruz Almeida, W.L.; Rescia, V.C.; de Carvalho, P.M.G.; de Carvalho, A.A.V.; Oesterreich, S.A. Molecular aspects of depression: A review from neurobiology to treatment. *Eur. J. Pharmacol.* **2019**, *851*, 99–121. [[CrossRef](#)]
19. Coleman, J.A.; Navratna, V.; Antermite, D.; Yang, D.; Bull, J.A.; Gouaux, E. Chemical and structural investigation of the paroxetine-human serotonin transporter complex. *eLife* **2020**, *9*, e56427. [[CrossRef](#)]
20. Davis, B.A.; Nagarajan, A.; Forrest, L.R.; Singh, S.K. Mechanism of paroxetine (paxil) inhibition of the serotonin transporter. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 23789. [[CrossRef](#)]
21. Bourin, M.; Chue, P.; Guillon, Y. Paroxetine: A review. *CNS Drug Rev.* **2001**, *7*, 25–47. [[CrossRef](#)]
22. Kowalska, M.; Nowaczyk, J.; Fijałkowski, L.; Nowaczyk, A. Paroxetine—Overview of the molecular mechanisms of action. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 1662. [[CrossRef](#)]
23. Oh, S.-J.; Cheng, J.; Jang, J.-H.; Arace, J.; Jeong, M.; Shin, C.-H.; Park, J.; Jin, J.; Greengard, P.; Oh, Y.-S. Hippocampal mossy cell involvement in behavioral and neurogenic responses to chronic antidepressant treatment. *Mol. Psychiatry* **2020**, *25*, 1215–1228. [[CrossRef](#)]
24. Duman, R.S.; Aghajanian, G.K.; Sanacora, G.; Krystal, J.H. Synaptic plasticity and depression: New insights from stress and rapid-acting antidepressants. *Nat. Med.* **2016**, *22*, 238–249. [[CrossRef](#)]
25. Coleman, J.A.; Green, E.M.; Gouaux, E. X-ray structures and mechanism of the human serotonin transporter. *Nature* **2016**, *532*, 334–339. [[CrossRef](#)]
26. Selvaraj Manikandan, A.; Ramanathan, T.; Selvarajan, K.; Kesavanarayanan, T.L.; Salleh, M. Identification of Benzoxazolinone Derivatives Based Inhibitors for Depression and Pain Related Disorders Using Human Serotonin and Norepinephrine Transporter as Dual Therapeutic Target: A Computational Approach. *Int. J. Drug Deliv.* **2014**, *6*, 389–395.
27. Penmatsa, A.; Wang, K.H.; Gouaux, E. X-ray structures of Drosophila dopamine transporter in complex with nisoxetine and reboxetine. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2015**, *22*, 506–508. [[CrossRef](#)]
28. Nowaczyk, A.; Fijałkowski, L.; Kowalska, M.; Podkowa, A.K.S. Studies on the activity of selected highly lipophilic compounds toward hGAT1 inhibition: Part II. *ACS Chem. Neurosci.* **2019**, *10*, 337–347. [[CrossRef](#)]
29. Haddad, Y.; Heger, Z.; Adam, V. Guidelines for homology modeling of dopamine, norepinephrine, and serotonin transporters. *ACS Chem. Neurosci.* **2016**, *7*, 1607–1613. [[CrossRef](#)]
30. Bero, S.; Muda, A.; Choo, Y.; Muda, N.; Pratama, S. Similarity measure for molecular structure: A brief review. *J. Phys.* **2017**, *2017*, 012015. [[CrossRef](#)]
31. Koldso, H.; Christiansen, A.B.; Sinning, S.; Schiøtt, B. Comparative modeling of the human monoamine transporters: Similarities in substrate binding. *ACS Chem. Neurosci.* **2013**, *4*, 295–309. [[CrossRef](#)]
32. Giros, B.; Wang, Y.-M.; Suter, S.; McLeskey, S.B.; Pifl, C.; Caron, M.G. Delineation of discrete domains for substrate, cocaine, and tricyclic antidepressant interactions using chimeric dopamine-norepinephrine transporters. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 15985–15988. [[CrossRef](#)]

33. Wang, K.H.; Penmatsa, A.; Gouaux, E. Neurotransmitter and psychostimulant recognition by the dopamine transporter. *Nature* **2015**, *521*, 322–327. [CrossRef] [PubMed]
34. Ortore, G.; Orlandini, E.; Betti, L.; Giannaccini, G.; Mazzoni, M.R.; Camodeca, C.; Nencetti, S. Focus on Human Monoamine Transporter Selectivity. New Human DAT and NET Models, Experimental Validation, and SERT Affinity Exploration. *ACS Chem. Neurosci.* **2020**, *11*, 3214–3232. [CrossRef] [PubMed]
35. Zafar, S.; Nguyen, M.E.; Muthyala, R.; Jabeen, I.; Sham, Y.Y. Modeling and Simulation of hGAT1: A Mechanistic Investigation of the GABA Transport Process. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **2019**, *17*, 61–69. [CrossRef] [PubMed]
36. Madhusudhan, M.; Marti-Renom, M.A.; Sanchez, R.; Sali, A. Variable gap penalty for protein sequence–structure alignment. *Protein Eng. Des. Sel.* **2006**, *19*, 129–133. [CrossRef]
37. Wong, C.; Currie, J. *Teaching with SCIGRES Molecular Modeling in Chemistry*; Fujitsu Limited: Forest Grove, OR, USA, 2012.
38. Chothia, C.; Lesk, A.M. The relation between the divergence of sequence and structure in proteins. *EMBO J.* **1986**, *5*, 823–826. [CrossRef]
39. Fujitsu Limited. *CACHE for Windows User Guide*; Fujitsu Limited: Tokyo, Japan; Oxford Molecular Ltd.: Oxford, UK, 2003.
40. Navratna, V.; Tosh, D.K.; Jacobson, K.A.; Gouaux, E. Thermostabilization and purification of the human dopamine transporter (hDAT) in an inhibitor and allosteric ligand bound conformation. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0200085. [CrossRef]
41. Mattson, R.J.; Catt, J.D.; Denhart, D.J.; Deskus, J.A.; Ditta, J.L.; Higgins, M.A.; Marcin, L.R.; Sloan, C.P.; Beno, B.R.; Gao, Q. Conformationally restricted homotryptamines. 2. Indole cyclopropylmethylamines as selective serotonin reuptake inhibitors. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 6023–6034. [CrossRef]
42. Owens, M.J.; Krulewicz, S.; Simon, J.S.; Sheehan, D.V.; Thase, M.E.; Carpenter, D.J.; Plott, S.J.; Nemeroff, C.B. Estimates of serotonin and norepinephrine transporter inhibition in depressed patients treated with paroxetine or venlafaxine. *Neuropsychopharmacology* **2008**, *33*, 3201–3212. [CrossRef]
43. Tatsumi, M.; Groshan, K.; Blakely, R.D.; Richelson, E. Pharmacological profile of antidepressants and related compounds at human monoamine transporters. *Eur. J. Pharmacol.* **1997**, *340*, 249–258. [CrossRef]
44. Andersen, J.; Ringsted, K.B.; Bang-Andersen, B.; Strömgaard, K.; Kristensen, A.S. Binding site residues control inhibitor selectivity in the human norepinephrine transporter but not in the human dopamine transporter. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 15650. [CrossRef]
45. Skovstrup, S.; Taboureau, O.; Bräuner-Osborne, H.; Jørgensen, F.S. Homology modelling of the GABA transporter and analysis of tiagabine binding. *ChemMedChem* **2010**, *5*, 986–1000. [CrossRef]
46. Abramyan, A.M.; Slack, R.D.; Meena, S.; Davis, B.A.; Newman, A.H.; Singh, S.K.; Shi, L. Computation-guided analysis of paroxetine binding to hSERT reveals functionally important structural elements and dynamics. *Neuropharmacology* **2019**, *161*, 107411. [CrossRef]
47. Kulkarni, S.S.; Grundt, P.; Kopajtic, T.; Katz, J.L.; Newman, A.H. Structure–activity relationships at monoamine transporters for a series of N-substituted 3 α -(bis [4-fluorophenyl] methoxy) tropanes: Comparative molecular field analysis, synthesis, and pharmacological evaluation. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 3388–3398. [CrossRef]
48. Beuming, T.; Kniazeff, J.; Bergmann, M.L.; Shi, L.; Gracia, L.; Raniszewska, K.; Newman, A.H.; Javitch, J.A.; Weinstein, H.; Gether, U. The binding sites for cocaine and dopamine in the dopamine transporter overlap. *Nat. Neurosci.* **2008**, *11*, 780–789. [CrossRef]
49. Rounsaville, B.J. Treatment of cocaine dependence and depression. *Biol. Psychiatry* **2004**, *56*, 803–809. [CrossRef]
50. Xu, L.; Chen, L.Y. Identification of a new allosteric binding site for cocaine in dopamine transporter. *J. Chem. Inf. Model.* **2020**, *60*, 3958–3968. [CrossRef]
51. Wilson, M.; Tripp, J. Clomipramine. Statpearls. 2020. Available online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK541006/> (accessed on 1 June 2021).
52. O'Donnell, J.; Zeppenfeld, D.; McConnell, E.; Pena, S.; Nedergaard, M. Norepinephrine: A neuromodulator that boosts the function of multiple cell types to optimize CNS performance. *Neurochem. Res.* **2012**, *37*, 2496–2512. [CrossRef]
53. Eliwa, H.; Belzung, C.; Surget, A. Adult hippocampal neurogenesis: Is it the alpha and omega of antidepressant action? *Biochem. Pharmacol.* **2017**, *141*, 86–99. [CrossRef]
54. Pidathala, S.; Mallela, A.K.; Joseph, D.; Penmatsa, A. Structural basis of norepinephrine recognition and transport inhibition in neurotransmitter transporters. *bioRxiv* **2020**. [CrossRef]
55. Altova, E.P.; Rykov, A.N.; Abaev, M.A.; Marochkin, I.I.; Vilkova, A.L.; Popik, M.V.; Shishkov, I.F. Molecular structure of noradrenaline according to gas-phase electron diffraction data and quantum chemical calculations. *Mendeleev Commun.* **2019**, *29*, 411–413. [CrossRef]
56. Andersen, A. Structural studies of metabolic products of dopamine. IV. Crystal and molecular structure of (–)-noradrenaline. *Acta Chem. Scand.* **1975**, *29*, 871–876. [CrossRef]
57. Pandit-Taskar, N.; Modak, S. Norepinephrine transporter as a target for imaging and therapy. *J. Nucl. Med.* **2017**, *58*, 39S–53S. [CrossRef]
58. Moret, C.; Briley, M. The importance of norepinephrine in depression. *Neuropsychiatry Dis. Treat.* **2011**, *7*, 9.
59. Brambilla, P.; Perez, J.; Barale, F.; Schettini, G.; Soares, J.C. GABAergic dysfunction in mood disorders. *Mol. Psychiatry* **2003**, *8*, 721–737. [CrossRef]
60. Kicking, S.; Hellsberg, E.; Schousboe, A.; Ecker, G.F.; Wellendorph, P. Structural and molecular aspects of betaine-GABA transporter 1 (BGT1) and its relation to brain function. *Neuropharmacology* **2019**, *161*, 107644. [CrossRef]

