

Biologia systemów i analiza sieci jako wsparcie dla poszukiwania nowych strategii farmakoterapii

Mariusz Panczyk¹, Tomasz Komoń²

¹Zakład Dydaktyki i Efektów Kształcenia, Wydział Nauki o Zdrowiu
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego
kierownik zakładu: dr Henryk Rebandel

²Instytut Chemii Przemysłowej
dyrektor instytutu: dr hab. inż. Regina Jezińska, prof. IChP



artykuł do pobrania
www.lekwypolsce.pl

Słowa kluczowe: biologia obliczeniowa, bioinformatyka, projektowanie leku, ocena jakości leku, indywidualizacja terapii.

Streszczenie

Prowadzenie wysoce pragmatycznych badań przy projektowaniu nowych leków musi uwzględniać ogromny postęp, jaki dokonuje się w naukach podstawowych i nowych technologiach, co wymaga wsparcia ze strony biologii komputerowej oraz technik modelowania matematycznego. Jednym z narzędzi bioinformatycznych jest analiza sieci wykorzystywana do badań nad mechanizmami funkcjonowania złożonych systemów biologicznych. Dane z badań molekularnych genomiki, proteomiki czy metabolomiki dostarczają poszczególnych „cegiełek” budujących wewnątrzkomórkową sieć zależności między biomolekułami, a integracja uzyskanych wyników pozwala na stworzenie wielopoziomowego układu stanowiącego system biologiczny komórki. Narzędzia analizy *in silico* mogą być z powodzeniem wykorzystane w badaniach farmakologii systemów, które dostarczają informacji na temat potencjalnych nowych tarcz działania leków i ułatwiają stawianie i weryfikowanie hipotez badawczych do celów eksperymentalnych. Ponadto farmakologia systemów może służyć podnoszeniu skuteczności i bezpieczeństwa obecnie stosowanych leków poprzez poznanie biologicznych przyczyn działań niepożądanych i skutków ubocznych. Nie tylko właściwości samego leku, ale również unikalny zestaw cech pacjenta decyduje w dużej mierze o sukcesie terapeutycznym. Możliwość prowadzenia zindywidualizowanej farmakoterapii jest ważnym elementem nowej strategii leczenia w wielu dziedzinach medycyny. Aby profilowanie pacjenta uwzględniło szeroki zakres zróżnicowanych cech osobniczych, to powinno ono odzwierciedlać złożoność systemu biologicznego, który można badać z użyciem analizy sieci. Niniejszy przegląd omawia, w jaki sposób analizy biologicznych systemów przyczyniają się do lepszego rozumienia mechanizmów farmakodynamiki leków, racjonalnego projektowania i oceny jakości nowych oraz obecnie stosowanych leków, a także do zwiększenia możliwości indywidualizacji terapii.

Key words: computational biology, bioinformatics, drug design, drug evaluation individualized medicine.

Abstract

Leading highly pragmatic research on new drugs design one must take onto account extensive progress of basic science and new technologies, which require support of computational biology and mathematical modelling techniques. One of the bioinformatic tools is network analysis used for research on complex biological systems mechanism. Research data deriving from such fields as molecular genomics, proteomics, and metabolomics creates intracellular relationships network between biomolecules. The integration of obtained results allows creation of multilevel biological cell system. The *in silico* analysis tools can successfully be used in pharmacological research on systems providing information on potential new drug targets and facilitate formulation and verification of research hypothesis for experimental purposes. Moreover, system pharmacology can enhance effectiveness and safety of presently used drugs through recognition of biological causes of adverse and side effects. The success of a therapy depends not only on properties of a particular drug but also on unique combination of patient's characteristics. Possibility of using individualized pharmacotherapy is an important element of new strategy of treatment in many fields of medicine. In order to include wide range of diversified personal characteristics in a patient's profile, the complexity of the biologic system which can be researched using network analysis must be taken onto account. This review presents how biological system analysis contribute to better understanding of drug pharmacodynamics, rational design and evaluation of new and presently used drugs, as well as enhancing capabilities of individualized therapy.

Wprowadzenie

Idea biologii systemów sięga połowy XX w. i wywodzi się z teorii systemów Ludwiga von Bertalanffy'ego [1]. Natomiast pierwsze zastosowania modelowania matematycznego do analizy parametrów związanych z przewodnictwem nerwowym i potencjałem czynnościowym serca [2, 3] miało miejsce na przełomie lat 60. i 70. ubiegłego wieku.

Współcześnie biologia systemów uważana jest za ewolucyjne następstwo osiągnięć ery genomicznej.

W ostatniej dekadzie, wraz z rozwojem biologii molekularnej oraz technik badania genomu, obserwujemy realizację szeregu działań istotnych dla badań systemowych:

- określenie całościowej sekwencji ludzkiego genomu w ramach działalności Human Genome Project, a także zgromadzenie licznych bibliotek danych dotyczących białek i metabolitów
- rozwijanie wysokosprawnych technik analizy zmienności molekularnej (polimorfizm genów i białek)
- rozwój interdyscyplinarnych badań oraz opracowanie komputerowych narzędzi wykorzystywanych w analizie zjawisk biologicznych, co umożliwiło integrację danych w sieci oraz standaryzację w obszarze ontologii (wspólny język i formaty danych)
- Internet staje się głównym źródłem pozyskiwania informacji naukowej, do której jest publiczny dostęp poprzez wyspecjalizowane bazy danych.

Biologia systemów to sposób podejścia analitycznego, w którym bada się wzajemne relacje między składnikami danego systemu w celu zrozumienia jego właściwości i mechanizmów działania [4-6].

Podejście systemowe ma charakter interdyscyplinarny i polega na łączeniu danych uzyskanych różnymi narzędziami:

- dane eksperymentalne (*in vivo*, *ex vivo* i *in vitro*),
- analiza bioinformatyczna,
- testowanie i modelowanie matematyczne (*in silico*).

