



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

**FAKULTA ELEKTROTECHNIKY
A KOMUNIKAČNÍCH TECHNOLOGIÍ**

FACULTY OF ELECTRICAL ENGINEERING AND COMMUNICATION

ÚSTAV BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ

DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING

**SROVNÁVACÍ STUDIE PŮSOBENÍ LÉČIV VYBRANÉHO
ONEMOCNĚNÍ NA ZÁKLADĚ GENOVÝCH
POLYMORFISMŮ ČLOVĚKA**

COMPARATIVE STUDY OF THE DRUG EFFECT ON SELECTED DISEASE BASED ON THE HUMAN
GENETIC POLYMORPHISMS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Daniela Beňková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Mgr. Pavlína Koščová

BRNO 2016



Bakalářská práce

bakalářský studijní obor **Biomedicínská technika a bioinformatika**

Ústav biomedicínského inženýrství

Studentka: Daniela Beňková

ID: 164964

Ročník: 3

Akademický rok: 2015/16

NÁZEV TÉMATU:

Srovnávací studie působení léčiv vybraného onemocnění na základě genových polymorfismů člověka

POKYNY PRO VYPRACOVÁNÍ:

1) Seznamte se s principy a významem farmakogenomiky, vypracujte úvod její základní metodologie, zhodnoťte výhody a nevýhody, posuďte vliv na farmakokinetiku. Zpracujte teorii mapování SNPs. 2) Provedte literární rešerši léčby vybraného onemocnění, prozkoumejte signální dráhy daných léčiv a určete proteiny ovlivněné jejich působením. 3) Identifikujte genové mutace, které jsou u pacientů příčinou rozdílné odpovědi na konkrétní léčiva. 4) Provedte ADMET profilování vašeho seznamu léčiv a vyhodnoťte získaná data. 5) Srovnajte účinky léčiv u rozdílných alel, stanovte rizika použití daných léčiv. Provedte diskuzi získaných výsledků.

DOPORUČENÁ LITERATURA:

[1] EVANS, W. E. "Pharmacogenomics: Translating Functional Genomics into Rational Therapeutics." *Science* 286, no. 5439 (October 15, 1999): 487–91.

[2] WANG, J., URBAN L. "The Impact of Early ADME Profiling on Drug Discovery and Development Strategy." *DDW DRUG DISCOVERY WORLD* 5, no. 4 (2004): 73–86.

Termín zadání: 8.2.2016

Termín odevzdání: 27.5.2016

Vedoucí práce: Mgr. Pavlína Koščová

Konzultant bakalářské práce:

prof. Ing. Ivo Provozník, Ph.D., předseda oborové rady

UPOZORNĚNÍ:

Autor bakalářské práce nesmí při vytváření bakalářské práce porušit autorská práva třetích osob, zejména nesmí zasahovat nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a musí si být plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č.40/2009 Sb.

ABSTRAKT

Bakalářská práce se zabývá účinky léčiv z hlediska výskytu genových polymorfismů člověka. Cílem je charakterizovat vědní obor farmakogenomiku, jednonukleotidové polymorfismy a metody jejich vyhledávání, podat informace o Alzheimerově chorobě, vyhledat léčiva určena k léčbě této nemoci, porovnat jejich účinky, popsat signální dráhy, provést ADMET profiling těchto léčiv a vyhodnotit získaná data.

KLÍČOVÁ SLOVA

Alzheimerova choroba, ADMET, farmakogenomika, jednonukleotidový polymorfismus, SNP

ABSTRACT

This bachelor thesis is dealing with topic of effects of medicine from the viewpoint of the genetic polymorphism occurrence in human being. The main targets of my bachelor thesis include describing the pharmacogenomics as a scientific branch, single nucleotide polymorphisms and methods of their searching, providing information about Alzheimer's disease, looking up the medicine for the treatment of this disease, comparing their effects, describing pathways and realizing ADMET profiling of these drugs and evaluating data.

KEYWORDS

Alzheimer's disease, ADMET, pharmacogenomics, single nucleotide polymorphism, SNP

BEŇKOVÁ, D. *Srovnávací studie působení léčiv vybraného onemocnění na základě genových polymorfismů člověka*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, Ústav biomedicínského inženýrství, 2016. 61 s., 8 s. příloh. Bakalářská práce. Vedoucí práce: Mgr. Pavlína Koščová

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci na téma Srovnávací studie působení léčiv vybraného onemocnění na základě genových polymorfismů člověka jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou všechny citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

Jako autor uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že v souvislosti s vytvořením této bakalářské práce jsem neporušil autorská práva třetích osob, zejména jsem nezasáhl nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a/nebo majetkových a jsem si plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č. 40/2009 Sb.

V Brně dně

.....

(podpis autora)

PODĚKOVÁNÍ

Chtěla bych poděkovat vedoucí bakalářské práce Mgr. Pavlíně Koščové za trpělivost a pomoc při řešení této práce.

V Brně dně

.....

(podpis autora)

OBSAH

Seznam obrázků	3
Seznam tabulek	4
Úvod	5
1 Význam farmakogenomiky a teorie mapování jednonukleotidových polymorfismů	6
1.1 Farmakogenomika.....	6
1.2 Teorie mapování jednonukleotidových polymorfismů	8
1.2.1 Obecná charakteristika jednonukleotidových polymorfismů	8
1.2.2 Metody mapování SNPs	9
2 Alzheimerova choroba	13
2.1 Obecná charakteristika onemocnění.....	13
2.2 Příčiny vzniku nemoci.....	14
2.3 Genetická podstata onemocnění	14
2.4 Diagnostika	16
2.5 Léčba	17
3 Léčiva Alzheimerovy choroby	19
3.1 Databáze léčiv	19
3.2 Seznam a charakteristika vybraných léčiv.....	20
3.2.1 Donepezil (Aricept®)	20
3.2.2 Rivastigmin (Exelon®)	21
3.2.3 Galantamin (Razadyne®)	21
3.2.4 Memantin (Namenda®)	22
3.2.5 Risperidon (Risperdal®)	23
3.2.6 Olanzapin (Zyprexa®)	23
3.3 ADME	24
4 ADMET profiling	27
4.1 Postup metody.....	27
4.2 Teoretické informace k predikovaným parametrům.....	28
4.3 Statistické zpracování dat ADMET profilingu	33
4.4 Výskyt SNP v jednotlivých genech.....	38
4.5 Shrnutí a diskuze výsledků	39

Literatura	43
Seznam použitých zkratek	47
Přehled aminokyselin	48
Chemické struktury léčiv	49
SNP ovlivňující účinek léčiv	50
Obsah CD	56

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1: Příklad substituce nukleotidů typu transverze - převzato z [48].....	9
Obr. 2: Průběh polymerázové řetězové reakce - upraveno z [37].....	10
Obr. 3: Princip Sangerovy metody - upraveno z [35]	12
Obr. 4: Zdravá mozková tkáň vs. tkáň postižena chorobou - převzato z [15].....	13
Obr. 5: Zobrazení míry poškození mozku pozitronovou emisní tomografií (PET) - převzato a upraveno z [49]	17
Obr. 6: Pohyb léčiva v organismu po jeho podání – upraveno z [45].....	25
Obr. 7: Histogram porovnávající predikované hodnoty střevní absorpce jednotlivých léčiv	34
Obr. 8: Histogram znázorňující míru prostupnosti jednotlivých léčiv kůží	34
Obr. 9: Histogram porovnávající množství nevázaných frakcí jednotlivých léčiv	35
Obr. 10: Histogram porovnávající míru propustnosti hematoencefalické bariéry pro všechny zástupce léčiv	35
Obr. 11: Histogram porovnávající propustnost CNS pro léčiva	36
Obr. 12: Histogram porovnávající celkovou clearanci jednotlivých léčiv	36
Obr. 13: Histogram znázorňující hodnoty maximální tolerované dávky jednotlivých léčiv	37
Obr. 14: Histogram porovnávající LD50 všech zástupců léčiv	37
Obr. 15: Histogram znázorňující hodnoty dávek léčiv, které vykazují toxicitu pro ryby	38

SEZNAM TABULEK

Tab. 1: Přehled nukleotidů tvořících molekulu DNA	8
Tab. 2: Geny s výskytem jednonukleotidových polymorfismů ovlivňujících účinek vybraných léčiv (souhrn pro všechna léčiva)	39
Tab. 3: Přehled základních proteinogenních aminokyselin	48
Tab. 4: Přehled lineárních zápisů strukturního vzorce	50
Tab. 5: Mutace v genech ovlivňující účinky donepezilu	50
Tab. 6: Mutace v genech ovlivňující účinky rivastigminu	51
Tab. 7: Mutace v genech ovlivňující účinky galantaminu	52
Tab. 8: Mutace v genech ovlivňující účinky memantinu	53
Tab. 9: Mutace v genech ovlivňující účinky risperidonu	53
Tab. 10: Mutace v genech ovlivňující účinky olanzapinu	55

ÚVOD

S rozvojem metod, mapujících výskyt jednonukleotidových polymorfismů v genu člověka, se vyvinuly také vědní obory a oblasti výzkumu, které se zabývají účinky podaných léků z hlediska výskytu těchto polymorfismů. Na podané léčivo se nemusí projevit žádná odezva organismu, mohou se však objevit projevy negativní až nebezpečné. Těmto problémům se nyní snaží vědci a farmaceutické společnosti předejít a existuje šance, že by v budoucnu bylo lidem podáváno léčivo šité na míru jejich genotypu. K predikci účinků léčiv jsou využívány modely ADME, sloužící k odhadu farmakokinetických vlastností molekul, které nastávají po jejich podání. Kromě těchto procesů se zkoumají také toxické vlastnosti léčiv.

Práce je rozdělena do čtyř základních kapitol. V první části je charakterizován vědní obor farmakogenomika a jsou popsány základní metody vyhledávání jednonukleotidových polymorfismů. Druhá část práce je věnována vybranému onemocnění – Alzheimerově chorobě. Zde je uvedena obecná charakteristika onemocnění, genetická podstata, diagnostika a léčba. Další kapitola je zaměřena na nejčastěji používaná léčiva k léčbě této choroby, jejich účinky v organismu, signální dráhy a také příklady mutací, které jsou příčinou rozdílné odpovědi na podaný lék. Praktická část se zabývá ADMET profílingem vybraných léčiv a statistickým vyhodnocením získaných dat.

1 VÝZNAM FARMAKOGENOMIKY A TEORIE MAPOVÁNÍ JEDNONUKLEOTIDOVÝCH POLYMORFISMŮ

1.1 Farmakogenomika

Základní metodologie

Farmakogenomika je vědní obor zabývající se vztahem mezi genetickou informací a individuální reakcí na podané léčivo¹ [1].

Vychází z předpokladu, že rozdíly v odpovědi na podání léku mezi jednotlivci mohou být predikovány na základě jejich genetického uzpůsobení, neboli profilu, konkrétně přítomností určitého genetického polymorfismu [1][4]. Na základě tohoto zjištění je poté možno vybrat individuální léčivo „šité na míru“ genotypu² jedince [4]. Tímto výběrem bude možné předem určit pacienty, pro které bude léčba účinná, a naopak také ty, pro které bude léčba neefektivní či dokonce riziková s nežádoucími účinky [1].

Výhody a nevýhody

Jednou ze základních výhod této disciplíny je již výše zmíněný fakt, že lékaři budou moci předem určit, který typ léku bude mít pro konkrétního pacienta největší terapeutický přínos a naopak jaký typ léku by u něj mohl vyvolat negativní účinky [4]. Bude tedy reálné zvolit jakousi nejefektivnější a nejbezpečnější cestu léčby.

Studium farmakogenomiky dále přispívá farmaceutickým společnostem k vývoji léčiv, která budou účinnější s menším množstvím nežádoucích účinků [4]. Farmakogenomika může také přispět k návratu léčiva, které bylo během klinických studií staženo z důvodu negativních reakcí na testovaných jedincích [4]. V tomto případě bychom také dle jejich genetické charakteristiky mohli zpětně určit, co mohlo být důvodem nežádoucích reakcí a následného stažení léčiva.

¹ substance, která svými fyzikálními nebo chemickými účinky vyvolává příznivé změny biologických funkcí organismu

² souhrn všech dědičných vloh jedince uložený v genech

Farmakogenomika je limitována identifikací významných genetických polymorfismů [4]. Variabilita lékové odpovědi není obvykle dána variabilitou jen jednoho genu, ale variabilitou více genů, přičemž každý gen obsahuje mnoho polymorfismů, které mohou ovlivnit metabolismus léků a které musí být odhaleny před vývojem daného léčiva [4]. Kvůli této složitosti lidského genomu nastává dlouhá časová prodleva při hledání těchto významných informací.

Další nevýhodou může být existence negenetických faktorů (věk, výživa, přítomnost inhibitorů a induktorů), na které nemusí být určovaný genotyp citlivý, avšak interakce léčiv s těmito vnějšími faktory mohou lékovou odpověď pacienta ovlivnit. Samotné určení genotypu tedy nemusí stačit k nalezení vhodného, účinného a bezpečného léčiva [3][4].

Vliv na farmakokinetiku

Farmakokinetika se zabývá procesy, které modifikují průběh koncentrace léčiva v organismu, tedy tím, jak organismus léčivo zpracovává [1].

Pro léčiva, jejichž biotransformace³ probíhá oxidační přeměnou, jsou nejvýznamnější enzymy cytochromu P450 [1]. Individuální rozdíly ve výskytu tohoto enzymu jsou způsobeny přítomností genetického polymorfismu, jehož studii v souvislosti s účinky léčiv na organismus se zabývá právě farmakogenomika [1][3].

V současné době existuje přes 200 druhů izoenzymů cytochromu P450, které se podílejí na biotransformaci látek. Izoenzymy CYP2D6 a CYP3A4 patří pro lékový metabolismus mezi nejvýznamnější a jejich aktivita je ovlivněna právě přítomností genetického polymorfismu [26]. Například snížená aktivita enzymu CYP2D6 může významně redukovat účinky léčiva a naopak zvýšená aktivita tohoto enzymu v souvislosti s některými léčivy může vyvolat nebezpečné stavy (intoxikace morfinem) [26].

Farmakogenomika patří mezi klíčové obory pro farmakokinetiku, neboť umožňuje využívat nové znalosti pro přesnější individualizaci dávkování léčiva k dosažení co nejúčinnější a nejbezpečnější farmakoterapie [3].

³ přeměna struktury látky působením organismu

1.2 Teorie mapování jednonukleotidových polymorfismů

1.2.1 Obecná charakteristika jednonukleotidových polymorfismů

Jednonukleotidové polymorfismy (SNP) patří mezi nejčastěji nalézané genetické změny v lidské populaci. Reprezentují změnu v jednom nukleotidu⁴ v sekvenci DNA (*Obr. 1*). Jedním ze způsobů jejich označení je pomocí rsID neboli referenčního SNP ID, přiděleného NCBI (*Obr. 1*). Jedná se o jedinečný identifikátor, který však neznačí přesnou pozici, může totiž identifikovat jednu nebo více pozic v sekvenci - v případě, že se v dané oblasti vyskytuje opakovaně [47].

Tab. 1: Přehled nukleotidů tvořících molekulu DNA

purinové báze	adenin (A)	guanin (G)
pyrimidinové báze	cytosin (C)	thymín (T)

SNP vznikají následkem bodových mutací, které mohou mít povahu transice - záměna purinové báze za purinovou nebo pyrimidinové za pyrimidinovou (př. A→G), transverze - záměna purinové báze za pyrimidinovou nebo pyrimidinové za purinovou (př. A→T), inserce - přidání nukleotidu (př. _→A) či delece - vypadnutí nukleotidu (př. A→_).

Vyskytují se přibližně po každých 300 nukleotidech, z čehož vyplývá, že je jich v lidském genomu okolo 10 milionů (genom obsahuje přibližně 3 000 000 000 nukleotidů)[8].

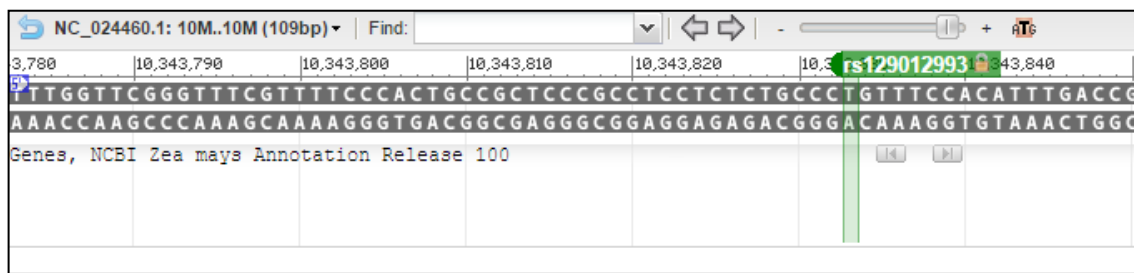
Genetický kód je degenerovaný, což znamená, že může být jedna aminokyselina⁵ kódována více kodony (např. aminokyselinu cystein kódují kodony UGU a UGC) (*Tab. 3*).

