

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

**MOLEKULÁRNÍ MECHANISMY POŠKOZENÍ JATER
NAVOZENÝCH LÉKY**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Tomáš Smutný, Ph.D.

Hradec Králové 2024

Markéta Vašků

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Tato práce nebyla použita k získání jiného či stejného titulu.“

V Hradci Králové 2024

Markéta Vašků

Poděkování

Za výborné vedení této diplomové práce, ochotu, věnovaný čas a skvělý přístup děkuji vedoucímu práce PharmDr. Tomáši Smutnému, Ph.D., zaslouží si poděkování za všechny rady, rychlé a srozumitelné odpovědi na jakékoliv otázky již od začátku psaní práce. V neposlední řadě děkuji členům mé rodiny, kteří byli v průběhu psaní hlavními kritiky mé práce a zároveň obrovskou podporou.

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Studentka: Markéta Vašků

Školitel: PharmDr. Tomáš Smutný, Ph.D.

Název diplomové práce: Molekulární mechanismy poškození jater navozených léky

Léky navozené poškození jater je častým důvodem k zastavení vývoje nových léčiv a v minulosti vedlo ke stažení řady léčiv z trhu. Cílem této diplomové práce je popsat molekulární mechanismy zodpovědné za polékovou hepatotoxicitu, představit způsoby preklinického a klinického testování léčiv, které mají odhalit případnou hepatotoxicitu a uvést příklady hepatotoxických léčiv.

Aktuálně je známo pět mechanismů způsobujících DILI, a to mitochondriální poškození, formování reaktivních forem kyslíku, stres endoplazmatického retikula, lysozomální poškození, inhibice transportu žlučových kyselin a aktivace imunitní odpovědi. Nicméně tyto mechanismy nejsou ještě plně prozkoumány a vyžadují další výzkum. Bohužel i testování má stále rezervy. Preklinické *in vitro* modely, ani zvířecí modely nejsou úplně vyhovující a nejsou schopné spolehlivě odhalit DILI. To stejné platí i o klinickém testování. DILI je velmi komplexní jev a jeho vznik vyžaduje souhru více faktorů, což se v klinickém testování nemusí projevit. Především idiosynkratické DILI je poměrně málo častý nežádoucí účinek, a proto se může projevit až v postmarketingovém sledování. Příkladem léčiv stažených z trhu z důvodu DILI jsou troglitazon, tolkapon a fialuridin.

Hodnocení hepatotoxicity je klíčovým prvkem v procesu vývoje nových léků, který pomáhá zajistit bezpečnost a účinnost léčiv pro pacienty. DILI představuje problémem nejen z hlediska zdravotního, ale také z finančního, a proto je třeba dále zkoumat jeho mechanismy, lépe je pochopit a zlepšovat metody testování.

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology & Toxicology

Student: Markéta Vašků

Supervisor: PharmDr. Tomáš Smutný, Ph.D.

Title of diploma thesis: Molecular mechanisms of drug-induced liver injury (DILI)

Drug-induced liver injury is a common reason for halting the development of new drugs and has led to the withdrawal of several drugs from the market in the past. This diploma thesis aims to describe the molecular mechanisms responsible for drug hepatotoxicity and present both methods of preclinical and clinical testing of drugs to detect potential hepatotoxicity and examples of hepatotoxicity.

Five mechanisms are currently known to cause DILI, namely mitochondrial damage, formation of reactive oxygen species, endoplasmic reticulum stress, lysosomal damage, inhibition of bile acid transport, and activation of the immune response. However, these mechanisms have not fully been explored yet and require further research. Unfortunately, even testing still falls short of perfection. Neither preclinical *in vitro* models nor animal models are completely satisfactory and cannot reliably detect DILI. The same applies to clinical testing. DILI is very complex and usually requires the interplay of multiple factors, which may not be reflected in clinical testing. Particularly, idiosyncratic DILI is a relatively infrequent side effect and thus often becomes apparent only in post-marketing surveillance. Some drugs withdrawn from market due to DILI include troglitazone, tolkapone and fialuridine.

Hepatotoxicity assessment is a key in the new drug development process to help ensure the safety and efficacy of drugs for patients. DILI represents a problem not only from a health point of view, but also from a financial perspective. Therefore, it is necessary to investigate the mechanisms further, to understand them better, and to improve the testing methods.

Obsah

1	Seznam zkratek.....	1
2	Úvod a cíl	5
3	Teoretická část	6
3.1	Charakteristika DILI	6
3.2	Molekulární mechanismy DILI.....	10
3.2.1	Vliv individuálních charakteristik pacienta, které přispívají k DILI	12
3.2.2	Vlastnosti léčiva a DILI.....	14
3.2.3	Mitochondriální poškození	15
3.2.4	Formování reaktivních forem kyslíku.....	18
3.2.5	Stres endoplazmatického retikula	20
3.2.6	Lysozomální poškození.....	24
3.2.7	Inhibice transportu žlučových kyselin	25
3.2.8	Aktivace imunitní odpovědi.....	27
3.3	Seznam vybraných léčiv dle molekulárního mechanismu DILI	31
3.4	Preklinické a klinické testování	34
3.4.1	Hodnocení DILI v <i>in vitro</i> modelech.....	34
3.4.2	Zvířecí modely	37
3.4.3	Klinické testování	40
3.5	Význam a metody zjišťování DILI	41
3.5.1	Současné biomarkery	41
3.5.2	Nové potenciální biomarkery.....	42
3.6	Příklady z praxe – stažená léčiva	45
3.6.1	Troglitazon	45
3.6.2	Tolkapon	46
3.6.3	Trovafloxacin.....	47
3.6.4	Nefazodon.....	47

3.6.5	Ximelagatran.....	48
3.6.6	Fialuridin.....	49
3.6.7	Bromfenak	50
3.6.8	Lumirakoxib.....	51
3.6.9	Benoxaprofen.....	52
3.7	Příklady z praxe – stále používaná léčiva	53
3.7.1	Isoniazid.....	53
3.7.2	Naproxen.....	54
3.7.3	Diklofenak	54
3.7.4	Nimesulid.....	55
3.7.5	Alopurinol.....	55
3.7.6	Nevirapin	55
4	Diskuse	57
5	Závěr.....	61
6	Zdroje	62

1 Seznam zkratek

ABC	ATP-binding cassette, ABC transportér
ABCB11	ABC subfamily B member 11, ABC transportér, podrodina B, člen 11
ABCC2	ABC subfamily C member 2, ABC transportér, podrodina C, člen 2
ADR	Adverse drug reaction, nežádoucí léková reakce
ALF	Acute liver failure, akutní jaterní selhání
ALI	Acute liver injury, akutní poškození jater
ALP	Alkaline phosphatase, alkalická fosfatáza
ALT	Alanin aminotransferase, alaniaminotransferáza
APC	Antigen presenting cells, antigen prezentující buňky
AST	Aspartate aminotransferase, aspartátaminotransferáza
ATF4	Activating transcription factor 4, aktivační transkripční faktor 4
ATF6	Activating transcription factor 6, aktivační transkripční faktor 6
BiP/GRP78	Binding immunoglobulin protein/ 78 kDa glucose-regulated protein, vazebný imunoglobulinový protein/ 78 kDa glukózou regulovaný protein
BSEP	Bile-salt export pump, exportní pumpa žlučových solí
COX-2	Cyclooxygenase 2, cyklooxygenáza 2
CYP	Cytochrome, cytochrom
DAMP	Damage-associated molecular patterns, molekulární vzory asociované s poškozením
DILI	Drug induced liver injury, léky navozené poškození jater
DIPL	Drug-induced phospholipidosis, léky indukovaná fosfolipidóza
DPK	Nucleoside diphosphate kinase, nukleosid difosfát kináza

eIF2 α	Eukaryotic initiation factor 2, eukaryotický iniciační faktor 2
EMA	European Medicines Agency, Evropská agentura pro léčivé přípravky
ENT1	Equilibrative nucleoside transporter 1, ekvilibrativní nukleosidový transportér 1
ER	Endoplasmic reticulum, endoplazmatické retikulum
FasL	Fas ligand
FDA	Food and Drug Administration, Úřad pro kontrolu potravin a léčiv
GLDH	Glutamate dehydrogenase, glutamátdehydrogenáza
GPx	Glutathione peroxidase, Glutathionperoxidáza
GSH	Glutathion
GST	Glutathione-S-transferase, glutathion-S-transferáza
HDS – induce liver injury	Herbal and dietary supplement induced liver injury, poškození jater vyvolané bylinami a doplňky stravy
HLA	Human leukocyte antigen, lidský leukocytární antigen
HILI	Herb-induced liver injury, poškození jater způsobené bylinami
IDILI	Idiosyncratic DILI, idiosynkratické DILI
IFN – γ	Interferon gamma, interferon gama
iHep	Induced hepatocytes, indukované hepatocyty
INH	Isoniazide, isoniazid
IRE1	Inositol requiring enzyme 1, enzym typu 1 vyžadující inositol
IRE1 α	Inositol requiring enzyme 1 α , enzym typu 1 α vyžadující inositol
KC	Kupffer cells, Kupfferovy buňky

Keap1	Kelch-like ECH-associated protein 1, kelch-like ECH-asociovaný protein 1
LPS	Lipopolysaccharide, lipopolysacharid
MDR1	Multidrug resistance protein 1, protein multilékové rezistence 1
MHC	Major histokompatibilty komplex, hlavní histokompatibilní komplex
miRNA	MikroRNA
MRP	Multidrug resistance-associated protein, protein spojený s mnohočetnou lékovou rezistencí
MTD	Maximum tolerated dose, maximální tolerovaná dávka
mtDNA	Mitochondrial DNA, mitochondriální DNA
NAC	N-acetylcystein
NAPQI	N-acetyl-p-benzochinonimin
NK	Natural killers, přirození zabíječi
NNRTI	Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor, nenukleosidový inhibitor reverzní transkriptázy
NPC	Non-parenchymal cells, neparenchymové buňky
Nrf2	Nuclear factor erythroid 2, jaderný faktor erytroidu typu 2
NSAID	Non-steroidal anti-inflammatory drugs, nesteroidní protizánětlivé léky
NTCP	Sodium taurocholate cotransporting polypeptide, polypeptid kotransportující taurocholát sodný
OATP	Organic anion transporting polypeptide, polypeptid transportující organické anionty
PERK	PRKR-like endoplasmic reticulum kinase, kináza endoplazmatického retikula podobná PRKR

PHH	Primar human hepatocytes, primární lidské hepatocyty
PPAR γ	Peroxisome proliferator-activated receptor- γ , receptor- γ aktivovaný peroxisomovým proliferátorem
PRR	Pattern recognition receptors, receptory rozpoznávající vzory
ROS	Reactive oxygen species, reaktivní formy kyslíku
RUCAM	Roussel Uclaf causality assessment method, metoda hodnocení kauzality Roussel Uclaf
SERCA	Sarco/endoplasmic reticulum Ca ²⁺ ATPase, Ca ²⁺ ATPáza sarko/endoplazmatického retikula
SLC	Solute carrier transporters, transprotéry nosičů rozpustných látek
SOD	Superoxide dismutase, superoxididismutáza
TK2	Thymidine kinase 2, thymidinkináza 2
TMPK	Thymidylate kinase, thymidylátkináza
ULN	Upper limit of normal level, horní hranice normální úrovně
UPR	Unfolded protein response, odpověď na rozložené proteiny
VPA	Valproic acid, kyselina valproová
XBP1	X-box binding protein 1, X-box vazebný protein 1

2 Úvod a cíl

Léky navozené poškození jater neboli DILI (drug-induced liver injury) bývá jedním z hlavních důvodů pro stažení léčiv z trhu nebo důvodem k zastavení vývoje nových léčiv (Holt a Ju, 2006). Jedná se o vzácnou, ale důležitou příčinu akutního i chronického onemocnění jater. Odhadem je 22 % neúspěšných klinických studií a 32 % stažení z trhu způsobeno hepatotoxicitou. Hepatotoxicita je obvykle identifikována až v klinických studiích nebo po uvedení léčiva na trh, což představuje zvýšené riziko pro účastníky těchto klinických studií, ale také finanční zátěž při vývoji léku (Zhang et al., 2023).