61. Kvist, T.; Christiansen, B.; Jensen, A.A.; Brauner-Osborne, H. The four human γ -aminobutyric acid (GABA) transporters: Pharmacological characterization and validation of a highly efficient screening assay. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* **2009**, *12*, 241–249. [CrossRef]
62. Sliwoski, G.; Kothiwale, S.; Meiler, J.; Lowe, E.W. Computational methods in drug discovery. *Pharmacol. Rev.* **2014**, *66*, 334–395. [CrossRef]
63. Shah, K.; Mujwar, S.; Gupta, J.K.; Shrivastava, S.K.; Mishra, P. Molecular Docking and In Silico Cogitation Validate Mefenamic Acid Prodrugs as Human Cyclooxygenase-2 Inhibitor. *Assay Drug Dev. Technol.* **2019**, *17*, 285–291. [CrossRef]
64. Stahl, S.M. Serotonin: It's possible to have too much of a good thing. *J. Clin. Psychiatry* **1997**, *58*, 520–521. [CrossRef]
65. Möhler, H. The GABA system in anxiety and depression and its therapeutic potential. *Neuropharmacology* **2012**, *62*, 42–53. [CrossRef]
66. Wang, S.; Du, L.; Peng, G.; Li, W. GABA inhibits proliferation and self-renewal of mouse retinal progenitor cell. *Cell Death Discov.* **2019**, *5*, 1–8. [CrossRef] [PubMed]
67. Park, S.-C. Neurogenesis and antidepressant action. *Cell Tissue Res.* **2019**, *377*, 95–106. [CrossRef] [PubMed]
68. Earnheart, J.C.; Schweizer, C.; Crestani, F.; Iwasato, T.; Itoharu, S.; Mohler, H.; Lüscher, B. GABAergic control of adult hippocampal neurogenesis in relation to behavior indicative of trait anxiety and depression states. *J. Neurosci.* **2007**, *27*, 3845–3854. [CrossRef] [PubMed]
69. De Oliveira, C.L.; Bolzan, J.A.; Surget, A.; Belzung, C. Do antidepressants promote neurogenesis in adult hippocampus? A systematic review and meta-analysis on naive rodents. *Pharmacol. Ther.* **2020**, *210*, 107515. [CrossRef]
70. Huffman, J.; Taylor, G.T. *Stress, Neurogenesis, and Mood: An Introduction to the Neurogenic Hypothesis of Depression*; Wiley: New York, NY, USA, 2020; pp. 37–42.
71. Kempermann, G.; Song, H.; Gage, F.H. Neurogenesis in the adult hippocampus. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2015**, *7*, a018812. [CrossRef]
72. Catavero, C.; Bao, H.; Song, J. Neural mechanisms underlying GABAergic regulation of adult hippocampal neurogenesis. *Cell Tissue Res.* **2018**, *371*, 33–46. [CrossRef]
73. Zhao, C.; Deng, W.; Gage, F.H. Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell* **2008**, *132*, 645–660. [CrossRef]
74. Pabba, M.; Sibille, E. GABA, depression and suicide. In *Biological Aspects of Suicidal Behavior*; Karger Publishers: Basel, Switzerland, 2016; Volume 30, pp. 37–50.
75. Pytka, K.; Dziubina, A.; Mlyniec, K.; Dziedzicak, A.; Żmudzka, E.; Furgała, A.; Olczyk, A.; Sapa, J.; Filipiek, B. The role of glutamatergic, GABA-ergic, and cholinergic receptors in depression and antidepressant-like effect. *Pharmacol. Rep.* **2016**, *68*, 443–450. [CrossRef]
76. Frazer, A.; Benmansour, S. Delayed pharmacological effects of antidepressants. *Mol. Psychiatry* **2002**, *7*, S23–S28. [CrossRef]
77. Snyder, J.S. Recalibrating the relevance of adult neurogenesis. *Trends Neurosci.* **2019**, *42*, 164–178. [CrossRef]
78. Jahromi, M.; Razavi, S.; Amirpour, N.; Khosravizadeh, Z. Paroxetine can enhance neurogenesis during neurogenic differentiation of human adipose-derived stem cells. *Avicenna J. Med. Biotechnol.* **2016**, *8*, 152.
79. Schousboe, A.; Madsen, K.K. Delineation of the Role of Astroglial GABA Transporters in Seizure Control. *Neurochem. Res.* **2017**, *42*, 2019–2023. [CrossRef]
80. Schousboe, A.; Wellendorph, P.; Frølund, B.; Clausen, R.P.; Krogsgaard-Larsen, P. Astrocytic GABA Transporters: Pharmacological Properties and Targets for Antiepileptic Drugs. In *Glial Amino Acid Transporters*; Springer: Cham, Switzerland, 2017; pp. 283–296.
81. Annalisa, S. Structure, function, and plasticity of GABA transporters. *Front. Cell. Neurosci.* **2014**, *8*, 1–14.
82. Lie, M.E.K.; Al-Khawaja, A.; Damgaard, M.; Haugaard, A.S.; Schousboe, A.; Clarkson, A.N.; Wellendorph, P. Glial GABA Transporters as Modulators of Inhibitory Signalling in Epilepsy and Stroke. *Adv. Neurobiol.* **2017**, *16*, 137–167.
83. Forrest, L.R.; Tavoulari, S.; Zhang, Y.-W.; Rudnick, G.; Honig, B. Identification of a chloride ion binding site in Na⁺/Cl⁻-dependent transporters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 12761–12766. [CrossRef]
84. Kempson, S.A.; Zhou, Y.; Danbolt, N.C. The betaine/GABA transporter and betaine: Roles in brain, kidney, and liver. *Front. Physiol.* **2014**, *5*, 159. [CrossRef]
85. Rusakov, D.A.; Saitow, F.; Lehre, K.P.; Konishi, S. Modulation of presynaptic Ca²⁺ entry by AMPA receptors at individual GABAergic synapses in the cerebellum. *J. Neurosci.* **2005**, *25*, 4930–4940. [CrossRef]
86. Herculano-Houzel, S. Numbers of neurons as biological correlates of cognitive capability. *Curr. Opin. Behav. Sci.* **2017**, *16*, 1–7. [CrossRef]
87. Drachman, D.A. *Do We Have Brain to Spare?* AAN Enterprises: Worcester, MA, USA, 2005.
88. Al-Khawaja, A.; Petersen, J.G.; Damgaard, M.; Jensen, M.H.; Vogensen, S.B.; Lie, M.E.K.; Kragholm, B.; Bräuner-Osborne, H.; Clausen, R.P.; Frølund, B.; et al. Pharmacological identification of a guanidine-containing β -alanine analogue with low micromolar potency and selectivity for the betaine/GABA transporter 1 (BGT1). *Neurochem. Res.* **2014**, *39*, 1988–1996. [CrossRef]
89. Furgała-Wojas, A.; Kowalska, M.; Nowaczyk, A.; Fijałkowski, L.; Sałat, K. Comparison of Bromhexine and its Active Metabolite-Ambroxol as Potential Analgesics Reducing Oxaliplatin-induced Neuropathic Pain-Pharmacodynamic and Molecular Docking Studies. *Curr. Drug Metab.* **2020**, *21*, 548–561. [CrossRef]
90. Kowalska, M.; Nowaczyk, J.; Nowaczyk, A. KV11.1, NaV1.5, and CaV1.2 Transporter Proteins as Antitarget for Drug Cardiotoxicity. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 8099. [CrossRef] [PubMed]

91. Pagadala, N.S.; Syed, K.; Tuszynski, J. Software for molecular docking: A review. *Biophys. Rev.* **2017**, *9*, 91–102. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. Frisch, M.J.; Trucks, G.W.; Schlegel, H.B.; Scuseria, G.E.; Robb, M.A.; Cheeseman, J.R.; Zakrzewski, V.G.; Montgomery, J.A.; Stratmann, R.E.; Burant, S.; et al. *Gaussian 09, Revision D.01*; Gaussian, Inc.: Wallingford, CT, USA, 2009.
93. Irwin, J.J.; Sterling, T.; Mysinger, M.M.; Bolstad, E.S.; Coleman, R.G. ZINC: A free tool to discover chemistry for biology. *J. Chem. Inf. Model.* **2012**, *52*, 1757–1768. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Dennington, R.; Keith, T.; Millam, J. *GaussView, Version 5*; Semichem Inc.: Shawnee Mission, KS, USA, 2009.
95. Morris, G.M.; Goodsell, D.S.; Halliday, R.S.; Huey, R.; Hart, W.E.; Belew, R.K.; Olson, A.J. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *J. Comput. Chem.* **1998**, *19*, 1639–1662. [[CrossRef](#)]
96. Morris, G.M.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M.F.; Belew, R.K.; Goodsell, D.S.; Olson, A.J. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J. Comput. Chem.* **2009**, *30*, 2785–2791. [[CrossRef](#)]
97. Boeckmann, B.; Bairoch, A.; Apweiler, R.; Blatter, M.-C.; Estreicher, A.; Gasteiger, E.; Martin, M.J.; Michoud, K.; Donovan, C.; Phan, I. The SWISS-PROT protein knowledgebase and its supplement TrEMBL in 2003. *Nucleic Acids Res.* **2003**, *1*, 365–370. [[CrossRef](#)]

9. WNIOSKI

Przedstawione w niniejszym cyklu prac badania wskazują, iż rozwój technologii opartych na metodach chemii obliczeniowej pozwolił na dogłębne zrozumienie bezpieczeństwa kardiologicznego stosowania leków. Zebrane w ramach pracy: *K_v11.1, Na_v1.5, and Ca_v1.2 Transporter Proteins as Antitarget for Drug Cardiotoxicity* dane dotyczące kanałów jonowych obecnych w sercu wskazują, iż:

- przewidywanie kardiotoksycznego działania leków stało się możliwe dzięki dokładnemu zbadaniu przewodnictwa jonowego układu sercowo - naczyniowego, szczególnie udziału kanałów kationowych istotnych w tym procesie;
- wymogi dotyczące bezpieczeństwa farmakologicznego ulegają ciągłym zaostreniu, co zmniejsza ryzyko wystąpienia działań niepożądanych wynikających ze stosowania leków;
- kluczowym etapem oceny bezpieczeństwa stosowania leków jest właściwe rozróżnianie i identyfikowanie celów terapeutycznych oraz antycelów;
- najnowsze wytyczne oceny kardiotoksyczności zaproponowane przez CiPA wskazują, iż K_v11.1, Na_v1.5, and Ca_v1.2 są celami terapeutycznymi leków stosowanych w nadciśnieniu, ale również antycelami w ocenie ryzyka działania nasercowego dla leków dedykowanych innym celom terapeutycznym.

Ocenę ryzyka kardiotoksyczności przeprowadzono dla jednego z najczęściej stosowanego leku w chorobach CSN – TGB. Przeprowadzone badania, zaprezentowane w pracy *Antiepileptic Drug Tiagabine Does Not Directly Target Key Cardiac Ion Channels K_v11.1, Na_v1.5 and Ca_v1.2*. wskazują, iż:

- proces dokowania molekularnego wskazuje, że TGB nie wiąże się z napięciowymi kanałami jonowymi i nie wywiera na nie bezpośredniego wpływu, dlatego obserwowany u pacjentów częstoskurcz z dużym prawdopodobieństwem nie jest wynikiem interakcji TGB z VGICs;
- badania przeprowadzone na szczurach potwierdziły dane otrzymane technikami obliczeniowymi, niemniej należy mieć na względzie różnice fizjologiczne dzielące organizmy gryzoni i ludzi.

W pracy *Paroxetine – overview of the molecular mechanisms of action* przeprowadzono przegląd dostępnych struktur krystalograficznych kompleksów PRX z różnymi białkowymi

celami terapeutycznymi. Dodatkowo opisano poznane mechanizmy jej działania oraz zastosowanie w farmakoterapii. Przeprowadzone analizy wskazały następujące wnioski:

- profil farmakologiczny PRX w pełni wpisuje się w potrzeby współczesnej medycyny ze względu na wielokierunkowość działania przy stosunkowo niskiej toksyczności;
- budowa oraz powinowactwo do wielu celów terapeutycznych PRX stwarza możliwości poszukiwań pochodnych PRX mających potencjalnie zastosowanie w leczeniu niewydolności serca oraz schorzeń onkologicznych;
- pomimo historycznych kontrowersji, związanych z procesem zatwierdzenia PRX w leczeniu depresji w grupie młodych pacjentów, najnowsze analizy i metaanalizy danych klinicznych uzasadniają rozważenie repozycjonowania PRX w tej grupie pacjentów.

Najnowsze badania układu nerwowego wskazują, iż powstawanie neuronów z komórek macierzystych mózgu stanowi kluczowy aspekt w procesie regeneracji CNS. Wykazano, że niektóre leki, mogą pobudzać proces neurogenezy. Z tego względu w pracy *Assessment of Paroxetine Molecular Interactions with Selected Monoamine and γ -Aminobutyric Acid Transporters* podjęto próbę oceny mechanizmu aktywacji neurogenezy wywołanej PRX. Przeprowadzone badania wskazują, iż:

- PRX silnie oddziałuje z transporterami monoamin oraz wchodzi w interakcje z transporterami GABA;
- wartości liczbowe powinowactwa PRX do GAT wskazują jednak, że neurogeny mechanizm działania badanego leku może być zdeterminowany głównie przez interakcje PRX z SERT;
- interakcja PRX z GAT daje możliwość poszukiwania pochodnych badanego leku silniej oddziałujących z transporterami kwasu γ -aminomasłowego, które miałyby zdolność indukcji neurogenezy.