Dle efektu pak můžeme rozlišit SNP na synonymní a nesynonymní. Synonymní SNP nemění smysl kódujícího řetězce - dochází sice k substituci nukleotidu, avšak daná trojice nukleotidů kóduje stále stejnou aminokyselinu, proto nedochází ke změně ve struktuře a funkci výsledného proteinu [8][9].

⁴ podjednotky tvořící řetězec DNA

⁵ základní stavební složka proteinů, kódována trojicí nukleotidů

Nesyonymní mutace naopak mění smysl kódujícího řetězce, dochází tedy ke ztrátě funkce či ke změně funkce proteinu [8][9].



Obr. 1: Příklad substituce nukleotidů typu transverze - převzato z [48]

1.2.2 Metody mapování SNPs

Mapování SNPs zahrnuje metody, které využíváme k detekci změn ve struktuře DNA.

Patří mezi ně například polymerázová řetězová reakce (PCR), metoda polymorfismu délky restričních fragmentů (PCR-RFLP), DNA čipy a sekvenování.

Polymerázová řetězová reakce (PCR)

PCR je biochemická metoda, která se využívá k amplifikaci (zmnožení) úseku DNA za použití DNA polymerázy⁶, výsledný produkt se hromadí geometrickou řadou [5][11] (*Obr. 2*).

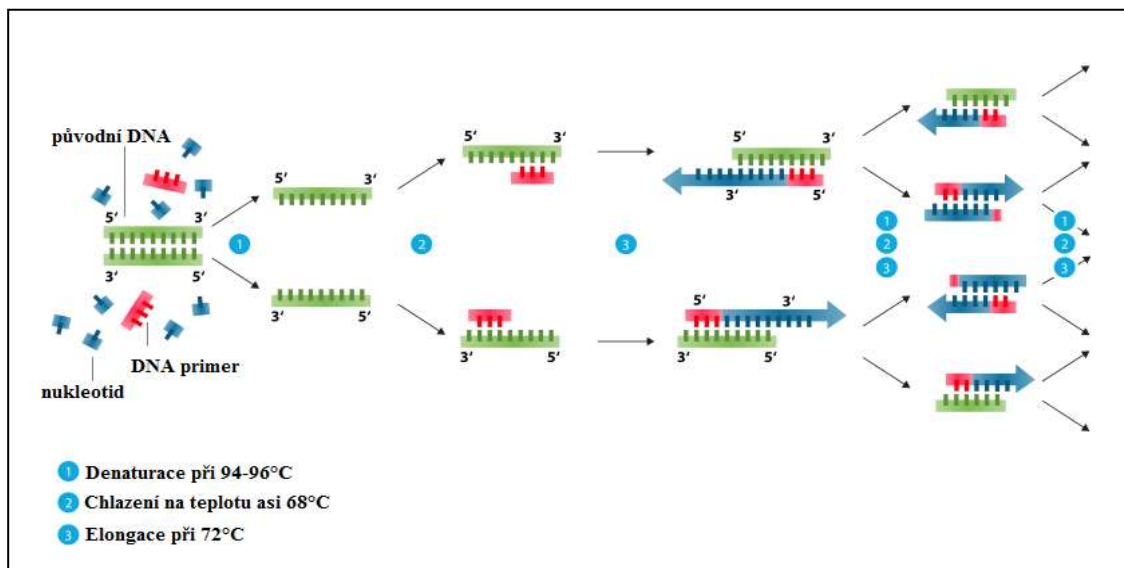
Samotná reakce je založena na schopnosti DNA polymerázy syntetizovat komplementární vlákno podle templátu⁷ jednovláknové DNA a to tak, že přidává nové nukleotidy k existujícímu úseku druhého vlákna [5][11]. Templátová vlákna vznikají denurací původní dvouvláknové DNA. K označení míst, odkud má polymeráza začít komplementární vlákno syntetizovat, jsou zapotřebí dva odlišné primery⁸, které dosedají na komplementární sekvence ve dvou templátových vláknech a za vhodných teplotních podmínek vytváří vodíkové můstky se sekvencí komplementárního vlákna (hybridizace), při reakci dochází k prodlužování primeru na 3' konci (extenze primeru)[11]. V prvním cyklu vznikají kopie dvě, v dalším cyklu čtyři a pokračováním můžeme vytvořit až miliony kopií úseku DNA [11].

⁶ enzym přidávající nukleotidy do nově vznikajícího řetězce DNA

⁷ namnožená, jednovláknové DNA

⁸ krátký fragment DNA, který se napojuje na templát, slouží jako kotva pro připojování nukleotidů

Reakce PCR má široké spektrum využití. Používá se při identifikaci dědičných chorob, diagnostice infekčních nemocí, vnášení mutací do vzorku a dalších. Namnožení úseku DNA dále využívají biotechnologické metody, např. sekvenování DNA [5].



Obr. 2: Průběh polymerázové řetězové reakce - upraveno z [37]

Metoda PCR-RFLP

Základem metody polymorfismu délky restrikčních fragmentů ve spojení s PCR je štěpení namnožené genomové DNA restrikčními endonukleázami, čímž vznikne množství fragmentů, které jsou poté elektroforézou v agarózovém gelu rozděleny podle velikosti [5].

Reakční směs pro štěpení PCR produktu se skládá z pufru pro restrikční endonukleázu, enzymu restrikční endonukleázy a destilované vody [5]. Při inkubaci dochází k enzymatickému štěpení specifických míst sekvence DNA, které rozpoznává daný enzym. Doba inkubace je asi 2 hodiny a teplota kolem 37 °C [5]. Po inkubaci se do připravených jamek v gelu pipetou nanese vzorek a elektroforetická vana se zapojí ke zdroji. Doba trvání elektroforézy závisí na velikosti fragmentu a množství gelu, zpravidla však činí kolem 45 min [5]. Nakonec se provede vizualizace fragmentů.

Tato metoda má celou řadu využití, jednou z možností je právě identifikace genů zodpovědných za určitá onemocnění [5].

DNA čipy (microarrays)

Tato metoda slouží k detekci sekvence DNA ze vzorku. Zjišťujeme, které geny jsou v daném vzorku za určitých podmínek aktivní a které ne. Výhodou oproti jiným metodám je, že můžeme v jednom pokusu detekovat velké množství různých DNA sekvencí [7].

Microarray se skládá z pole tisíců mikroskopických bodů s úseky oligonukleotidů, kde každý obsahuje malé množství specifické DNA sekvence. U standardních microarrayů jsou sondy (oligonukleotidy) navázány kovalentní vazbou na chemickou matici (polyakrylamid) na pevném podkladu (sklo) [11]. Molekuly vzorku po kontaktu s DNA čipem hybridizují s komplementárními molekulami přichycenými na destičce [11]. Po omytí zůstanou v čipu kovalentní vazbou pevně přichycené sondy k jeho povrchu a na sondách přichycené molekuly. Molekuly vzorku, které nebyly přichycené na sondách dostatečným počtem vodíkových můstků, tedy nebyly dostatečně sekvenčně podobné, jsou odplaveny [7].

Výsledek hybridizace vyhodnocujeme pomocí laserového skeneru, podle intenzity vyzářeného světla lze určit počet přítomných komplementárních molekul ve vzorku [7].

DNA čipy jsou využívány například k detekci jednonukleotidových polymorfismů, ke zjištění změn v expresi genů nebo také ke genotypizaci⁹ [7].

Sekvenování

Sekvenování DNA je metodou, pomocí které získáváme posloupnosti nukleotidů v sekvencích DNA [22].

Existují dvě metody. První z nich, tzv. Maxamova-Gilbertova metoda, je založena na částečně chemické modifikaci nukleotidů a následném štěpení [22]. Dnes už se však tato metoda využívá jen zřídka. Druhá, tzv. Sangerova metoda, využívá inhibice enzymatické syntézy DNA a je stále používanou metodou [22] (*Obr. 3*).

Základním krokem sekvenace podle Sangerovy metody je replikace DNA, tedy vznik nového komplementárního vlákna podle vlákna templátového [11].

Sekvenace začíná denaturací (zahřátím na 94 °C) velkého množství kopií dvouvláknové DNA do jednovláknových [11]. Poté se vybraná sekvence vloží do

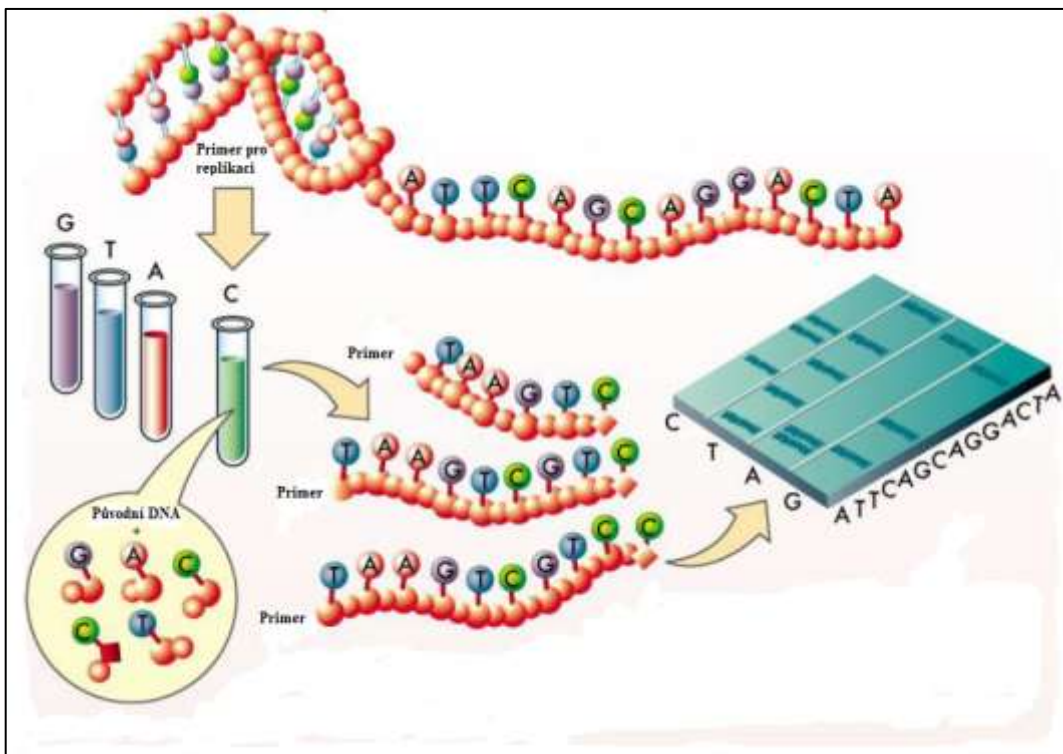
⁹ určení genotypu jedince

reakční směsi, kterou tvoří DNA polymeráza, radioaktivně označený primer, pufr, deoxyribonukleotidtrifosfáty a dideoxyribonukleotidtrifosfáty [11].

Deoxyribonukleotidtrifosfáty za přítomnosti polymerázy doplňují primer a formují tak DNA řetězec [11]. Pokud DNA polymeráza začlení dideoxynukleotid do narůstajícího řetězce namísto deoxynukleotidů, nemůže být připojen žádný další nukleotid a syntéza je ukončena [11]. Všechny dosavadní vzniklé různě dlouhé oligonukleotidy budou končit jedním typem nukleotidu (např. pokud dojde k zastavení syntézy díky ddATP, budou končit adeninem) [11].

Pokud necháme reakci proběhnout s ddATP, ddCTP, ddGTP a ddTTP, dostaneme 4 směsi oligonukleotidů, kdy v každé směsi budou končit oligonukleotidy příslušnou bází [11].

Klasická metoda vyhodnocení spočívá v provedení elektroforézy, kdy jsou v gelu vytvořeny čtyři dráhy pro každou z oligonukleotidové směsi [11]. Díky rozdílné délce doputuje každá z nich různě daleko a jejich následným porovnáním můžeme snadno zjistit, jak za sebou následovaly nukleové báze ve zkoumané sekvenci DNA [11].



Obr. 3: Princip Sangerovy metody - upraveno z [35]

2 ALZHEIMEROVA CHOROBA

2.1 Obecná charakteristika onemocnění

Alzheimerova choroba byla poprvé popsána v roce 1907 německým lékařem Aloisem Alzheimerem. Dříve byla považována za velmi vzácnou, dnes se již její výskyt rozrostl a postihuje několik desítek milionů lidí po celém světě.

Patří mezi jednu z nejčastějších neurodegenerativních poruch. Je způsobena odumíráním buněk v mozkové hemisféře¹⁰, dochází k atrofii¹¹ mozkové tkáně a postupnému rozpadu nervových vláken a buněk [33].

Poškození a zánik nervových buněk je způsoben ukládáním patologických proteinů, zejména beta-amyloidu, v podobě amyloidových¹² plaků v mozkové tkáni - v jejich okolí poté vzniká sterilní zánět [33]. Z důvodu této zánětlivé reakce se uvolňují cytokininy¹³ a volné kyslíkové radikály¹⁴, které způsobují další neurodegenerativní změny – peroxidují lipidy buněčné membrány neuronů¹⁵ a tím způsobují jejich zánik. Mozková tkáň ubývá, atrofuje [33] (*Obr. 4*).



Obr. 4: Zdravá mozková tkáň vs. tkáň postižena chorobou - převzato z [15]

¹⁰ párová struktura mozku

¹¹ zmenšení orgánu v důsledku úbytku jeho buněk

¹² bílkovina, která se ukládá při chorobných stavech v mezibuněčných prostorech

¹³ látky bílkovinné povahy

¹⁴ vysoce reaktivní molekuly schopné samostatné existence

¹⁵ nervová buňka, jednotka nervové tkáně

Onemocnění má také vliv na látkovou činnost mozku. Způsobuje například úbytek neurotransmiteru¹⁶ acetylcholinu, pomocí kterého vznikají nervové vzruchy, glutamátu, který vzruchy přenáší, ale také hormonu serotoninu a noradrenalinu [33].

2.2 Příčiny vzniku nemoci

Přesné příčiny vzniku choroby dosud nejsou známy, je však evidentní, že je způsobena působením různých faktorů.

Prvním z důležitých faktorů, které ovlivňují vznik onemocnění, je věk. Je prokázáno, že u lidí starších 85 let trpí chorobou každý pátý. Naopak pod 60. rok života se choroba vyskytuje spíše vzácně [33]. Dalším faktorem je pohlaví, v období senilia se vyskytuje u žen dvakrát častěji než u mužů. V mladším věku je rozložení výskytu onemocnění pro obě pohlaví rovnoměrné [1]. Výskyt Alzheimerovy choroby významně ovlivňují také genetické předpoklady (*viz kap. 2.3*). Dle studií je také prokázáno, že kouření a dlouhodobá konzumace alkoholu přináší větší riziko vzniku onemocnění [33].

2.3 Genetická podstata onemocnění

Některá onemocnění mohou být zapříčiněna genetickými mutacemi nebo trvalými změnami v jednom či více specifických genech [23]. Jestliže dítě zdědí po svých rodičích genetické mutace, které jsou jistou příčinou vzniku onemocnění, je velká pravděpodobnost, že také onemocní [23]. Alzheimerova choroba je příkladem nemoci, která vzniká právě z důvodu vrozených genetických změn.

V některých případech může hrát roli při vzniku nemoci varianta genu. Častěji má však tento faktor vliv na zvýšení či snížení rizika rozvoje nemoci [23]. Jestliže varianta genu zvyšuje riziko nemoci, ale nezavazuje přímo její vznik, mluvíme o genetickém rizikovém faktoru [23]. Identifikace genetických variant může pomoci objevit nejvíce efektivní cestu léčby nemoci nebo předcházet jejímu vzniku u konkrétního jedince.

Existují dva typy Alzheimerovy choroby, které mají genetický předpoklad – s časným nástupem a pozdním nástupem [23].

¹⁶ chemická látka vznikající přirozeně v nervové soustavě, sloužící k přenosu vzruchů

Alzheimerova choroba s časným nástupem

Tento druh choroby postihuje populaci mezi 30. a 60. rokem života a reprezentuje méně než 5 % všech nemocných touto chorobou. Mnoho případů je zaviněno dědičnou změnou v jednom ze tří genů, kdy poté označujeme tento typ choroby s časným nástupem jako FAD – familiární Alzheimerova choroba [23]. V ostatních případech dochází k rozvoji nemoci bez konkrétních známých příčin.

Dítě, jehož matka nebo otec nesou genetickou mutaci pro FAD, má 50% šanci, že tuto mutaci také ponese [23]. Dojde-li k tomuto přenosu mutace na dítě, je u něj vysoká pravděpodobnost rozvoje onemocnění [23].