Cílem této diplomové práce je popsat molekulární mechanismy poškození jater způsobené léky. Kromě analýzy těchto mechanismů, práce poskytuje přehled modelových hepatotoxických léčiv. V neposlední řadě se práce zabývá důvody, které způsobily selhání identifikace DILI u nově vyvíjených léčiv a zkoumá metody posuzování bezpečnosti léčiv.

3 Teoretická část

3.1 Charakteristika DILI

DILI je pojem označující jakékoliv poškození jater způsobené léky (Leise et al., 2014), ať už přípravky na lékařský předpis nebo i volně prodejnými léčivy (Zhang et al., 2022). Nejen konvenční léčiva, ale i bylinné přípravky mohou způsobit poškození jater. V literatuře se tento jev označuje jako HILI (herb-induced liver injury, poškození jater způsobené bylinami) (Ballotin et al., 2021). Posledním pojmem je HDS (herbal and dietary supplement)-induced liver injury, tedy poškození jater navozené bylinami a doplňky stravy (Real et al., 2019). Závažnost tohoto poškození je různá od asymptomatického zvýšení jaterních testů až po akutní selhání jater (Leise et al., 2014).

DILI je možné klasifikovat několika způsoby. První ze způsobů dělí DILI na předvídatelné a idiosynkratické (nepředvídatelné). Předvídatelná jaterní toxicita je závislá na podané dávce léčiva a rozvinula by se u všech pacientů po podání dostatečně vysoké dávky hepatotoxického léčiva (Dragovic et al., 2016). Nejčastějším příkladem léčiva, které způsobuje předvídatelné DILI je acetaminofen. V tomto případě hepatotoxicitu zapříčiňuje toxický metabolit N-acetyl-p-benzochinonimin (NAPQI). Dalšími příklady jsou cyklofosfamid nebo metotrexát (Kuna et al., 2018). Toxiny buď zasahují do buněčného metabolismu přímo nebo se stanou toxickými, jakmile dojde k jejich bioaktivaci (Gomez-Lechon et al., 2010). Naopak idiosynkratické DILI (IDILI) je nepředvídatelné, na dávce většinou nezávisí, má variabilnější latenci a je méně časté. Mezi léčiva způsobující idiosynkratické jaterní poškození patří například nesteroidní protizánětlivé látky nebo isoniazid (Leise et al., 2014). Idiosynkratická hepatotoxicita má genotypický a fenotypický podklad, který vede k nadměrné nebo naopak nedostatečné expresi metabolizujících enzymů, odlišnému vzorci metabolismu léčiv a případně abnormální produkci toxického metabolitu (Gomez-Lechon et al., 2010). Idiosynkrazie je ale poměrně vzácný jev, který se objevuje u méně než 1 z 10 000 pacientů. Rizikové faktory jsou multifaktoriální a často se vztahují ke genetickému polymorfismu enzymů metabolizujících léčiva (Gomez-Lechon et al., 2010). Idiosynkratické poškození

jater lze dále rozdělit do dvou podkategorií na alergické a nealergické (Kuna et al., 2018). Alergické DILI je imunitně zprostředkované a projevuje se například horečkou, vyrážkou, eosinofilií nebo tvorbou autoprotilátek. Dalším rysem alergického DILI je časný nástup do 1-6 týdnů a rychlé opětovné poškození jater po znovu podání léku. Neimunitně zprostředkované DILI má obvykle pozdější nástup, většinou do 1 roku, postrádá systémové rysy imunitního DILI a není spojeno s rychlým poškozením jater při opětovném podávání léčiva (Leise et al., 2014).

Léky způsobená hepatotoxicita vzniká na podkladě interakcí mezi genetickými, negenetickými a environmentálními faktory. Hlavním výsledkem patogeneze DILI je smrt hepatocytů. Dalšími potenciálními cíli mohou být také cholangiocyty nebo endoteliální buňky a s tím souvisí další možný způsob dělení. Existují tři základní typy poškození jater – hepatocelulární, které se projevuje jako akutní hepatitida, dále cholestatické projevující se jako cholestáza a smíšené poškození jater (Kuna et al., 2018). Rozlišení těchto tří typů poškození je založené na základě hladin alaninaminotransferázy (ALT, alanin aminotransferase), alkalické fosfatázy (ALP, alkaline phosphatase) a bilirubinu. Hepatocelulární typ je nejčastějším typem, následuje smíšené poškození a nejméně časté je cholestatické. Neexistují specifická histologická kritéria pro diagnózu DILI, takže ve většině případů není jaterní biopsie pro diagnózu potřebná (Unzueta a Vargas, 2013).

Míra poškození jater je definována pomocí hodnoty R. Poměr R se vypočítá vydělením ALT a ALP, přičemž se pro obě hodnoty použijí násobky ULN (upper limit of normal level, horní hranice normální úrovně). Poměr R pokud je větší než 5, definuje hepatocelulární typ poškození, v případě, že je menší než 2 jedná se o cholestatický typ poškození a pokud je poměr R mezi 2 a 5 poškození je smíšené (Suh, 2020).

Tab. 1 Příklady léčiv dle typů poškození jater

Typ poškození	Příklady léčiv
Hepatoceulární poškození	acetaminofen, alopurinol, diklofenak, isoniazid, ketokonazol, paroxetin, pyrazinamid, risperidon, ritonavir, sertralin, statiny, trazodon, valproová kyselina
Cholestatické poškození	azathioprin, chlorpromazin, erythromycin, deriváty estrogenu, tricyklická antidepresiva
Smíšené poškození	azathioprin, karbamazepin, nitrofurantoin, fenobarbital, fenytoin

Zdroj: Chang a Schiano, 2007

Hodnocení závažnosti DILI se dělí na mírné, středně těžké, těžké a fatální na základě běžných laboratorních hodnot, které hodnotí onemocnění jater (Unzueta a Vargas, 2013).

V případě, že se DILI projeví, je nutné lék okamžitě vysadit. Vysazení často vede ke spontánnímu zotavení v řádu dnů až týdnů a nevyžaduje další zásahy. Může ale dojít i ke zhoršení jaterních funkcí navzdory vysazení léku. Byly schváleny dva léčebné přístupy k léčbě pacientů, u kterých se rozvine léky vyvolané ALF (acute liver failure, akutní selhání jater). Jedním z nich je rychlá detoxikace léčiva, což vede k omezení jeho vstřebávání a hepatotoxických účinků. Aktivní uhlí je používáno k léčbě předávkování léky jako je paracetamol, fenobarbital a karbamazepin. Účinnost této terapie je závislá na rychlém přijetí pacienta do péče, na rozpoznání DILI lékařem a včasném podání aktivního uhlí. V důsledku toho je detoxikační terapie limitována na léčiva, která způsobují předvídatelné DILI. Dřívější postup použití výplachu celého střeva a žaludku byl do značné míry nahrazen detoxikací aktivním uhlím, ale někdy může být používán v případech otravy železem, lithiem nebo tabletami s postupným uvolňováním (Hosack et al., 2023).

Druhý terapeutický přístup zahrnuje aplikaci specifického antidota, které má za cíl snížit hepatotoxické účinky léčiv. Při předávkování paracetamolem a kyselinou valproovou byly použity hepatoprotektivní látky, jako je N-acetylcystein (NAC) a L-karnitin. „*Léky na ochranu jater včetně N-acetylcysteinu (NAC) a L-karnitinu byly široce používány u ALI (acute liver injury, akutní poškození jater) sekundárně po předávkování paracetamolem a kyselinou valproovou (Hosack et al., 2023).*“ Nicméně role NAC jako hepatoprotektivního činidla zůstává kontroverzní. „*Hosack et al. (2023) uvádí, že hepatoprotektivní role NAC u idiosynkratické DILI však zůstává kontroverzní.*“ Podobně je diskutováno i použití kortikosteroidů (Hostck et al., 2023).

Existuje mnoho léků, včetně konvenčních i rostlinných, které jsou předmětem diskuse o potenciálním použití k léčbě pacientů s DILI. Příkladem takových látek je cholestyramin, silymarin, klausenamid, bicyklol, S-adenosyl-methionin, imunosupresiva, různé antioxidanty nebo již zmíněný NAC a kortikoidy (Teschke, 2023).

3.2 Molekulární mechanismy DILI

Játra jsou orgánem, který hraje velmi důležitou roli v metabolizaci léků nebo jiných exogenních látek, čímž chrání organismus před jejich potenciálně toxickými účinky. Pro vysvětlení mechanismů DILI je zásadní pochopení bioaktivačních procesů léků produkujících reaktivní metabolity a mechanismy podílející se na detoxifikaci a vylučování xenobiotik (Villanueva-Paz et al., 2021).

Primární úlohou metabolismu je odstranění exogenních, ale i některých endogenních molekul z těla. Většinou se jedná o proces, při kterém dochází k přeměně lipofilní molekuly na hydrofilní, což usnadňuje její eliminaci z organismu. V některých případech dochází k přeměně na biologicky aktivní formu molekuly. Děje se tak v případě proléčiv. Produkty metabolismu mohou být tedy jak farmakologicky aktivní, tak farmakologicky inaktivní (Almazroo et al., 2017).