10. STRESZCZENIE

Wstępne badania mechanizmów oraz bezpieczeństwa stosowania leków są możliwe dzięki zaawansowanym metodom obliczeniowym. Ze względu na ciągle rosnące wymagania dotyczące oceny toksyczności leków, testy *in silico* są niezastąpionym narzędziem, które na podstawie struktury chemicznej cząsteczki przewidują jej aktywność biologiczną.

W niniejszych rozważaniach uwagę skupiono na dwóch lekach powszechnie stosowanych w zaburzeniach ośrodkowego układu nerwowego: tiagabinie (TGB) oraz paroksetynie (PRX). Dane piśmiennicze wskazują, iż u 1% pacjentów leczonych TGB występuje zjawisko tachykardii. Najnowsze wytyczne oceny kardiotoxyczności skupiają się na kanałach zaproponowanych przez *Comprehensive In Vitro Proarrhythmia Assay* (CiPA): $K_v11.1$, $Na_v1.5$ -late, $Ca_v1.2$, $K_v4.3$, $K_vLQT1/mink$ oraz $K_{ir}2.1$. Interakcja z $K_v11.1$, $Na_v1.5$ -late, $Ca_v1.2$ ma decydujący wpływ na ryzyko wywoływania arytmii. W związku z tym w pracy: *$K_v11.1$, $Na_v1.5$, and $Ca_v1.2$ Transporter Proteins as Antitarget for Drug Cardiotoxicity* zebrano najważniejsze informacje dotyczące jonowych kanałów obecnych w sercu. Przeprowadzona analiza stała się podstawą do przeprowadzenia procesu dokowania molekularnego cząsteczki TGB do modeli ludzkich kanałów jonowych: $hK_v11.1$, $hNa_v1.5$, $hCa_v1.5$. Otrzymane wyniki porównano z wartościami otrzymanymi dla związków referencyjnych, a następnie potwierdzono testami *in vitro*. Uzyskane dane opisano w pracy zatytuowanej: *Antiepileptic Drug Tiagabine Does Not Directly Target Key Cardiac Ion Channels $K_v11.1$, $Na_v1.5$ and $Ca_v1.2$* . Uzyskane metodami chemii obliczeniowej wartości energii kompleksów R-TGB z modelami ludzkich kanałów jonowych wskazują, iż interakcje te prawdopodobnie nie stanowią przyczyny wywoływania tachykardii po stosowaniu terapii TGB.

Techniki modelowania molekularnego wykorzystano również w badaniach neurogenego mechanizmu działania PRX. W tym celu z sukcesem zadokowano badaną cząsteczkę do miejsc aktywnych transporterów hMATs: hSERT, hNET, hDAT, oraz hGAT1. Testy potwierdziły interakcję PRX ze wszystkimi badanymi transporterami, niemniej ustalono, że zjawisko neurogenezy z wysokim prawdopodobieństwem zachodzi głównie dzięki interakcji PRX - hSERT. Dodatkowo interesującym okazał się fakt, iż PRX oddziałuje z hGATs, co daje możliwość poszukiwania nowych pochodnych PRX, tworzących jeszcze silniejsze połączenia. Otrzymane dane zweryfikowano testami farmakologicznymi na komórkach jajnika chomika chińskiego, które potwierdziły wychwyt zwrotny kwasu γ -aminomasłowego ze szczeliny synaptycznej.

11. SUMMARY

Preliminary studies of the mechanisms and safety of drugs are possible by advanced computational methods. Due to the constantly increasing requirements for drug toxicity assessment, *in silico* assays are indispensable tools to predict the biological activity of a molecule from the chemical structure.

In the present considerations the focus is centered on two drugs commonly used for Central Nervous System disorders i.e. tiagabine (TGB) and paroxetine (PRX). It has been observed that tachycardia occurs in 1% of patients treated with tiagabine. The newest cardiotoxicity assessment guidelines concentrate on the channels proposed by Comprehensive In Vitro Proarrhythmia Assay (CiPA): $K_V11.1$, $Na_V1.5$ -late, $Ca_V1.2$, $K_V4.3$, $K_VLQT1/mink$ and $Kir2.1$. Interaction with $K_V11.1$, $Na_V1.5$ -late, $Ca_V1.2$ plays a critical role in the risk of inducing arrhythmias. Accordingly, at work: *$K_V11.1$, $Na_V1.5$, and $Ca_V1.2$ Transporter Proteins as Antitarget for Drug Cardiotoxicity* collected the essential information about the ion channels involved in the heart. The conducted analysis provided the foundation for molecular docking of the tiagabine molecule to human ion channel models: $hK_V11.1$, $hNa_V1.5$, $hCa_V1.5$. The obtained results were compared with the values received for the reference compounds and then confirmed by *in vitro* tests. The resulting data are described in the paper titled: *Antiepileptic drug tiagabine does not directly target key cardiac ion channels $K_V11.1$, $Na_V1.5$ and $Ca_V1.2$* . Energy values of R–TGB complexes with models of human ion channels generated by computational chemistry methods indicate that these interactions are probably not the cause of tachycardia induction after TGB therapy.

Molecular modelling studies were also employed in the study of the neurogenic mechanism of action of PRX. For this purpose, the investigated molecule was successfully docked to the sites of active transporters hMATs: hSERT, hNET, hDAT and hGAT1. The results confirmed the interaction of PRX with all transporters studied. However, it was established that the phenomenon of neurogenesis with high probability occurs mainly due to PRX–hSERT interaction as it is the complex with the highest energy value. Additionally, it was observed that PXT interacts with hGATs, which gives an opportunity to search for new PRX derivatives, forming even stronger bond. The data obtained were verified by pharmacological assays on Chinese hamster ovary cells, which confirmed γ -aminobutyric acid reuptake from the synaptic cleft.

12. PIŚMIENNICTWO

1. WHO, <https://www.who.int/about/governance/constitution>; data dostępu: 2022.01.30.
2. Smith MA. Alzheimer Disease. *International Review of Neurobiology*. 1998; 42: 1-54.
3. Poewe W, Seppi K, Tanner CM, Halliday GM, Brundin P, Volkman J, Schrag AE, Lang AE. Parkinson disease. *Nature Reviews Disease Primers*. 2017; 3: 17013.
4. Thijs RD, Surges R, O'Brien TJ, Sander JW. Epilepsy in adults. *Lancet*. 2019; 393(10172): 689-701.
5. Janiec, W. *Kompedium farmakologii*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa. 2012.
6. Wallis R., Benson C, Darpo B, Gintant G, Kanda Y, Prasad K, Strauss DG, Valentin JP. CiPA challenges and opportunities from a non-clinical, clinical and regulatory perspectives. An overview of the safety pharmacology scientific discussion. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. 2018; 93: 15-25.
7. Art. 2 Ustawy z dnia 6 września 2001 r. Prawo farmaceutyczne (tj. Dz. U. z 2001 poz 1977 z późn. zm.).
8. Pugsley MK, Authier S, Curtis MJ. Principles of safety pharmacology. *British Journal of Pharmacology*. 2008; 154(7): 1382-1399.
9. Baran A, Skoczyńska K. Istotne zmiany w monitorowaniu bezpieczeństwa leków w Polsce oraz Europie. *Farmacja współczesna*. 2014; 7:18 - 24.
10. DEA, <https://www.dea.gov/>; data dostępu: 2022 15.01.2022.
11. NIH, <https://www.nih.gov/>; data dostępu: 15.01.2022.
12. Drug Abuse, <https://www.drugabuse.gov/>; data dostępu: 15.01.2022.
13. Authier S, Abernathy MM, Correll K, Chui RW, Dalton J, Foley CM, Friedrichs GS, Koerner JE, Kallman MJ, Pannirselvam M, Redfern WS, Urmaliya V, Valentin JP, Wisialowski T, Zabka TS, Pugsley MK. An Industry Survey With Focus on Cardiovascular Safety Pharmacology Study Design and Data Interpretation. *International Journal of Toxicology*. 2020, 4: 274-293.
14. Shah RR, Stonier PD, Repurposing old drugs in oncology: Opportunities with clinical and regulatory challenges ahead. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*. 2019; 44(1): 6-22.
15. European Medicines Agency, ICH Topic S 7 A Safety Pharmacology Studies for Human Pharmaceuticals. 2001.

16. Marechal E, Roy-Laurence S; Laurence L. Measuring Bioactivity: KI, IC50 and EC50. *Chemogenomics and Chemical Genetics*, Springer. Berlin, Heidelberg. 2011; 55–65.
17. Overall CM, Kleinfeld O. Validating matrix metalloproteinases as drug targets and anti-targets for cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*. 2006; 6(3): 227.
18. Lindsay MA. Target discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2003; 2: 831–838.
19. Hopkins A, Groom C. The druggable genome. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2002, 1: 727–730
20. Zhang XC, Yang H, Liu Z, Sun F. Thermodynamics of voltage-gated ion channels. *Biophys Rep* 2018; 4(6): 300–319.
21. Barker BS, Young GT, Soubrane CH, Stephens GJ, Stevens EB, Patel MK. *Ion Channels*. Conn's Translational Neuroscience 1st Edition. Elsevier Academic Press. London. 2017; 11–43.
22. Huang H, Pugsley MK, Fermini B, Curtis MJ, Koerner J, Accardi M, Authier S. Cardiac voltage-gated ion channels in safety pharmacology: review of the landscape leading to the CiPA initiative. *Journal of pharmacological and toxicological methods*. 2017; 87: 11–23.
23. Wulff H, Castle NA, Pardo LA. Voltage-gated potassium channels as therapeutic targets. *Nature*. 2009; 8(12): 982–1001.
24. Gutman GA, Chandy KG, Grissmer S, Lazdunski M, McKinnon D, Pardo LA, Robertson GA, Rudy B, Sanguinetti MC, Stühmer W, Wang X. International Union of Pharmacology. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacological reviews*. 2005; 57(4): 473–508.
25. Raschi E, Vasina V, Poluzzi E, De Ponti F. The hERG K⁺ channel: target and antitarget strategies in drug development. *Pharmacological Research*. 2008; 57(3): 181–195.
26. Tian C, Zhu R, Zhu L, Qiu T, Cao Z, Kang T. Potassium channels: structures, diseases, and modulators. *Chemical biology & drug design*. 2014; 83(1): 1–26.
27. Robbins CA, Tempel BT. Kv1.1 and Kv1.2: Similar channels, different seizure models. *Epilepsia*. 2012; 53: 134–141.
28. Wang W, MacKinnon R. Cryo-EM Structure of the Open Human Ether-à-go-go-Related K⁺ Channel hERG. *Cell*. 2017; 20(3): 422–430.
29. Tamargo J, Caballero R, Gómez R, Valenzuela C, Delpón E. Pharmacology of cardiac potassium channels. *Cardiovascular Research*. 2004. 62(1): p. 9–33.
30. Grandi E, Sanguinetti MC, Bartos DC, Bers DM, Chen-Izu Y, Chiamvimonvat N, Colecraft HM, Delisle BP, Heijman J, Navedo MF, Noskov S, Proenza C, Vandenberg JI, Yarov-

- Yarovoy V. Potassium channels in the heart: structure, function and regulation. *J Physiol.* 2017; 595(7): 2209–2228.
31. Zamponi GW, Striessnig J, Koschak A, Dolphin AC. The physiology, pathology, and pharmacology of voltage-gated calcium channels and their future therapeutic potential. *Pharmacological reviews.* 2015; 67(4): 821–870.
 32. Li P, Rubaiy HN, Chen GL, Hallett T, Zaibi N, Zeng B, Saurabh R, Xu SZ. Mibefradil, a T-type Ca²⁺ channel blocker also blocks Orai channels by action at the extracellular surface. *British Journal of Pharmacology.* 2019; 176(19): 3845–3856.
 33. Haeseleer F, Williams B, Lee A. Characterization of C-terminal Splice Variants of Cav1.4 Ca²⁺ Channels in Human Retina. *The journal of biological chemistry.* 2016; 291(30): 15663–15673.
 34. Catterall WA, Perez-Reyes E, Snutch T P, Striessnig J. International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacological Reviews.* 2005; 57(4).
 35. Lee AS, Ra S, Rajadhyaksha AM, Britt JK, De Jesus-Cortes H, Gonzales KL, Lee A, Moosmang S, Hofmann F, Pieper AA. Forebrain elimination of cacna1c mediates anxiety-like behavior in mice. *Molecular Psychiatry.* 2012; 17: 1054–1055.
 36. Clare JJ, Tate SN, Nobbs M, Romanos MA. Voltage-gated sodium channels as therapeutic targets. *Drug Discovery Today.* 2000; 5(11): 506–520.
 37. Lera RM, Kraus RL. Voltage-gated sodium channels: structure, function, pharmacology, and clinical indications. *Journal of Medicinal Chemistry.* 2015; 58(18): 7093–7118.
 38. Yan Z, Zhou Q, Wang L, Wu J, Zhao Y, Huang G, Peng W, Shen H, Lei J, Yan N. Structure of the Nav1.4-β1 Complex from Electric. *Cell.* 2017; 170(3): 470–482.
 39. Zimmer T, Haufe V, Blechschmidt S. Voltage-gated sodium channels in the mammalian heart. *Global cardiology science & practice.* 2014; 4: 449.
 40. Sukumar N., Kar BK, Pal P. Theory and Applications of Cellular Automata. *IEEE Transactions on Computers.* 1995; 43(12): 1346–1357.
 41. Benfenati E, Gini G, Hoffmann S, Luttk R. Comparing in vivo, in vitro and in silico methods and integrated strategies for chemical assessment: problems and prospects. *Alternatives to Laboratory Animals.* 2010; 38(2): 153–166.
 42. Schollenberger A. Zasada 3R w ochronie zwierząt wykorzystywanych do badań naukowych. *Życie Weterynaryjne.* 2017; 92(6): 424–426.