W założeniu badania systemowe mają mieć charakter holistyczny, a więc powinny angażować kilka poziomów złożoności, które składają się na dany system. Każdy z poziomów może mieć wpływ lub podlegać wpływowi innych poziomów systemu. Uzyskiwane wyniki analizy są poddawane ciągłemu procesowi oceny, przy czym dane pozyskiwane drogą eksperymentów biologicznych prowadzą do zmiany przyjętego wcześniej modelu matematycznego i ponownego zrewidowania oceny otrzymanych wyników. Dzięki takiej iteratywnej cyklicznej analizie można integrować dane w kolejnych cyklach i dokonywać zmian w przyjętym modelu systemu [7].

Wraz z narastającym kryzysem związanym z rozwojem nowych leków, do czego przyczyniają się wzrastające koszty opracowania i wprowadzenia na rynek innowacyjnych preparatów, istnieje duża potrzeba racjonalizacji całego procesu wytaniania obiecujących cząsteczek, które byłyby kandydatami na „prototyp leku”. Podstawowym elementem nowego podejścia w badaniach nad projektowaniem leków powinno być dogłębne zrozumienie podłoża patologicznego danej choroby, tak aby można było w miarę dokładnie ocenić charakterystykę farmakodynamiczną przyszłego leku. Również znajomość wielowariantowości choroby w danej populacji oraz schorzeń współistniejących ma istotne znaczenie dla opracowania założeń dla nowych cząsteczek leków.

Ponieważ ostatecznym celem farmakoterapii jest zmiana funkcjonowania komórki na poziomie jej fizjologii i biochemii lub naprawa niektórych patologicznie zmienionych struktur tkankowych, to pierwsze hipotezy badawcze powinny skupiać się na najniższym poziomie systemu, czyli poziomie molekularnym. Składniki komórki tworzą sieć wzajemnie powiązanych elementów, które tylko w pewnym stopniu stanowią układ izolowany. Zrozumienie, w jaki sposób system komórkowy funkcjonuje w warunkach fizjologicznych (zdrowy), a jak w warunkach patologicznych (chory), będzie punktem wyjścia do określenia potencjalnych celów, na które mogą być nakierowane nowe leki. Ponadto znajomość procesów regulacji i wzajemnych relacji genów i białek to możliwość opracowania markerów prognostycz-

nych i predykcyjnych, mających zastosowanie w epidemiologii oraz diagnostyce i terapii [8-10]. Poniżej zostanie przedstawiona metodologia związana z prowadzeniem badań nad nowymi lekami oraz optymalizacją farmakoterapii z zastosowaniem narzędzi integracji danych w ramach sieci systemu biologicznego.

Znaczenie analizy sieci w interpretacji systemów biologicznych

Analiza sieciowa to badanie wzajemnych oddziaływań i relacji między elementami systemu; przedstawiana jest w formie grafu z wyodrębnieniem obiektów węzłowych. Podstawy tej metody zostały opracowane w poprzedniej dekadzie [11], a ponieważ ma ona charakter uniwersalny, to jest stosowana w wielu dziedzinach [12].

Biologiczne sieci mogą być projektowane na kilka sposobów:

- (a) *de novo*, korzystając bezpośrednio z wyników badań eksperymentalnych (np. celowana delecja genu), szczególnie użyteczne w badaniach strukturalnych;
- (b) z wykorzystaniem znanych interakcji pozytywnych z wielkoskalowych badań genomicznych lub proteomicznych i opracowanych za pomocą narzędzi do analizy szlaków (*Ingenuity Pathways Analysis, MetaCore*); mogą być przydatne do postawienia hipotez weryfikowanych w toku dalszych badań eksperymentalnych;
- (c) tworzenie podzbiorów z elementów sieci *ab initio* do przewidywania zmian dynamicznych w toku prowadzenia badania (np. wpływ stężenia leku na obserwowane parametry), które pozwalają na tworzenie symulacji dla modelu sieci, co może być przydatne w badaniach klinicznych [13].

Wpływ na tworzenie modelu sieci ma zarówno liczba poznanych interakcji (dane ilościowe), ale także charakter wzajemnych relacji (dane jakościowe). Jak wspomniano wcześniej, modelowanie sieci nie jest procesem jednorazowym, ale

ma charakter ciągły, umożliwia stałą rozbudowę i aktualizację zbioru danych o nowe parametry i zmienne. Dlatego też z punktu widzenia rozwoju nauki, analiza systemowa pozwala na doskonalenie modelu i jego ewolucję wraz z poszerzeniem zasobu wiedzy o obserwowanych zjawiskach biologicznych [14].

Interpretacja danych w ramach sieci różni się znacząco od tej, która jest tradycyjnie stosowana w badaniach o charakterze redukcjonistycznym, np. w klasycznej genetyce molekularnej. Mimo że narzędzia stosowane w badaniach genomicznych i proteomicznych pozwalają na zbieranie obszernych danych dotyczących różnic w ekspresji genów i/lub białek, to trudno jest je analizować w odniesieniu do pojedynczych elementów całego zbioru. Priorytetem takich analiz porównawczych jest wyselekcjonowanie genów/białek, których zmiany w poziomach ekspresji są największe, pomija się jednak te elementy systemu, które mogą być istotne dla jego funkcyjono-

Podstawowym elementem nowego podejścia w badaniach nad projektowaniem leków powinno być dogłębne zrozumienie podłoża patologicznego danej choroby, tak aby można było w miarę dokładnie ocenić charakterystykę farmakodynamiczną przyszłego leku.