Metabolismus léčiv má několik fází. V první fázi metabolismu dochází k chemické modifikaci molekuly na více rozpustnou ve vodě, což následně usnadní její exkreci ledvinami nebo játry. Nejdůležitějšími enzymy první fáze jsou enzymy ze superrodiny cytochromů P450 (CYP), které katalyzují různé reakce včetně oxidace, hydroxylace nebo dealkylace. V následné druhé fázi metabolismu dochází ke konjugaci molekuly s hydrofilní endogenní molekulou za pomoci transferáz. Významné enzymy druhé fáze jsou například N-acetyltransferáza, glutathion-S-transferáza (GST, glutathione-S-transferase) nebo katechol O-methyltransferáza (Almazroo et al., 2017). Transportéry léků jsou převážně transmembránové proteiny, které usnadňují transport velkých a/nebo ionizovaných molekul do (fáze 0 metabolismu) a z buňky (3. fáze metabolismu). Transportéry jsou klasifikovány do dvou hlavních superrodin – ABC transportéry (ATP-binding cassette) a skupina transportérů, které jsou nosiči rozpuštěných látek (SLC transporters, solute carrier transporters). V případě léčiv jsou důležité mimo jiné ABC efluxní transportéry, které přenášejí molekuly směrem ven z buněk. Mezi jaterní efluxní transportéry patří například exportní pumpa žlučových solí (BSEP, bile-salt export pump) nebo protein

asociovaný s rezistencí k mnoha lékům (MRP, multidrug resistance-associated protein) (Almazroo et al., 2017).

Játra jsou hlavním orgánem pro první a druhou fázi metabolismu, nicméně transportéry léčiv hrají důležitou roli v usnadnění vstupu molekul do hepatocytů a ven do žluči (Almazroo et al., 2017).

Bylo navrženo mnoho různých hypotéz molekulárních mechanismů vzniku a průběhu DILI, které odráží jeho variabilní povahu (Villanueva-Paz et al., 2021).

Za počáteční krok rozvoje DILI je považováno vystavení hepatocytů zvýšenému buněčnému stresu. Poškození buněk je indukováno léky, případně jejich reaktivními metabolity přes kovalentní vazby nebo přímým poškozením mitochondrií, což vede k oxidačnímu stresu a k aktivaci signálních drah senzitivních na stres, dále k narušení mitochondriální funkce anebo stresu endoplazmatického retikula (Villanueva-Paz et al., 2021).

Při vzniku DILI hraje důležitou roli nejen lék, ale i faktory na straně pacienta, které společně určují individuální vnímavost a míru poškození buněk. To může vést k buněčné smrti, vyvolat otok buněk a případně může dojít i k prasknutí buněčné membrány a k uvolnění intracelulárního obsahu včetně molekulárních vzorů spojených s poškozením (DAMP, damage-associated molecular patterns), které stimulují zánětlivou/ imunitní odpověď (Villanueva-Paz et al., 2021).

Podstatou mechanismu DILI mohou být metabolické nebo imunitní reakce. Metabolické reakce se rozvinou v případě, že se lék nebo jeden z jeho metabolitů naváže na buněčný protein, DNA případně jinou buněčnou molekulu, což vede k buněčné dysfunkci.

Podstatou imunitní reakce je vznik zánětu, který je způsoben aktivací řady prozánětlivých cytokinů. Imunitně zprostředkované poškození jater se vyvíjí sekundárně kvůli defektu indukčních mechanismů imunitní tolerance, a to i přesto, že játra mají schopnost vyvinout toleranci k velkému množství cizích

antigenů (Bleibel et al., 2007). Tato tolerance brání vzniku bouřlivé imunitní reakce. Může také dojít k adaptaci, a tak i přes pokračující podávání léku, poškození jater spontánně odezní (Villanueva-Paz et al., 2021).

Jak bylo dříve uvedeno na vzniku DILI se podílí jak faktory na straně pacienta, tak i na straně vlastností léku. Následuje popis individuálních faktorů náchylnosti k poškození jater. Ten zahrnuje věk, pohlaví, genetické faktory, životní styl, jiná onemocnění, komedikaci nebo těhotenství (Almazroo et al., 2017).

3.2.1 Vliv individuálních charakteristik pacienta, které přispívají k DILI

Věk má vliv na metabolismus léčiv v játrech. U kojenců je menší exprese enzymů, což může vést ke snížení metabolismu léčiv. Například aktivita enzymů CYP450 u novorozenců je o něco méně než poloviční v porovnání s dospělým člověkem, což znamená, že novorozenci nejsou schopni účinně metabolizovat většinu léčiv. Postupně s věkem narůstá i kapacita metabolismu. Expresa a funkčnost enzymů není výrazně ovlivněna u starší populace. Nicméně kombinace horšího průtoku krve játry a užívání více léčiv může modifikovat metabolismus léčiv. S věkem klesá objem jater každým rokem zhruba o 0,5 až 1 %. Dále snížení oxygenace a zvýšená depozice tuku může vést k redukci metabolismu léčiv u starších osob (Almazroo et al., 2017).

Nežádoucí účinky léčiv jsou obecně 1,5 - 2x častější u žen než u mužů. Rozdíly mezi pohlavími mohou být způsobeny vlivem hormonů, tělesnou vahou případně rozložením tělesného tuku (Almazroo et al., 2017). Dále aktivita určitých enzymů je u mužů vyšší než u žen, ale u jiných enzymových systémů je tomu naopak (Almazroo et al., 2017).

Těhotenství je spojeno se spoustou fyziologických změn, například změněné množství vody v těle, množství tuku a hormony mohou potenciálně způsobit změnu absorpce, distribuce, metabolismu nebo exkrece léčiva (Almazroo et al., 2017).

Mezi onemocnění, která ovlivňují metabolismus léčiv, patří nejen onemocnění jater, ale také onemocnění ledvin, diabetes mellitus nebo stav po transplantaci orgánu. U pacientů s diabetem bylo pozorováno ovlivnění enzymů zodpovědných za metabolizaci léčiv. Například aktivita enzymu CYP3A4 je u diabetiků výrazně snížena. To vede k vyššímu riziku nežádoucích a toxických účinků léků v důsledku jejich sníženého metabolismu. Proto je u diabetických pacientů nezbytné pečlivě zvažovat dávkování léků s úzkým terapeutickým indexem (Almazroo et al., 2017).

Polymorfismy metabolizujících enzymů a transportérů jsou genetickými faktory, které ovlivňují kinetiku některých léčiv. Například polymorfismus CYP2C9 vede k odlišnému metabolismu warfarinu. Pacienti, kteří jsou nositeli různých alel CYP2C9 jako například CYP2C9*2 a CYP2C9*3 vykazují nižší metabolismus warfarinu, což vede k vyšší plazmatické koncentraci léčiva (Almazroo et al., 2017).

Dalším faktorem, který ovlivňuje metabolismus léčiv a potenciálně vznik DILI je souběžné podávání léčiv a jejich vzájemné interakce. Z toho důvodu FDA (Food and Drug Administration, Úřad pro kontrolu potravin a léčiv) požaduje, aby byla všechna léčiva při vývoji otestována na potenciální interakce s enzymatickými inhibitory a induktory. Inhibitory mohou blokovat enzymatickou funkci nebo kompetovat s enzymovým substrátem, spolupodaným léčivem. Induktory zvyšují genovou transkripci, což může vést ke zvýšené expresi enzymu a k rychlejšímu metabolismu současně podaného léku (Almazroo et al., 2017).

3.2.2 Vlastnosti léčiva a DILI

Riziko vzniku DILI dané fyzikálně-chemickými a toxikologickými vlastnostmi léků má několik příčin. Zaprvé, aby došlo k iniciaci DILI je nutné, aby léčivo/reaktivní metabolit dosáhl určité prahové hodnoty. Existuje souvislost mezi denní dávkou léčiva a vznikem DILI. Zadruhé je s rizikem DILI spojena vyšší lipofilita léku. Lipofilita s hodnotou $\text{LogP} \geq 3$ v kombinaci s vysokou denní dávkou léčiva (≥ 100 mg) jsou spojené s těžkou DILI (Villanueva-Paz et al., 2021). Kombinace těchto dvou faktorů je známa jako „pravidlo dvou“ (“the rule of two”). Dávka a lipofilita zvyšuje riziko rozvoje DILI kvůli zvýšenému vychytávání léku z krve do hepatocytů (Alempijevic et al., 2017). Dalším rizikovým faktorem je vlastnost léčiva tvořit reaktivní metabolity, a to kvůli jejich vlastní toxicitě a jejich schopnosti tvořit endogenní proteinové adukty, které mohou aktivovat imunitní odpověď. Nicméně i léčiva, která nevytváří reaktivní metabolity, mohou způsobit DILI (Villanueva-Paz et al., 2021).

Reaktivní metabolity vznikající při metabolismu léčiv jsou hlavní příčinou prudkého nárůstu oxidačního stresu, který je přímo generovaný v mitochondriích poškozeného hepatocytu. Zvýšené množství reaktivních forem kyslíku (ROS, reactive oxygen species) může přímo poškodit DNA, proteiny a lipidy buněk (Villanueva-Paz et al., 2021).

Metabolická aktivace léčiva a tvorba reaktivních meziproductů, tedy nedostatečná detoxikace reaktivního meziproductu a jeho kovalentní vazba na makromolekuly může vést k následné jaterní toxicitě. Tvorba reaktivních metabolitů byla zdokumentována u léků, které byly staženy z trhu nebo mají varování před hepatotoxicitou (Villanueva-Paz et al., 2021).

Obecně platí, že zvýšená hladina chemicky reaktivních meziproductů přehltí kapacitu detoxikačních enzymů a endogenních antioxidantů. Široká škála mechanismů pro udržení rovnováhy mezi oxidanty a antioxidanty včetně glutathionu (GSH), superoxidodismutázy (SOD, superoxide dismutase), katalázy a glutathionperoxidázy (GPx, glutathione peroxidase) je narušena, což vede ke vzniku oxidačního stresu (Villanueva-Paz et al., 2021).

Dále budou specificky popsány mechanismy vedoucí k poškození buněk, které následně vede ke vzniku DILI.