43. Bashir AA, Tiwari H, Nargotra A. Chapter 3: In Silico Drug Design Methods for Drug Repurposing. In *Silico Drug Design*. 2019; 47–83.
44. Eisenbrand G, Pool-Zobel B, Baker V, Balls M, Blaauboer BJ, Boobis A, Carere A, Kevekordes S, Lhuguenot JC, Pieters R, Kleiner J. Methods of in vitro toxicology. *Food and Chemical Toxicology*. 2002; 40: 193–236.
45. Andrade EL, Bento AF, Cavalli J, Oliveira SK, Freitas CS, Marcon R, Schwanke RC, Siqueira JM, Calixto JB. Non-clinical studies required for new drug development - Part I: early in silico and in vitro studies, new target discovery and validation, proof of principles and robustness of animal studies. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2016; 24(49): e5644.
46. Zhu X, Li H, Huang L, Zhange M, Fan W, Cui L. 3D printing promotes the development of drugs. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2020; 131: 11064.
47. Smit IA, Afzal AM, Allen HG, Svensson F, Hanser T, Bender A. Systematic analysis of protein targets associated with adverse events of drugs from clinical trials and post-marketing reports. *Chemical Research in Toxicology*. 2020.
48. Ballester PJ. Machine Learning for Molecular Modelling in Drug Design. *Biomolecules*. 2019; 9: 216.
49. Sari S, Molecular Modelling and Computer-Aided Drug Design: The Skill Set Every Scientist in Drug Research Needs and Can Easily Get. *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy*. 2020; 40(1): 34–47.
50. Bielenica A, Kossakowski J. Zastosowanie metod obliczeniowych do wyznaczania budowy modeli farmakoforowych receptorów 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} ORAZ 5-HT₇. *Biuletyn Wydziału Farmaceutycznego WUM*. 2010; 1: 1–12.
51. Drugs, www.drugs.com; data dostępu: 2022.04.10.
52. Sander T, Freyss, von Korff M, Rufener C. DataWarrior: An Open-Source Program For Chemistry Aware Data Visualization And Analysis. *Journal of Chemical Information and Modeling*. 2015; 55: 460–473.
53. ACDLabs, www.acdlabs.com; data dostępu: 14.02.2022.
54. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 1997, 23: 3–25.

55. Veber DF, Johnson SR, Cheng HY, Smith BR, Ward KW, Kopple KD. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2002; 45: 2615–2623.
56. Erickson CB, Ankenman BE, Sanchez SM. Comparison of Gaussian process modeling software. *European Journal of Operational Research*. 2018; 266(1): 179–192.
57. Moll A, Hildebrandt A, Lenhof HP, Kohlbacher O. BALLView: a tool for research and education in molecular modeling. *Bioinformatics*. 2006; 22(3): 365–366.
58. Yang H, Lou C, Sun L, Li J, Cai Y, Wang Z, Li W, Liu G, Tang T. admetSAR 2.0: web-service for prediction and optimization of chemical ADMET properties. *Bioinformatics*. 2019; 35(6): 1067–1069.
59. Banerjee P, Eckert AO, Schrey AK, Preissner R. ProTox-II: a webserver for the prediction of toxicity of chemicals. *Nucleic Acids Research*. 2018; 2(46): 257–263.
60. Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Scientific Reports*. 2017; 7: 42717
61. Ritchie TJ, Ertl P, Lewis R. The graphical representation of ADME-related molecule properties for medicinal chemists. *Drug Discovery Today*. 2011; 16(1-2): p. 65–72.
62. Iqbal A, Haque, S.E.; Sharma, S.; Ansari, M.A.; Khan. V, Iqbal MK. Clinical updates on drug - induced cardiotoxicity. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 2018; 9(1): 16–26.
63. Skubiszewska M, Fijałkowski Ł, Nowaczyk A. Assessment of the role of protein transporters in drug toxicity studies. 1st International Electronic Conference on Biomedicine online. 2021.06.01-2021.06.26; plakat zjazdowy.
64. Fan J, Fu A, Le Z. Progress in molecular docking. *Quantitative Biology*. 2019; 7(2): 83 – 89.
65. Guedes IA, de Magalhães CS, Dardenne LE. Receptor–ligand molecular docking. *Biophysical Reviews*. 2014; 6(1):75–87
66. Craveiro NS, Lopes BS, Tomás L, Almeida SF. Drug Withdrawal Due to Safety: A Review of the Data Supporting Withdrawal Decision. *Current Drug Safety*. 2020; 15: 4–12.
67. Wytyczne ICH E14: The Clinical Evaluation of QT/QTc Interval Prolongation and Proarrhythmic Potential for Non-Antiarrhythmic Drugs; International Council for Harmonization of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use: Geneva, Switzerland. 2015.

68. Li Z, Dutta S, Sheng J, Tran PN, Wu W, Chang K, Mdluli T, Strauss DG, Colatsky T. Improving the In Silico Assessment of Proarrhythmia Risk by Combining hERG (Human Ether-à-go-go-Related Gene) Channel-Drug Binding Kinetics and Multichannel Pharmacology. *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology*. 2017; 10(2): e004628.
69. Mirams GR, Cui Y, Sher A, Fink M, Cooper J, Heath BM, McMahon NC, Gavaghan DJ, Noble D. Simulation of multiple ion channel block provides improved early prediction of compounds' clinical torsadogenic risk. *Cardiovascular Research*. 2011; 91: 53–61.
70. Crumb WJ Jr, Vicente J, Johannesen L, Strauss DG. An evaluation of 30 clinical drugs against the comprehensive in vitro proarrhythmia assay (CiPA) proposed ion channel panel. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. 2016; 81: 251–262.
71. Shmueli S, Van der Lende M, Lamberts RJ, Sander JW, Thijs RD. The heart of epilepsy: Current views and future concepts. *Seizure*. 2017; 44: 176–183.
72. Spiller H, Wiles D, Russell J, Casavant M. Review of toxicity and trends in the use of tiagabine as reported to US poison centers from 2000 to 2012. *Human & Experimental Toxicology*. 2016; 35: 109–113.
73. Rahm AK, Lugenbiel P, Schweizer PA, Katus HA, Thomas D. Role of ion channels in heart failure and channelopathies. *Biophysical Reviews*. 2018; 10: 1079–1106.
74. Karmolińska-Jagodzic E. Zaburzenia depresyjne wśród studentek i studentów w Polsce. *Studia Edukacyjne*. 2019; 55: 139–162.
75. Han LKM, Aghajani M, Clark SL, Chan RF, Hattab MW, Shabalin AA, Zhao M, Kumar G, Xie LY, Jansen R, Milaneschi Y, Dean B, Aberg KA, van den Oord EJCG, Penninx BWJH. Epigenetic Aging in Major Depressive Disorder. *American Journal of Psychiatry*. 2018; 1(8): 774–782.
76. Pan A, Sun Q, Okereke OI, Rexrode KM, Hu FB. Depression and risk of stroke morbidity and mortality: a meta-analysis and systematic review. *Journal of the American Medical Association*. 2011; 306: 1241–1249.
77. Penninx BW. Depression and cardiovascular disease: epidemiological evidence on their linking mechanisms. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 2017; 74: 277–286.
78. John FO. Neuropharmacological Classification of Antidepressant Agents Based on their Mechanisms of Action. *Archives of Medicine and Health Sciences*. 2018; 6(1): 81–94.
79. Wilkinson ST, Gerard S. A new generation of antidepressants: an update on the pharmaceutical pipeline for novel and rapid-acting therapeutics in mood disorders based on glutamate/GABA neurotransmitter systems. *Drug Discovery Today*. 2019; 24(2): 606–615.

80. Nevels RM, Gontkovsky ST, Williams BE. Paroxetine—the antidepressant from hell? Probably not, but caution required. *Psychopharmacology Bulletin*, 2016. 46(1): 77.
81. World Health Organization Model List of Essential Medicines nr 22. 2021.
82. Stone KJ, Viera AJ, Parman CL. Off-label applications for SSRIs. *American Family Physician*. 2003; 68(3): 498–504.
83. Skubiszewska (Kowalska) M, Nowaczyk J, Fijałkowski Ł, Nowaczyk A. Paroxetine - overview of the molecular mechanisms of action. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021; 22: 1662.
84. Kit-Kay M, Mallikarjuna RP. Artificial intelligence in drug development: present status and future prospects. *Drug Discovery Today*. 2019; 24(3): 773–780.
85. Xue H, Li J, Xie H, Wang Y. Review of Drug Repositioning Approaches and Resources. *International Journal of Biological Sciences*. 2018; 14(10): 1232–1244.
86. Ashburn TT, Thor Karl B. Drug repositioning: Identifying and developing new uses for existing drugs. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2004; 3: 673–683.
87. Schumacher SM, Gao E, Zhu W, Chen X, Chuprun JK, Feldman AM, Tesmer JJ, Koch WJ. Paroxetine-mediated GRK2 inhibition reverses cardiac dysfunction and remodeling after myocardial infarction. *Science Translational Medicine*. 2015; 4(7): 277.
88. Weeks JC, Roberts WM, Leasure C, Suzuki BM, Robinson KJ, Currey H, Wangchuk P, Eichenberger RM, Saxton AD, Bird TD, Kraemer BC, Loukas A, Hawdon JM, Caffrey CM, Liachko NF. Sertraline, Paroxetine, and Chlorpromazine Are Rapidly Acting Anthelmintic Drugs Capable of Clinical Repurposing. *Scientific Reports*. 2018; 8(1): 975.
89. Foletto VS, Serafin Marissa B., Bottega A, da Rosa TF, Machado CS, Coelho SS, Hörner R. Repositioning of fluoxetine and paroxetine: study of potential antibacterial activity and its combination with ciprofloxacin. *Medicinal Chemistry Research*. 2020. 29: 556–563.
90. Chandran PP, Sindhu S, Navaneethakrishnan S, Sasikumar S, Karthik S. Effect of paroxetine in anxiety disorder among school dropout teenager in south indian population. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2020. 12(7): 23–25.
91. Leerssen ECM, Tak RO, Breur JMPJ. Severe transient neonatal long QT syndrome due to maternal paroxetine usage: a case report. *Cardiology in the Young*. 2019; 29(10):1300–1301.
92. Waldschmidt HV, Homan KT, Cato MC, Cruz-Rodríguez O, Cannavo A, Wilson MW, Song J, Cheung JY, Koch WJ, Tesmer JJ. Structure-based design of highly selective and potent

- G protein coupled receptor kinase 2 inhibitors based on paroxetine. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2017; 60(7): 3052–3069.
93. Cho YW, Kim EJ, Nyiramana MM, Shin EJ, Jin H, Ryu JH, Kang KR, Lee GW, Kim HJ, Han J, Kang D. Paroxetine Induces Apoptosis of Human Breast Cancer MCF-7 Cells through Ca²⁺- and p38 MAP Kinase-Dependent ROS Generation. *Cancers*. 2019; 11(1): 64.
94. Prévot T, Sibille E. Altered GABA-mediated information processing and cognitive dysfunctions in depression and other brain disorders. *Molecular Psychiatry*. 2021; 26: 151–167.
95. Harmer CJ, Goodwin GM, Cowen PJ. Why do antidepressants take so long to work? A cognitive neuropsychological model of antidepressant drug action. *British Journal of Psychiatry*. 2009: 102–108.
96. Robinson ESJ. Translational new approaches for investigating mood disorders in rodents and what they may reveal about the underlying neurobiology of major depressive disorder. *The Royal Society*. 2018; 373(1742): 20170036.
97. Angelos H. Inflammation and depression but where does the inflammation come from? *Current Opinion in Psychiatry*. 2019; 32(5): 422–428
98. Joseph A. Are new neurons formed in the brains of adult mammals? *Science*. 1962; 135(3509): 1127–1128.
99. Fernando N. Neuronal replacement in adulthood. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1985; 457(1): 143–161.
100. Eriksson PS, Perfilieva E, Nordborg C, Björk-Eriksson T, Peterson DA, Alborn AM, Gage FH. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nature America*, 1998; 4(11): 1313–1317.
101. Michelia L, Ceccarellia M, D’Andrea G, Tirone F. Depression and adult neurogenesis: Positive effects of the antidepressant fluoxetine and of physical exercise. *Brain Research Bulletin*. 2018; 143: 181–193.
102. Kumar A, Pareek V, Faiq MA, Ghosh SK, Kumari C. Adult Neurogenesis In Humans: A Review of Basic Concepts, History, Current Research and Clinical Implications. *Innovations in Clinical Neuroscience*. 2019; 16(5-6): 30–37.
103. Sorokina M, Steinbeck C. Review on natural products databases: where to find data in 2020. *Journal of Cheminformatics*. 2020; 12(20).