wania tylko dlatego, że zmiany ich poziomu ekspresji nie są wyraźne. Skojarzenie pojedynczego markera molekularnego z procesem patologicznym nie jest odzwierciedleniem prawdziwego obrazu zmian funkcjonalnych, jakie zachodzą w systemie komórkowym w przebiegu procesu chorobowego. Należy zakładać, że dziesiątki, a nawet setki różnych białek jest zaangażowanych w zmiany, jakie zachodzą w komórce w warunkach zaburzenia jej funkcjonowania. Analiza sieci może dostarczać pewnych rozwiązań do prowadzenia bardziej racjonalnej interpretacji procesów na poziomie molekularnym. Z powodu ograniczonego zakresu dostępnych danych biologicznych nie ma możliwości zastosowania pełnego algorytmu prowadzącego do rozwiązania. Jednak dzięki zastosowaniu komputerowych metod heurystycznych możliwe jest uzyskanie przybliżonego i optymalnego modelu wzajemnych relacji w sieci. W takim podejściu nie koncentrujemy się na pojedynczych elementach systemu, dla których nasz wybór mógłby być subiektywny,

tylko uwzględniamy w modelu wszystkie mierzalne zmiany i interakcje. Pozornie niespecyficzne efekty, nieistotne szlaki czy też cele molekularne mogą okazać się ważne, w miarę jak system będzie doskonalony i modelowany w kolejnych cyklach iteratywnej analizy. Również wstępne hipotezy robocze mogą z czasem ulegać znaczącej ewolucji, a nawet całkowitej zmianie w kierunku założeń alternatywnych. Oczywiście analiza sieci jest w swoich podstawach ograniczona jakością danych wejściowych, ponieważ wnioski końcowe z każdego cyklu analizy iteratywnej są od nich bezpośrednio uzależnione.

Zastosowanie wielopoziomowej integracji systemów opartych na eksploracji danych z badań transkryptomu, proteomu i metabolomu oraz utworzenie jednej sieci umożliwia analizowanie zmian w układzie pod wpływem wybranych bodźców zakłócających stan homeostazy [15]. Ostatnio wykorzystano wielopoziomowe modelowanie systemów sieciowych do badań nad kierowanym rozwojem komórek macierzystych do określonego typu tkanki [16]. Oceniając zmiany epigenetyczne (acetylacja histonów, rekonfiguracja chromatyny) w połączeniu z danymi z profilowania ekspresyjnego na poziomie RNA i białka, wskazano na dynamiczny charakter procesów regulujących przepływ informacji w pętli ...gen – białko – gen – białko... Na podstawie uzyskanych informacji z wielopoziomowej integracji danych systemowych badacze ustalili, że znaczny udział w procesie różnicowania się komórek mają mechanizmy regulujące translacyjne i potranslacyjne modyfikacje białek [16]. Powyższy przykład pokazuje, jak istotne jest wielopoziomowe integrowanie danych przy modelowaniu dynamiki układów w systemie biologicznym.

Poszukiwanie nowych celów terapeutycznych

Globalna analiza sieci powiązań pomiędzy poszczególnymi elementami szlaków biochemicznych na poziomie molekularnym danej komórki okazała się być przydatna w bardziej ukierun-

kowanych analizach dotyczących patofizjologii jej funkcjonowania w chorobie. Ponieważ białka współdziałają ze sobą i uczestniczą we wspólnym procesie biologicznym [17], to mogą również na podobnej zasadzie wchodzić ze sobą w interakcje i być zaangażowane wspólnie w dany proces chorobowy [18, 19]. Powyższe założenia doprowadziły do opracowania kilku narzędzi służących

do typowania genów kandydatów, na podstawie ich względnego położenia w sieci i przewidywanej roli w systemie powiązań.

Uzyskano w ten sposób pulę białek kandydatów topologicznie związanych

z zestawem genów, których funkcjonowanie w jakiś sposób było zaangażowane w proces chorobowy [20-22]. Z farmakologicznego punktu widzenia nie tylko białka mogą być potencjalnym celem działania nowych leków, ale także same geny, które są typowane jako mające wpływ na rozwój i przebieg procesów patologicznych.

Analiza sieciowa została wykorzystana przez kilka zespołów badawczych m.in. do badania procesów chorobowych w przebiegu astmy, schizofrenii, chorób układu krążenia, różnych rodzajów nowotworów oraz chorób zakaźnych [23-31].

Często określenie pierwszej puli kandydatów na cele terapeutyczne pozwala na późniejsze wytypowanie innych molekuł, dzięki pogłębionej analizie sieciowej (analiza węzłów oraz właściwości poszczególnych powiązań w systemie).

Przykładem takiego podejścia badawczego jest analiza metabolitów *Entamoeba histolytica*, pierwotniaka wywołującego amebozę. Badania topologii sieci powiązań metabolitów i zaangażowanych w procesy fizjologiczne enzymów pozwoliły na wskazanie potencjalnych celów terapeutycznych [32]. Oczywiście bez danych kinetycznych dotyczących inhibicji wytypowanych enzymów nie można dokładnie określić, czy wystarczająco można hamować te enzymy tak, aby spowodować śmierć pierwotniaka, np. w wyniku akumulacji toksycznych metabolitów w komórce. Jednakże taka analiza *in silico* daje konkretne hipotezy badawcze dla eksperymen-

Analiza sieciowa to badanie wzajemnych oddziaływań i relacji między elementami systemu; przedstawiana jest w formie grafu z wyodrębnieniem obiektów węzłowych.

tów laboratoryjnych. Obecnie dostępnych jest kilka narzędzi analitycznych mających zastosowanie w identyfikacji punktów uchwytu dla nowych leków z użyciem sieci metabolicznych. Narzędzia te opierają się na algorytmie identyfikującym zestaw enzymów, których zablokowanie hamuje syntezę wybranych, krytycznych dla fizjologii organizmu metabolitów, przy jednoczesnej minimalizacji wpływu na inne metabolity [33, 34]. Podobne rozwiązanie zastosowano w sieciach opartych na ścieżkach przekazywania sygnałów biologicznych. Algorytmy te identyfikują białka regulujące określony węzeł w sieci, co pozwala na wskazanie tych elementów, które hamują określony proces biologiczny, pozostawiając inne nienaruszone [35]. Ma to istotne znaczenie w projektowaniu leków o pożądanym efekcie farmakologicznym, ale przy jednoczesnym zmniejszeniu ryzyka niepożądanych efektów ubocznych.