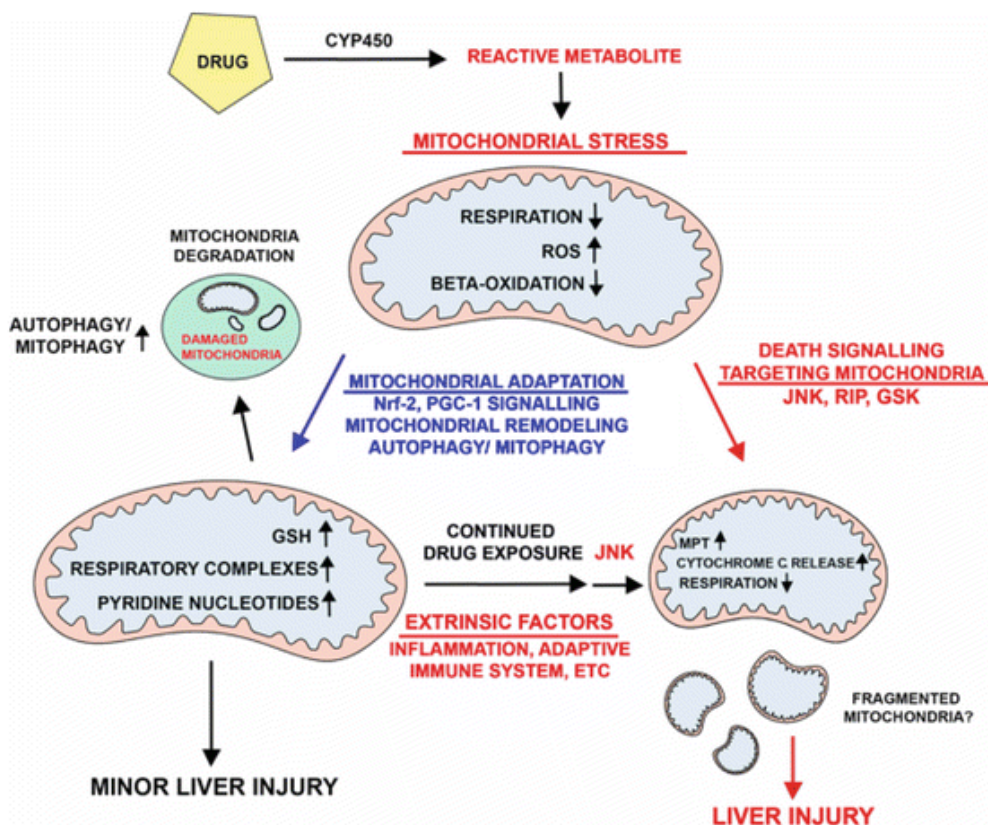
3.2.3 Mitochondriální poškození

Mitochondrie jsou buněčné organely, které mají významnou roli v buňce. Syntetizují ATP, což je pro buňku zásadní zdroj energie (Norman, 2020). Mitochondrie nejsou pouze „elektrárnou“ buňky, ale odehrává se v nich také řada důležitých metabolických procesů, například zde dochází k regulaci buněčné koncentrace vápníku, lipidů anebo k převodu buněčných signálů. Navíc se jedná o hlavní zdroj intracelulárních ROS a také o regulační centrum apoptózy. Udržování normální struktury a funkce mitochondrií je klíčové pro normální fungování buněk a lidského zdraví (Zhang et al., 2022).

Mitochondrie také hrají klíčovou roli u DILI v průběhu patologického procesu. Zaprvé přímá inhibice mitochondriálních funkcí léčivem nebo jeho reaktivním metabolitem může navodit DILI. Dále adaptační mechanismy zahrnující mitochondrie mohou pomoci vyvinout toleranci na léčivo, a zatřetí aktivace signálních drah smrti léčivem může nepřímo ovlivnit funkci mitochondrie a způsobit smrt hepatocytů (Ding a Yin, 2017).

Hepatotoxická léčiva nebo jejich reaktivní metabolity způsobují inhibici mitochondriální respirace, narušují beta-oxidaci, vyčerpávají mitochondriální GSH, zvyšují tvorbu mitochondriálních ROS a způsobují další mitochondriální poruchy, které způsobují stres nebo poškození mitochondrie (Ding a Yin, 2017).

Mitochondriální poškození je pojem označující změny různých mitochondriálních metabolických drah a narušení mitochondriálních komponent (Dragovic et al., 2016). Existuje několik typů mitochondriálních dysfunkcí.



Obr. 1. *Mechanismus mitochondriálního poškození.* Obrázek znázorňuje průběh mitochondriálního poškození. Po podání léčiva s potenciálem vzniku DILI dochází k mitochondriálnímu stresu, který se projevuje sníženou respirací, beta oxidací a zvýšenou produkcí ROS. Dále jsou možné 2 scénáře. V prvním případě dochází k mitochondriální adaptaci nebo v případě velkého poškození mitochondrie k její degradaci. Výsledkem je menší jaterní poškození. Druhým případem je vznik signálů smrti zaměřených na mitochondrii, což postupně vede k jaternímu poškození. V případě, že mitochondrie, která se adaptuje je dále vystavována podávání léčiva a zároveň jsou přítomné vnější faktory jako například zánět, může také dojít k poškození jater.

Převzato z: [web 1].

V prvním případě dochází k poškození morfologické struktury a porušení vnější membrány, které vede ke zvýšení membránové permeability (Zhang et al., 2022). Další z mechanismů souvisí s redoxní kontrolou v mitochondrii, která je nezbytná pro normální funkci hepatocytů. Při inhibici mitochondriálního elektronového transportního řetězce spojeného

s oxidativní fosforylací dochází k depleci ATP a k akumulaci ROS, což vede k aktivaci buněčné signální dráhy smrti, jak je možné vidět na Obr. 1. Dalším popsaným mechanismem je VPA (valproic acid, valproová kyselina) – indukované DILI, které vzniká na podkladě inhibice metabolismu mastných kyselin a mutace polymerázy mtDNA (mitochondrial DNA, mitochondriální DNA).

Ke změně homeostázy mitochondrie může dojít i inhibicí replikace a translace mtDNA (Villanueva-Paz et al., 2021). Mimo jiné mtDNA může být poškozena i nukleázami nebo ROS (Zhang et al., 2022).

Ve většině případů ale mitochondriální stres vyvolaný lékem není dostatečný k vyvolání hepatotoxicity. Většina pacientů se tudíž adaptuje regulací adaptačních signálních drah. Mitochondriální adaptační dráhy zahrnují autofagii/mitofáгии nebo mitochondriální remodelaci. U malé části pacientů se může vyvinout závažné onemocnění způsobené selháním adaptace jater v důsledku zánětu a dalších vnějších faktorů (Ding a Yin, 2017).

Mezi léčiva způsobující DILI mechanismem mitochondriálního poškození patří fialuridin (Dragovic et al., 2016), tolkapon, troglitazon, nefazodon, nimesulid, cerivastatin, takrin, ganciklovir a diklofenak (Villanueva-Paz et al., 2021).

3.2.4 Formování reaktivních forem kyslíku

Dalším molekulárním mechanismem vedoucím ke vzniku DILI je oxidační stres, který vzniká jako důsledek tvorby ROS (Villanueva-Paz et al., 2021). Vzhledem k tomu, že většina metabolických procesů probíhá v játrech, je jaterní tkáň vystavena oxidačnímu stresu (Norman, 2020).

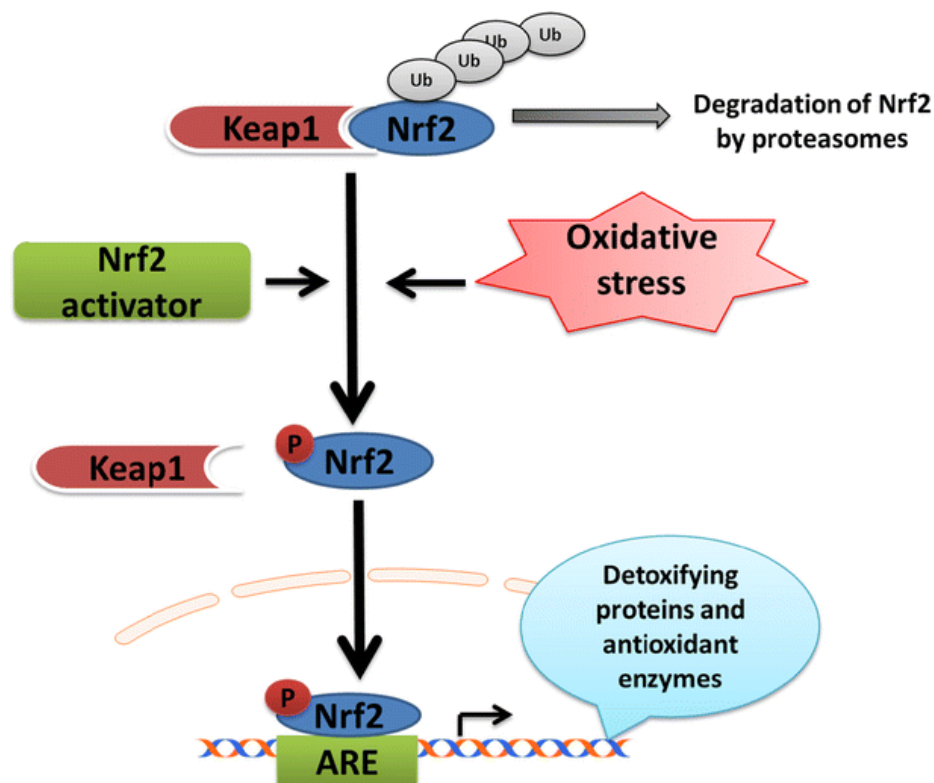
ROS jsou vedlejším produktem metabolismu a jsou také důležité pro buněčnou signalizaci a homeostázu. Nicméně některé léky, které způsobují DILI, evidentně zvyšují akumulaci ROS v hepatocytech (Villanueva-Paz et al., 2021). Mezi ROS patří mimo jiné superoxidový radikál, peroxid vodíku a hydroxidový radikál. V prevenci buněčného poškození ROS hrají klíčovou roli antioxidantní enzymy. Ochrana buňky před oxidačním poškozením zahrnuje dostatek GSH a antioxidantních enzymů SOD, katalázy nebo GPx. GSH je malý peptid, který umí relativně rychle reagovat s ROS a chránit buňku před oxidačním poškozením. Pokud ale dojde v buňce k vyčerpání přibližně 90 % GSH, významně se zvyšuje náchylnost k oxidativní smrti buňky.

Mechanismy antioxidantních enzymů fungují tak, že buď dojde k přeměně reaktivnějších ROS na peroxid vodíku nebo k přeměně ROS na vodu (Roth a Lee., 2017).

Kontrola oxidativního stresu hraje důležitou roli v patogenezi DILI. Jak bylo uvedeno, lidé jsou vybaveni antioxidantním systémem pro zachování homeostázy v játrech. Pokud však dojde k velkému oxidačnímu stresu, dochází k ohrožení orgánu na podkladě poškození intracelulárních cílů, zejména lipidů, ale také proteinů nebo DNA (Yew et al., 2018).