FAD s časným nástupem je zapříčiněna některou z různých mutací genu na chromosomech 21, 14 a 1 [23]. Tyto mutace zapříčiňují vznik abnormálních proteinů. Mutace na chromosomu 21 způsobují vznik amyloidního prekurzorového proteinu (APP), na chromosomu 14 vznik abnormálního presenilinu 1 a mutace na chromosomu 1 vedou ke vzniku presenilinu 2 [23]. Každá z těchto mutací hraje důležitou roli při úbytku APP, proteinu, jehož funkce není zcela známa [23]. Během tohoto procesu se poté vytváří škodlivé formy amyloidových plaků charakteristických pro Alzheimerovu chorobu.

Alzheimerova choroba s pozdním nástupem

Většina nemocných Alzheimerovou chorobou je postižena tímto typem choroby, kdy se objevují příznaky kolem 60. roku života [23]. Příčiny vzniku nemoci nejsou zcela známy, pravděpodobně se jedná o kombinaci více faktorů- genetika, životní prostředí a životní styl.

Zatím nebyl nalezen specifický gen, který by přímo zapříčiňoval vznik pozdní formy nemoci, nicméně jedním z rizikových faktorů je výskyt apolipoprotein E (APOE) genu na chromosomu 19 [23]. Existuje více forem APOE alel:

APOE ε2: Poměrně vzácná forma alely, která může poskytovat určitou ochranu proti onemocnění. Jestliže se Alzheimerova choroba vyskytne u osoby s touto formou alely, obvykle dojde k rozvoji nemoci během života později než u osoby s formou alely APOE ε4 [23].

APOE ε3: Nejběžnější forma alely, má neutrální roli co se týče onemocnění - nezvyšuje ani nesnižuje riziko vzniku [23].

APOE ε4: Zvyšuje riziko vzniku onemocnění a je spojená s nástupem nemoci v dřívějším věku. Obvykle má člověk jednu, dvě nebo žádnou APOE ε4 alelu. Jestliže jich má více, zvyšuje se riziko rozvoje nemoci [23]. Zdědí-li dítě tuto formu

alely, nemusí to znamenat, že dojde v každém případě k rozvoji choroby. Mnoho lidí s touto formou alely nikdy chorobou neonemocní a naopak spousta lidí s Alzheimerovou chorobou nemá variantu alely APOE ε4 [23].

S použitím relativně nového přístupu studie genomu vědci identifikují mnoho oblastí zájmu genomu, které by mohly v různé míře zvyšovat riziko propuknutí nemoci s pozdním nástupem.

Pomocí jiných metod, jako je sekvenování celého genomu nebo sekvenování celého exomu¹⁷, můžou vědci identifikovat nové geny, které mohou přispět k ochraně před rizikem výskytu onemocnění [23].

Genetické testování

Krevní testy mohou identifikovat, které APOE alely člověk má, ale tyto výsledky nemohou předpovědět, zda se nemoc bude nebo nebude rozvíjet. Je bohužel velmi nepravděpodobné, že by toto testování někdy mohlo se 100% přesností předpovědět vznik nemoci, protože její rozvoj a progres je ovlivněna velkým množstvím jiných faktorů [24].

2.4 Diagnostika

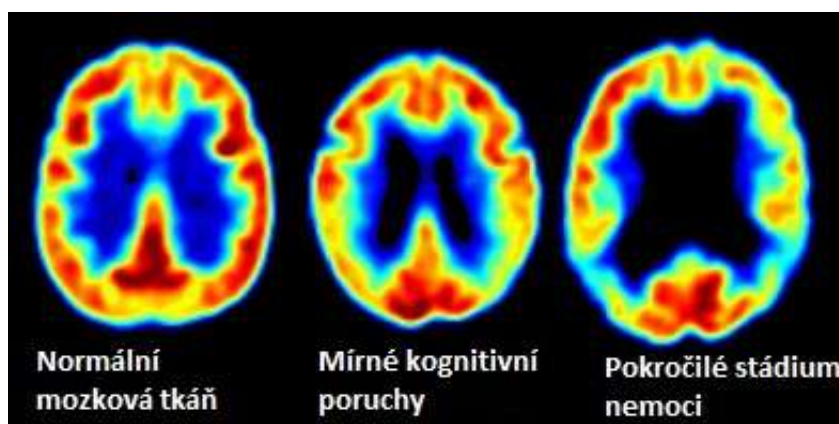
První příznaky choroby jsou rozpoznány pacientem samým nebo lidmi v jeho okolí. Dojde-li však k těmto projevům, je již mozek do určité míry poškozen. Proto nastupuje odborná diagnostika choroby, která potvrdí přítomnost choroby, odhalí stádium nemoci a nasadí léčbu prodlužující kvalitu života nemocného [33].

Jedním ze způsobů diagnostiky Alzheimerovy choroby jsou neuropsychologické testy. Podstatou testů jsou otázky a úkoly různého charakteru (zaměřeny na orientaci, zapamatování informací, opakování vět, psaní, čtení či počítání), které mají daný skórovací systém a dle výsledné hodnoty celého testu je potvrzena či vyloučena přítomnost Alzheimerovy choroby případně stádium nemoci [34].

Mezi další metody patří strukturální vyšetření mozku pomocí počítačové tomografie (CT) a magnetické rezonance (MRI). Tyto zobrazovací metody prokážou vznik mozkové atrofie a naopak vyloučí jiné příčiny vzniku demence, například existenci nádoru [34]. Funkční poruchy mozku hodnotíme pomocí metody SPECT

¹⁷ část genomu tvořená exony, které vytváří mRNA po vystřížení intronů

(jednofotonová emisní počítačová tomografie) nebo PET (pozitronová emisní tomografie) (Obr. 5).



Obr. 5: Zobrazení míry poškození mozku pozitronovou emisní tomografií (PET)
- převzato a upraveno z [49]

K mapování metabolických markerů je využíváno vyšetření mozkomíšního moku [34]. Ukládá-li se beta amyloid v mozkové tkáni, vylučuje se do mozkomíšního moku v menším množství, což je klíčová informace pro toto vyšetření [34].

EEG patří mezi neinvazivní diagnostické metody, které slouží k záznamu elektrické aktivity mozku. Při vyšetřování pacienta s Alzheimerovou chorobou lze zaznamenat zpomalení základního rytmu do pásma delta (bdělost, ospalost) až theta (bdělost, vzrušení) aktivity [27][34].

2.5 Léčba

Kognitiva

Nejvíce používané léky k terapii Alzheimerovy choroby patří do skupiny kognitiv. Jejich účinkem je zejména zlepšení paměťových schopností a pozornosti [1].

Osvědčily se léky posilující transmitterské funkce acetylcholinu inhibicí jeho enzymu biodegradace acetylcholinesterázy (AChE) [1]. Dříve byl využíván *physostigmin* a *tacriny*, měly však vážné nežádoucí účinky – působily hepatotoxicky. Nyní probíhá léčba pomocí *donepezilu* a *rivastigminu*, u kterých se také vyskytují nežádoucí účinky, ne však závažného charakteru (nauzea, průjemy) [1]. Posledním léčivem často využívaným k léčbě Alzheimerovy choroby ze skupiny kognitiv je *galantamin* [1].

Antipsychotika

Antipsychotika patří k hlavní skupině léků, které jsou užívány k potlačení nevhodného chování alzheimerovských pacientů. Hojně jsou používány například léky *olanzapin* a *risperidon*.

Ostatní léčiva

K ovlivnění neurodegenerativních procesů na různých úrovních se využívají neurotrofní růstové faktory [1]. Pro inhibování tvorby a ukládání beta amyloidu lze využít nesteroidní antiflogistika (aspirin, ibuprofen) [1]. Excitotoxicitu potlačují inhibitory vápníkových kanálů či antioxidantia (např. vitamin C) [1]. Při léčbě středně závažné až závažné Alzheimerovy demence bývá aplikován *memantin* [1].

3 LÉČIVA ALZHEIMEROVY CHOROBY

Tato kapitola je věnována vybraným léčivům Alzheimerovy choroby a také stručné charakteristice databází, které byly pro charakteristiku těchto léčiv využity.

3.1 Databáze léčiv

K nalezení informací o vybraných léčivech, používaných k léčbě Alzheimerovy choroby, bylo využito několik databází léků.

Pharm GKB

The Pharmacogenomics Knowledgebase je farmakogenomická a farmakogenetická databáze, která podporuje oblast farmakogenomiky spojováním, seskupováním a objasněním údajů o genotypch a fenotypch, drahách a farmakogenech [16].

Slouží jako zdroj informací výsledků projektů týkajících se haplotypového mapování lidského genomu [16]. Lze předpokládat, že zde bude možné postupem času vyhledat kompletní genomické informace pacienta pro předpověď nežádoucích farmakogenetických a nutrigenetických interakcí [16].

European Medicines Agency

Evropská agentura pro léčivé přípravky (EMA) je agentura Evropské unie se sídlem v Londýně. Agentura odpovídá za vědecké hodnocení a sledování bezpečnosti léčivých prostředků vyvinutých farmaceutickými společnostmi pro použití v EU [17]. Má vlastní právní subjektivitu, dodržuje provozní zásady a pravidla, které byly přijaty její správní radou a je částečně financována z Evropské unie [17].

Binding DB

Binding DB je veřejná internetová databáze zaměřující se především na vzájemné působení proteinů, které jsou považovány za léčebný cíl s malými léčivy – jako molekuly [18].

Drug Bank

Databáze Drug Bank slouží jako bioinformatický a chemoinformatický zdroj, který kombinuje podrobná data o léčivech (chemická, farmakologická a farmaceutická) s komplexními informacemi o jejich cílových molekulách (sekvence, struktura a dráhy) [19].

3.2 Seznam a charakteristika vybraných léčiv

Ke srovnání účinků léčby Alzheimerovy choroby je vybráno 6 zástupců, kteří budou v této kapitole blíže charakterizováni.

V *Tab. 4* v příloze je znázorněn přehled lineárních zápisů strukturních vzorců jednotlivých léčiv – InChI Key a SMILES. Zápis SMILES bude využit pro ADMET profiling v praktické části práce, protože je oproti InChI srozumitelnější a lépe čitelný softwary.

V tabulkách pro konkrétní léčiva, které jsou uvedeny v přílohách (*Tab. 5, Tab. 6, Tab. 7, Tab. 8, Tab. 9, Tab. 10*) nalezneme geny, ve kterých se vyskytují SNP ovlivňující léčbu, identifikátory SNP, typy mutací, nukleotidové substituce a následné změny kódovaných aminokyselin. Pro toto zpracování nebyly bohužel dostupné všechny informace.

3.2.1 Donepezil (Aricept®)

Donepezil je inhibitor cholinesterázy předepisován k léčbě mírných, středně pokročilých i pokročilých symptomů nemoci [13]. Jeho hlavním účinkem je prevence před úbytkem acetylcholinu v mozku [13].

Mechanismus účinku spočívá v reverzibilní inhibici acetylcholinesterázy, která zabraňuje hydrolyze acetylcholinu a vede ke zvýšené koncentraci acetylcholinu na cholinergních synapsích [31].

Přibližně 95 % donepezil hydrochloridu se u člověka váže na plazmatické bílkoviny. Donepezil je metabolizován izoenzymy CYP2D6 a CYP3A4. Samotný metabolismus je velmi pomalý [39]. Je vylučován močí v nezměněném stavu.

Mezi časté nežádoucí účinky patří nauzea, zvracení, svalové křeče, únava a úbytek hmotnosti [13]. Léčivo je podáváno ve formě tablet.

Dle klinických studií je prokázáno, že při výskytu rs2177370 v genu CHAT mohou pacienti s genotypem AA a AG mít zvýšenou odpověď na podání donepezilu, zatímco pacienti s genotypem GG mohou mít oproti dvěma předešlým genotypům reakci sniženou [50]. Při výskytu rs3793790 v genu CHAT genotypy AA a AG snižují reakci na léčbu, GG odezvu zvyšuje [50]. V poslední řadě při výskytu rs6494223 v genu CHRNA7 je méně pravděpodobné, že pacienti s genotypem CC a CT reagují na léčbu inhibitory cholinesterázy, oproti genotypu TT, u kterého je vyšší pravděpodobnost reakce [50].

3.2.2 Rivastigmin (Exelon®)

Rivastigmin, patří mezi inhibitory cholinesterázy a je používán k léčbě mírných až středně pokročilých příznaků nemoci. Zabraňuje úbytku acetylcholinu a butyrylcholinu v mozku [13].

Přesné účinky rivastigminu nejsou přesně známy, ale pravděpodobně se reverzibilně váže na cholinesterázu (acetylcholinesterázu a butyrylcholinesterázu) a inaktivuje ji, čímž zabraňuje hydrolyze acetylcholinu a zvyšuje jeho koncentraci na cholinergních synapsích [32].

Rivastigmin podléhá rychlému a rozsáhlému metabolismu především hydrolyzou prostřednictvím cholinesterázy na dekarbamoylovaný metabolit. Na základě důkazů studií se hlavní izoenzymy cytochromu P450 podílejí na metabolismu rivastigminu jen minimálně, může se však objevit inhibice izoenzymu CYP1A2 [32].

Užívá se v kapslích, perorálním roztoku nebo náplastech. Časté nežádoucí účinky jsou zvracení, nauzea, průjem, svalové křeče, ztráta chuti a úbytek hmotnosti [13].

Stejně jako při léčbě donepezilem výskyt rs2177370 v genu CHAT může u pacientů s kombinací alel AA a kombinací alel AG způsobit zvýšenou odpověď na podání rivastigminu, zatímco u pacientů s kombinací GG se může projevit reakce snižená [53]. Při výskytu rs3793790 v genu CHAT alely AA a AG snižují reakci na léčbu, GG odezvu zvyšuje [53]. V poslední řadě při výskytu SNP rs6494223 v genu CHRNA7 je méně pravděpodobné, že pacienti s kombinací alel CC a kombinací alel CT reagují na léčbu inhibitory cholinesterázy, oproti kombinaci alel TT, při které je větší pravděpodobnost reakce [53].

3.2.3 Galantamin (Razadyne®)

Galantamin je využíván k léčbě mírných až středně pokročilých příznaků choroby. Patří mezi inhibitory AChE, spolu s acetylcholinem se snaží získat vazbu s tímto enzymem. Jeho účinnost je tedy závislá na koncentraci acetylcholinu, čím je jeho hodnota vyšší, tím je inhibice AChE nižší [14].

Tento lék je předmětem výzkumu, protože má schopnost modulovat nikotinové receptory a to by mohlo poskytovat terapeutický mechanismus k inhibici acetylcholinesterázy [14]. Při Alzheimerově chorobě dochází k redukci nikotinových receptorů, které jsou obzvlášť důležité pro paměť a učení, proto by byl tento postup velmi přínosný. Mnohé studie se přiklání k faktu, že galantamin má terapeutický účinek

pouze v souvislosti s působením na nikotinové receptory, nikoliv na podpoře inhibice acetylcholinesterázy [14].

Galantamin je metabolizován enzymy cytochromu P450, glukuronidován a v nezměněné podobě vyloučen močí [42]. Zvýšený metabolismus CYP2D6 způsobuje větší O-demethylaci léčiva než metabolismu snížený [42].

Mezi doprovodné negativní příznaky užívání léku patří zvracení, průjem, ztráta chuti a hmotnosti. Většina nežádoucích účinků však nepřetrvává déle než týden [13].

Užívá se v tabletách po 4 mg dvakrát denně, v perorálním roztoku se stejným dávkováním nebo v pilulce s prodlouženým účinkem 1x denně [13].

Ovlivnění léčby výskytem SNP je u galantaminu totožné jako u donepezilu a rivastigminu [51].

3.2.4 Memantin (Namenda®)

Antagonista N-methyl- D-asparatu (NMDA) k léčbě středně pokročilých až pokročilých stádií demence [13]. Brání vzniku toxických efektů ve spojení s nadbytem glutamátu tím, že reguluje jeho aktivaci [13].

Prodloužená zvýšená hladina glutamátu v mozku u pacientů způsobuje zamezení vazby Mg^{2+} iontů na NMDA receptor a umožňuje plynulý příliv Ca^{2+} iontů do buněk, což v konečném důsledku způsobuje degeneraci neuronů [30]. Studie naznačují, že memantin se váže na NMDA receptor lépe než Mg^{2+} ionty a tím účinně blokuje příliv Ca^{2+} iontů přes kanál NMDA, je však potřeba zachovat přechodnou fyziologickou aktivaci kanálů vyššími koncentracemi synapticky uvolněného glutamátu [30].

Enzymy cytochromu P450 nehrají v metabolismu memantinu podstatnou roli. Většina léčiva je vyloučena v nezměněné podobě močí [41].

Může způsobovat závratě, bolesti hlavy, průjem, zácpu nebo zmatenost. Aplikuje se v tabletách nebo perorálním roztoku v množství 5 mg/den nebo v tabletě s postupným uvolňováním s dávkou 7 mg/den [13].

Výskyt rs1523130 v genu NR1I2 u kombinace alel CC zvyšuje clearanci memantinu, naopak kombinace alel CT a TT clearanci snižují [54].