Zidentyfikowanie potencjalnego punktu uchwytu dla nowego leku w sieci biologicznej nie oznacza jeszcze zakończenia analizy *in silico*, ponieważ istnieją różne możliwe sposoby oddziaływania na cel terapeutyczny. Na przykład leki, które wiążą się z określoną konformacją białka docelowego mogą być bardziej skuteczne niż leki, który łączą się konformacyjnie nieselektywnie. Podstawowe dane zawarte w sieci nie pozwalają na ogół dokonać takiego rozróżnienia, jednak włączenie do analizy, na późniejszych etapach, danych dotyczących kinetyki procesu, w który zaangażowane jest białko, może umożliwić bardziej szczegółową analizę. Dynamiczny model sieci pozwolił określić, która strategia inhibicji tworzenia kompleksu białka Ras z GTP i/lub GDP jest bardziej korzystna z punktu widzenia terapii przeciwnowotworowej. Analiza *in silico* wskazała, że potencjalny lek powinien selektywnie hamować tworzenie się kompleksu białka Ras z GDP w komórkach nowotworowych, aby skutecznie zmniejszać aktywność tego białka względem komórek zdrowych [36].

Skojarzenie pojedynczego markera molekularnego z procesem patologicznym nie jest odzwierciedleniem prawdziwego obrazu zmian funkcjonalnych, jakie zachodzą w systemie komórkowym w przebiegu procesu chorobowego.

Analiza sieciowa w badaniach nad nowymi punktami uchwytu dla leków daje również nieocenione możliwości w przewidywaniu skutków terapii skojarzonej, opartej na leczeniu skierowanym na różne cele biologiczne. Aby taka strategia była możliwa w przyszłości w zastosowaniach klinicznych, terapia kombinowana musi być bezpieczna, a więc na wczesnym etapie należy wykluczyć potencjalnie szkodliwe interakcje. Jak wspomniano wcześniej, białka współdziałające ze sobą uczestniczą we wspólnych procesach biologicznych

[17]. Ruths i współpracownicy [35] opracowali algorytm identyfikujący zbiór węzłów w sieci, które muszą być zablokowane w danym szlaku, aby odłączyć pulę cząsteczek sygnałowych z niższych pięter ścieżki (tzw. *minimum knockout problem*) [35]. Podobne rozwiązanie zaproponował Dasika i współpracownicy [37] za pomocą narzędzia określanego jako *Min-Interference Problem*, czyli identyfikacja minimalnego zestawu węzłów, które muszą być poddane inhibicji w celu zablokowania niepożądanego procesu patologicznego, przy równoczesnym zachowaniu ciągłości w pozostałych szlakach [37]. Zastosowanie powyższych strategii w analizie sieci biologicznej umożliwia testowanie kombinacji różnych potencjalnych inhibitorów, których równoczesne podanie da efekt synergistyczny.

Postęp, jaki dokonuje się w obszarze badań molekularnych nad patologicznym podłożem chorób, pozwala na ponowne testowanie *in silico* stosowanych już leków, dla których możliwe są nowe aplikacje kliniczne. Takie ponowne wykorzystanie zarejestrowanych leków ma tę zaletę, że ich profil bezpieczeństwa został już wcześniej ustalony. Dodatkowo, leczenie skojarzone za pomocą wcześniej opracowanych leków, a teraz ponownie zanalizowanych z użyciem technik *in silico*, może przyczynić się do bezpieczniejszego i bardziej efektywnego leczenia. Lepsze zrozumienie, a także przewidywanie skutków stosowania kombinacji różnych leków jest jednym z najważniejszych zastosowań farmakologii systemów.

We wczesniej fazie rozwoju nowego leku istotne jest ustalenie, z jakimi potencjalnie innymi celami w organizmie prototypowa cząsteczka może wchodzić w interakcje. Ponieważ zastosowanie pojedynczego leku w wielu przypadkach jest niewystarczające dla osiągnięcia satysfakcjonującego efektu terapeutycznego, jednym z możliwych rozwiązań jest poszukiwanie leków działających specyficznie na kilka wybranych celów (leki multi-targetowe) [38, 39]. Leki takie muszą charakteryzować się pożądanym profilem biologicznym (określone cechy farmakokinetyczne i farmakodynamiczne), w tym oddziaływać na wiele celów, które łącznie modulują patologiczny proces chorobowy.

Projektowanie takich cząsteczek przyszłych leków musi również uwzględniać prawdopodobieństwo działań toksycznych, wynikających z powinowactwa do różnych biomolekuł w organizmie [40].