Na regulaci oxidačního stresu se podílí Kelch-like ECH-asociovaný protein 1 (Keap1, Kelch-like ECH-associated protein) / jaderný faktor erytroidu typu 2 (Nrf2, nuclear factor erythroid 2). Systém funguje tak, že aktivita Nrf2 je potlačena Keap1 v cytoplazmě, kdy Keap 1 obsahuje thiolové skupiny, které se váží s Nrf2. Za patologických podmínek dojde k oxidaci těchto thiolových skupin, což způsobí následnou translokaci Nrf2 do jádra, a to způsobí

podporu antioxidantní odezvy. Expres antioxidantních enzymů je řízena tímto systémem. Příkladem cílových enzymů jsou hemoxigenáza-1 nebo GST. Tato osa je detailněji znázorněna a popsána na níže uvedeném obr. 2.



Obr. 2. Schématické znázornění osy Keap1/Nrf2. Za normálních podmínek je Nrf2 konstitutivně vázán na protein Keap 1, který inhibuje signální dráhu Nrf2. Keap 1 cílí na Nrf2 kvůli ubikvitinaci a následné degradaci prostřednictvím proteazomální dráhy. Bud' oxidační stres nebo aktivátory Nrf2 nebo oba mohou způsobit disociaci komplexu Keap1/Nrf2 a fosforylaci Nrf2, která se pak přenesse do jádra. V jádře Nrf2 podporuje transkripční aktivaci antioxidantních a detoxikačních enzymů vazbou na prvky reagující na antioxidanty v promotorových oblastech cílových genů.

Převzato z: Zhang et al., 2015.

Z uvedeného vyplývá, že nerovnováha oxidačního stresu (nadměrná tvorba ROS a/nebo inhibice detoxikačních cest) se podílí na vzniku a závažnosti DILI, protože ovlivňuje mitochondriální funkce a integritu DNA. Může tak dojít k indukci buněčné smrti a k poškození jater (Villanueva-Paz et al., 2021).

U léků spojených s DILI, jako je troglitazon, flutamid, nimesulid a diklofenak bylo pozorováno, že zvyšují intracelulární oxidanty (Villanueva-Paz et al., 2021).

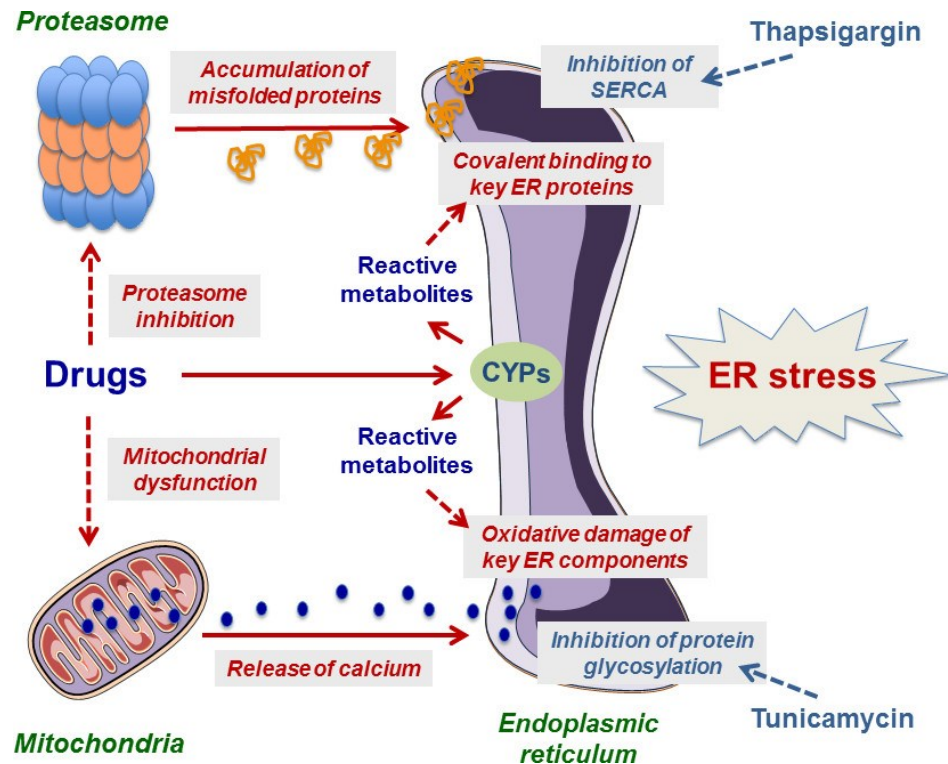
3.2.5 Stres endoplazmatického retikula

Endoplazmatické retikulum (ER, endoplasmic reticulum) je buněčná organela přítomná ve všech eukaryotních buňkách, která provádí mnoho základních buněčných funkcí včetně syntézy a zpracování proteinů, syntézy lipidů a ukládání vápníku.

ER stres nastává, když dochází k nadměrné akumulaci rozloženého a špatně složeného proteinu v ER nebo když je vyčerpán vápník ER (Liu a Green, 2019).

Přehled působení jednotlivých mechanismů stresu ER je znázorněn na Obr. 3

Bylo popsáno, že při poškození jater způsobeným podáním paracetamolu dochází k nadměrné akumulaci ROS, která způsobuje dysregulaci Ca^{2+} rovnováhy a vede ke stresu ER. Pokud naprogramované mechanismy v buňce nedokážou zmírnit stres ER, je spuštěna buněčná smrt. Jedná se o složitý mechanismus, který zahrnuje aktivaci kaspáz, únik Ca^{2+} z ER a mitochondriální poškození. S největší pravděpodobností mitochondriální poškození, které vede k aktivaci signálních drah buněčné smrti a stres ER jsou související mechanismy, což ukazuje na složitost patofyziologie DILI (Villanueva-Paz et al., 2021).



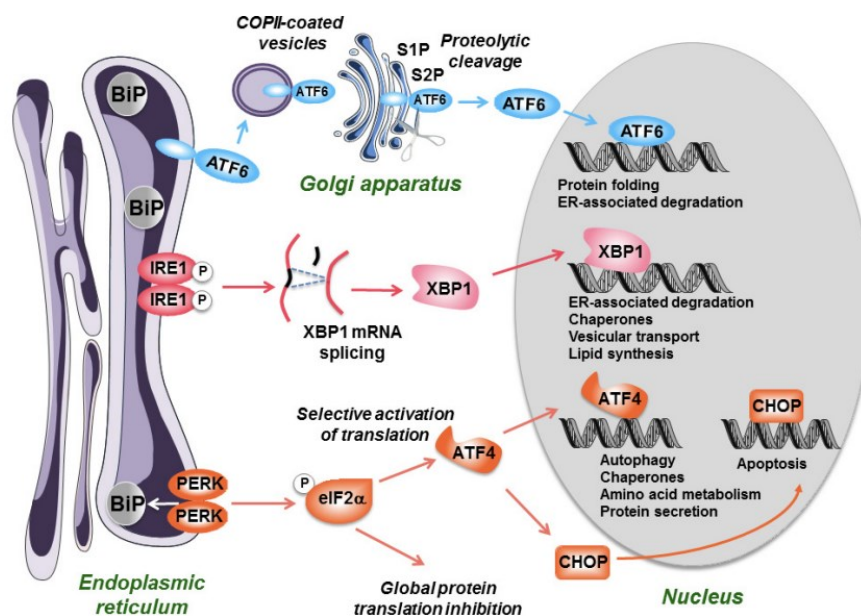
Obr. 3. Mechanismus stresu ER. Léky mohou vyvolat stres ER prostřednictvím různých mechanismů. Může dojít k inhibici proteazomu a následně k akumulaci nesprávně složených proteinů nebo k mitochondriální dysfunkci a k uvolnění vápníku. Dále také může docházet k alteraci klíčových složek ER, tento mechanismus je předpokládán u léků, které jsou transformovány na jeden nebo několik reaktivních metabolitů schopných vázat se kovalentně na proteiny ER nebo indukovat oxidační poškození složek ER. CYP se často podílí na tvorbě reaktivních metabolitů. Obrázek znázorňuje i příslušné cíle pro thapsigargin a tunicamycin, což jsou dva prototypické induktory stresu ER. Thapsigargin způsobuje inhibici SERCA (sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase, Ca^{2+} ATPáza sarko/endoplazmatického retikula) a tunicamycin inhibuje glykosylaci proteinů.

Převzato z: Foufelle a Fromenty, 2016.

Hromadění špatně složených nebo rozložených proteinů v ER za různých patologických stavů nebo při vystavení určitým farmakologickým sloučeninám vede ke stresu ER a k aktivaci UPR (unfolded protein response,

odpověď na rozložené proteiny) stresové signalizační kaskády, jejíž průběh je popsán na Obr. 4.

Signální dráha UPR byla dobře popsána u eukaryotických buněk. Skládá se ze tří transmembránových proteinů PERK (PRKR-like endoplasmic reticulum kinase, kináza endoplazmatického retikula podobná PRKR), IRE1 α (inositol requiring enzyme 1 α , enzym typu 1 α vyžadující inositol) a ATF6 (activating transcription factor 6, aktivační transkripční faktor 6) a jednoho chaperonu BiP/GRP78 (binding immunoglobulin protein/78kDa glucose-regulated protein, vazebný imunoglobulinový protein/78kDa glukózou regulovaný protein) (Ding a Yin, 2017). N-konec těchto proteinů je umístěn v lumen ER a C-konec je v cytosolu, takže spojují 2 buněčné kompartmenty. V momentě, kdy je homeostáza ER narušena, a nadbytek nesbalených/chybně složených proteinů se hromadí v ER, tři ER senzory jsou aktivovány prostřednictvím disociace z chaperonu a/nebo přímou asociací s nesbaleným nebo chybně složeným proteinem, což iniciuje následnou UPR signalizační kaskádu, kterou máme znázorněnu na Obr. 4 (Liu a Green, 2019).