104. Frisch MJ, Trucks GW, Schlegel HB, Scuseria GE, Robb MA, Cheeseman JR, Zakrzewski VG, Montgomery JA, Stratmann RE, Burant S. Gaussian 09W, Version 7.0 Gaussian, Wallingford, CT (USA). 2009.
105. Burley SK, Berman HM, Christie C, Duarte JM, Feng Z, Westbrook J, Young J, Zardecki C. RCSB Protein Data Bank: Sustaining a living digital data resource that enables breakthroughs in scientific research and biomedical education. *Protein Science*. 2017; 27(1): 316–330.
106. Gasteiger E, Jung E, Bairoch A., SWISS-PROT: Connecting biomolecular knowledge via a protein database. *Current Issues in Molecular Biology*. 2001; 3(3): 47–55.
107. Bajusz D, Rácz A, Héberger K. Why is Tanimoto index an appropriate choice for fingerprint-based similarity calculations? *Journal of Cheminformatics*. 2015; 7: 20.

13. FINANSOWANIE ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Badania wykonane w ramach cyklu prac prezentowanych w niniejszej pracy doktorskiej zostały współfinansowane ze środków:

- grantu NCN nr UMO-2015/17/B/NZ7/02937 *Opracowanie metody optymalizacji dawkowania leków przeciwbólowych stosowanych jako terapia skojarzona bólu neuropatycznego z wykorzystaniem metod sztucznej inteligencji* (kierownik: prof. Kinga Sałat);
- grantu w ramach projektu IDUB *Badanie mechanizmów działania wybranych substancji aktywnych wobec transporterów monoamin centralnego układu nerwowego.* (kierownik: dr Łukasz Fijałkowski);
- zadanie badawcze Wydział Farmaceutyczny CM UMK DS-UPD nr WF450 – *Badanie zależności pomiędzy strukturą a aktywnością biologiczną związków o potencjalnym działaniu terapeutycznym* (kierownik: dr hab. Alicja Nowaczyk, prof. UMK)

14. WYKAZ RYCIN

Ryc. 1. Wpływ działanie leków na układ nerwowy i pracę serca.....	12
Ryc. 2. Prawdopodobna lokalizacja obszaru mózgu, w którym zachodzi neurogeneza.....	13
Ryc. 3. Etapy badań nad lekiem oraz rodzaje testów toksyczności wykonywane na każdym z nich.....	15
Ryc. 4. Podział celów terapeutycznych.....	19
Ryc. 5. Schemat budowy wybranych do badań VGICs.....	17
Ryc.6. Schematyczna lokalizacja kanałów potasowych w poszczególnych częściach ludzkiego organizmu.....	20
Ryc. 7. Schematyczna lokalizacja kanałów wapniowych w poszczególnych częściach ludzkiego organizmu.....	22
Ryc. 8. Schematyczna lokalizacja kanałów sodowych w poszczególnych częściach ludzkiego organizmu.....	23
Ryc. 9. Tarcza Trafności.....	28
Ryc. 10. Graficzne przedstawienie wyników otrzymanych metodami modelowania molekularnego w zbiorze leków z grupy ATC: NO6AB.....	31
Ryc. 11. Etapy procesu dokowania molekularnego.....	32
Ryc. 12. Wykres procentowego profilu blokowania kanałów jonowych.....	35
Ryc. 13. Mechanizmy inhibicji kanałów jonowych: a) zatykanie porów, b) wiązanie allosteryczne.....	36
Ryc. 14. Graficzny schemat metodyki przeprowadzonych badań.....	53
Ryc. 15. Schemat obrazujący zmiany potencjału czynnościowego serca.....	54
Ryc.16. Porównanie szacunkowego czasu procesu odkrywania nowego leku z szacunkowym czasem procesu repozycjonowania.....	91
Ryc. 17. Zestawienie struktur 2D badanych ligandów.....	119
Ryc. 18. Graficzne przedstawienie wyników porównania badanych 3D struktur.....	120
Ryc. 19. Wyniki badań farmakologicznych.....	121

15. WYKAZ TABEL

Tabela 1. Grupy leków antydepresyjnych.....	88
--	----

16. OŚWIADCZENIA WSPÓŁAUTORÓW O UDZIALE W PUBLIKACJI

Mgr farm. Magdalena Skubiszewska
Katedra Chemii Organicznej
Wydział Farmaceutyczny CM UMK
Jurasza 2, 85-094 Bydgoszcz

Bydgoszcz, dn 30.03.22

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracach:

- Skubiszewska (Kowalska), M.; Nowaczyk, J.; Nowaczyk, A., *Kv11.1, Nav1.5, and Cav1.2 Transporter Proteins as Antitarget for Drug Cardiotoxicity*. International Journal of Molecular Sciences 8099; 2020, 21, 8099.

Punktacja: IF: 5.923, MNiSW: 140.

- Skubiszewska (Kowalska), M.; Nowaczyk, A.; Fijałkowski, Ł.; Kubacka, M.; Podkowa, A.; Sałat, K.; Grzešek, G.; Nowaczyk, J., *Antiepileptic Drug Tiagabine Does Not Directly Target Key Cardiac Ion Channels Kv11.1, Nav1.5 and Cav1.2*. Molecules 2021, 26, 3522.

Punktacja: IF: 4.411, MNiSW: 140.

- Skubiszewska (Kowalska), M.; Nowaczyk, J.; Fijałkowski, Ł.; Nowaczyk, A., *Paroxetine - overview of the molecular mechanisms of action*. International Journal of Molecular Sciences 2021, 22, 1662.

Punktacja: IF: 5.923, MNiSW: 140.

- Skubiszewska (Kowalska), M.; Fijałkowski, Ł.; Nowaczyk, A., *Assessment of Paroxetine Molecular Interactions with Selected Monoamine and γ -Aminobutyric Acid Transporters*. International Journal of Molecular Sciences 2021, 22, (12), 6293.

Punktacja: IF: 5.923, MNiSW: 140.

mój udział polegał na:

- współpracowaniu koncepcji oraz projektu badań,
- zebraniu oraz analizie danych farmakologicznych,
- współprowadzeniu badań *in silico*,
- analizie i interpretacji danych *in silico* oraz redagowaniu wniosków,
- współredagowaniu manuskryptu.

Magdalena Skubiszewska

Dr hab. Alicja Nowaczyk, Prof. UMK
Katedra Chemii Organicznej
Wydział Farmaceutyczny CM UMK
Jurasza 2, 85-094 Bydgoszcz

Bydgoszcz, dnia 30.03.22

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracach:

- Kowalska M, Nowaczyk J, Nowaczyk A. Kv11. 1, Nav1. 5, and Cav1. 2 Transporter Proteins as Antitarget for Drug Cardiotoxicity. International Journal of Molecular Sciences. 2020;21(21):8099.
- Kowalska M, Fijałkowski Ł, Kubacka M, Sałat K, Grzešek G, Nowaczyk J, Nowaczyk A. Antiepileptic Drug Tiagabine Does Not Directly Target Key Cardiac Ion Channels Kv11. 1, Nav1. 5 and Cav1. 2. Molecules. 2021;26(12):3522.
- Kowalska M, Nowaczyk J, Fijałkowski Ł, Nowaczyk A. Paroxetine - Overview of the molecular mechanisms of action. International Journal of Molecular Sciences. 2021;22(4):1662.
- Kowalska M, Fijałkowski Ł, Nowaczyk A. Assessment of Paroxetine Molecular Interactions with Selected Monoamine and γ -Aminobutyric Acid Transporters. International Journal of Molecular Sciences. 2021;22(12):6293.

mój udział polegał na współpracowaniu koncepcji badań oraz współredagowaniu niniejszych prac.


Katedra Chemii Organicznej
Alicja Nowaczyk
dr hab. Alicja Nowaczyk, prof. UMK

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracach:

- Kowalska M, Fijałkowski Ł, Kubacka M, Sałat K, Grzešek G, Nowaczyk J, Nowaczyk A. Antiepileptic Drug Tiagabine Does Not Directly Target Key Cardiac Ion Channels Kv11. 1, Nav1. 5 and Cav1. 2. *Molecules*. 2021;26(12):3522.
- Kowalska M, Nowaczyk J, Fijałkowski Ł, Nowaczyk A. Paroxetine - Overview of the molecular mechanisms of action. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(4):1662.
- Kowalska M, Fijałkowski Ł, Nowaczyk A. Assessment of Paroxetine Molecular Interactions with Selected Monoamine and γ -Aminobutyric Acid Transporters. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(12):6293.

mój udział polegał na współprowadzeniu badań oraz współredakcji niniejszych prac.



Prof. Kinga Sałat
Katedra Farmakodynamiki
Wydział Farmaceutyczny CM UJ
Medyczna 9, 30-688 Kraków

Kraków, dnia 30.03.22

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

- Kowalska, M.; Fijałkowski, Ł.; Kubacka, M.; Sałat, K.; Grzešek, G.; Nowaczyk, J.; Nowaczyk, A., Antiepileptic Drug Tiagabine Does Not Directly Target Key Cardiac Ion Channels Kv1.1, Nav1.5 and Cav1.2. *Molecules* 2021, 26, (12), 3522.

mój udział polegał na opracowaniu koncepcji badań farmakologicznych oraz współredagowaniu niniejszych prac.

Katedra i Zakład
Farmakodynamiki UJ CM

Kinga Sałat
prof. dr hab. Kinga Sałat

Dr hab. Monika Kubacka
Katedra Farmakodynamiki
Wydział Farmaceutyczny CM UJ
Medyczna 9, 30-688 Kraków

Kraków, dnia 30.03.22

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

- Kowalska, M.; Fijałkowski, L.; Kubacka, M.; Sałat, K.; Grzešek, G.; Nowaczyk, J.; Nowaczyk, A., Antiepileptic Drug Tiagabine Does Not Directly Target Key Cardiac Ion Channels Kv11.1, Nav1.5 and Cav1.2. *Molecules* 2021, 26, (12), 3522.

mój udział polegał na opracowaniu koncepcji badań farmakologicznych oraz współredagowaniu niniejszych prac.

Katedra i Zakład
Farmakodynamiki UJCM
Monika Kubacka
dr hab. Monika Kubacka

Dr hab. Jacek Nowaczyk, Prof. UMK
Katedra Chemii Fizycznej i Fizykochemii Polimerów
Wydział Chemii UMK
ul. Gagarina 7, 87-100 Toruń

Toruń, dnia 30.03.22

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracach:

- Kowalska M, Nowaczyk J, Nowaczyk A. Kv11. 1, Nav1. 5, and Cav1. 2 Transporter Proteins as Antitarget for Drug Cardiotoxicity. International Journal of Molecular Sciences. 2020;21(21):8099.
- Kowalska M, Fijałkowski Ł, Kubacka M, Sałat K, Grzešek G, Nowaczyk J, Nowaczyk A. Antiepileptic Drug Tiagabine Does Not Directly Target Key Cardiac Ion Channels Kv11. 1, Nav1. 5 and Cav1. 2. Molecules. 2021;26(12):3522.
- Kowalska M, Nowaczyk J, Fijałkowski Ł, Nowaczyk A. Paroxetine - Overview of the molecular mechanisms of action. International Journal of Molecular Sciences. 2021;22(4):1662.

mój udział polegał na konsultacji danych chemicznych oraz współredagowaniu niniejszych prac.