Farmakologia systemów została wykorzystana jako narzędzie analityczne w badaniach nad przyczynami wystąpienia skutków ubocznych po podaniu Torcetrapib, inhibitora białka przenoszącego estry cholesterolu (CETP, *Cholesteryl ester transfer protein*). Lek ten został opracowany w celu leczenia podwyższonego poziomu cholesterolu, ale efekt uboczny wywołujący niebezpieczne nadciśnienie o nieznanym mechanizmie spowodował przerwanie dalszych badań klinicznych. Xie i współpracownicy [41] wykorzystując techniki analizy komputerowej (*chemical systems biology*), zidentyfikowali domeny wiążące lek w białku CETP. Następnie poszukiwali innych protein w organizmie, które zawierały strukturalnie podobne miejsca do tych, które miały powinowactwo do Torcetrapib. Na podstawie uzyskanych danych skonstruowano sieć zależności białko – ligand. Jej analiza pozwoliła na wytypowanie miejsc w sieci, których inhibicja może odpowiadać za wystąpienie nadciśnienia tętniczego. Wykazano za pomocą powyższej analizy *in silico*, że obserwowany efekt uboczny wiąże się z oddziaływaniem Torcetrapib na układ renina – angiotensyna – al-

dosteron [41]. Jak pokazuje powyższy przykład, znajomość możliwie pełnego profilu farmakologicznego danej cząsteczki leku pozwoli racjonalnie modyfikować jego budowę, a także przyniesie korzyści w zakresie bezpieczeństwa i skuteczności obecnych i przyszłych terapii [42].

Indywidualizacja farmakoterapii

Jednym z założeń indywidualizacji terapii jest możliwość przewidywania działań niepożądanych i skutków ubocznych stosowanych leków dla pojedynczego pacjenta, względnie podgrupy pacjentów. Przy obecnych możliwościach badawczych możliwe jest jedynie analizowanie tych niekorzystnych działań, które ujawniają się w stosunkowo krótkim czasie po podaniu leku i zwykle mają ostry przebieg. Przykładem takiej analizy są

badania nad bardzo niebezpiecznym dla życia pacjenta efektem toksycznym, zespołem Stevensa-Johnsona i martwicą toksyczno-rozptywną naskórka (TEN, *toxic epidermal necrolysis*). Analiza z użyciem sieci pozwoliła na ustalenie, że za występowanie przypadków

polekowego TEN odpowiada jeden z ciężkich łańcuchów białka I klasy głównego układu zgodności tkankowej (MHC I, *major histocompatibility complex*). Stworzenie odpowiedniej sieci interakcji białko – ligand wymagało analizy 845 białek o przewidywanym powinowactwie do cząsteczek tych leków, które wywołują zespół Stevensa-Johnsona lub TEN [43].

W przyszłości konieczne będzie rozwijanie narzędzi analizy sieciowej, która będzie przydatna w badaniach nad odległymi skutkami ubocznymi, będącymi wynikiem zmian epigenetycznych związanych z leczeniem schorzeń przewlekłych. Przykładem mogą być badania dotyczące występowania tocznia rumieniowatego układowego czy późnych dyskinez po długotrwałej terapii [44]. Wypracowanie odpowiedniego podejścia analitycznego będzie konieczne, jeżeli chcemy przewidywać odległe skutki uboczne po kilkuletniej terapii NLPZ w prewencji chorób sercowo-naczyniowych. Roz-

Analiza sieciowa w badaniach nad nowymi punktami uchwytu dla leków daje również nieocenione możliwości w przewidywaniu skutków terapii skojarzonej, opartej na leczeniu skierowanym na różne cele biologiczne.

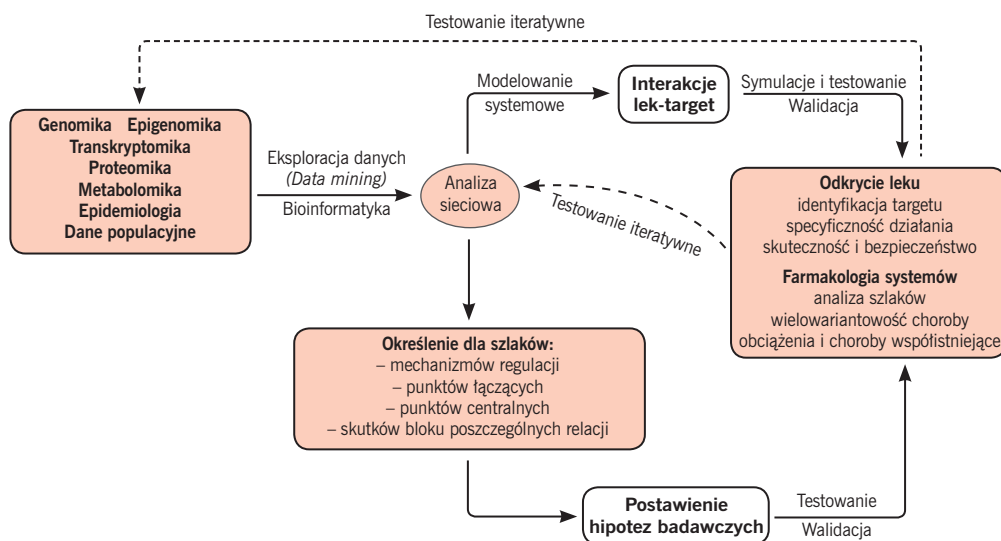
wój tego typu, odległych w czasie, niekorzystnych dla pacjenta działań ma zwykle charakter powolny i trudny do uchwycenia mechanizm zmian na poziomie molekularnym. Jednakże możliwość przewidywania tego typu skutków przed podjęciem leczenia ma ogromne znaczenie tak dla pacjenta, jak i zdrowia publicznego.