3.2.5 Risperidon (Risperdal®)

Risperidon patří do skupiny serotoninových a dopaminových antagonistů¹⁸ [13]. Má výrazné antipsychotické účinky, proto je často využíván při výskytu bludů a poruch vnímání [12].

Blokáda dopaminergních D2 receptorů v limbickém systému zmírňuje pozitivní příznaky - halucinace, bludy a nevyzpytatelné chování [29]. Blokování serotoninergních receptorů 5-HT₂ v mesokortikálním¹⁹ traktu způsobuje nadbytek dopaminu, což vede ke zvýšení jeho přenosu a odstranění hlavních negativních příznaků [29].

Hlavní metabolickou cestou risperidonu je 9-hydroxylace, která se odehrává především v játrech. Vedlejší cestou je N-dealkylace. Izoenzym CYP2D6 katalyzuje 9-hydroxylaci risperidonu [38]. Dle studií je prokázáno, že na tvorbě 9-OH-risperidonu se podílí rovněž CYP3A4 a to z důvodu změn v koncentraci risperidonu a 9-OH-risperidonu po podání inhibitorů a induktorů CYP3A4. Neinhibuje CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19 ani CYP3A4 [38]. Risperidon a jeho metabolity jsou vylučovány močí.

Denní dávka se pohybuje v rozmezí 1-1,5 mg, je aplikována na noc nebo rozdělena na dvě dávky v průběhu dne [13].

U risperidonu se objevuje 46 klinických záznamů o výskytu SNP, které ovlivňují účinek léčby nejen při léčbě Alzheimerovy choroby, ale také schizofrenii, psychotických poruch či autismu. Například výskyt rs6313 v genu HTR2A způsobuje u pacientů s kombinací alel AA a AG rezistenci na léčbu risperidonem, kombinace GG může snižovat reakci na léčbu, ale neexistuje riziko rezistence vůči léčbě [52].

3.2.6 Olanzapin (Zyprexa®)

Olanzapin patří mezi antipsychotika, používané k potlačení nevhodného chování alzheimerovských pacientů, především k tlumení akutního neklidu [12]. Užívání tohoto přípravku může zvýšit tělesnou hmotnost a glykémii, proto jej není vhodné použít pro pacienty s diabetem [12].

Antipsychotická aktivita olanzapinu je zajištěna pravděpodobně kombinací antagonismu na D2 receptory v mesolimbických drahách a 5HT_{2A} receptory ve frontálním kortexu [28]. Antagonismus na D2 receptory zmírňuje pozitivní symptomy

¹⁸ opačně působící lék, který působí proti jinému léku

¹⁹ dráha z ventrální tegmentální oblasti do frontální kůry

schizofrenie a psychotických poruch, zatímco antagonismus na 5HT2A zmírňuje symptomy negativní [28].

Primární metabolická dráha olanzapinu vede zprostředkováním oxidace přímou glukuronidací²⁰ a cytochromem P450. Studie ukazují, že enzymy CYP1A1 a CYP2D6 jsou právě do této oxidace zapojeny [40]. Zároveň je také zřejmé, že oxidace enzymem CYP2D6 tvoří menší metabolickou cestu, protože clearance olanzapinu není snížena u osob, které trpí deficitem tohoto enzymu [40].

Obvyklá denní dávka je 5,0-7,5 mg, většinou ve dvou podáních [13].

Pro olanzapin existuje 61 klinických záznamů o výskytu SNP, které mohou ovlivnit reakci na podané léčivo při léčbě schizofrenie, Alzheimerově chorobě, autismu či psychotických poruch. Například výskyt rs11960832 v genu SV2C způsobuje pro kombinaci alel CC a kombinaci CT vyšší odezvu na podané léčivo, kombinace alel TT může odezvu snižovat [55]. Rs6277 v genu DRD2 u kombinace alel AA snižuje riziko zvýšení hmotnosti při léčbě olanzapinem, kombinace AC a CC toto riziko zvyšují [55].

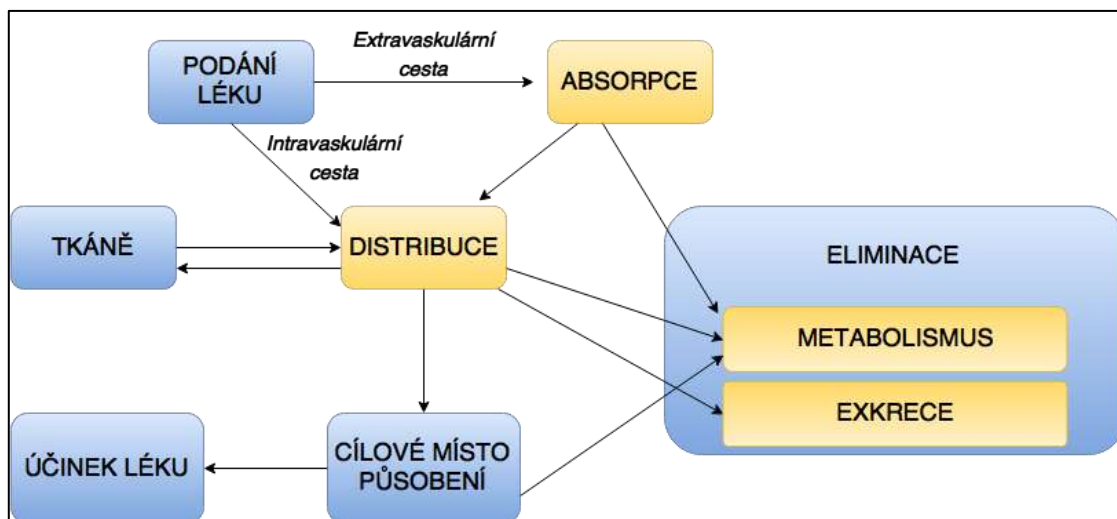
3.3 ADME

Podané léčivo se po aplikaci do organismu účastní základních farmakokinetických procesů, které ovlivňují jeho výsledný biologický účinek. ADME je zkratka pro čtyři z těchto procesů - absorpci, distribuci, metabolismus a exkreci (*Obr. 6*). Děje se prolínají, neprobíhají tedy odděleně. Například při podání léčiva ve formě tablety s nepřetržitým uvolňováním probíhají všechny tyto děje zároveň - zatímco část tablety ještě uvolňuje aktivní látku, již dříve absorbovaná část tablety s aktivní látkou už je eliminována [45].

Všechny tyto procesy ovlivňují hladinu léku v plazmě a tkáních a kinetiku expozice léků do tkání, což ovlivňuje výkon a farmakologickou aktivitu léčiva [20].

Mezi problémy spojené s ADME patří například neúplná absorpce, příliš pomalý nebo naopak rychlý transport léčiva do těla a problémy toxicity [21].

²⁰ konjugace –COOH nebo –OH skupiny s kyselinou glukuronovou



Obr. 6: Pohyb léčiva v organismu po jeho podání – upraveno z [45]

Prvnímu z dějů – absorpci, předchází uvolnění léčiva z lékové formy, bez něhož by nemohlo vykazovat svůj biologický účinek. Po uvolnění této aktivní látky dochází k jejímu rozpouštění v gastrointestinálním traktu [45].

Absorpce

Absorpce zahrnuje procesy, při kterých léčivo vstupuje do krevního a lymfatického řečiště. Dříve, než se dostane léčivo k cílovým buňkám, musí se dostat skrz stěnu trávicího traktu [20]. To probíhá buďto pasivní difúzí, která je nejdůležitějším mechanismem vstřebání většiny léčiv, dále filtrací, která je důležitá pro vstřebání malých molekul, které jsou rozpustné ve vodě v tenkém střevě a v neposlední řadě aktivním transportem, kdy jsou absorbována léčiva podobná látkám, pro které je tento transport fyziologický [45].

Absorpční účinek podaného léčiva může být omezen mnoha faktory, např. chemickou nestálostí v žaludku, neschopností prostoupit střevní stěnou, tokem krve či špatnou rozpustností sloučeniny [20]. Absorpce léčiv probíhá většinou v tenkém střevě, protože jeho plocha je mnohem větší než plocha žaludku.

Distribuce

Dříve, než je léčivo absorbováno, je transportováno krevním oběhem do tkání a orgánů. Distribuce tedy charakterizuje, jak se léčivo pohybuje po těle a jak se přenáší mezi orgány nebo tkáněmi. Může být ovlivněna mnoha faktory, například průtokem krve, polaritou a vazbou na sérové proteiny nebo velikostí molekuly [20]. Problémy při distribuci mohou nastat, jestliže léčivo narazí na některé přirozené překážky, mezi které

patří třeba hematoencefalická bariéra, která umožňuje pouze omezený transport látek mezi mozkovou tkání a krví [20].

Metabolismus

Léčivo začíná být obvykle metabolizováno již při vstupu do těla, protože tělo rozpoznává léky jako cizorodé látky [20].

Je-li lék přijat do těla orálně, začnou jej enzymy v gastrointestinálním traktu metabolizovat [20]. Velká část metabolismu probíhá v játrech, kam postupuje léčivo ihned po absorpci z gastrointestinálního traktu. Hodně léčiv představuje kromě substrátů také induktory či inhibitory jaterních enzymů. Inhibice a indukce aktivity těchto enzymů může ovlivňovat rychlost eliminace léčiv a výsledný biologický efekt terapie [45]. Může dojít ke snížení účinku podaného léčiva, k jeho zvýšení, projevům vedlejších účinků nebo až k toxickému působení. Inhibitory zvyšují koncentraci a prodlužují účinek léčiv, induktory zvyšují metabolismus aktivních léčiv a ve svém důsledku zkracují a snižují účinek [45].

Metabolismus má obecně dvě fáze, v první fázi, tzv. nesyntetické, dochází k oxidaci, redukci a hydrolýze [25]. V druhé části metabolismu, tzv. syntetické, dochází ke konjugaci [25].

Exkrece

Vylučování léčiva probíhá převážně pomocí ledvin. Ve funkční jednotce ledvin – nefronu probíhají tři procesy: glomerulární filtrace (filtrace léčiv procházejících do primární moči s molekulovou hmotností menší než 25 000), tubulární filtrace (aktivní transport) a pasivní reabsorpce (difuze lipofilních molekul zpět do krve) [45].

Léky mohou být vylučovány také jinými způsoby, například stolicí, plícemi, potem či slinami [20].

Bere-li se v úvahu také potenciální či skutečná toxicita léčiva, používá se označení **ADMET**.

4 ADMET PROFILING

Tato kapitola bakalářské práce je zaměřena na ADMET profiling vybraného seznamu léčiv a na statistické zpracování získaných dat.

4.1 Postup metody

K předpovědi ADMET vlastností malých molekul na základě dat získaných z grafů (pkCSM) je použit uživatelsky přívětivý webový server poskytován univerzitou v Cambridge [44]. Ten představuje nový přístup k predikci farmakokinetiky a toxikologie, který umožňuje rychlý návrh, vyhodnocení a stanovení priorit sloučenin, čímž lze usnadnit proces vývoje léčiv a minimalizovat rizika jejich použití.

K získání predikovaných hodnot byly použity lineární zápisy strukturních vzorců SMILES z *Tab. 4*, která je uvedena v přílohách. Výpočet probíhá automaticky a skládá se z několika částí (*Obr. 7*). První z nich se odkazuje na molekulární vlastnosti, mezi které patří například molekulární hmotnost, počet otočných vazeb, počet donorových atomů, počet akceptorových atomů, plocha povrchu, toxikoforní²¹ otisk a počet farmakoforních²² atomů [46].

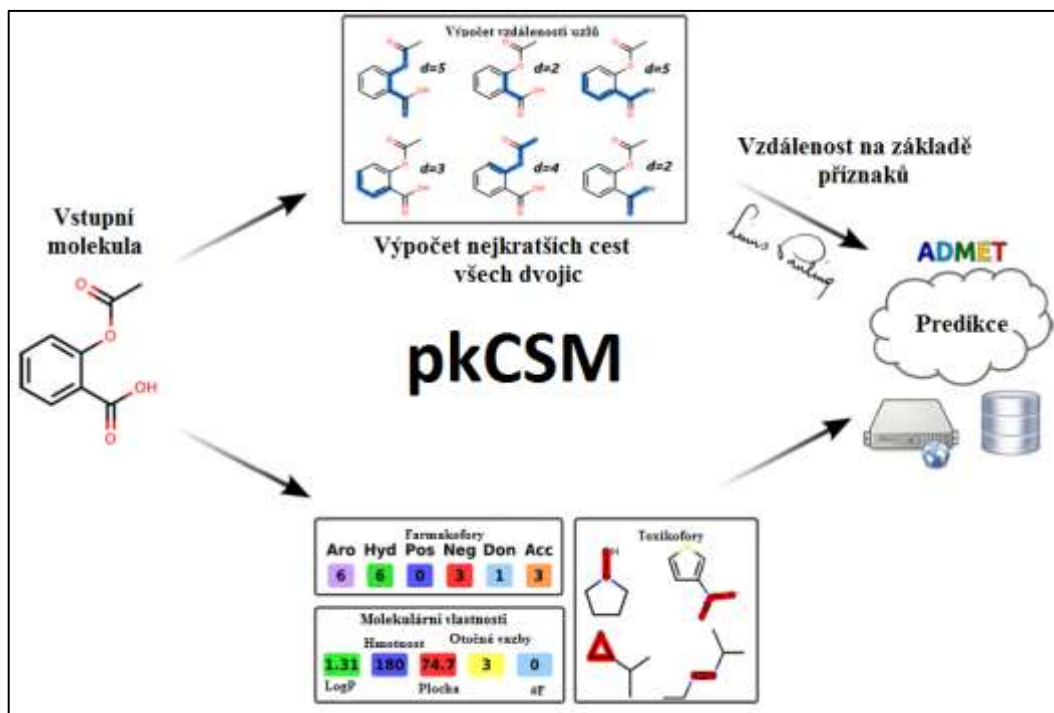
Druhá výpočetní část představuje vzdálenosti vzorů, které jsou reprezentovány jako kumulativní distribuční funkce, kódované v grafu malých molekul založeném na příznacích, které byly uzpůsobeny z Cutoff²³ Scanning matice [46]. Tímto způsobem je označen počet atomů (roztříděných dle farmakoforního typu) v určité vzdálenosti v molekulárním grafu [46]. Vzdálenost mezi dvěma libovolnými uzly v grafu je dána jejich nejkratší cestou, která je vypočítána dle Johnsonova²⁴ algoritmu [46]. Odhad nejkratší cesty je dán součtem vah hran této cesty. Je pravděpodobné, že všechny hrany mají stejnou hmotnost, to znamená, že odhadem nejkratší cesty je počet hran v dané cestě [46].

²¹ odpovědný za toxický účinek

²² atomy s fyzikálně chemickými vlastnostmi, které jsou zodpovědné za schopnost vázat se na biologický cíl (makromolekulu)

²³ strukturální klasifikační metoda, generuje vektory, které reprezentují vzdálenost vzorů mezi proteinovými rezidui

²⁴ algoritmus sloužící k hledání nejkratších cest mezi všemi uzly v ohodnoceném grafu



Obr. 7: Výpočetní algoritmus pkCSM – upraveno z [46]

Pro každé léčivo jsou uvedeny základní chemické informace a poté predikovány hodnoty jednotlivých pochodů při absorpci, distribuci, metabolismu a exkreci. Zahrnutý jsou kromě zmíněných dějů také toxikologické předpovědi. Jednotlivé hodnoty mají dva druhy jednotek – numerické a kategorické. Numerické mají jednotky přesně stanoveny, zatímco kategorické jednotky pouze napovídají, zda daný děj proběhne a jestli je pravděpodobné, že dané léčivo bude substrátem či inhibítorem daného enzymu (ano/ne). Souhrn všech predikovaných hodnot je vložen na CD, v práci budou tyto hodnoty pouze blíže specifikovány a vyhodnoceny.

4.2 Teoretické informace k predikovaným parametrům

Absorpce

- *Rozpustnost ve vodě*

Rozpustnost ve vodě je založena na rozpustnosti sloučenin ve vodě při 25°C. Je podmínkou pro vstřebání léčiva z gastrointestinálního traktu. Nerozpustná léčiva se pomalu a málo vstřebávají. Tento model zahrnuje experimentální měření rozpustnosti ve vodě asi 1708 molekul.

- *Permeabilita Caco-2*

Caco-2 buněčná linie je složena z lidských epiteliálních buněk kolorektálního adenokarcinomu, která byla původně vyvinutá pro výzkum rakoviny.

Tato monovrstva patří mezi populární buněčné modely používané jak pro predikci absorpce léčiv u lidí, tak k identifikaci substrátů či inhibitorů transportérů [44].

- *Intestinální absorpce*

Střevo je za normálních okolností primárním místem pro absorpci perorálně podávaných léčiv. Tato metoda je založena na předpovědi podílu sloučenin, které byly absorbovány v lidském tenkém střevě [44].