Prof. Grzegorz Grzešek
Katedra Kardiologii i Farmakologii Klinicznej
Wydział Nauk o Zdrowiu, CM UMK
ul. Ujejskiego 75, 85-168 Bydgoszcz

Bydgoszcz, dnia 30.03.22

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

- Kowalska M, Fijałkowski L, Kubacka M, Salat K, Grzešek G, Nowaczyk J, Nowaczyk A
Antiepileptic Drug Tiagabine Does Not Directly Target Key Cardiac Ion Channels Kv11. 1,
Nav1. 5 and Cav1. 2. *Molecules*. 2021;26(12):3522.

mój udział polegał na konsultacji danych kardiologicznych oraz współredagowaniu niniejszej pracy.



17. ZAŚWIADCZENIA O UDZIALE W GRANTACH

Dr hab. Kinga Sałat, prof. UJ
Katedra Farmakodynamiki
Wydział Farmaceutyczny CM UJ
Medyczna 9, 30-688 Kraków

Kraków, dnia 22.09.20

ZAŚWIADCZENIE

Zaświadczam, że mgr Magdalena Kowalska (Katedra Chemii Organicznej, Wydział Farmaceutyczny, Collegium Medicum UMK) w roku 2020 współuczestniczyła w badaniach i analizach w ramach realizacji projektu Narodowego centrum Nauki OPUS nr UMO-2015/17/B/NZ7/02937 pt. „Opracowanie metody optymalizacji dawkowania leków przeciwbólowych stosowanych jako terapia skojarzona bólu neuropatycznego z wykorzystaniem metod sztucznej inteligencji”.

Kierownik projektu
Farmakodynamiki UJ CM
K. Sałat
Prof. n. farm. Kinga Sałat
prof. dr hab. Kinga Sałat

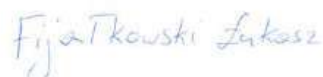
Bydgoszcz dnia 27.09.2021

Katedra Chemii Organicznej
Wydział Farmaceutyczny CM UMK
ul. dr. A. Jurasza 2, 85-089 Bydgoszcz

Zaświadczenie

Zaświadczam, że mgr farm. Magdalena Skubiszewska w roku akademickim 2020/2021 uczestniczyła w prowadzeniu badań naukowych w ramach grantu UMK – projekt Inicjatywa Doskonałości - Debiuty 2 - *Badanie mechanizmów działania wybranych substancji aktywnych wobec transporterów monoamin centralnego układu nerwowego/ Finding and understanding mechanisms of action of selected compounds active on central nervous system monoamine transporters.*

Kierownik Projektu



dr Łukasz Fijałkowski

Bydgoszcz dnia 27.09.2021

Katedra Chemii Organicznej
Wydział Farmaceutyczny CM UMK
ul. dr. A. Jurasza 2, 85-089 Bydgoszcz

Zaświadczenie

Zaświadczam, że Magdalena Skubiszewska w roku akademickim 2020/2021 współuczestniczyła w prowadzeniu badań naukowych w ramach statutowej działalności Wydziału – projekt DS-UPD nr WF450- *Badanie zależności pomiędzy strukturą a aktywnością biologiczną związków o potencjalnym działaniu terapeutycznym.*

Kierownik Projektu



dr hab. n. farm. Alicja Nowaczyk, prof UMK



18. OŚWIADCZENIE O ZMIANIE NAZWISKA

Mgr farm. Magdalena Skubiszewska

Bydgoszcz, dn 30.03.22

Katedra Chemii Organicznej

Wydział Farmaceutyczny CM UMK

Jurasza 2, 85-094 Bydgoszcz

OŚWIADCZENIE O ZMIANIE NAZWISKA

Niniejszym oświadczam, że w roku 2021 nastąpiła zmiana mojego nazwiska. Poprzednie nazwisko: Kowalska. Posiadam dorobek naukowy: publikacje, wystąpienia konferencyjne, które ukazały się pod poprzednim nazwiskiem.

Magdalena
Skubiszewska

19. DOROBEK NAUKOWY

Zestawienie pełnego wykazu działalności naukowej.

dorobek	objęty rozprawą doktorską		nieobjęty rozprawą doktorską		sumarycznie	
	IF	MNiSW	IF	MNiSW	IF	MNiSW
punktacja	22.180	560.000	14.14	419	36.32	979.00
liczba publikacji				11		
liczba monografii				3		
liczba konferencji				18		
liczba wygłoszonych referatów:				8		
liczba zaprezentowanych posterów				34		
udział w konferencjach i sympozjach farmaceutycznych				55		
Reserch ID			ABF-7561-2021			
ORCID			0000-0001-7950-5543			
H-indeks				4		
Ilość cytowań prac wg bazy Web of Science				22		
Popularyzacja nauki	<p>25.05.2019 Warsztaty w ramach Bydgoskiego Festiwalu Nauki</p> <p>07.02.2020 Przeprowadzenie warsztatów dydaktycznych nt. pracy farmaceuty dla uczniów Szkoły Podstawowej nr 2 w Przysusze</p> <p>21.07.2021 Współprowadzenie akcji profilaktycznej dla pacjentów Apteki Meritum w Łukcie nt. diagnostyki i leczenia depresji</p>					

Publikacje naukowe niebędące przedmiotem rozprawy doktorskiej

1. **Skubiszewska (Kowalska) M.**, Fijałkowski Ł., Nowaczyk A. *The biological activity assessment of potential drugs acting on cardiovascular system using Lipinski and Veber Rules*. Journal of Education, Health and Sport. 2018; 8(12): 184 – 191, DOI: <http://dx.doi.org/10.5281/zenodo.2066519>
2. Kowalski A., Kowalska I., **Skubiszewska (Kowalska) M.**, Drózdź W., Nowaczyk A., Narcolepsy in the light of modern diagnostic, clinical and therapeutic concepts, Journal of Education, Health and Sport. 2018; 8(11):99 - 111, DOI:10.5281/zenodo.1471651.
3. Nowaczyk A., Fijałkowski Ł., **Skubiszewska (Kowalska) M.**, Podkowa A., Sałat K., Studies on the activity of selected highly lipophilic compounds toward hGAT1 inhibition: Part II. ACS Chemical Neuroscience 2019; 10(1), 337-347, DOI: 10.1021/acschemneuro.8b00282.
4. Furgała-Wojas A., **Skubiszewska (Kowalska) M.**, Nowaczyk A., Fijałkowski Ł., Sałat K., Comparison of bromhexine and its active metabolite : ambroxol as potential analgesics reducing oxaliplatin-induced neuropathic pain : pharmacodynamic and molecular docking studies. Current Drug Metabolism. 2020: 21(7), 548-561, DOI: 0.2174/1389200221666200711155632.
5. Kowalska I., Skubiszewski R., **Skubiszewska (Kowalska) M.**, Kowalski A., Nowaczyk A. Zapalenie oskrzelików: trudności diagnostyczno-terapeutyczne u pacjentów pediatrycznych. Farmacja Polska. 2020; 76(2), 102-109. DOI: 10.32383/farmpol/118862.
6. Nowaczyk A., **Skubiszewska (Kowalska) M.**, Nowaczyk J., Grzešek G., Carbon monoxide and nitric oxide as examples of the youngest class of transmitters, International Journal of Molecular Sciences. 2021; 22(11): 1-25, DOI: 10.3390/ijms22116029.
7. **Skubiszewska (Kowalska) M.**, Fijałkowski Ł., Nowaczyk A., Detailed comparison between the safety profiles of chloroquine and hydroxychloroquine. Biology and Life Sciences Forum. 2021; 7(4): 1-6, DOI: 10.3390/ECB2021-10281.

Wykaz monografii:

- **Skubiszewska (Kowalska) M.**, Kowalska I., Kowalski A., Nowaczyk A. Ocena biodostępności oraz bezpieczeństwa stosowania leków używanych w narkolepsji z wykorzystaniem metod obliczeniowych, Współczesne badania przyrodnicze I medyczne:

zastosowanie praktyczne: wybrane zagadnienia. Wydawca: Poznań: Uniwersytet A. Mickiewicza 2019, s. 59-73

- **Skubiszewska (Kowalska) M.**, Fijałkowski Ł., Nowaczyk A. Wykorzystanie metod obliczeniowych in silico w celu oceny przeciwbólowego mechanizmu działania wybranych pochodnych kwasu gamma-aminomasłowego. Współczesne badania przyrodnicze i medyczne: zastosowanie praktyczne: wybrane zagadnienia. Wydawca: Poznań: Uniwersytet A. Mickiewicza, 2019, s. 74-88.
- **Skubiszewska (Kowalska) M.**, Fijałkowski Ł., Nowaczyk A., Ocena bezpieczeństwa leków stosowanych off-label w zaburzeniach lękowych u dzieci. Na pograniczu chemii, biologii i fizyki- Tom 2. Wydawca: Toruń: Wydawnictwo Naukowe Uniwersytetu Mikołaja Kopernika, 2021, s. 217-232.

Udział w konferencjach i zjazdach:

- Konferencja Młodych Naukowców nt.: *Nowe Wyzwania dla Polskiej Nauki*. Gdańsk 08.09.2018 r.
- XXV Konferencja Naukowa Wydziału Farmaceutycznego z OML Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Gdańsk, 07–08.12.2018 r.
- XIII Kopernikańskie Seminarium Doktoranckie, Bachotek, 16–18.06.2019 r.
- Ogólnopolska Konferencja Naukowa „Przełomowe osiągnięcia polskich nauk przyrodniczych i medycznych”, Poznań, 03.06.2019 r.
- Analiza zagadnienia, analiza wyników- wystąpienie młodego naukowca, Edycja II., 01–02.04.2020 r.
- BioOrg 2019: III Ogólnopolskie Sympozjum Chemii Bioorganicznej, Organiczne i Biomateriałów, Toruń 07.12. 2019r.
- National Scientific Conference „Knowledge- Key to Success” – IV edition, Toruń 18.01.2020 r.
- Kopernikańskie E-Seminarium Doktoranckie, 7.09.2020 r.
- I Interdyscyplinarna Konferencja Doktorantów Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, 07.11.2020 r.
- Nowe trendy w badaniach naukowych : cz. 3., Kraków, 26–28.02.2021 r.

- National Scientific Conference "Knowledge - key to success" : V edition , Łódź, 23.01.2021 r.
- 1st International Electronic Conference on Biomedicine online, 01–26.06.2021 r.
- 5th International Medical Interdisciplinary Congress. Medical, Pharmaceutical and Health Sciences; iMEDIC 2021 Bydgoszcz, 05.06.2021 r.
- I Ogólnopolska Konferencja Kopernikańska COVID–19 – wyzwania we współczesnej nauce, 14–15.05.2021 r.
- XIV Kopernikańskie Seminarium Doktoranckie, Toruń, 20–22.10.2021 r.
- II Interdisciplinary Conference of Doctoral Students of Medical Universities "DocUMed" under Logan "Libertas et ipsa scientia", Łódź 22–24.10.2021.
- IV Śląskie Farmaceutyczne Spotkanie Naukowe "Od nauki do pacjenta". Sosnowiec, 3.12.2021 r.
- Ogólnopolska konferencja młodych naukowców nt. COVID-19 Spojrzenie Młodych Naukowców, 26–27.02.2022r.

Prezentacja referatów i posterów na konferencjach międzynarodowych i krajowych:

- **Skubiszewska (Kowalska) M.**, Fijałkowski Ł., Tyburski A., Nowaczyk A., Analiza lekopodobieństwa w grupie pochodnych tiazolidyn–4–onu o potencjalnej aktywności przeciwgrzybiczej z wykorzystaniem metod obliczeniowych SAR, Nowe wyzwania dla polskiej nauki: edycja III: Gdańsk 08.09.2018, plakat zjazdowy.
- **Skubiszewska (Kowalska) M.**, Fijałkowski Ł., Tyburski A., Nowaczyk A., Poszukiwanie optymalnych parametrów farmakokinetycznych w grupie pochodnych kwasu nipekotynowego o potencjalnej aktywności na układ nerwowy człowieka, Nowe wyzwania dla polskiej nauki: edycja III: Gdańsk 08.09.2018, plakat zjazdowy.
- **Skubiszewska (Kowalska) M.**, Fijałkowski Ł., Tyburski A., Nowaczyk A., Zastosowanie reguł Lipińskiego i Vebera w ocenie aktywności biologicznej pochodnych o potencjalnych działaniu w układzie krążenia, Nowe wyzwania dla polskiej nauki: edycja III: Gdańsk 08.09.2018, plakat zjazdowy.
- Fijałkowski Ł., **Skubiszewska (Kowalska) M.**, Babecka M., Nowaczyk A., Analiza wpływu wybranych inhibitorów wychwyty zwrotnego monoamin na transportery serotonint,

noradrenaliny oraz dopaminy, Nowe wyzwania dla polskiej nauki: edycja III: Gdańsk 08.09.2018, wystąpienie ustne.