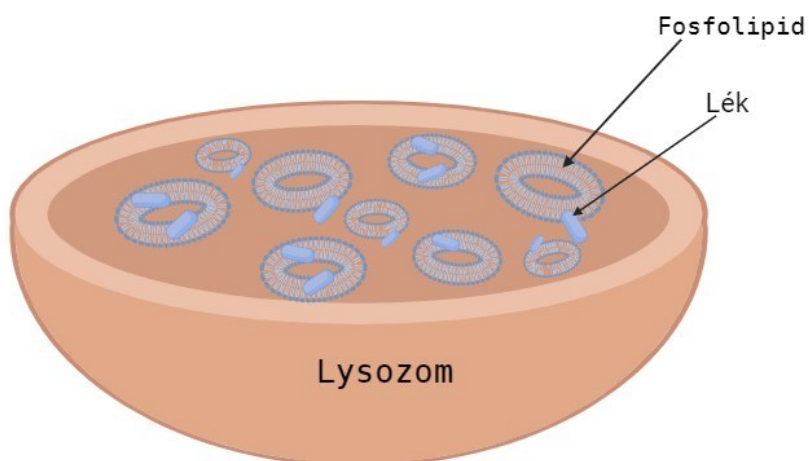
Obr. 4. *Popis UPR cesty.* Když dojde ke stresu ER buňka zahájí adaptivní reakci – UPR. Začíná aktivací tří efektorů PERK, IRE1 (inositol-requiring enzyme type 1, enzym typu 1 vyžadující inositol) a ATF6. Dále dochází k odstranění chaperonu BiP, který je udržuje v deaktivovaném stavu. PERK je kináza, která fosforyluje a inaktivuje elongační iniciační faktor eIF2 α (eukaryotic initiation factor 2, eukaryotický iniciační faktor 2), což vede k obecnému poklesu translace proteinů. Dále eIF2 α selektivně stimuluje translaci ATF4 (activating transcription factor 4, aktivační transkripční faktor 4) transkripčního faktoru, který pak aktivuje syntézu chaperonů a proteinů zapojených do autofagie a metabolismu aminokyselin. IRE1 má kinázovou aktivitu vedoucí k její autofosforylaci a aktivaci RNAsové aktivity, což vede k sestřihu mRNA XBP1 (X-box binding protein 1, X-box vazebný protein 1), která je následně přeložena do aktivního transkripčního faktoru. Transkripční faktor ATF6, který je navázaný na membrány ER jako neaktivní prekurzor je přenesen vezikuly do Golgiho aparátu, kde je štěpen S1P a S2P proteázami do aktivní formy. XBP1 a ATF6 dále aktivují v jádře transkripci souboru faktorů umožňujících obnovit homeostázu ER včetně chaperonů a proteinů zapojených do degradace nesbalených polypeptidů. Pokud nejsou tyto mechanismy účinné pro obnovení buněčné homeostázy ER, UPR nakonec aktivuje mechanismy vedoucí k buněčné apoptóze.

Převzato z Foufelle a Fromenty, 2016.

3.2.6 Lysozomální poškození

Lysozomy jsou membránové organely přítomné v živočišných buňkách obsahující kyselé hydrolázy. Jedná se o terminální degradační kompartmenty potřebné pro trávení intracelulárního materiálu (Luzio et al., 2007).

Dalším možným mechanismem vzniku DILI je lysozomální poškození vznikající v důsledku podávání léčiv, které indukují fosfolipidózu (DIPL, drug-induced phospholipidosis) neboli akumulaci fosfolipidů (Sagini et al., 2021).



Created in BioRender.com 

Obr. 5: Mechanismus lysozomálního poškození.

Léčivo vytváří komplexy s fosfolipidy, které se hromadí a zvětšují lysozomy.

Vytvořeno v programu BioRender.com

Většina induktorů DIPL jsou kationická amfifilní léčiva, která jsou po vstupu do buněk protonizována v kyselém prostředí lysozomů. Kladně nabitě molekuly nemohou procházet zpět přes membránu. V důsledku toho se lék hromadí v lysozomech a jako kladně nabitě léčivo tvoří nekovalentní komplexy s fosfolipidy. Pokud nejsou komplexy lék-fosfolipid degradovány, pak se postupně hromadí ve formě zvětšených lysozomálních

tělísek (Dragovic et al., 2016), jak můžeme názorně vidět na vytvořené grafice viz. Obr. 5.

Příkladem léčiva způsobující DIPL je antiarytmikum amiodaron.

3.2.7 Inhibice transportu žlučových kyselin

Dalším mechanismem podílejícím se na vzniku DILI je inhibice transportu žlučových kyselin. DILI, na jehož vzniku se podílí tento mechanismus, se projevuje jako cholestatické nebo smíšené cholestatické a hepatocelulární poškození jater.

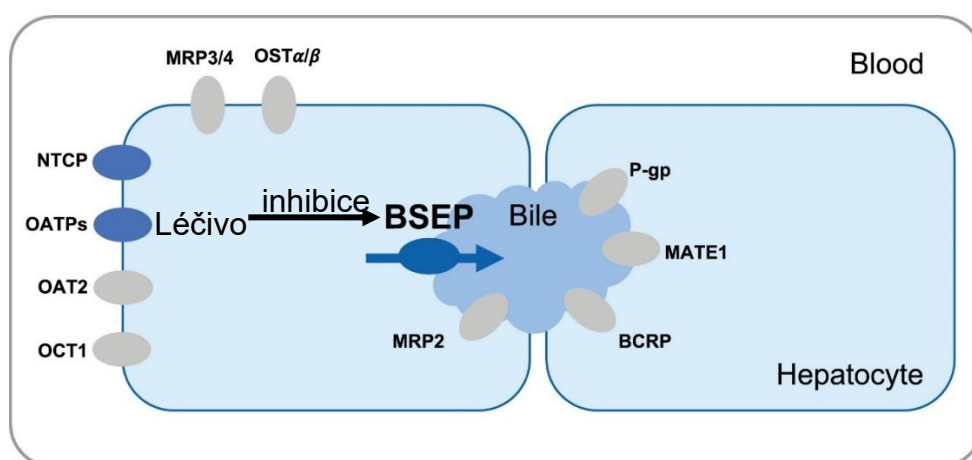
Tok žluči je regulován prostřednictvím několika bazolaterálních a kanalikulárních transportních proteinů. Mezi tyto transportní proteiny patří například MDR1 (multidrug resistance protein 1, protein multilékové rezistence 1), BSEP a také MRP neboli ABCC2 (ABC subfamily C member 2, ABC transportér, podrodina C, člen 2) (Almazroo et al., 2017).

Předpokládá se, že BSEP hraje klíčovou roli pro vznik DILI (Dragovic et al., 2016). Kanalikulární BSEP je jednosměrný exfluxní transportér umístěný na membráně hepatocytů, který umožňuje drenáž žlučových solí do kanálků (Allison et al., 2023). Je kódován genem ABCB11 (ABC subfamily B member 11, ABC transportér, podrodina B, člen 11), který je lokalizovaný na dlouhém raménku chromosomu 2 (Kubitz et al., 2012). Inhibice BSEP byla navržena jako mechanismus vzniku léky indukované cholestázy (Villanueva-Paz et al., 2021), protože retence žlučových kyselin přispívá k hepatocelulárnímu stresu, jak můžeme pozorovat na Obr. 6. (Allison et al., 2023). To je v souladu s pozorováním, kdy úplný geneticky podmíněný nedostatek BSEP vede k cholestatickému poškození jater a jejich selhání (Villanueva-Paz et al., 2021).

Avšak celková souhra mechanismů cholestázy vyvolané léky zůstává nedostatečně objasněna (Dragovic et al., 2016).

Inhibice BSEP sama o sobě nestačí k určení jednoznačného rizika DILI a je třeba zvážit vliv dalších faktorů vzniku DILI, jako je například mitochondriální dysfunkce (Villanueva-Paz et al., 2021).

Nedávné důkazy o léčích vylučovaných do žluči naznačují, že tyto léky jsou primárními kandidáty vyvolávajícími u pacientů cholestatické onemocnění jater (Dragovic et al. 2016). Mezi léčiva, u nichž vzniká DILI tímto mechanismem patří cyklosporin, troglitazon a bosentan (Dragovic et al., 2016).



Obr. 6. *Mechanismus inhibice transportu žlučových kyselin.* Schéma uvádí hlavní transportéry žlučových solí z krve do hepatocytů, a to NTCP (Sodium taurocholate cotransporting polypeptide, polypeptid kotransportující taurocholát sodný) a OATP (organic anion transporting polypeptide, polypeptidy transportující organické anionty). Transport z hepatocytů do žlučových kanálek, zajišťuje BSEP, jehož inhibice je předpokladem vzniku DILI.

Převzato z: Rodríguez-Pérez a Gerebtzoff, 2021.

3.2.8 Aktivace imunitní odpovědi

Aktivace imunitního systému, která je vyvolána léky, představuje rozmanitý soubor idiosynkratických reakcí (Roth a Lee., 2017).

V játrech se nachází různé populace imunitních buněk jak vrozené, tak adaptivní imunity (Allison a kol., 2023). Makrofágy zvané Kupfferovy buňky (KC, Kupffer cells) po expozici léku iniciují zánět v játrech. Kromě Kupfferových buněk jsou v játrech i jiné lymfocyty včetně dalších makrofágů, T buněk, B buněk a přirozených zabíječů (NK, natural killers) (Roth a Lee., 2017). Předpokládá se, že imunitní systém hraje zásadní roli při zahajování DILI, ale i při zotavování organismu (Allison et al., 2023).

Játra jsou často vystavena cizím antigenům kvůli své biologické filtrační roli, a proto jsou schopna vykazovat imunitní toleranci vůči cizím antigenům. V případě lékově indukované hepatotoxicity je tato tolerance omezená, případně inhibovaná. To může znamenat, že imunitní reakce vede k poškození jaterní tkáně (Allison a kol., 2023).

Imunitní odpověď je aktivována pomocí různých mechanismů, které jsou znázorněny na Obr. 7.

Níže je uvedeno několik hypotéz, které popisují léky navozenou aktivaci imunitního systému.

Haptenová hypotéza

Hapteny jsou malé molekuly (včetně léčiv), které vyvolávají imunitní odpověď, když dojde k jejich kovalentní vazbě na endogenní proteiny. Tvoří tak adukty (Villanueva-Paz et al., 2021). Následně se adukt lék – protein vchytná antigen prezentujícími buňkami (APC, antigen presenting cells) a je prezentován na hlavním histokompatibilním komplexu (MHC, major histokompatibilní komplex) třídy II T buňkám, které vyvolají adaptivní imunitní odpověď (Villanueva-Paz et al., 2021). Dochází k tvorbě pomocných a cytotoxických T buněk rozpoznávajících antigen.

Další prezentace antigenu hepatocyty ve spojení s MHC typu I aktivuje humorální a buněčnou imunitu, což může vést k poškození jater. Zánětlivou reakci způsobuje řada prozánětlivých cytokinů jako například TNF, FasL (Fas ligand) nebo IFN – γ (interferon gamma, interferon gama) (Bleibel et al., 2007).

Tato hypotéza není úplná a existují nedostatky. Například nedokáže vysvětlit, proč se DILI vyvine pouze u menšího počtu pacientů, i když bylo popsáno, že léčivo vytváří adukty. Není bez zajímavosti, že flukloxacilin, známý svou hepatotoxicitou, má na haptenu závislý a na haptenu nezávislý mechanismus imunitní aktivace (Villanueva-Paz et al., 2021).

Hypotéza nebezpečí

Tato teorie rozšiřuje koncept hapténové hypotézy. Pracuje s předpokladem, že k aktivaci adaptivní imunitní odpovědi je potřeba nejen přítomnost hapténů, ale také „signál nebezpečí“.