- *Propustnost kůže*

Propustnost kůže je důležitým faktorem pro stanovení účinnosti mnoha spotřebních produktů a pro rozvoj transdermálních léčiv. Tento prediktor byl vytvořen s použitím 211 sloučenin, u kterých byla měřena *in vitro* propustnost lidské kůže [44].

- *P-glykoprotein substrát*

P-glykoprotein je ABC transportér, který funguje jako biologická bariéra - vytěšňuje xenobiotika a toxiny ven z buněk. Screening transportu P-glykoproteinu se provádí pomocí transgenních²⁵ knock-out²⁶ myší a *in vitro* buněčných systémů [44]. Tento model byl vytvořen s použitím 332 sloučenin, které byly charakterizovány na základě schopností transportu P-glykoproteinem [44].

- *P-glykoprotein I a II inhibitory*

Modifikace transportu zprostředkovaného P-glykoproteinem má významný farmakokinetický dopad pro substráty P-glykoproteinu, čehož může být využito buď pro specifické terapeutické zvýhodnění nebo ke stanovení kontraindikace [44]. Tyto modely byly vytvořeny s použitím 1273 a 1275 sloučenin, které byly navzájem charakterizovány pro schopnost inhibovat transport P-glykoproteinem I a II [44].

²⁵ laboratorní zvířata chovaná za účelem manipulace s geny

²⁶ zabývající se ztrátou funkce genu, např. načasování na ztrátu funkce v dospělosti

Distribuce

- *Distribuční objem (V_{dss})*

Distribuční objem (V_d) představuje objem, ve kterém je potřeba rozpustit léčivo, aby jeho koncentrace byla stejná jako v krevní plasmě. Čím vyšší je V_d , tím více léčiva je distribuováno ve tkáni oproti plasmě [44]. To může být ovlivněno selháním ledvin nebo dehydratací. Tento model byl vytvořen s použitím vypočítaných rovnovážných distribučních objemů (V_{dss}) u 670 léků. Často se udává relativně vzhledem k hmotnosti pacienta, tedy v l/kg [44].

- *Nevázané frakce*

Většina léků v plasmě existuje buď v nevázaném stavu, nebo vazbou na sérové proteiny. Účinnost daného léku může být ovlivněna tím, do jaké míry se váže na proteiny uvnitř krve, protože čím méně efektivně je vázáno, tím více může procházet buněčnými membránami nebo difuzí [44]. Prediktivní model měřil poměr nevázaných částic u 552 sloučenin v lidské krvi [44].

- *Propustnost hematoencefalické bariéry (BBB)*

Hematoencefalická bariéra chrání mozek před exogenními sloučeninami. Schopnost léčiv přejít do mozku je důležitým parametrem pro zvažování, zda pomáhají snižovat vedlejší účinky a toxicitu nebo zlepšují účinnost léčiv, jejichž farmakologická aktivita je v mozku [44]. Propustnost hematoencefalické bariéry je měřena *in vivo* u zvířecích modelů jako \log_{BB} - logaritmičtý poměr mozku ke koncentraci léčiva v plasmě. Model byl vytvořen pomocí 320 sloučenin, jejichž \log_{BB} bylo experimentálně měřeno [44].

- *CNS permeabilita*

Měření propustnosti hematoencefalické bariéry může být obtížné z důvodu výskytu matoucích faktorů. Stanovení \log_{PS} patří mezi více přesné měření. Získává se z *in situ* perfúze mozku se sloučeninou, která je přímo vstříknuta do krční tepny, to však postrádá systémový distribuční efekt, což může narušit penetraci²⁷ mozkem [44]. Model byl získán měřením \log_{PS} u 153 sloučenin [44].

²⁷ průnik, průchod

Metabolismus

- *CYP2D6/CYP3A4 substrát*

CYP2D6 a CYP3A4 patří mezi hlavní isoformy cytochromu P450, které jsou zodpovědné za lékový metabolismus a mohou dramaticky změnit farmakokinetiku těchto léků [44]. Tyto modely byly vytvořeny s použitím 671 sloučenin, jejichž metabolismus byl měřen každou isoformou cytochromu P450 [44].

- *Inhibitory cytochromu P450*

Cytochrom P450 patří mezi významné detoxikační enzymy v lidském těle, vyskytuje se převážně v játrech. Oxiduje xenobiotika k usnadnění jejich vylučování. Většina léků je cytochromem P450 deaktivována, některé také aktivovány. Inhibitory tohoto enzymu, například grepový džus, mohou ovlivnit metabolismus léků a jsou kontraindikovány, proto je důležité posoudit schopnost sloučenin inhibovat cytochrom P450 [44]. Modely pro různé isoformy byly vytvořeny použitím 1400 až 1800 sloučenin, u kterých byla stanovena schopnost této inhibice [44]. Sloučenina je považována za inhibitor cytochromu P450, jestliže koncentrace potřebná k dosažení 50% inhibice je nižší než 10 uM [44].

Exkrece

- *Celková clearance*

Clearance léčiv je měřena konstantou úměrnosti CL_{tot} , která je tvořena především kombinací jaterní clearance a renální clearance [44]. Je důležitá pro stanovení dávky k dosažení hodnoty ustáleného stavu koncentrací. Prediktor byl vytvořen s použitím dat celkové clearance pro 398 sloučenin [44].

- *OCT2 substrát*

OCT2 je kationtový organický transportér, který je důležitý pro dispozici a renální clearanci léků [44]. Má také význam pro nežádoucí interakce s podávanými OCT2 inhibitory. Posuzování schopnosti kandidátů být transportovány OCT2 poskytuje užitečné informace týkající se nejen jeho clearance, ale také případných kontraindikací [44]. Model použil 906 sloučenin, jejichž transport OCT2 byl zkoumán [44].

Toxicita

- *AMES toxicita*

AMES test je široce používaná metoda k posouzení mutagenity látek pomocí bakterií. Je-li pozitivní, znamená to, že daná sloučenina je mutagenní a může působit jako

karcinogen [44]. Tento prediktivní model byl vytvořen na základě výsledků AMES testů u více než 8000 sloučenin [44].

- *Maximální tolerovaná dávka*

Maximální doporučená dávka (MRTD) udává odhad prahu toxické dávky chemických látek u lidí. Tento model pomůže stanovit maximální doporučenou počáteční dávku pro léčiva ve fázi klinických studií, které jsou v současné době založeny na extrapolaci údajů získaných u zvířat [44]. Model byl vytvořen s použitím 1222 experimentálních dat z lidských klinických studií a predikuje logaritmus MRTD [44].

- *hERG I a II inhibitory*

Inhibice draslíkových kanálů kódovaných hERG (human-ether-a-go-go gene) jsou hlavními příčinami rozvoje syndromu dlouhého QT intervalu, což vede ke vzniku závažných komorových arytmií [44]. Inhibice hERG kanálů je příčinou odebrání mnoha léčiv z farmaceutického trhu. Tento model byl vytvořen na základě informací o inhibici hERG I a II kanálů pro 368 a 806 sloučenin [44].

- *LD50*

LD50 je v toxikologii označení pro množství látky současně podané testovaným jedincům, které způsobí do 24 hodin od podání úhyn 50% živočichů. Stanovení této dávky patří mezi standardní měření akutní toxicity k posouzení relativní toxicity u různých molekul [44].

- *Orální krysí chronická toxicita*

Významným problémem mnoha léčebných strategií je vystavení nízkým a mírným dávkám léčiv po delší dobu. Chronické studie mají za úkol určit nejnižší dávku sloučeniny, u které můžeme pozorovat vedlejší účinky (LOAEL) a nejvyšší dávku, při které žádné vedlejší účinky nejsou pozorovány (NOAEL) [44]. Tento model byl vytvořen s výsledky LOAEL u 455 sloučenin [44].

- *Hepatotoxicita*

Poškození jater vyvolané léčivou je významným bezpečnostním problémem pro vývoj léčiv a také příčinou oslabování léků [44]. Prediktor byl vytvořen na základě vedlejších účinků souvisejících s játry u 531 léčiv [44]. Sloučenina je klasifikována jako hepatotoxická, jestliže vyvolá alespoň jednu patologickou nebo fyziologickou příhodu, která naruší normální funkci jater [44].

- *Senzibilizace kůže*

Senzibilizace kůže je potenciální nepříznivý účinek pro dermálně aplikovaný přípravek [44]. Vyhodnocení, zda sloučenina při setkání s kůží může vyvolat alergickou kontaktní dermatidu, je důležitým bezpečnostním opatřením. Pro tento model bylo použito 254 sloučenin, které byly schopny vyvolat kožní senzibilizaci [44].

- *T. pyriformis toxicita*

Test s použitím *Tetrahymena pyriformis* byl vytvořen za účelem zjištění toxicity různých chemických látek. Stanovuje se koncentrace látky, při které je proliferace *T. pyriformis* omezena na jednu polovinu slepého pokusu [44]. Tato snadná a rychlá metoda byla aplikována na 57 látek [44].

- *Toxicita pro ryby*

Smrtící hodnoty koncentrací (LC50) představují takovou koncentraci molekul, která během sledované doby usmrtí 50 % ryb (pro výzkum byl použit druh jelečků velkohlavý) [44]. Model byl vytvořen na základě měření LC50 u 554 sloučenin [44].

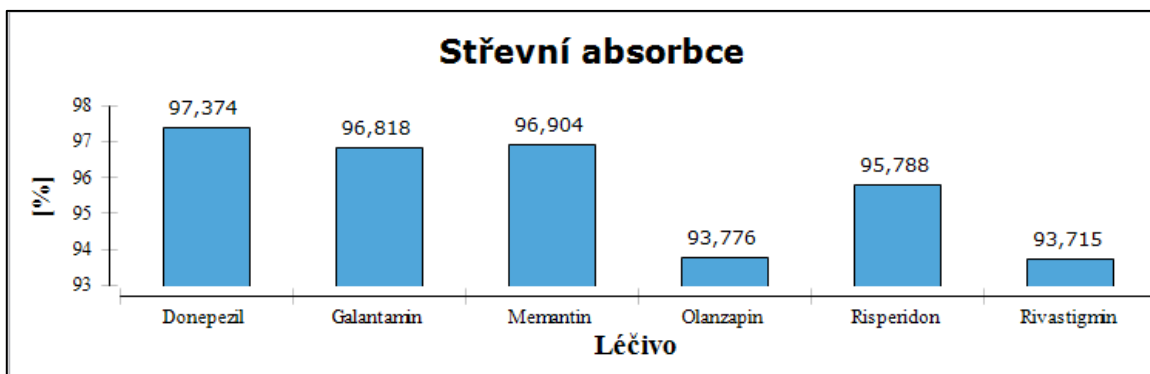
4.3 Statistické zpracování dat ADMET profilingu

V této kapitole budou porovnány a znázorněny některé predikované hodnoty ADMET profilingu mezi jednotlivými léčivy. Ke zpracování dat je použit software KNIME.

Absorbce

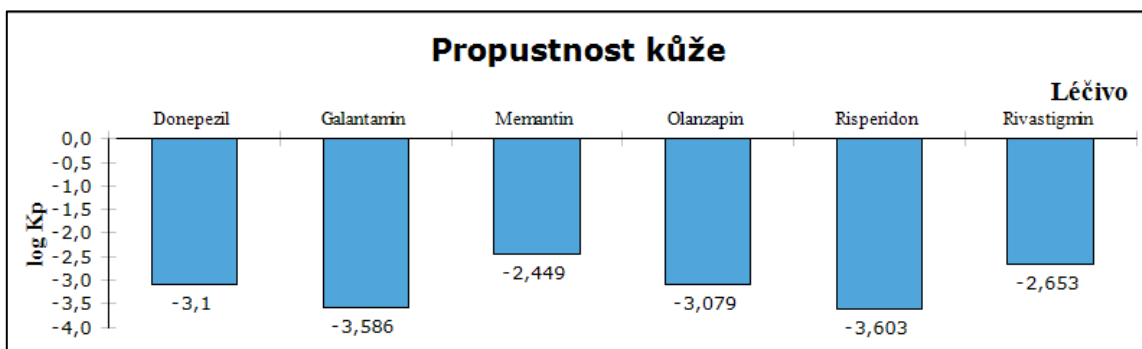
U léčiv donepezil a risperidon je velmi pravděpodobné, že budou substráty P-glykoproteinu, ale také mohou být inhibitory P-glykoproteinu I a II. Rivastigmin, galantamin, memantin a olanzapin mohou být pouze substráty P-glykoproteinu. Nejvyšší rozpustnost ve vodě má rivastigmin, nejnižší donepezil. Všichni zástupci mají vysokou Caco-2 permeabilitu.

Na *Obr. 7* je znázorněno porovnání predikovaných hodnot střevní absorpce jednotlivých léčiv. Tyto hodnoty jsou udávány v procentech a lze vidět, že všechna léčiva mají střevní absorpci vyšší než 90 %, jedná se tedy o sloučeniny, které jsou v těle dobře vstřebatelné. V případě, že by některá ze sloučenin měla střevní absorpci nižší než 30 %, byla by v těle vstřebatelná špatně. Nejvyšší procento střevní absorpce má donepezil s hodnotou 97,374 %, naopak nejnižší hodnotu má rivastigmin s 93,715 %.



Obr. 7: Histogram porovnávající predikované hodnoty střevní absorpce jednotlivých léčiv

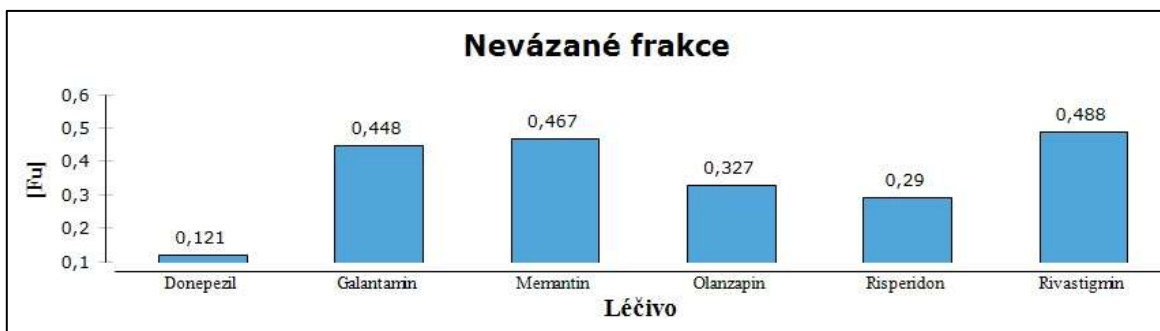
Obr. 8 porovnává hodnoty propustnosti kůže pro daná léčiva. Sloučenina je považována za špatně prostupnou kůží, jestliže má hodnotu $\log K_p$ větší než $-2,5$. Do této kategorie spadá pouze léčivo memantin s hodnotou $-2,449$. Všechna ostatní léčiva jsou kůží dobře propustná.



Obr. 8: Histogram znázorňující míru prostupnosti jednotlivých léčiv kůží

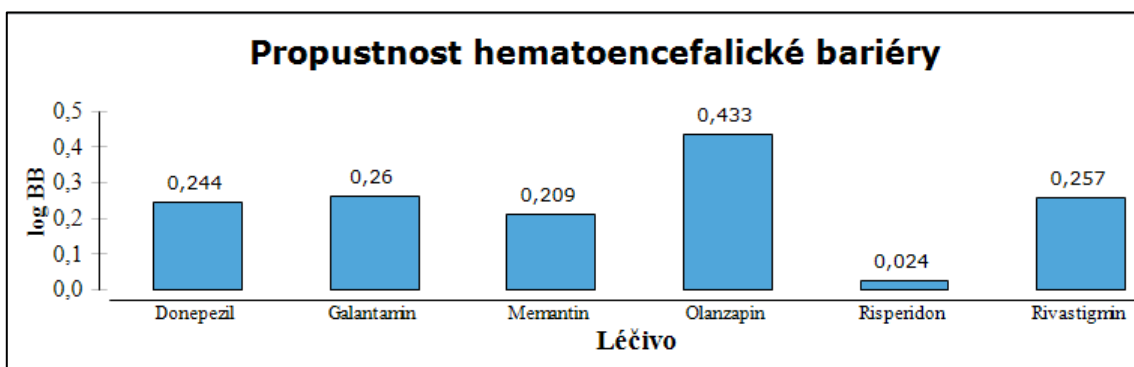
Distribuce

Histogram na Obr. 9 ukazuje, že nejvyšší počet nevázaných frakcí bude mít léčivo rivastigmin s hodnotou $0,488$, dále potom memantin s $0,467$ a galantamin s hodnotou $0,448$. Nižší počet nevázaných frakcí se vyskytuje u léčiv olanzapinu s hodnotou $0,327$ a risperidonu na hodnotě $0,29$, nejnižší počet u donepezilu s hodnotou $0,121$. Čím vyšší počet nevázaných frakcí léčiva se v těle vyskytuje, tím více dochází k jejich průchodu buněčnými membránami a následnému ovlivnění účinnosti léku, protože se dostává rychleji k cílovým orgánům než vazbou na proteiny.