- Fijałkowski Ł., **Skubiszewska (Kowalska) M.**, Babecka M., Nowaczyk A., Badanie oddziaływań tiagabiny z hGAT1 z użyciem technik modelowania molekularnego, Nowe wyzwania dla polskiej nauki: edycja III: Gdańsk 08.09.2018, wystąpienie ustne.
- Fijałkowski Ł., **Skubiszewska (Kowalska) M.**, Babecka M., Nowaczyk A., Potencjalne znaczenie wybranych substancji w leczeniu bólu neuropatycznego – badania in silico, Nowe wyzwania dla polskiej nauki: edycja III: Gdańsk 08.09.2018, plakat zjazdowy.
- **Skubiszewska (Kowalska) M.**, Fijałkowski Ł., Nowaczyk A., Analiza parametrów fizykochemicznych w celu oceny bezpieczeństwa stosowania wybranych pochodnych działających na układ nerwowy, XXV Konferencja Naukowa Wydziału Farmaceutycznego z OML Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Gdańsk, 07–08.12.2018, plakat zjazdowy.
- **Skubiszewska (Kowalska) M.**, Kowalska I., Kowalski A., Drózdź W., Nowaczyk A., Narkolepsja w świetle współczesnych koncepcji terapeutycznych, XXV Konferencja Naukowa Wydziału Farmaceutycznego z OML Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Gdańsk, 07–08.12.2018, plakat zjazdowy.
- **Skubiszewska (Kowalska) M.**, Fijałkowski Ł., Nowaczyk A., Ocena toksycznego działania grupy pochodnych N– (arylopiperazylopropylo)pirolidyn–2–onu z wykorzystaniem metod obliczeniowych, XXV Konferencja Naukowa Wydziału Farmaceutycznego z OML Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Gdańsk, 07–08.12.2018, plakat zjazdowy.
- Stielow M., Fijałkowski Ł., **Skubiszewska (Kowalska) M.**, Nowaczyk A., Analiza wskaźników in silico w regułach Lipińskiego oraz Vebera dla wybranych grup leków działających w ośrodkowym układzie nerwowym, XIII Kopernikańskie Seminarium Doktoranckie, Bachotek, 16–18.06.2019, plakat zjazdowy.
- Stielow M., Fijałkowski Ł., **Skubiszewska (Kowalska) M.**, Nowaczyk A., Ocena bezpieczeństwa stosowania wybranych analogów kwasu gamma-aminomasłowego z wykorzystaniem metod obliczeniowych, XIII Kopernikańskie Seminarium Doktoranckie, Bachotek, 16–18.06.2019, plakat zjazdowy.
- **Skubiszewska (Kowalska) M.**, Fijałkowski Ł., Nowaczyk A., Badanie mechanizmu działania analgetycznego pochodnych kwasu γ -hydroksymasłowego jako potencjalnych

- inhibitorów hGAT1, XIII Kopernikańskie Seminarium Doktoranckie, Bachotek, 16–18.06.2019, plakat zjazdowy.
- **Skubiszewska (Kowalska) M.**, Fijałkowski Ł., Nowaczyk A., Ocena bezpieczeństwa stosowania pochodnych kwasu 4-hydroksybutanowego z wykorzystaniem metod obliczeniowych, XIII Kopernikańskie Seminarium Doktoranckie, Bachotek, 16–18.06.2019, plakat zjazdowy.
 - **Skubiszewska (Kowalska) M.**, Stielow M., Kowalski A., Kowalska I., Drózd W., Nowaczyk A., Ocena biodostępności oraz bezpieczeństwa stosowania leków używanych w narkolepsji z wykorzystaniem metod obliczeniowych, Ogólnopolska Konferencja Naukowa „Przełomowe osiągnięcia polskich nauk przyrodniczych i medycznych”, Poznań, 03.06.2019, plakat zjazdowy.
 - **Skubiszewska (Kowalska) M.**, Stielow M., Fijałkowski Ł., Nowaczyk A., Wykorzystanie metod obliczeniowych in silico w celu oceny przeciwbólowego mechanizmu działania wybranych pochodnych kwasu gamma-hydroksymasowego, Ogólnopolska Konferencja Naukowa „Przełomowe osiągnięcia polskich nauk przyrodniczych i medycznych”, Poznań, 03.06.2019r., plakat zjazdowy.
 - **Skubiszewska (Kowalska) M.**, Fijałkowski Ł., Klera P., Domagalski D., Nowaczyk A., Zastosowanie testów in silico w świetle nowych wytycznych dotyczących bezpieczeństwa stosowania leków, Analiza zagadnienia, analiza wyników- wystąpienie młodego naukowca, Edycja II., 2020.04.01- 2020.04.02., plakat zjazdowy.
 - **Skubiszewska (Kowalska) M.**, Fijałkowski Ł., Domagalski D., Klera P., Nowaczyk A., Ocena kardiotoxyczności wybranych substancji przy pomocy metod obliczeniowych in silico , BioOrg 2019: III Ogólnopolskie Sympozjum Chemii Bioorganicznej, Organiczne i Biomateriałów, Toruń 07.12. 2019, plakat zjazdowy.
 - **Skubiszewska (Kowalska) M.**, Fijałkowski Ł., Klera P., Domagalski D., Nowaczyk A., Evaluation of cardiotoxicity of selected substances using in silico calculation methods, National Scientific Conferencje „Knowledge- Key to Success” – IV edition, Toruń 18.01.2020, plakat zjazdowy.
 - **Skubiszewska (Kowalska) M.**, Fijałkowski Ł., Klera P., Domagalski D., Nowaczyk A., In silico methods as a source of data on drug toxicity, National Scientific Conferencje „Knowledge- Key to Success” – IV edition, Toruń 18.01.2020, plakat zjazdowy.

- **Skubiszewska (Kowalska) M.**, Fijałkowski Ł., Klera P., Domagalski D., Nowaczyk A., Oszacowanie kardiotoksycznego działania potencjalnych leków przy pomocy metod chemii obliczeniowej, Analiza zagadnienia, analiza wyników- wystąpienie młodego naukowca, Edycja II., 01.04.2020–02.04.2020, plakat zjazdowy.
- Domagalski D., Klera P., **Skubiszewska (Kowalska) M.**, Fijałkowski Ł., Nowaczyk A., Analiza in silico zależności pomiędzy strukturą chemiczną a parametrami fizykochemicznymi w grupie wybranych antywitamin, BioOrg 2019: III Ogólnopolskie Sympozjum Chemii Bioorganicznej, Organiczne i Biomateriałów, Toruń 07.12. 2020, wystąpienie ustne.
- Fijałkowski Ł., **Skubiszewska (Kowalska) M.**, Domagalski D., Klera P., Nowaczyk A., Analiza oddziaływań chemicznych w kompleksach ligand-białko wybranych neuronalnych astrocytowych inhibitorów izoformy i ludzkiego transportera kwasu 4-aminobutanowego, BioOrg 2019: III Ogólnopolskie Sympozjum Chemii Bioorganicznej, Organiczne i Biomateriałów, Toruń 07.12. 2020, wystąpienie ustne.
- • Klera P., Domagalski D., **Skubiszewska (Kowalska) M.**, Fijałkowski Ł., Nowaczyk A., Analiza parametrów fizykochemicznych w grupie wybranych antywitamin witamin lipofilowych, BioOrg 2019: III Ogólnopolskie Sympozjum Chemii Bioorganicznej, Organiczne i Biomateriałów, Toruń 07.12. 2020, wystąpienie ustne. Klera P., Domagalski D., **Skubiszewska (Kowalska) M.**, Fijałkowski Ł., Nowaczyk A., Ocena bezpieczeństwa stosowania antywitamin witamin rozpuszczalnych w tłuszczach z wykorzystaniem metod obliczeniowych, Analiza zagadnienia, analiza wyników- wystąpienie młodego naukowca, Edycja II., 01.04.2020–02.04.2020, Plakat zjazdowy
- Klera P., Domagalski D., **Skubiszewska (Kowalska) M.**, Fijałkowski Ł., Nowaczyk A., Ocena bezpieczeństwa stosowania antywitamin witaminy K z wykorzystaniem metod obliczeniowych , Analiza zagadnienia, analiza wyników- wystąpienie młodego naukowca, Edycja II., 01.04.2020–02.04.2020, plakat zjazdowy
- Domagalski D., Klera P., Fijałkowski Ł., **Skubiszewska (Kowalska) M.**, Nowaczyk A., Ocena toksyczności wybranych antywitamin B9 z wykorzystaniem metod chemii obliczeniowej, Analiza zagadnienia, analiza wyników- wystąpienie młodego naukowca, Edycja II., 2020.04.01- 2020.04.02, plakat zjazdowy
- Domagalski D., Klera P., Fijałkowski Ł., **Skubiszewska (Kowalska) M.**, Nowaczyk A., Ocena toksyczności wybranych antywitamin witamin rozpuszczalnych w wodzie

z wykorzystaniem metod chemii obliczeniowej, Analiza zagadnienia, analiza wyników- wystąpienie młodego naukowca, Edycja II., 01.04.2020–02.04.2020, wystąpienie ustne.

- **Skubiszewska (Kowalska) M.**, Fijałkowski Ł., Klera P., Domagalski D., Nowaczyk A., Ocena bezpieczeństwa stosowania leków off – label u dzieci z zaburzeniami lękowymi, Kopernikańskie E-Seminarium Doktoranckie, 7.09.2020, plakat zjazdowy
- **Skubiszewska (Kowalska) M.**, Fijałkowski Ł., Nowaczyk A., Wykorzystanie metod obliczeniowych in silico w ocenie bezpieczeństwa stosowania leków używanych w terapii leku, I Interdyscyplinarna Konferencja Doktorantów Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, 07.11.2020. plakat zjazdowy.
- **Skubiszewska (Kowalska) M.**, Fijałkowski Ł., Nowaczyk A., Wykorzystanie metod in silico w ocenie bezpieczeństwa stosowania paroksetyny, Nowe trendy w badaniach naukowych : cz. 3., Kraków, 26.02.2021-28.02.2020, plakat zjazdowy.
- **Skubiszewska (Kowalska) M.**, Fijałkowski Ł., Nowaczyk A., Ocena roli transporterów białek w badaniach toksyczności leków, Nowe trendy w badaniach naukowych : cz. 3., Kraków, 26.02.2021-28.02.2020, wystąpienie ustne.
- **Skubiszewska (Kowalska) M.**, Fijałkowski Ł., Nowaczyk A., Ocena bezpieczeństwa stosowania chlorochiny i hydroksychlorochiny z wykorzystaniem metod chemii obliczeniowej, Nowe trendy w badaniach naukowych : cz. 3., Kraków, 26.02.2021-28.02.2020, plakat zjazdowy.
- **Skubiszewska (Kowalska) M.**, Fijałkowski Ł., Nowaczyk A., Calculating chemistry methods as a source of data on toxicity of potential drugs, National Scientific Conference "Knowledge - key to success": V edition , Łódź, 2021.01.23, plakat zjazdowy.
- **Skubiszewska (Kowalska) M.**, Fijałkowski Ł., Nowaczyk A., Assessment of the role of protein transporters in drug toxicity studies, 1st International Electronic Conference on Biomedicine online, 01.06.2021-26.06.2021, plakat zjazdowy.
- **Skubiszewska (Kowalska) M.**, Fijałkowski Ł., Nowaczyk A., Application in silico methods in drug toxicity studies. 5th International Medical Interdisciplinary Congress. Medical, Pharmaceutical and Health Sciences; iMEDIC 2021 Bydgoszcz, 2021.06.05 plakat zjazdowy.
- **Skubiszewska (Kowalska) M.**, Fijałkowski Ł., Nowaczyk A., Ocena farmakoterapii wybranymi pochodnymi 4-aminochinoliny- badania potencjalnych neuronalnych działań

niepożądanych, I Ogólnopolska Konferencja Kopernikańska COVID-19 – wyzwania we współczesnej nauce, 14-15.05.2021, wystąpienie ustne.