Jednym z problemów, które wiążą się z prowadzeniem skutecznej farmakoterapii, jest rezygnacja ze stosowania leku przez pacjenta ze względu na uciążliwe działania niepożądane. Działania te są wynikiem obecności punktów uchwytu dla danego leku w wielu typach tkanek czy narządach. Na przykład częstą przyczyną rezygnacji z leczenia inhibitorami konwertazy angiotensynowej (ACE) jest suchy, uporczywy kaszel. Przyczyną kaszlu u tych pacjentów jest nagromadzenie bradykininy, która obok angiotensyny jest konwertowana przez ACE. Bradykinina na drodze mechanizmu prozapalnego wywołuje u niektórych pacjentów kaszel [45, 46]. Ponieważ alternatywą

dla stosowania inhibitorów ACE są antagoniści receptora angiotensynowego, to możliwość wcześniejszego typowania pacjentów do odpowiedniej grupy pod względem stosowanej terapii jest istotne. Ponadto przykład ten pokazuje, jak prace nad znanymi i stosowanymi już lekami mogą przyczyniać się do poszukiwania alternatywnych strategii terapeutycznych. Wstępna analiza *in silico* oparta na sieciach i systemach biologicznych znacząco skraca czas poszukiwania przyczyn obserwowanych skutków biologicznych i pozwala na stawianie hipotez badawczych, weryfikowanych następnie w badaniach *in vitro* i *in vivo*.

Obecnie najbardziej zaawansowane badania nad leczeniem zindywidualizowanym opartym na terapii celowanej są prowadzone w onkologii. Badania molekularne tkanki guza nowotworowego oraz ocena genomu pacjenta są w niektórych krajach standardowym elementem podejmowania decyzji terapeutycznych, m.in. w raku piersi, jelita grubego i płuc [47]. Mimo tego obserwuje się czę-

Jednym z założeń indywidualizacji terapii jest możliwość przewidywania działań niepożądanych i skutków ubocznych stosowanych leków dla pojedynczego pacjenta, względnie podgrupy pacjentów.



Rysunek 1. Analiza sieciowa jako główne narzędzie w badaniach systemowych przy projektowaniu nowych leków [na podstawie 56].

sto niską skuteczność terapii celowanej, trudności w opracowaniu dobrych biomarkerów predykcyjnych i prognostycznych, a także rozwój mechanizmów lekooporności i selekcję klonów opornych na leczenie [48-51]. Powyższe trudności skłaniają naukowców do poszukiwania narzędzi pozwalających lepiej zrozumieć wzajemne interakcje, jakie zachodzą między białkami w komórkach nowotworowych w porównaniu z tymi, jakie są obserwowane w komórkach zdrowych. Możliwości analizy systemowej i stosowanie narzędzi opartych na typologii sieci są w tym przypadku nieocenione.

Przykładem wykorzystania zintegrowanego systemu analizy danych są badania nad wytypowaniem potencjalnych molekuł do terapii raka piersi i raka okrężnicy u indywidualnego pacjenta. Leary i współpracownicy [52] zidentyfikowali na podstawie danych z analizy liczby kopii genów oraz analizy sekwencyjnej pulę genów kandydatów, którą następnie poddali filtrowaniu za pomocą narzędzi proteomiki funkcjonalnej. W ten sposób wytypowali najbardziej prawdopodobne molekuly odpowiadające za onkogenezę danego klonu komórek nowotworowych. Na podstawie takiego zestawu danych można zbudować sieć do analizy wzajemnych interakcji, a także przeprowadzić mapowanie. Po wskazaniu najbardziej krytycznych szlaków onkogenezy (np. zmiany w interakcjach białek FGF, EGFR, ERBB2) można zaproponować najbardziej racjonalne strategie leczenia dla indywidualnego pacjenta, którego tkankę nowotworową poddano analizie [52].

Podsumowanie

Sieci biologiczne są coraz częściej stosowanym narzędziem, pozwalającym lepiej zrozumieć mechanizmy działające w złożonych systemach, w tym umożliwiające poznanie aberracji będących podłożem zmian o charakterze patologicznym [38, 53-55].

Analiza sieci w ramach biologii systemów, a w szczególności farmakologii systemów, to potencjał możliwości, na który składa się:

- poszukiwanie punktów uchwytu dla nowych leków [56],
- opracowanie leków multi-targetowych o pożądanym profilu farmakologicznym [39],
- przewidywanie możliwych skutków ubocznych i działań niepożądanych dla nowoprojektowanych leków (analiza skierowana na *off-target*) [57],
- wyjaśnianie przyczyn występowania niekorzystnych powikłań związanych z terapią lekami już zarejestrowanymi [57],
- zwiększenie możliwości wykorzystania wysokosprawnych technik analizy molekularnej do indywidualizacji farmakoterapii [47].

Dużą zaletą analizy sieciowej jest możliwość stałych modyfikacji poszczególnych jej parametrów, aktualizacja danych czy wręcz implementowanie całych poziomów złożoności, co prowadzi do rekonfiguracji sieci. Zastosowanie narzędzi sieciowych znacząco zwiększa nasze rozumienie patomechanizmów leżących u podstaw rozwoju chorób [58, 59].

W odniesieniu do głównych punktów kontroli i regulacji danego systemu, których dysfunkcja prowadzi do patologicznych

Dużą zaletą analizy sieciowej jest możliwość stałych modyfikacji poszczególnych jej parametrów, aktualizacja danych czy wręcz implementowanie całych poziomów złożoności, co prowadzi do rekonfiguracji sieci.



Aktualna lista refundacyjna w wersji papierowej

ZGODNA Z PUBLIKACJĄ:  Ministerstwo Zdrowia

DLA PRENUMERATORÓW „LEKU W POLSCE” CENA 12 ZŁ

www.medyk.com.pl ☎ infolinia 801 55 45 42

zmian w układzie, można poszukiwać najbardziej optymalnych sposobów przywrócenia homeostazy. Przy tak racjonalnym podejściu badawczym, projektowanie oraz opracowywanie nowych leków, a także „odkrywanie” nowych możliwości zastosowań znanych terapii jest szansą na zwiększenie potencjału i innowacyjności przemysłu farmaceutycznego.