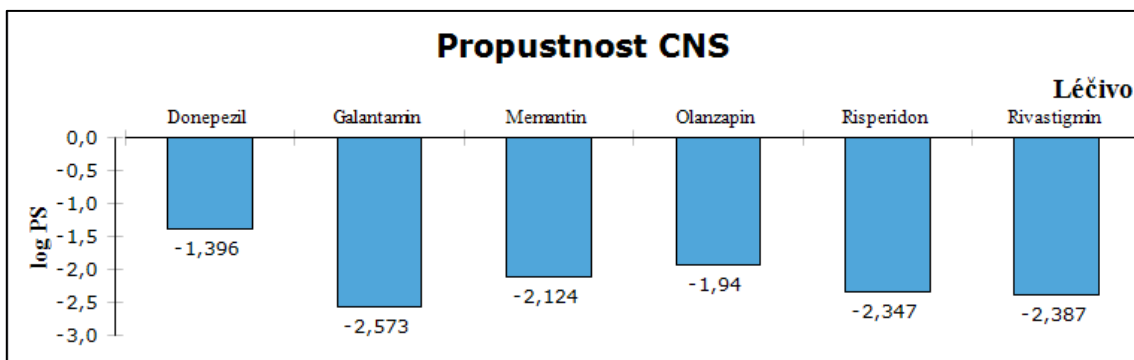
Obr. 9: Histogram porovnávající množství nevázaných frakcí jednotlivých léčiv

Dalším parametrem k porovnání je propustnost hematoencefalické bariéry na Obr. 10. Jestliže je hodnota $\log BB$ větší než 0,3, prostupuje sloučenina touto bariérou velmi snadno. Mezi takové sloučeniny patří pouze olanzapin. Ostatní sloučeniny jsou však v normě prostupnosti. Hraniční je hodnota $\log BB = -1$ a méně, kdy jsou sloučeniny špatně distribuovány do mozku, mezi takové nepatří žádný z vybraných zástupců.



Obr. 10: Histogram porovnávající míru propustnosti hematoencefalické bariéry pro všechny zástupce léčiv

Obr. 11 znázorňuje srovnání prostupnosti léčiv centrální nervovou soustavou (CNS). Sloučeniny, které mají hodnotu $\log PS$ větší než -2, jsou schopny dobře pronikat centrální nervovou soustavou. Mezi takové sloučeniny patří donepezil a olanzapin. Ostatní sloučeniny jsou v rozsahu hodnot mezi -2 a -3, což znamená, že CNS procházet můžou, avšak o něco hůře. Naopak sloučeniny s $\log PS$ menší než -3 nejsou vůbec schopny soustavou procházet, takovou hodnotu však nemá žádná z vybraných sloučenin.



Obr. 11: Histogram porovnávající propustnost CNS pro léčiva

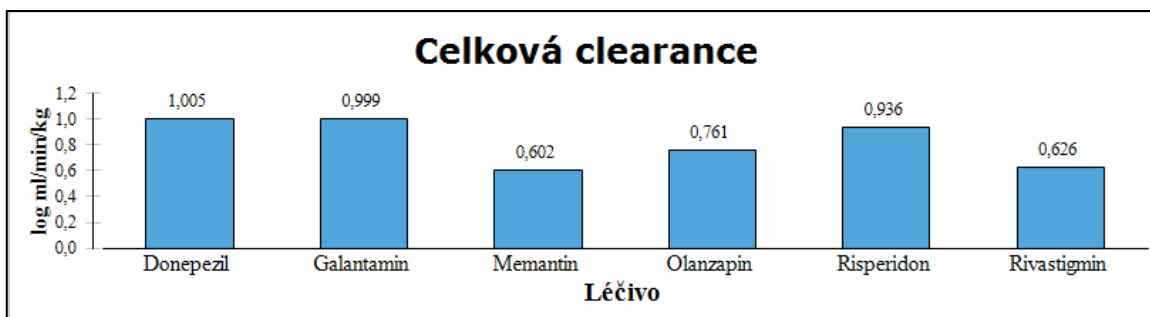
Metabolismus

Donepezil může být substrátem CYP3A4 a také může být inhibítoem CYP1A2, CYP2D6 a CYP3A4. U léčiv rivastigmin a memantin je velmi pravděpodobné, že budou inhibitory CYP1A2. Galantamin a risperidon budou pravděpodobně substráty CYP3A4. Poslední zástupce olanzapin může být substrátem CYP3A4 a také inhibítoem CYP1A2.

Exkrece

U žádného z vybraných léčiv není pravděpodobné, že by bylo substrátem renálního OCT2.

Histogram na *Obr. 12* porovnává celkovou clearanci léčiv. Nejvyšší hodnotu celkové clearance má donepezil, což znamená, že k eliminaci tohoto léčiva dochází nejrychleji, nejnižší clearanci má memantin.



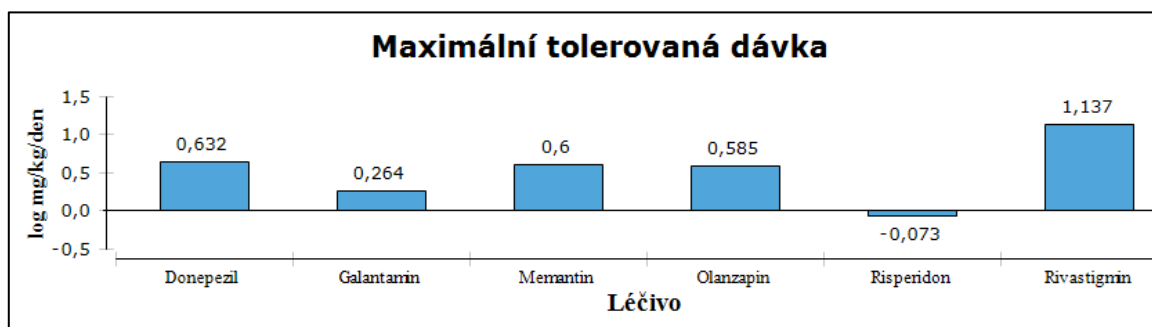
Obr. 12: Histogram porovnávající celkovou clearanci jednotlivých léčiv

Toxicita

Donepezil, galantamin, risperidon a olanzapin mohou být inhibitory hERG II, žádný zástupce pravděpodobně nebude inhibítoem hERG I. AMES toxicita byla prokázána pouze u léčiva olanzapin. Mezi hepatotoxické léčiva můžeme zahrnout donepezil, galantamin, risperidon a olanzapin. Kožní senzibilace se může projevit při podání

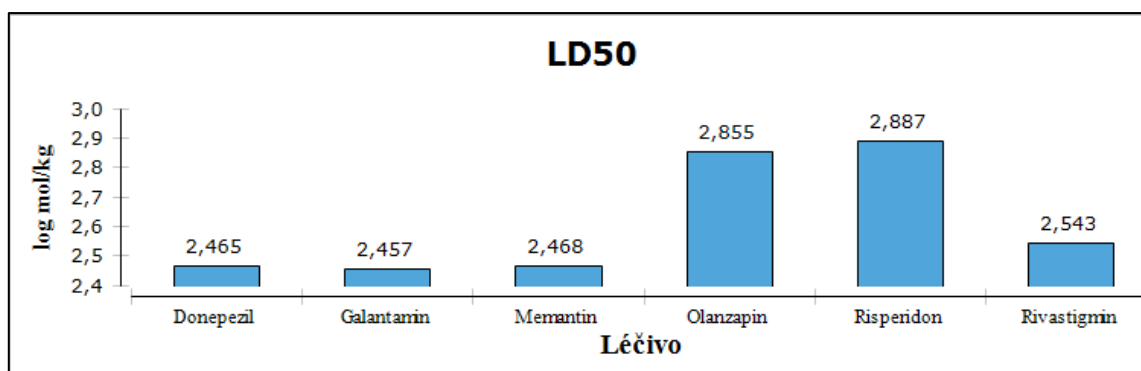
memantinu. Všechna léčiva jsou toxická pro bakterii *T.Pyiformis*, to znamená, že omezí její proliferaci na polovinu slepého pokusu. Nejnižší dávka léčiva, při které můžeme pozorovat vedlejší účinky (LOAEL), byla predikována pro memantin, nejvyšší pro galantamin.

Maximální tolerovaná dávka jednotlivých léčiv je znázorněna na *Obr. 13*. Hodnoty menší nebo rovny 0,477 jsou považovány za nízkou maximální tolerovanou dávku. Galantamin a risperidon mají tedy nízkou hodnotu maximální tolerované dávky. Ostatní léčiva mají vysokou hodnotu maximální tolerované dávky.



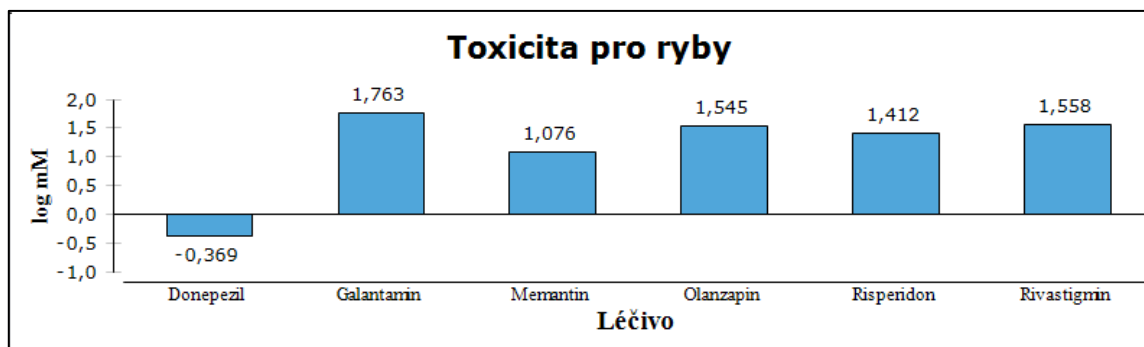
Obr. 13: Histogram znázorňující hodnoty maximální tolerované dávky jednotlivých léčiv

Obr. 14 porovnává hodnoty LD50. Nejvyšší hodnotu, která je potřeba k usmrcení 50% živočichů, má risperidon s hodnotou 2,887, nejnižší hodnotu galantamin – 2,457.



Obr. 14: Histogram porovnávající LD50 všech zástupců léčiv

Dávky léčiv, které usmrtí 50% vybraného druhu ryb, jsou znázorněny na *Obr. 15*. Hodnoty LC50 menší než -0,3 jsou považovány za vysoce toxické. Mezi takové sloučeniny patří donepezil. Ostatní sloučeniny nepatří mezi vysoce toxické.



Obr. 15: Histogram znázorňující hodnoty dávek léčiv, které vykazují toxicitu pro ryby

4.4 Výskyt SNP v jednotlivých genech

V Tab. 2 jsou pro jednotlivé geny zpracovány počty výskytů SNP, u kterých bylo prokázáno, že ovlivňují účinek 6 vybraných zástupců léčiv Alzheimerovy choroby. Tyto údaje jsou porovnány také s tabulkami účinků léčiv pro jednotlivé zástupce (Tab. 5, Tab. 6, Tab. 7, Tab. 8, Tab. 9, Tab. 10).

Nejvíce jednonukleotidových polymorfismů se objevuje v genu CHAT, konkrétně 46 případů. V největší míře jsou tyto mutace dávány do souvislosti s ovlivněním farmakokinetiky léku donepezil a galantamin, u donepezilu tvoří SNP v genu CHAT 53,66% a u galantaminu 70% všech výskytů SNP, dávány do souvislosti s rozdílnými účinky léků. Deset případů jednonukleotidových polymorfismů je zaznamenáno v genech CYP2D6 - všechny u léčiva risperidon a DRD2 - u léčiv risperidon a olanzapin, devět případů v genu ABCB1 u léčiv risperidon, olanzapin a galantamin. SNP v genu CYP3A4 jsou nalezeny v 7 případech, konkrétně u léčiv donepezil, galantamin, risperidon a olanzapin, 6 případů se objevuje v genech SLC1A1 - léčiva risperidon a olanzapin a SLC5A7 - pro léčiva galantamin a donepezil. Jednonukleotidové polymorfismy v genu NR1I2 existují v 5 případech a ovlivňují pouze lék memantin, v genech BCHE a COMT ovlivňují kinetiku donepezilu, rivastigminu, memantinu a risperidonu. Čtyři případy jsou prokázány v genech CNR1, LEP a SV2C, pro léčiva risperidon a olanzapin. Tři případy v genu CHRNA7 u léčiv donepezil, galantamin a rivastigmin, DRD3 u olanzapinu a risperidonu, FTO u risperidonu, HTR2C u olanzapinu, PRKCE u donepezilu, galantaminu a rivastigminu a RGS4 u risperidonu. V ostatních genech se objevují SNP pouze v jednom nebo dvou případech, například SNP v genu CYP1A2 u léčiva olanzapin.

Tab. 2: Geny s výskytem jednonukleotidových polymorfismů ovlivňujících účinek vybraných léčiv (souhrn pro všechna léčiva)

Gen	Počet SNP	Gen	Počet SNP	Gen	Počet SNP
CHAT	46	PRKCE	3	AKT1	1
CYP2D6	10	RGS4	3	ANK1	1
DRD2	10	ACHE	2	ANKK1	1
ABCB1	9	BDNF	2	CYP3A5	1
CYP3A4	7	CCL2	2	EIF2AK4	1
SLC1A1	6	CYP1A2	2	FMO3	1
SLC5A7	6	FAAH	2	GIPR	1
BCHE	5	GNB3	2	GRIN2B	1
COMT	5	GRM3	2	GSTM3	1
NR1I2	5	HRH3	2	GSTP1	1
CNR1	4	HTR2A	2	NPAS3	1
LEP	4	MC4R	2	PPARG	1
SV2C	4	PLAGL1	2	SLC26A9	1
CHRNA7	3	POR	2	TMEFF2	1
DRD3	3	ADRB2	1	UGT1A4	1
FTO	3	ADRB3	1		
HTR2C	3	AGAP1	1		

4.5 Shrnutí a diskuze výsledků

K porovnání vlastností léčiv, určených k léčbě Alzheimerovy choroby, byly použity léky donepezil, rivastigmin a galantamin ze skupiny kognitiv, olanzapin a risperidon ze skupiny antipsychotik a jako poslední lék memantin, který se osvědčil při léčbě závažných forem demencí.

Při ADMET profilingu byly predikovány hodnoty, pomocí kterých byly porovnávány vlastnosti a účinky léčiv při absorpci, distribuci, metabolismu a exkreci, tedy pochodu, které nastávají po podání léčiva do organismu. U léčiv byly hodnoceny taky jejich toxické vlastnosti. Predikce ADMET vlastností léčiv umožňuje vyloučit rizika farmakoterapie a předchází komplikacím s užívanou medikací.

Bylo zjištěno, že střevní absorpce pro všechna léčiva je vyšší než 90%, jedná se tedy o sloučeniny v těle dobře vstřebatelné, nejvyšší hodnotu má donepezil, který je však nejhůře rozpustný ve vodě. Všechna léčiva s výjimkou memantinu jsou také dobře prostupná kůží a mají vysokou Caco-2 permeabilitu.

Při distribuci bylo prokázáno, že nejvyšší počet nevázaných frakcí má léčivo rivastigmin, což znamená, že rychleji prostupuje buněčnými membránami, což může

ovlivnit jeho účinek (rychleji se dostává k cílovým orgánům). Jako lék nejlépe prostupný hematoencefalickou bariérou byl vyhodnocen olanzapin, nejlépe se tedy distribuuje mezi mozkovou tkání a krví. Olanzapin spolu s donepezilem patří také mezi léčiva nejlépe prostupné CNS.

Pro metabolismus bylo predikováno, že donepezil může být substrátem CYP3A4 a také může být inhibítorem CYP1A2, CYP2D6 a CYP3A4. U léčiv rivastigmin a memantin je velmi pravděpodobné, že budou inhibitory CYP1A2. Galantamin a risperidon budou pravděpodobně substráty CYP3A4. Poslední zástupce olanzapin může být substrátem CYP3A4 a také inhibítorem CYP1A2. Při inhibici enzymů cytochromu P450 se zpomaluje metabolismus a může dojít k předávkování léčivem.

Nejvyšší celkovou clearanci má léčivo donepezil, což znamená, že je v těle nejrychleji eliminováno. Nejpomaleji je eliminován lék memantin.

Mezi hepatotoxická léčiva, která mohou vyvolat změnu, jež naruší normální funkci jater, můžeme zahrnout donepezil, galantamin, risperidon a olanzapin. Kožní senzibilace a dráždivost se může projevit při podání memantinu. Ames toxicitu vykazuje pouze léčivo olanzapin. Nejnižší hodnoty maximální tolerované dávky jsou stanoveny pro léčiva galantamin a risperidon. Nejvyšší hodnotu LD50 má léčivo risperidon, je tedy zapotřebí nejvyšší dávka, aby došlo k usmrcení 50% živočichů. Při predikování hodnot LC50 bylo zjištěno, že lék donepezil patří mezi vysoce toxické.