- **Skubiszewska (Kowalska) M.**, Fijałkowski Ł., Nowaczyk A., Ocena interakcji Paroksetyny z wybranymi celami molekularnymi- badania in silico, XIV Kopernikańskie Seminarium Doktoranckie, Toruń, 20.10.2021–22.10.2021, plakat zjazdowy.
- **Skubiszewska (Kowalska) M.**, Fijałkowski Ł., Nowaczyk A. Kanały jonowe jako cele terapeutyczne- badania in silico, XIV Kopernikańskie Seminarium Doktoranckie, Toruń, 20.10.2021–22.10.2021, plakat zjazdu.
- **Skubiszewska (Kowalska) M.**, Fijałkowski Ł., Koech F.K., Nowaczyk A., Analiza parametrów fizykochemicznych oraz toksyczności aspiryny i jej pochodnych, IV Śląskie Farmaceutyczne Spotkanie Naukowe "Od nauki do pacjenta". Sosnowiec, 3 grudnia 2021. plakat zjazdowy.
- **Skubiszewska (Kowalska) M.**, Koech F.K., Fijałkowski Ł., Nowaczyk A. Molecular modelling study of aspirin, aspirin derivatives and paracetamol drugs, II Interdisciplinary Conference of Doctoral Students of Medical Universities "DocUMed" under Logan "Libertas et ipsa scientia", Łódź 21.10.22-2021.10.24, plakat zjazdowy.
- **Skubiszewska M.**, Fijałkowski Ł., Nowaczyk A., Protein transporters in drug toxicity studies- in silico methods, Knowledge- Key to Success, 22.01.2022r., plakat zjazdowy.
- **Skubiszewska M.**, Fijałkowski Ł., Nowaczyk A., *Badanie działań niepożądanych wybranych pochodnych 4-aminochinoliny- testy in silico*, Ogólnopolska konferencja młodych naukowców nt. COVID-19 Spojrzenie Młodych Naukowców, Kraków, 26.02.2022–27.02.2022r., plakat zjazdowy.

Szkolenia i kursy

- Fitoterapia chorób infekcyjnych górnych dróg oddechowych. Organizator: Uniwersytet Medyczny w Lublinie, wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej, 08.08.2018r.
- Nutraceutyki, suplementy i witaminy. Organizator: Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Studium Kształcenia Podyplomowego Wydziału Farmaceutycznego, 06.10.2018r.

- Najczęstsze zaburzenia rytmu snu i czuwania oraz metody ich leczenia. Organizator: Ośrodek szkolenia Podyplomowego Wydziału Farmaceutycznego Collegium Medicum UMK, 06.10.2018r.
- Racjonalna suplementacja witamin dla kobiet w ciąży, jak zadbać o siebie po porodzie. Organizator: Ośrodek szkolenia Podyplomowego Wydziału Farmaceutycznego Collegium Medicum UMK, 06.10.2018r.
- Witaminy i cynk w pielęgnacji włosów. Organizator: Uniwersytet Medyczny w Lublinie, wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej, 05.11.2018r.
- Vitaminum D- słońce zamknięte w kapsułce. Organizator: Uniwersytet Medyczny w Lublinie, wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej, 07.11.2018r.
- Rekomendacje postępowania w zapaleniach górnych dróg oddechowych. Organizator: Uniwersytet Medyczny w Lublinie, wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej, 26.03.2019r.
- Informacja o leku w praktyce aptecznej. Organizator: Uniwersytet Medyczny w Lublinie, wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej, 26.03.2019r.
- Inhibitory pompy protonowej- nadużywanie i jego konsekwencje. Część I., Warszawa, 18.02.2019r.
- Szkolenie ciągłe farmaceutów. Sympozjum szkoleniowe – problematyka łysienia. Organizator: Okręgowa Izba Aptekarska w Krakowie, 26.05.2019r.
- Szkolenie ciągłe farmaceutów. Sympozjum szkoleniowe – łysienie polekowe. Organizator: Okręgowa Izba Aptekarska w Krakowie, 26.05.2019r.
- Kurs szczepień w aptece (potwierdzony europejskim certyfikatem uprawniającym do wykonywania szczepień i iniekcji w aptekach (ISO 9001 certified Quality Managment), Warszawa, 09.05.2019r.
- Immunoprofilaktyka wybranych chorób infekcyjnych. Organizator: Studium Kształcenia Podyplomowego Wydziału Farmaceutycznego Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu oraz Konsorcjum Naukowe Uniwersytety Kardynała Stefana Wyszyńskiego, Piktorex sp. z o.o., 12.05.2019r.

- Komunikacja i informacja o leku w praktyce aptekarza- wybrane aspekty teoretyczne i praktyczne. Organizator: Uniwersytet Medyczny w Lublinie, wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej, 18-19.05.2019r.
- Kurs: Schemat leczenia bólu nazwany drabiną analgetyczną, Warszawa, 24.10.2019r.
- Kurs: (Nie)Bezpieczny Paracetamol, Warszawa, 24.10.2019r.
- Posiedzenie naukowo-szkoleniowe: Jak pomóc pacjentom uzupełniać niedobory witaminy D. Organizator: Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie oraz Lubelskie Towarzystwo Wspierania Nauk Farmaceutycznych, 21.05.2020 r.
- Kurs: Zespół suchego oka, Warszawa. 04.06.2020r.
- Kurs: Bezpieczeństwo stosowania leków, Olsztyn. Organizator: Warszawski Uniwersytet Medyczny, 5.06.2020r.
- Posiedzenie naukowo-szkoleniowe: Nieżyt nosa i jego leczenie. Organizator: Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie oraz Lubelskie Towarzystwo Wspierania Nauk Farmaceutycznych, 12.06.2020r.
- Kurs: Jaki preparat zarekomendować na problemy skórne, w zależności od sytuacji? Warszawa, 18.06.2020r.
- Szkolenie: Wpływ probiotyków na układ immunologiczny. Wskazania do stosowania probiotyków i ich kliniczna skuteczność, organizator: Uniwersytet Medyczny w Łodzi, 08.07.2020r.
- Farmakoterapia bólu. Organizator: Ośrodek szkolenia podyplomowego Wydziału Farmaceutycznego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, 06.10.2020r.
- Finanse apteki rozszyfrowane – czyli jak nimi zarządzać, aby zarabiać więcej, Organizator: Naczelna Izba Aptekarska, 06.10.2020r.
- Przez żołądek do serca, a z jelit do mózgu. Psychobiotyki w rekomendacji farmaceuty. Organizator: Naczelna Izba Aptekarska, 13.10.2020r

- Lek recepturowy- aspekty prawne. Organizator: Naczelna Izba Aptekarska, 13.10.2020r.
- Zwalczanie gorączki u dzieci: zasady wyboru leków OTC w chorobach przebiegających z gorączką- Organizator: Okręgowa Izba Aptekarska w Białymstoku, 17.10.2020r.
- Alergologia: Postępy w farmakoterapii chorób alergicznych. Organizator: Okręgowa Izba Aptekarska w Białymstoku, 17.10.2020r.
- Pytania do programu edukacyjnego „reumatologia”. Organizator: Okręgowa Izba Aptekarska w Białymstoku, 17.10.2020r.
- Sprzedawca czy farmaceuta? Rola farmaceuty w fitoterapii schorzeń układu oddechowego w kontekście aktualnych badań klinicznych. Organizator: Naczelna Izba Aptekarska, 20.10.2020r.
- Promocja zdrowia i profilaktyka zdrowotna w aptekach ogólnodostępnych. Organizator: Ośrodek szkolenia podyplomowego Wydziału Farmaceutycznego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, 03.11.2020r.
- Promocja zdrowia i profilaktyka zdrowotna w aptekach ogólnodostępnych. Organizator: Ośrodek szkolenia podyplomowego Wydziału Farmaceutycznego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, 12.11.2020r.
- Probiotyki wpływające na funkcje bariery jelitowej- komu warto je polecać?. Organizator: Naczelna Izba Aptekarska, 01.12.2020r.
- Farmakoterapia bólu: bóle głowy. Organizator: Okręgowa Izba Aptekarska w Białymstoku, 03.12.2020r.
- Farmakoterapia chorób nosa i zatok przynosowych- wybrane zagadnienia. Organizator: Okręgowa Izba Aptekarska w Białymstoku, 03.12.2020r.
- Profesjonalna pielęgnacja stóp. Organizator: Wydział Farmaceutyczny UM w Lublinie i Lubelskie Towarzystwo Wspierania Nauk Farmaceutycznych, 09.12.2020r.

- Zastosowanie probiotyków w leczeniu schorzeń proktologicznych i urologicznych. Organizator: Wydział Farmaceutyczny UM w Lublinie i Lubelskie Towarzystwo Wspierania Nauk Farmaceutycznych, 09.12.2020r.
- Probiotykoterapia celowana. Organizator: Wydział Farmaceutyczny UM w Lublinie i Lubelskie Towarzystwo Wspierania Nauk Farmaceutycznych, 10.12.2020r.
- Szczepienia przeciw grypie i COVID–19 – praktyczne ujęcie aktualnych zagadnień. Organizator: Naczelna Izba Aptekarska, 15.12.2020r.
- Astma oskrzelowa- współpraca lekarza i farmaceuty w procesie edukacji pacjenta. Organizator: Naczelna Izba Aptekarska, 12.01.2021r.
- Ustawa o zawodzie farmaceuty- co zmieni w pracy aptekarza. Organizator: Naczelna Izba Aptekarska, 19.01.2021r.
- Planowana rola farmaceutów w szczepieniach przeciw COVID–19. Organizator: Naczelna Izba Aptekarska, 21.01.2021r.
- Mikrobiota w leczeniu chorób metabolicznych. Dieta w cukrzycy. Organizator: Naczelna Izba Aptekarska, 02.02.2021r.
- Zwykły katar to też zapalenie zatok? Organizator: Zachodniopomorska Okręgowa Izba Aptekarska w Szczecinie, 10.03.2021r.
- Wpływ czynników fizjologicznych i patologicznych na działanie leków. Organizator: Ośrodek szkolenia podyplomowego Wydziału Farmaceutycznego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, 20.03.2021r.
- Wybrane zagadnienia z prawa farmaceutycznego. Kodeks etyki aptekarza RP. Organizator: Ośrodek szkolenia podyplomowego Wydziału Farmaceutycznego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, 25.03.2021r.
- Szkolenie teoretyczne dla fizjoterapeutów, farmaceutów i diagnostów laboratoryjnych prowadzących szczepienia ochronne przeciwko COVID–19. Organizator: Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego 15.03.2021r.

- Szkolenie praktyczne dla fizjoterapeutów, farmaceutów i diagnostów laboratoryjnych prowadzących szczepienia ochronne przeciwko COVID–19. Organizator: Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego 26.03.2021r.
- Studencki wtorek z nauką- idea i planowanie doświadczeń naukowych. Organizator: Wydział Nauk o Zdrowiu CM UMK w Bydgoszczy, 30.03.2021r.
- Najważniejsze aspekty opieki nad chorymi na POCHP – spojrzenie przez pryzmat pandemii COVID-19. Organizator: Grupa Conway, 16.04.2021r.
- Studencki wtorek z nauką – statystyka – czy jest mi potrzebna? Organizator: Wydział Nauk o Zdrowiu CM UMK w Bydgoszczy, 25.05.2021r.
- Probiotyki w ciąży – nowy standard postępowania dietetycznego. Organizator: platforma Doctrina, 23.08.2021r.
- Leki wpływające na motorykę przewodu pokarmowego. Organizator: firma Takeda pod patronatem Wielkopolskiej Okręgowej Izby Aptekarskiej, 20.04.2022r.
- Farmakoterapia choroby refluksowej i wrzodowej. Organizator: firma Takeda pod patronatem Wielkopolskiej Okręgowej Izby Aptekarskiej, 20.04.2022r.
- W jaki sposób powinien poprowadzić rozmowę farmaceuta, gdy pacjent nie umie określić swoich dolegliwości?. Organizator: firma Takeda pod patronatem Wielkopolskiej Okręgowej Izby Aptekarskiej, 20.04.2022r.

Nagrody i wyróżnienia

- Wyróżnienie za *Czynny udział w dyskusji naukowej* podczas Konferencji Młodych Naukowców nt. Analizy zagadnienia, Analizy wyników – Wystąpienie Młodego Naukowca, Edycja II, Kraków 01.04.2020–02.04.2020r.