Piśmiennictwo:

1. Bertalanffy L.V.: An outline of general system theory. *Br J Philos Sci* 1950; 1: 134-165.
2. Hodgkin A.L., Huxley A.F.: A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol* 1952; 117: 500-544.
3. Noble D.: Cardiac action and pacemaker potentials based on the Hodgkin-Huxley equations. *Nature* 1960; 188: 495-497.
4. Weston A.D., Hood L.: Systems biology, proteomics, and the future of health care: toward predictive, preventative, and personalized medicine. *J Proteome Res* 2004; 3: 179-196.
5. Hood L., Perlmutter R.M.: The impact of systems approaches on biological problems in drug discovery. *Nat Biotechnol* 2004; 22: 1215-1217.
6. Kohl P., Noble D.: Systems biology and the virtual physiological human. *Mol Syst Biol* 2009; 5: 292.
7. Silver P.A., Way J.C.: Molecular systems biology in drug development. *Clin Pharmacol Ther* 2007; 82: 586-590.
8. Arrell D.K., Zlatkovic J., Kane G.C., Yamada S., Terzic, A.: ATP-sensitive K⁺ channel knockout induces cardiac proteome remodeling predictive of heart disease susceptibility. *J Proteome Res* 2009; 8: 4823-4834.
9. Nelson T., Behfar A., Terzic A.: Stem cells: biologics for regeneration. *Clin Pharmacol Ther* 2008; 84: 620-623.
10. Bartunek J., Sherman W., Vanderheyden M., Fernandez-Aviles F., Wijns W., Terzic, A.: Delivery of biologics in cardiovascular regenerative medicine. *Clin Pharmacol Ther* 2009; 85: 548-552.
11. Barabasi A.L., Albert R.: Emergence of scaling in random networks. *Science* 1999; 286: 509-512.
12. Barabasi A.L.: Scale-free networks: a decade and beyond. *Science* 2009; 325: 412-413.
13. Khalil I., Brewer M.A., Nayarapally T., Runowicz C.D.: The potential of biologic network models in understanding the etiopathogenesis of ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2010; 116: 282-285.
14. Sauer U., Yenemann M., Zamboni N.: Genetics. Getting closer to the whole picture. *Science* 2007; 316: 550-551.
15. Ishii N., Nakahigashi K., Baba T., Robert M., Soga T., Kanai A. et al.: Multiple high-throughput analyses monitor the response of E. coli to perturbations. *Science* 2007; 316: 593-597.
16. Lu R., Markowitz F., Urwin R.D., Leek J.T., Airolidi E.M., MacArthur B.D. et al.: Systems-level dynamic analyses of fate change in murine embryonic stem cells. *Nature* 2009; 462: 358-362.
17. Luo F., Yang Y., Chen C.F., Chang R., Zhou J., Scheuermann R.H.: Modular organization of protein interaction networks. *Bioinformatics* 2007; 23: 207-214.
18. Goh K.I., Cusick M.E., Valle D., Childs B., Vidal M., Barabasi A.L.: The human disease network. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 8685-8690.
19. Ozgur A., Vu T., Erkan G., Radev D.R.: Identifying gene-disease associations using centrality on a literature mined gene-interaction network. *Bioinformatics* 2008; 24: i277-285.
20. Berger S.I., Posner J.M., Ma'ayan A.: Genes-Networks: connecting lists of gene symbols using mammalian protein interactions databases. *BMC Bioinformatics* 2007; 8: 372.
21. Chen J., Aronow B.J., Jegga A.G.: Disease candidate gene identification and prioritization using protein interaction networks. *BMC Bioinformatics* 2009; 10: 73.
22. Kohler S., Bauer S., Horn D., Robinson P.N.: Walking the interactome for prioritization of candidate disease genes. *Am J Hum Genet* 2008; 82: 949-958.
23. Camargo L.M., Collura V., Rain J.C., Mizuguchi K., Hermjakob H., Kerrien S. et al.: Disrupted in Schizophrenia 1 Interactome: evidence for the close connectivity of risk genes and a potential synaptic basis for schizophrenia. *Mol Psychiatry* 2007; 12: 74-86.
24. Chu L.H., Chen B.S.: Construction of a cancer-perturbed protein-protein interaction network for discovery of apoptosis drug targets. *BMC Syst Biol* 2008; 2: 56.
25. Durmus Tekir S., Yalcin Arga K., Ulgen K.O.: Drug targets for tumorigenesis: insights from structural analysis of EGFR signaling network. *J Biomed Inform* 2009; 42: 228-236.
26. Fatumo S., Plaimas K., Mallm J.P., Schramm G., Adebisi E., Oswald M. et al.: Estimating novel potential drug targets of Plasmodium falciparum by analysing the metabolic network of knock-out strains in silico. *Infect Genet Evol* 2009; 9: 351-358.
27. Hwang S., Son S.W., Kim S.C., Kim Y.J., Jeong H., Lee D.: A protein interaction network associated with asthma. *J Theor Biol* 2008; 252: 722-731.
28. Hyduke D.R., Jarboe N.R., Tran L.M., Chou K.J., Liao J.C.: Integrated network analysis identifies nitric oxide response networks and dihydroxyacetate dehydratase as a crucial target in Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 8484-8489.