Dle predikovaných ADMET vlastností může být nevýhodné k léčbě Alzheimerovy choroby použít léčivo memantin, protože je špatně prostupné kůží, může vyvolat kožní senzibilaci a dráždivost a také je v organismu nejpomaleji eliminováno. Špatné vlastnosti vykazuje také léčivo donepezil, které je z hlediska LC50 vysoce toxické a také je u něj pravděpodobné způsobení hepatotoxického poškození. Hepatotoxicitu může způsobit také užívání léků galantamin, risperidon a olanzapin. S těmito komplikacemi je třeba počítat a sledovat případné jaterní poškození jak v průběhu léčby, tak také po jejím ukončení. Nejvyšší počet nevázaných frakcí byl predikován pro risperidon, proto u něj lze předpokládat ovlivnění účinku léčby, protože bude rychleji distribuován. Naopak výhodně může být k léčbě choroby použití rivastigminu.

Z hlediska ovlivnění účinku léku výskytem SNP v genu se jeví jako nejvýhodnější použití léku memantin, u kterého se objevují jednonukleotidové polymorfismy pouze ve dvou genech - BCHE a NR1I2, pro každý gen jen jeden případ. Naopak nevýhodné může být k léčbě Alzheimerovy choroby použití léku donepezil a

galantamin, protože v genu CHAT se vyskytuje u donepezilu hned 22 a u galantaminu 21 jednonukleotidových polymorfismů, které mohou ovlivnit jejich léčebný účinek. Dle klinických anotací má nejvíce záznamů ovlivnění účinku léčby výskytem jednonukleotidových polymorfismů lék olanzapin (61 záznamů) a lék risperidon (46 záznamů), proto by mohlo být použití těchto léčiv bez znalosti genotypu jedince rizikové.

ZÁVĚR

Cílem bakalářské práce bylo seznámit se s podstatou vědního oboru farmakogenomika, s jednonukleotidovými polymorfismy a metodami jejich mapování, charakterizovat Alzheimerovu chorobu a popsat účinky léčiv používaných k léčbě této choroby, provést ADMET profiling těchto léčiv a data statisticky zpracovat a vyhodnotit.

Byl charakterizován vědní obor farmakogenomika, popsány výhody a nevýhody tohoto oboru a vliv na farmakokinetiku. Jako základní metody pro mapování SNP byly popsány metody PCR, PCR-RFLP, sekvenování a DNA čipy.

Ke srovnání účinků léčiv Alzheimerovy choroby bylo vybráno šest zástupců – rivastigmin, donepezil, memantin, galantamin, risperidon a olanzapin. Tato léčiva byla obecně charakterizována, byly popsány jejich metabolické účinky, dávkování, uvedeny příklady genů s mutacemi, které jsou příčinou rozdílné odpovědi organismu na podané léčivo u různých pacientů i nežádoucí účinky užívání.

V praktické části bakalářské práce byl proveden ADMET profiling vybraných zástupců léčiv Alzheimerovy choroby. Byly zpracovány predikované hodnoty, které hrají důležitou roli při výběru vhodné farmakoterapie.

Všech 6 vybraných zástupců patří k častým medikamentům k léčbě Alzheimerovy choroby. Nelze přesně určit, která léčiva jsou k léčbě choroby nejvýhodnější, protože zde hraje roli mnoho různých faktorů. Dle predikovaných ADMET hodnot by byla pravděpodobně nejvýhodnější léčba rivastigminem. Nejvíce případů ovlivnění léčby výskytem jednonukleotidových polymorfismů se vyskytuje u léčiv olanzapin a risperidon, proto by mohlo být jejich použití nejméně výhodné a rizikové.

Pro zpracování a vyhodnocení dat byl použit software KNIME s uživatelsky příjemným grafickým rozhraním, jehož předností je možnost propojení s jinými jazyky a programy (Matlab, R) a také možnosti rozšíření v různých oblastech (chemoinformatika, bioinformatika, biochemie). Vytvořené workflow by mohlo být přínosné také pro další uživatele s potřebou statistického vyhodnocení dat.

LITERATURA

- [1] LINCOVÁ, Dagmar a Hassan FARGHALI. *Základní a aplikovaná farmakologie*. 2., dopl. a přeprac. vyd. Praha: Galén, 2007, xxiv, 672 s. ISBN 9788072623730.7
- [2] BENEŠ, Luděk a Oldřich FARSA. *Farmaceutická chemie: (Farmakochemie) : úvod do studia chemických léčiv*. Vyd. 1. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita, 2005, 107 s. ISBN 80-7305-516-3.
- [3] Individualizace farmakoterapie. *Základy farmakogenomiky* [online]. <http://farmakogenomika.cz/> [cit. 2015-12-02].
- [4] Charakteristika farmakogenomiky, farmakogenetiky a jejich teoretická východiska. *Základy farmakogenomiky* [online]. <http://farmakogenomika.cz/> [cit. 2015-12-02].
- [5] ŠMARDA, Jan. *Metody molekulární biologie*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2005, 188 s. ISBN 9788021038417.
- [6] DNA čipy (microarrays) a jejich využití v onkologické diagnostice. *Linkos: Česká onkologická společnost České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně* [online]. [cit. 2015-12-02]. Dostupné z: <http://www.linkos.cz/po-kongresu/databaze-tuzemskych-onkologickych-konferencnich-abstrakt/abstrakta/cislo/19/>
- [7] Technologie DNA čipů. *Příroda* [online]. [cit. 2015-12-02]. Dostupné z: <http://www.priroda.cz/clanky.php?detail=1090>
- [8] Jednonukleotidové polymorfismy. *SZÚ: Státní zdravotní ústav* [online]. [cit. 2015-11-30]. Dostupné z: <http://www.szu.cz/uploads/documents/CLC/OTLVS/olt/genpolym.html>
- [9] Molekulárně biologická podstata genového polymorfismu. *Základy farmakogenomiky* [online]. [cit. 2015-12-03]. Dostupné z: <http://farmakogenomika.cz/index.php?kapitola=4>
- [10] KURZ, Alexander a Timo GRIMMER. Die medikamentöse Behandlung der Demenz. *Deutsche Alzheimer Gesellschaft* [online]. [cit. 2015-12-03]. Dostupné z: https://www.deutsche-alzheimer.de/fileadmin/alz/pdf/factsheets/FactSheet05_2012_01.pdf
- [11] PROVAZNÍK, Ivo. *Sekvence a databáze: Bioinformatika* [online]. Přednášky. FEKT VUT v Brně, 2014 [cit. 2015-12-21].
- [12] JIRÁK, Roman. Poruchy chování u pacientů s Alzheimerovou chorobou. *Neurologie pro praxi* [online]. 2007 [cit. 2015-12-21]. Dostupné z: <http://www.neurologiepropraxi.cz/pdfs/neu/2007/05/09.pdf>
- [13] Alzheimer's Disease Medications. *National Institute on Aging* [online]. 2015 [cit. 2015-12-21]. Dostupné z: <https://www.nia.nih.gov/alzheimers/publication/alzheimers-disease-medications-fact-sheet>

- [14] PALIČKA, Vladimír a L'ubica CIBIČKOVÁ. *Galantamin v terapii Alzheimerovy demence* [online]. : 1-6 [cit. 2015-12-23]. Dostupné z: http://www.prolekare.cz/pdf?ida=gr_05_02_05.pdf
- [15] Healthy Brain Versus Alzheimer's Brain. *Alzheimer's Association* [online]. [cit. 2015-12-25]. Dostupné z: https://www.alz.org/braintour/healthy_vs_alzheimers.asp
- [16] An Introduction to PharmGKB: A Research Tool for Pharmacogenomics. *National Cancer Institute* [online]. [cit. 2015-12-27]. Dostupné z: <http://pid.nci.nih.gov/PID/2007/070612/full/pid.2007.1.shtml>
- [17] About us. *European Medicines Agency* [online]. [cit. 2015-12-27]. Dostupné z: http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/about_us/general/general_content_000235.jsp&mid=
- [18] The Binding Database. *Binding DB* [online]. [cit. 2015-12-27]. Dostupné z: <https://www.bindingdb.org/bind/info.jsp>
- [19] About DrugBank. *DrugBank* [online]. [cit. 2015-12-27]. Dostupné z: <http://www.drugbank.ca/about>
- [20] What is ADME. *ADME-Pharmacodynamics* [online]. [cit. 2015-12-27]. Dostupné z: <http://www.adme-pharmacodynamics.com/what-is-adme/>
- [21] Prodrugs - an approach to solve problems related to ADME. *Gahlot Institute of Pharmacy* [online]. [cit. 2015-12-27]. Dostupné z: <http://www.slideshare.net/JyotsnaPatil1/prodrugs-an-approach-to-solve-problems-related-to-adme>
- [22] Metodiky stanovení genových polymorfismů. *Základy farmakogenomiky* [online]. [cit. 2015-12-28]. Dostupné z: *Alzheimerova choroba* [online]. In: Alzheimer centrum [cit. 2016-01-04]. Dostupné z: <http://farmakogenomika.cz/index.php?kapitola=9>
- [23] Alzheimer's Disease Medications: Alzheimer's Disease Genetics. *National Institute on Aging* [online]. [cit. 2015-12-28].
- [24] Alzheimer's Disease Medications: Genetic Testing. *National Institute on Aging* [online]. [cit. 2015-12-28]. Dostupné z: <https://www.nia.nih.gov/alzheimers/publication/2012-2013-alzheimers-disease-progress-report/genetics-alzheimers-disease>
- [25] ŠTAUD, František. *Eliminace léčiv* [online]. Univerzita Karlova v Praze: Katedra farmakologie a toxikologie [cit. 2015-12-28]. Dostupné z: <http://www.faf.cuni.cz/~staud/lectures%5Cobecn%C04-metabolismus.pdf>
- [26] Polymorfismus v genech kódujících biotransformační enzymy. In: *Farmakogenomika* [online]. Brno: Farmaceutická fakulta, 2014 [cit. 2015-12-28]. Dostupné z: <http://farmakogenomika.cz/index.php?kapitola=6>
- [27] Elektroencefalografie. *WikiSkripta* [online]. [cit. 2015-12-30]. Dostupné z: <http://www.wikiskripta.eu/index.php/Elektroencefalografie>

- [28] Olanzapine. *DrugBank* [online]. [cit. 2015-12-30]. Dostupé z: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00334>
- [29] Risperidone. *DrugBank* [online]. [cit. 2015-12-30]. Dostupné z: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00734>
- [30] Memantine. *DrugBank* [online]. [cit. 2015-12-30]. Dostupné z: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB01043>
- [31] Donepezil. *DrugBank* [online]. [cit. 2015-12-30]. Dostupné z: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00843>
- [32] Rivastigmine. *DrugBank* [online]. [cit. 2015-12-30]. Dostupné z: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00989>
- [33] *Alzheimerova choroba* [online]. In: Alzheimer centrum [cit. 2016-01-04]. Dostupné z: <http://www.alzheimercentrum.cz/alzheimerovo-onemocneni/alzheimerova-choroba/>
- [34] *Současné možnosti diagnostiky a léčby* [online]. In: Alzheimer nadační fond [cit. 2016-01-04]. Dostupné z: <http://alzheimernf.cz/pro-pecujici-a-pacienty/soucasne-moznosti-diagnostiky-a-lecby/>
- [35] DNA Sequencing Sanger Method. In: *Online simulation and more for nanotechnology* [online]. nanoHUB [cit. 2016-01-04]. Dostupné z: <https://nanohub.org/app/site/resources/2013/05/17816/slides/012.01.jpg>
- [36] *Microarrays* [online]. Palmer-DNA-Technology-Wikis [cit. 2016-01-04]. Dostupné z: <https://palmer-dna-technology-wikis.wikispaces.com/Megan+Goedert+2>
- [37] Polymerase chain reaction. In: *Mikrobiology* [online]. [cit. 2016-01-04]. Dostupné z: <http://www.microbiologyinfo.com/polymerase-chain-reaction-pcr-principle-procedure-types-applications-and-animation/>
- [38] BARTEČEK, Richard, Jan JUŘICA, Tomáš KAŠPÁREK, Eva PINDUROVÁ, Alexandra ŽOURKOVÁ a Jana ZRŮSTOVÁ. Aktivita CYP2D6 u pacientů léčených risperidonem. *Česká a slovenská psychiatrie* [online]. [cit. 2016-01-04]. Dostupné z: <http://www.cspychiatr.cz/detail.php?stat=759>
- [39] *Aricept* [online]. In: . RxList [cit. 2016-01-04]. Dostupné z: <http://www.rxlist.com/aricept-drug/clinical-pharmacology.htm>
- [40] *Zyprexa* [online]. In: . RxList [cit. 2016-01-04]. Dostupné z: <http://www.rxlist.com/zyprexa-drug.htm>
- [41] *Namenda* [online]. In: . RxList [cit. 2016-01-04]. Dostupné z: <http://www.rxlist.com/namenda-drug/clinical-pharmacology.htm>
- [42] *Razadyne* [online]. In: . RxList [cit. 2016-01-04]. Dostupné z: <http://www.rxlist.com/razadyne-er-drug/clinical-pharmacology.htm>
- [43] Donepezil. In: *Státní ústav pro kontrolu léčiv* [online]. [cit. 2016-01-04]. Dostupné z: <http://www.sukl.cz/download/spc/SPC32647.pdf>
- [44] *PkCSM - pharmacokinetics* [online]. University of Cambridge, 2015 [cit. 2016-02-16]. Dostupné z: <http://bleoberis.bioc.cam.ac.uk/pkcsm/>

- [45] Farmakokinetické procesy. *Farmakokinetika pro farmaceuty* [online]. [cit. 2016-03-08]. Dostupné z: <http://www.farmakokinetika.wz.cz/>
- [46] PIRES, Douglas E. V., Tom L. BLUNDELL a David B. ASCHER. PkCSM: Predicting Small-Molecule Pharmacokinetic and Toxicity Properties Using Graph-Based Signatures. *Journal of Medicinal Chemistry* [online]. 2015 [cit. 2016-03-15]. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/acs.jmedchem.5b00104>
- [47] Clustered RefSNPs (rs) and Other Data Computed in House. In: *SNP FAQ Archive* [online]. NCBI [cit. 2016-05-17]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK44417/>
- [48] Db SNP. *National Center for Biotechnology Information* [online]. [cit. 2015-12-30]. Dostupné z: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=4340
- [49] Researchers find early markers of Alzheimer's disease. *UC Berkeley News* [online]. [cit. 2015-12-30]. Dostupné z: <http://phys.org/news/2009-07-early-markers-alzheimer-disease.html>
- [50] *Clinical Annotations: Donepezil* [online]. PharmGKB [cit. 2016-05-23]. Dostupné z: <https://www.pharmgkb.org/chemical/PA449394?previousQuery=donepezil#tabview=tab0&subtab=33>
- [51] *Clinical Annotations: Galantamin* [online]. PharmGKB [cit. 2016-05-23]. Dostupné z: <https://www.pharmgkb.org/chemical/PA449726?previousQuery=Galantamin#tabview=tab0&subtab=33>
- [52] *Clinical Annotations: Risperidon* [online]. PharmGKB [cit. 2016-05-23]. Dostupné z: <https://www.pharmgkb.org/chemical/PA451257?previousQuery=risperidon#tabview=tab0&subtab=33>
- [53] *Clinical Annotations: Rivastigmin* [online]. PharmGKB [cit. 2016-05-23]. Dostupné z: <https://www.pharmgkb.org/chemical/PA451262#tabview=tab0&subtab=33>
- [54] *Clinical Annotations: Memantin* [online]. PharmGKB [cit. 2016-05-23]. Dostupné z: <https://www.pharmgkb.org/chemical/PA10364?previousQuery=memantin#tabview=tab0&subtab=33>
- [55] *Clinical Annotations: Olanzapin* [online]. PharmGKB [cit. 2016-05-23]. Dostupné z: <https://www.pharmgkb.org/chemical/PA450688?previousQuery=olanzapin#tabview=tab0&subtab=33>

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ABC	transportní protein (ATP-binding cassette)
ADMET	absorpce, distribuce, metabolismus, exkrece (absorption, distribution, metabolism, excretion, toxicita)
APOE	apolipoprotein E
APP	amyloidní prekursorový protein
BBB	hematoencefalická bariéra (blood-brain barrier)
DNA	deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)
FAD	familiární Alzheimerova choroba (familial Alzheimer's disease)
hERG	lidský gen (the human Ether-à-go-go-Related Gene)
InChI	mezinárodní chemický identifikátor (International Chemical Identifier)
LC50	letální koncentrace (lethal concentration)
LD50	letální dávka (lethal dose)
LOAEL	nejnižší úroveň pozorovaného nepříznivého účinku (lowest-observed-adverse-effect level)
MRTD	maximální doporučená terapeutická dávka (maximum recommended therapeutic dose)
NMDA	N-methyl-D-asparat
PCR	polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction)
pkCSM	predikce farmakokinetických vlastností malých molekul s použitím příznaků grafů (predicting small-molecule pharmacokinetic properties using graph-based signatures)
RFLP	polymorfismus délky restričních fragmentů (Restriction Fragment Length Polymorphism)
SMILES	zjednodušená molekulární specifikace vstupu (Simplified Molecular Input Entry Specification)
SNP	jednonukleotidový polymorfismus (single nucleotide polymorphism)
VDss	distribuční objem v rovnovážném stavu (distribution volume at steady state)