Po poškození buněk a aktivaci buněčné smrti se uvolňují antigeny, které jsou odvozeny od DAMP a představují zmíněný signál. Tyto antigeny se vážou na receptory rozpoznávající vzory (PRR, pattern recognition receptors) na APC.

Hypotéza farmakologické interakce

Předpokládá, že chemicky inertní látky mohou aktivovat určité T buňky tak, že přímo tvoří nekovalentní interakce s jejich MHC molekulami a spouští aktivaci imunitního systému (Villanueva-Paz et al., 2021).

Hypotéza změněného repertoáru peptidů

Tato hypotéza je často považována za součást hypotézy farmakologické interakce, s klíčovým rozdílem spočívajícím v tom, že se endogenní peptidy vážou na komplex lék – MHC (Villanueva-Paz et al., 2021).

Tato hypotéza naznačuje, že léky mohou způsobit nesprávné zacílení imunitních buněk proti endogenním peptidům, což může vést k autoimunitní reakci. To proto, že i chemicky inertní léky mohou vytvářet nekovalentní interakce s komplexy MHC, což mění jejich vazebnou kapsu a modifikuje imunitní odpověď (Allison et al., 2023).

Hypotéza více determinant

Hypotéza naznačuje, že vznik DILI je důsledkem komplexního působení mnoha faktorů, jako jsou pohlaví, věk, genetické predispozice, vnější prostředí a fyziologické faktory. Tyto faktory zvyšují pravděpodobnost nežádoucí jaterní příhody. Pokud se ale neprojeví více faktorů současně, DILI se nevyvine. To může pomoci vysvětlit, proč je DILI tak vzácné, přesto, že je například četnost příslušných genetických polymorfismů v populaci častá (Villanueva-Paz et al., 2021).

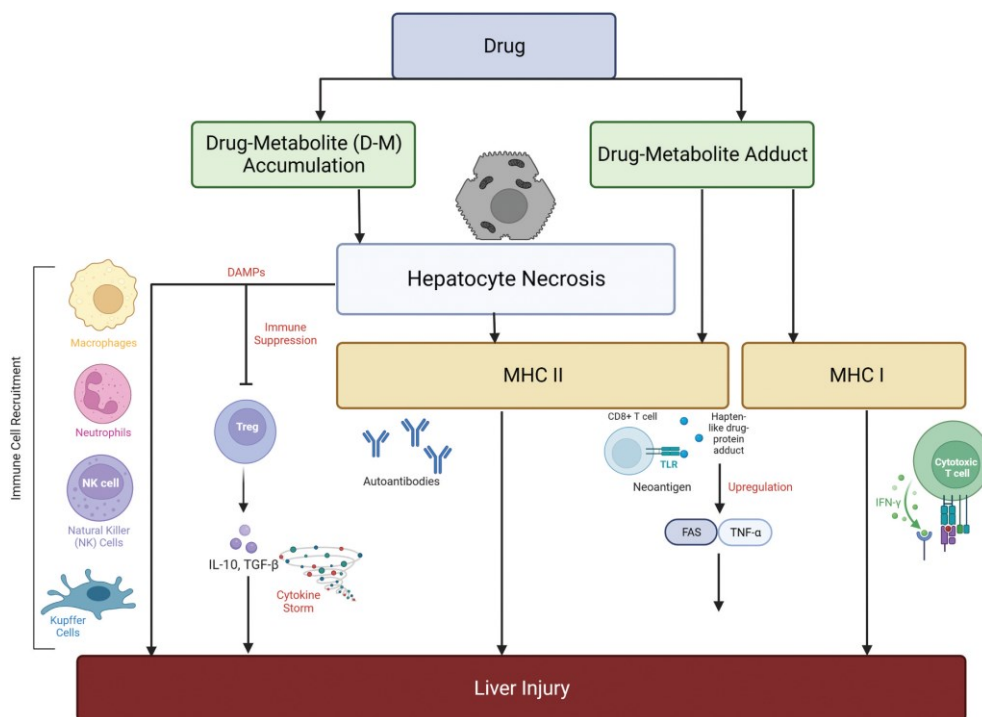
Hypotéza zánětlivého stresu

Tato hypotéza říká, že k poškození jater léčivy je nezbytný souběh zánětu jater s léčbou (Villanueva-Paz et al., 2021).

Dalším potenciálním mechanismem vzniku imunitního DILI je předpoklad, že haplotyp lidského leukocytárního antigenu (HLA, human leukocyte antigen) ovlivní rozpoznání buněk prezentujících poškozené motivy imunitním systémem. HLA kóduje MHC u lidí, konkrétně geny HLA-A, HLA-B, HLA-C určují strukturu MHC I a HLA-DP, HLA-DQ, HLA-DR kódují strukturu MHC II. „Roth a Lee (2017) v článku uvádí, že pro MHC I je celkem 1,7 miliardy haplotypů a pro MHC II je 10^{15} haplotypů.“ Obecně platí, že některé HLA polymorfismy jsou spojené se zvýšenou náchylností k DILI (Roth a Lee., 2017).

Imunologické DILI je také spojeno s modelem selhání adaptace, který předpokládá dysfunkci v expresi cytokinů. Při standardním zánětu

podskupina makrofágů, v případě jater KC, fagocytují antigeny z mrtvých/ odumírajících buněk zvané DAMP před jejich prezentací na MHC.



Obr. 7 Mechanismy aktivace imunitní odpovědi. Poškození hepatocytů může být způsobeno akumulací léčiva v buňce. Následně uvolněné DAMP aktivují přirozené zabijáče a KC. Další mechanismus aktivace imunitní odpovědi zahrnuje adukty léčivo – protein, které jsou prezentovány na MHC I a II, a to iniciuje imunitní kaskádu vedoucí k poškození hepatocytů.

Převzato z: Allison et al., 2023

Dále mohou na antigen reagovat cirkulující makrofágy, dendritické buňky nebo neutrofilové. Prezentace vede buď k iniciaci buněčné imunitní odpovědi nebo k humorální imunitní odpovědi. Za normálních okolností následně zánět ustupuje prostřednictvím aktivity T regulačních buněk, které produkují transformační růstový faktor beta. Deregulace cytokinů je potenciálním mechanismem imunologického DILI. Zánětlivé poškození jater způsobuje nadbytek prozánětlivých cytokinů a snížení regulačních cytokinů, což vede celkově k úmrtí jaterních buněk spíše, než k cílení na buňky, které exprimují motivy poškození. Tuto deregulaci zánětlivých cytokinů lze nalézt u nesteroidních protizánětlivých léků nebo antibiotik (Roth a Lee., 2017).

3.3 Seznam vybraných léčiv dle molekulárního mechanismu DILI

U některých léčiv nezpůsobuje DILI pouze jeden mechanismus. Příkladem může být amiodaron. Jedná se o kationtovou amifilní sloučeninu se sklonem k akumulaci v prostředí organel bohatých na lipidy. Amiodaron tak ovlivňuje jak mitochondriální, tak lysozomální funkce (Dragovic et al., 2016).

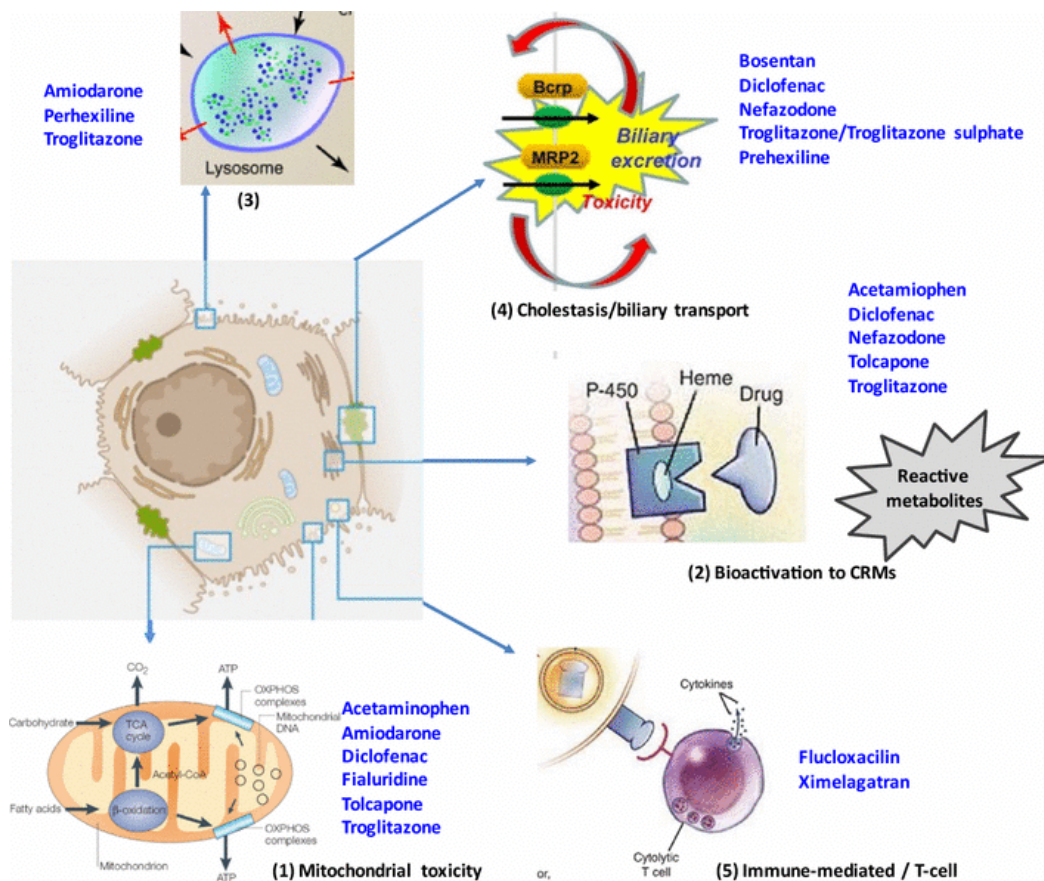
Souhrn dosud známých mechanismů, které mohou kombinovaně působit, je uveden níže na Obr. 8.