29. Lim J., Hao T., Shaw C., Patel A.J., Szabo G., Rual, J.F. et al.: A protein-protein interaction network for human inherited ataxias and disorders of Purkinje cell degeneration. *Cell* 2006; 125: 801-814.
30. Raman K., Chandra N.: Mycobacterium tuberculosis interactome analysis unravels potential pathways to drug resistance. *BMC Microbiol* 2008; 8: 234.
31. Tanaka T., Oka T., Shimada Y., Umemoto N., Kuroyanagi J., Sakamoto C. et al.: Pharmacogenomics of cardiovascular pharmacology: pharmacogenomic network of cardiovascular disease models. *J Pharmacol Sci* 2008; 107: 8-14.
32. Singh S., Malik B.K., Sharma D.K.: Choke point analysis of metabolic pathways in E.histolytica: a computational approach for drug target identification. *Bioinformatics* 2007; 2: 68-72.
33. Sridhar P., Kahveci T., Ranka S.: An iterative algorithm for metabolic network-based drug target identification. *Pac Symp Biocomput* 2007; 88-99.
34. Sridhar P., Song B., Kahveci T., Ranka S.: Mining metabolic networks for optimal drug targets. *Pac Symp Biocomput* 2008; 291-302.
35. Ruths D.A., Nakhleh L., Iyengar M.S., Reddy S.A., Ram P.T.: Hypothesis generation in signaling networks. *J Comput Biol* 2006; 13: 1546-1557.
36. Sittes E.C., Tramont P.C., Ma Z., Ravichandran K.S.: Network analysis of oncogenic Ras activation in cancer. *Science* 2007; 318: 463-467.
37. Dasika M.S., Burgard A., Maranas C.D.: A computational framework for the topological analysis and targeted disruption of signal transduction networks. *Biophys J* 2006; 91: 382-398.
38. Hopkins A.L.: Network pharmacology: the next paradigm in drug discovery. *Nat Chem Biol* 2008; 4: 682-690.
39. Morphy R., Kay C., Rankovic Z.: From magic bullets to designed multiple ligands. *Drug Discov Today* 2004; 9: 641-651.
40. Leeson P.D., Springthorpe B.: The influence of drug-like concepts on decision-making in medicinal chemistry. *Nat Rev Drug Discov* 2007; 6: 881-890.
41. Xie L., Li J., Bourne P.E.: Drug discovery using chemical systems biology: identification of the protein-ligand binding network to explain the side effects of CETP inhibitors. *PLoS Comput Biol* 2009; 5: e1000387.
42. Schratzenhoiz A., Soskic V.: What does systems biology mean for drug development? *Curr Med Chem* 2008; 15: 1520-1528.
43. Yang L., Xu L., He L.: A CitationRank algorithm inheriting Google technology designed to highlight genes responsible for serious adverse drug reaction. *Bioinformatics* 2009; 25: 2244-2250.
44. Csoka A.B., Szyf M.: Epigenetic side-effects of common pharmaceuticals: a potential new field in medicine and pharmacology. *Med Hypotheses* 2009; 73: 770-780.
45. Sica D.A., Brath L.: Angiotensin-converting enzyme inhibition-emerging pulmonary issues relating to cough. *Chest Heart Fail* 2006; 12: 223-226.
46. Cheung B.M., Cheung G.T., Lauder I.J., Lau C.P., Kumana C.R.: Meta-analysis of large outcome trials of angiotensin receptor blockers in hypertension. *J Hum Hypertens* 2006; 20: 37-43.
47. Gonzalez-Angulo A.M., Hennessy B.T., Mills G.B.: Future of personalized medicine in oncology: a systems biology approach. *J Clin Oncol* 2010; 28: 2777-2783.
48. Engelman J.A., Chen L., Tan X., Crosby K., Guimaraes A.R., Upadhyay R. et al.: Effective use of PI3K and MEK inhibitors to treat mutant Kras G12D and PIK3CA H1047R gastric lung cancers. *Nat Med* 2008; 14: 1351-1356.
49. Massarelli E., Varella-Garcia M., Tang X., Xavier A.C., Ozburn N.C., Liu D.D. et al.: KRAS mutation is an important predictor of resistance to therapy with epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small-cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 2890-2896.
50. Ihle N.T., Lemos R. Jr., Wipf P., Yacoub A., Mitchell C., Siwak D. et al.: Mutations in the phosphatidylinositol-3-kinase pathway predict for anti-tumor activity of the inhibitor PX-866 whereas oncogenic Ras is a dominant predictor of resistance. *Cancer Res* 2009; 69: 143-150.
51. Jimeno A., Messersmith W.A., Hirsch FR., Franklin W.A., Eckhardt S.G.: KRAS mutations and sensitivity to epidermal growth factor receptor inhibitors in colorectal cancer: practical application of patient selection. *J Clin Oncol* 2009; 27: 1130-1136.
52. Leary R.J., Lin J.C., Cummins J., Boca S., Wood L.D., Parsons D.W. et al.: Integrated analysis of homozygous deletions, focal amplifications, and sequence alterations in breast and colorectal cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 16224-16229.
53. Barabasi A.L., Oltvai Z.N.: Network biology: understanding the cell's functional organization. *Nat Rev Genet* 2004; 5: 101-113.
54. Merico D., Gfeller D., Bader G.D.: How to visually interpret biological data using networks. *Nat Biotechnol* 2009; 27: 921-924.
55. Yildirim M.A., Goh K.I., Cusick M.E., Barabasi A.L., Vidal M.: Drug-target network. *Nat Biotechnol* 2007; 25: 1119-1126.
56. Arrell D.K., Terzic A.: Network systems biology for drug discovery. *Clin Pharmacol Ther* 2010; 88: 120-125.
57. Berger S.I., Iyengar R.: Role of systems pharmacology in understanding drug adverse events. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 2011; 3: 129-135.
58. Faustino R.S., Terzic A.: Bioinformatic networks: molecular reticles for pinpointing pharmacological target selection. *Clin Pharmacol Ther* 2008; 84: 543-545.
59. Arrell D.K., Niederlander N.J., Perez-Terzic C., Chung S., Behfar A., Terzic A.: Pharmacoproteomics: advancing the efficacy and safety of regenerative therapeutics. *Clin Pharmacol Ther* 2007; 82: 316-319.

Adres Autora:

dr n. farm. Mariusz Panczyk
e-mail: mariusz.panczyk@wum.edu.pl



Artykuł porusza zagadnienia, które są m.in. tematami realizowanymi w ramach kształcenia ciągłego farmaceutów (przyp. red.).