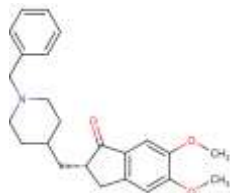
PŘEHLED AMINOKYSELIN

Tab. 3: Přehled základních proteinogenních aminokyselin

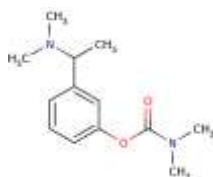
	U		C		A		G	
U	UUU	fenylalanin	UCU	serin	UAU	tyrosin	UGU	cystein
	UUC	fenylalanin	UCC	serin	UAC	tyrosin	UGC	cystein
	UUA	leucin	UCA	serin	UAA	stop	UGA	stop
	UUG	leucin	UCG	serin	UAG	stop	UGG	tryptofan
C	CUU	leucin	CCU	prolin	CAU	histidin	CGU	arginin
	CUC	leucin	CCC	prolin	CAC	histidin	CGC	arginin
	CUA	leucin	CCA	prolin	CAA	glutamin	CGA	arginin
	CUG	leucin	CCG	prolin	CAG	glutamin	CGG	arginin
A	AUU	izoleucin	ACU	threonin	AAU	asparagin	AGU	serin
	AUC	izoleucin	ACC	threonin	AAC	asparagin	AGC	serin
	AUA	izoleucin	ACA	threonin	AAA	lysin	AGA	arginin
	AUG	methionin	ACG	threonin	AAG	lysin	AGG	arginin
G	GUU	valin	GCU	alanin	GAU	kys. asparagová	GGU	glycin
	GUC	valin	GCC	alanin	GAC		GGC	glycin
	GUA	valin	GCA	alanin	GAA	kys. glutamová	GGA	glycin
	GUG	valin	GCG	alanin	GAG		GGG	glycin

CHEMICKÉ STRUKTURY LÉČIV

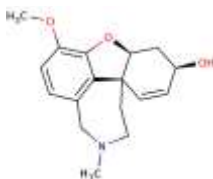
Donepezil



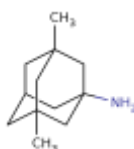
Rivastigmin



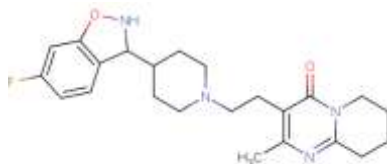
Galantamin



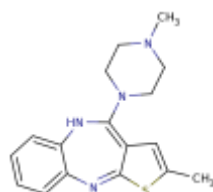
Memantin



Risperidon



Olanzapin



Tab. 4: Přehled lineárních zápisů strukturního vzorce

Donepezil	InChI Key	ADEBPBSSDYVVLD-FQEVSTJZSA-N
	SMILES	<chem>COc1cc2C[C@H](CC3CCN(Cc4ccccc4)CC3)C(=O)c2cc1OC</chem>
Rivastigmin	InChI Key	AIHREYCBCYOMLZ-UHFFFAOYSA-N
	SMILES	<chem>CC(N(C)C)c1cccc(OC(=O)N(C)C)c1</chem>
Galantamin	InChI Key	ASUTZQLVASHGKV-JDFRZJQESA-N
	SMILES	<chem>COc1ccc2CN(C)CC[C@@]34C=C[C@H](O)C[C@@H]3Oc1c24</chem>
Memantin	InChI Key	BUGYDGFZZOZRHP-UHFFFAOYSA-N
	SMILES	<chem>CC12CC3CC(C)(C1)CC(N)(C3)C2</chem>
Risperidon	InChI Key	WDNMHZRFIIOXOD-UHFFFAOYSA-N
	SMILES	<chem>Cc1nc2CCCCn2c(=O)c1CCN1CCC(CC1)C1NOc2cc(F)ccc12</chem>
Olanzapin	InChI Key	WXPNDRBBWZMPQG-UHFFFAOYSA-N
	SMILES	<chem>CN1CCN(CC1)C1=c2cc(C)sc2=Nc2ccccc2N1</chem>

SNP OVLIVŇUJÍCÍ ÚČINEK LÉČIV

Donepezil

Tab. 5: Mutace v genech ovlivňující účinky donepezilu

Gen	Označení SNP	Substituce nukleotidů	Typ mutace	Aminokyselinová translace
ABCB1	rs1045642	A>T	synonymní	Ile1145Ile
POR	rs1057868	C>T	nesynonymní	Ala503Val
CHAT	rs10776586	T>C	intronové	-
CHAT	rs11101187	C>T	intronové	-
CHAT	rs11101192	G>A	intronové	-
CHAT	rs11101193	G>T	intronové	-
ABCB1	rs1128503	A>G	synonymní	Gly412Gly
SLC5A7	rs11685873	G>A	-	-
CHAT	rs12246528	G>A	intronové	-
CHAT	rs12264845	A>C	intronové	-
CHAT	rs12266458	C>T	intronové	-
BCHE	rs1355534	T>C	intronové	-
NR1I2	rs1523130	T>C	5'UTR	-
BCHE	rs1803274	C>T	nesynonymní	Ala567Thr
CHAT	rs1917818	T>G	intronové	-
ABCB1	rs2032582	A>T	nesynonymní	Ser893Ala

Gen	Označení SNP	Substituce nukleotidů	Typ mutace	Aminokyselinová translace
CHAT	rs2177369	G>A	intronové	-
CHAT	rs2177370	A>G	intronové	-
NR1I2	rs2472677	C>T	intronové	-
ACHE	rs2571598	C>T	intronové	-
CYP3A4	rs2740574	C>T	5'flanking	-
CYP3A4	rs35599367	G>A	intronové	-
CHAT	rs3793790	G>A	intronové	-
CHAT	rs3793791	C>T	intronové	-
CHAT	rs3793797	C>T	intronové	-
CHAT	rs3793798	T>A	intronové	-
CHAT	rs3793800	A>G	intronové	-
CHAT	rs3793801	C>T	synonymní	-
CHAT	rs3810950	G>A	nesynonymní	-
CYP3A4	rs4646437	G>A	intronové	-
CHAT	rs4838391	C>T	intronové	-
CHAT	rs4838392	A>G	intronové	-
CHRNA7	rs6494223	C>T	intronové	-
SLC5A7	rs6542746	C>T	-	-
SLC5A7	rs6720783	T>G	-	-
PRKCE	rs6720975	T>C	intronové	-
CHAT	rs7076926	C>T	intronové	-
CHAT	rs7094248	C>G	intronové	-
CHAT	rs7094421	A>G	intronové	-
NR1I2	rs7643645	A>G	intronové	-
CYP3A5	rs776746	T>C	intronové	-
ABCB1	rs1045642	A>G	synonymní	Ile1145Ile

Rivastigmin

Tab. 6: Mutace v genech ovlivňující účinky rivastigminu

Gen	Označení SNP	Substituce nukleotidů	Mutace	Aminokyselinová translace
BCHE	rs1355534	T>C	intronové	-
BCHE	rs1803274	C>T	nesynonymní	Ala567Thr
CHAT	rs2177369	G>A	intronové	-
ACHE	rs2571598	C>T	intronové	-
CHRNA7	rs6494223	C>T	intronové	-
PRKCE	rs6720975	T>C	intronové	-

Galantamin

Tab. 7: Mutace v genech ovlivňující účinky galantaminu

Gen	Označení SNP	Substituce nukleotidů	Mutace	Aminokyselinová translace
ABCB1	rs1045642	A>T A>G	synonymní	Ile1145Ile
POR	rs1057868	C>T	nesynonymní	Ala503Val
CHAT	rs10776586	T>C	intronové	-
CHAT	rs11101187	C>T	intronové	-
CHAT	rs11101192	G>A	intronové	-
CHAT	rs11101193	G>T	intronové	-
SLC5A7	rs11685873	G>A	-	-
CHAT	rs12246528	G>A	intronové	-
CHAT	rs12264845	A>C	intronové	-
CHAT	rs12266458	C>T	intronové	-
CHAT	rs1917818	T>G	intronové	-
ABCB1	rs2032582	A>C A>T	nesynonymní	Ser893Thr Ser893Ala
CHAT	rs2177370	A>G	intronové	-
CYP3A4	rs35599367	G>A	intronové	-
CHAT	rs3793790	G>A	intronové	-
CHAT	rs3793791	C>T	intronové	-
CHAT	rs3793797	C>T	intronové	-
CHAT	rs3793798	T>A	intronové	-
CHAT	rs3793800	A>G	intronové	-
CHAT	rs3793801	C>T	synonymní	-
CHAT	rs3810950	G>A	nesynonymní	-
CYP3A4	rs4646437	G>A	intronové	-
CHAT	rs4838391	C>T	intronové	-
CHAT	rs4838392	A>G	intronové	-
SLC5A7	rs6542746	C>T	-	-
SLC5A7	rs6720783	T>G	-	-
CHRNA7	rs6494223	C>T	intronové	-
PRKCE	rs6720975	T>C	intronové	-
CHAT	rs7076926	C>T	intronové	-
CHAT	rs7094248	C>G	intronové	-
CHAT	rs7094421	A>G	intronové	-

Memantin

Tab. 8: Mutace v genech ovlivňující účinky memantinu

Gen	Označení SNP	Substituce nukleotidů	Mutace	Aminokyselinová translace
NR1I2	rs1523130	T>C	5'UTR	-
BCHE	rs1803274	C>T	nesynonymní	Ala567Thr

Risperidon

Tab. 9: Mutace v genech ovlivňující účinky risperidonu

Gen	Označení SNP	Substituce nukleotidů	Mutace	Aminokyselinová traslace
LEP	rs10244329	A>T	intronové	-
ADRB2	rs1042713	G>A	nesynonymní	Arg16Gly
ABCB1	rs1045642	A>T	synonymní	Ile1145Ile
CNR1	rs1049353	C>T	synonymní	Thr453Thr
SV2C	rs10514062	T>A	-	-
CYP2D6	rs1065852	G>A	5'Flanking	Pro34Ser
RGS4	rs10917670	C>T	-	-
FTO	rs1121980	G>A	intronové	-
ABCB1	rs1128503	A>G	synonymní	Gly412Gly
MC4R	rs11872992	G>A	5'Flanking	-
LEP	rs12706832	A>G	intronové	-
NPAS3	rs1315115	G>A	intronové	-
FTO	rs1421085	T>C	intronové	-
DRD3	rs167771	G>A	intronové	-
CYP2D6	rs16947	G>A	nesynonymní	Arg196Cys
ANK1	rs1800497	G>A	nesynonymní	Glu716Lys
DRD2	rs1801028	G>C	nesynonymní	Ser282Cys
GRIN2B	rs1806201	G>A	synonymní	Thr888Thr
AGAP1	rs1869295	G>C	intronové	-
COMT	rs2020917	C>T	intronové	-
ABCB1	rs2032582	A>T A>C	nesynonymní	Ser893Ala Ser893Thr
LEP	rs2071045	T>C	intronové	-
SLC1A1	rs2228622	G>A	synonymní	Thr138Thr
GRM3	rs2299214	C>T	intronové	-
EIF2AK4	rs2412459	C>T	intronové	-
AKT1	rs2494732	T>C	intronové	-

Gen	Označení SNP	Substituce nukleotidů	Mutace	Aminokyselinová traslace
RGS4	rs2661319	T>C	intronové	-
CYP2D6	rs28371706	G>A G>T	5' doprovodné	Thr107Asn Thr107Ile Thr107His Thr107Gln
CYP2D6	rs28371725	C>T	nesynonymní	Glu242Lys
RGS4	rs2842030	G>T	intronové	-
CCL2	rs2857657	G>C	intronové	-
FAAH	rs324420	C>A	nesynonymní	Pro129Thr
CYP2D6	rs35742686	T>_	posunová	Arg159Gly
TMEFF2	rs3738883	T>G	intronové	-
SLC1A1	rs3780412	T>C	intronové	-
SLC1A1	rs3780413	C>G	intronové	-
HRH3	rs3787430	C>T	synonymní	Pro326Pro
CYP2D6	rs3892097	C>T	akceptor	-
DRD2	rs4436578	C>T	intronové	-
CCL2	rs4586	T>C	synonymní	Cys35Cys
COMT	rs4633	C>T	synonymní	His62His
CYP3A4	rs4646437	G>A	intronové	-
COMT	rs4680	G>A	nesynonymní	Val158Met
CYP2D6	rs5030656	CTT > - CTT > TTC	nesynonymní	-
CYP2D6	rs5030655	A>_	posunová	Val52Gly
GNB3	rs5443	C>T	synonymní	Ser275Ser
CYP2D6	rs59421388	C>T	3'UTR	Val287Thr Val287Met
CYP2D6	rs61736512	C>T	nesynonymní	Arg36His Arg36Ile Arg36Met
BDNF	rs6265	C>T	nesynonymní	Val66Met
DRD3	rs6280	C>T	nesynonymní	Gly9Ser
HTR2A	rs6313	G>A	intronové	Ser34Ser
FTO	rs6499640	G>A	intronové	-
SV2C	rs6882321	A>C	intronové	-
GRM3	rs724226	A>G	intronové	-
NR1I2	rs7643645	A>G	intronové	-
CNR1	rs806377	T>C	intronové	-
CNR1	rs806378	C>T	intronové	-
MC4R	rs8087522	G>A	5' Flanking	-
COMT	rs933271	T>C	intronové	-
COMT	rs9606186	C>G	intronové	-
HRH3	rs3787429	C>T	synonymní	Ser332Ser

Olanzapin

Tab. 10: Mutace v genech ovlivňující účinky olanzapinu

Gen	Označení SNP	Substituce nukleotidů	Mutace	Aminokyselinová translace
GIPR	rs10423928	T>A	intronové	-
ABCB1	rs1045642	A>T A>G	synonymní	Ile1145Ile
CNR1	rs1049353	C>T	synonymní	Thr453Thr
DRD2	rs1079598	A>G	intronové	-
SLC26A9	rs11240594	G>A	intronové	-
DRD2	rs1124493	T>G	intronové	-
SV2C	rs11960832	C>T	intronové	-
HTR2C	rs1414334	C>G	intronové	-
GSTP1	rs1695	A>G	nesynonymní	Ile105Val
GSTM3	rs1799735	C>CCT	intronové	-
ANKK1	rs1800497	G>A	nesynonymní	Glu713Lys
DRD2	rs1801028	G>C	nesynonymní	Ser282Cys
PPARG	rs1801282	C>G	intronové	Pro12Ala
CHAT	rs1880676	G>A	intronové	Asp7Asn
SV2C	rs1995381	A>G	intronové	-
UGT1A4	rs2011425	T>G	intronové	Leu48Val
CYP1A2	rs2069526	T>G	intronové	-
SLC1A1	rs2228622	G>A	synonymní	Thr138Thr
PLAGL1	rs2247408	T>C	intronové	-
FMO3	rs2266780	A>G	nesynonymní	Glu308Gly
DRD2	rs2440390	T>C	intronové	-
HTR2C	rs2497538	A>C	intronové	-
CYP3A4	rs2572023	A>G	nesynonymní	Ile77Thr
DRD2	rs2734841	A>C	intronové	-
FAAH	rs324420	C>A	nesynonymní	Pro129Thr
SLC1A1	rs3780412	T>C	intronové	-
SLC1A1	rs3780413	C>G	intronové	-
CHAT	rs3810950	G>A	nesynonymní	Ala120Thr
PLAGL1	rs3819811	A>G	intronové	-
DRD2	rs4436578	C>T	intronové	-
CYP1A2	rs4646425	C>T	intronové	-
LEP	rs4731426	G>C	intronové	-
ADRB3	rs4994	A>G	nesynonymní	Trp64Arg
GNB3	rs5443	C>T	synonymní	Ser275Ser
BDNF	rs6265	C>T	nesynonymní	Val66Met
DRD2	rs6275	A>G	synonymní	His284His
DRD2	rs6277	G>A	synonymní	Pro290Pro
DRD3	rs6280	C>T	nesynonymní	Gly9Ser
HTR2A	rs6313	G>A	intronové	Ser34Ser
HTR2C	rs6318	C>G	intronové	Cys23Ser

OBSAH CD

- predikované hodnoty ADMET profilingu pro všechna léčiva
- vytvořené workflow v softwaru KNIME
- dokument obsahující popis workflow v softwaru KNIME