Tab. 2 Přehled hepatotoxických léčiv dle mechanismu

Mechanismus	Zástupci
Mitochondriální dysfunkce	acetaminofen, amineptin, amiodaron, dronedaron, kyselina acetylsalicylová, benzon, diklofenak, diflunisal, fialuridin, isoniazid, mefenamová kyselina, nefazodon, nimesulid, perhexilin, stavudin, tamoxifen, tianeptin, tolkapon, trazodon, troglitazon, valproát (Ding a Yin, 2017), cerivastatin, takrin, ganciklovir (Villanueva-Paz et al., 2021)
Formování reaktivních forem kyslíku	isoniazid (Yew et al., 2018), troglitazon, flutamid, nimesulid, diklofenak (Villanueva-Paz et al., 2021)
Stres endoplazmatického retikula	acetaminofen, amiodaron, isoniazid, metotrexát, troglitazon, erlotinib, diklofenak
Lysozomální poškození	amiodaron, fialuridn, perhexilin, tamoxifen, karbamazepin (Dragovic et al., 2016)

Inhibice transportu žlučových kyselin	cyklosporin, troglitazon, bosentan (Dragovic et al., 2016) karbamazepin, amoxicillinklavulanát, sulfamethoxazol, floxuridin (Allison et al., 2023), diklofenak, perhexilin, tolkapon, nefazodon (Dragovic et al., 2016)
Aktivace imunitní odpovědi	amodiaquin, alopurinol (web 2), halothan, sulindac, sulfamethoxazol, chlorpromazin, flukloxacillin, amoxicillinklavulanát, (Allison et al., 2023), acetaminofen, ximelagatran (Dragovic et al., 2016)

Mezi veřejné zdroje informací o hepatotoxických léčivech patří například Liver tox (web 2), což je on-line databáze. Byla vytvořena v roce 2012 a poskytuje aktuální klinické informace týkající se přibližně 600 léků v současnosti schválených FDA v USA. Popisuje klinické případy a také generuje skóre hodnocení jednotlivých případů na základě diagnostického nástroje RUCAM (Roussel Uclaf causality assessment method, metoda hodnocení kauzality Roussel Uclaf). Dále byl vytvořen soubor léků, které byly spojeny s ALF a byly nahlášeny do hlavních registrů a dalších databází (Unzueta a Vargas, 2013). Informace o hepatotoxicky působících léčivech lze nalézt i na stránkách FDA, konkrétně se jedná o Drug Induced Liver Injury Rank (DILI Rank) Dataset (datový soubor hodnocení poškození jater vyvolaného léky) (web 3). Jedná se o největší referenční seznam léků seřazených podle rizika rozvoje DILI u lidí.



Obr. 8 Souhrnný obrázek mechanismů souvisejících s DILI s uvedenými modelovými hepatotoxickými léčivy.

Zdroj: Dragovic et al., 2016

3.4 Preklinické a klinické testování

Preklinické testování je realizováno na buněčných kulturách a experimentálních zvířatech. Zvířecí studie zkoumají bezpečnost léčiv v dávce ekvivalentní lidským dávám, farmakodynamiku, tedy mechanismus účinku a vztah mezi hladinou léčiva a klinickou odpovědí a dále farmakokinetiku, tedy absorpci, distribuci, metabolismus a exkreci léčiva a potenciální interakce lék-lék. Tato data musí být předložena ke schválení příslušným úřadům, pokud má být léčivo dále klinicky studováno (Umscheid et al., 2015).

3.4.1 Hodnocení DILI v *in vitro* modelech

Cílem *in vitro* screeningu hepatotoxicity léčiv je identifikovat molekuly, které jsou potenciálně toxické pro lidská játra (Gomez-Lechon et al., 2010). *In vitro* testy hepatotoxicity se využívají během ranného vývoje léku. Přesto, že mají poměrně nízkou citlivost jsou v preklinickém testování široce používány, protože jsou finančně dostupné (Babai et al., 2021). Buněčné modely představují také cenné nástroje k pochopení mechanismů DILI.

Cílem této oblasti je i vývoj robustního multiparametrického screeningu, který by pokryl širší spektrum klíčových mechanismů DILI. Urychlil by se tak proces vývoje léčiv. Technologický pokrok v oborech jako je genomika, proteomika, a metabolomika hraje velmi důležitou roli při odhalování nových biochemických drah, biologických procesů a hepatotoxických biomarkerů. *In vitro* testy se však musí validovat na souboru léčiv, které vyvolávají hepatotoxicitu několika různými mechanismy (Gomez-Lechon et al., 2010).

Současné konvenční *in vitro* protokoly však zahrnují hodnocení pouze jednoho nebo několika málo sledovaných parametrů. Většina testů je založena na životaschopnosti buněk, na odhadech počtu buněk, integritě membrány a aktivitě různých enzymů v buňkách. Klasické testy měří, například uvolňování cytosolových enzymů jako důsledek změn membrány. V současné době se nejčastěji používají testy cytotoxicity založené na odhadu funkčního nebo metabolického stavu buňky. Tyto metody často hodnotí přeměnu substrátu

na produkt, který lze kvantifikovat pomocí absorbance, fluorescence nebo bioluminiscence (Gomez-Lechon et al., 2010).

Stanovení priorit a optimalizace struktury chemických sloučenin představuje důležitý úkol při vývoji léků. Vytvoření a použití *in vitro* screeningových systémů odrážejících lidskou *in vivo* toxicitu např. DILI je zapotřebí pro posouzení bezpečnosti léčiv.

***In vitro* kultivované jaterní buňky pro hodnocení DILI**

Existuje řada buněčných modelů, které mohou být užitečné pro identifikaci a studium mechanismů DILI – kultury primárních lidských hepatocytů, buněčné linie odvozené z nádoru jater, geneticky upravené jaterní buňky a lidské hepatocyty odvozené od pluripotentních kmenových buněk (Kuna et al., 2018).

Primární kultury lidských hepatocytů jsou považovány za zlatý standard pro vytvoření modelů jaterních buněk relevantních pro člověka. Podávají prediktivní výsledky ve farmakologickém a toxikologickém výzkumu *in vitro*. Nevýhodou je jejich nestabilní fenotyp a postupná dediferenciace v kultuře (Kuna et al., 2018).

Mezi výhody buněčných linií odvozených z nádorů jater patří dobrá dostupnost, snadná manipulace a neomezená proliferace. V současné době použitelnost HepG2, Hep3B, HuH7 a dalších je omezená z důvodu jejich dediferencovaného fenotypu a nedostatečné metabolické funkce. Velmi široce používány jako model pro hodnocení DILI jsou HepaRG buňky, které byly odebrány od pacientky trpící chronickou infekcí hepatitidy C a hepatokarcinomem. Několik studií ukázalo, že HepaRG buňky mají relativně podobné hladiny exprese enzymů první a druhé fáze metabolismu a jaderných receptorů jako primární lidské hepatocyty (PHH, primar human hepatocytes). Ve srovnání s jinými buněčnými kulturami se buňky HepaRG ukázaly jako vhodný nástroj pro studium některých chronických účinků léčiv (Kuna et al., 2018).

Rekombinantní buněčné modely jsou využívány pro studium jaterního metabolismu léčiv (Kuna et al., 2018). Jedná se o buňky vytvořené genetickou modifikací, což vede k úpravě jejich funkce.

Nedávné studie ukázaly, že jaterní buňky odvozené z lidských pluripotentních kmenových buněk (indukované hepatocyty iHep), jsou použitelné pro potenciální modelování toxicity léčiv *in vitro*. Vzhledem k tomu, že iHep mají fenotyp relativně podobný hepatocytům, pak toxicitní testy na iHep mohou být přesnější než testy prováděné na některých nádorových buněčných liniích. Je však nutné zdůraznit, že se kompletní diferenciací kmenových buněk na hepatocyty zatím nepodařila (Kuna et al., 2018).

Jaterní tkáňové inženýrství

Údaje získané ze stávajících *in vitro* modelových systémů často nedokážou předpovědět hepatotoxicitu testovaných léčiv. Proto je potřeba vyvinout nové a lepší modely. Ty může poskytnout tkáňové inženýrství. Je známo, že primární hepatocyty v kultuře ztrácí své fenotypové charakteristiky a životaschopnost. Společná kultivace s neparenchymovými buňkami (NPC, non-parenchymal cells), jako jsou KC nebo sinusoidní endotelové buňky vedly v experimentech k dlouhodobému udržení fenotypu a životaschopnosti hepatocytů. Hepatocyty kultivované společně s NPC navíc v 3D systému poskytly ještě lepší model pro studium DILI vzhledem k vyšší míře podobnosti s *in vivo* tkáňovou architekturou. Nedávná studie ukázala, že proteom hepatocytárních sféroidů zůstal podobný jako u dárcovské jaterní tkáně. Navíc interindividuální rozdíly mezi dárci hepatocytů lze využít ke studiu hepatotoxicity u pacientů s konkrétním genotypem. Zdá se, že 3D kultury mají řadu výhod ve srovnání s 2D *in vitro* modely, ale stále jsou potřeba další studie k rozsáhlému srovnání jejich citlivosti a specifity predikovat DILI (Kuna et al., 2018).

3.4.2 Zvířecí modely

Experimentální zvířata jsou užitečnými modely pro studium DILI a jeho patogeneze. Navzdory zavádění nových systémů buněčných kultur, experimenty na zvířatech jsou v současnosti nevyhnutelnou součástí preklinického vývoje léčiv. Testování na zvířatech je nutné především kvůli tomu, že laboratorní buněčné modely nejsou zcela reprezentativní pro lidskou funkci jater, což platí zejména s ohledem na nedostatek imunitního systému, který hraje důležitou roli při vývoji DILI (Kuna et al., 2018). Zvířecí modely předvídatelného DILI patří z hlediska techniky mezi relativně jednoduché. Většinou stačí zvířeti podat velkou dávku léčiva, která vyvolá hepatotoxicitu. Nicméně pro správné využití těchto modelů je nezbytné porozumět také mechanismům toxicity. V kontextu předvídatelného DILI je acetaminofen přímo učebnicovým příkladem, a předávkování u myši je zdaleka nejčastějším modelem DILI. Dalším příkladem je tetrachlormethan, který je možné použít ve studiích chronického DILI a fibrózy, dále se dá využít i thioacetamid.

Zvířecí modely pro idiosynkratické DILI s sebou přináší větší technické výzvy. Dosáhnout nežádoucí reakce na lék, u kterého je známo, že způsobuje DILI u lidí, obvykle vyžaduje premedikaci zvířat nebo genetickou úpravu, navrženou k predispozici zvířat k rozvoji DILI. Bohužel příprava modelu má potenciál ovlivnit jeho klinickou relevanci. Zatím se používají tři různé přístupy, které buď indukují zánět, způsobí potlačení imunitní tolerance nebo vedou ke genetické manipulaci funkce mitochondrií (McGill a Jaeschke, 2019). Jednotlivé přístupy budou popsány v následujících kapitolách.

Model vyvolání zánětu

Model vyvolání zánětu („inflammagen“ model) využívá zvířata, která jsou buď předem, současně nebo následně ošetřena bakteriálním lipopolysacharidem (LPS, lipopolysaccharide) s cílem vyvolat zánět. Model vychází z dříve uvedené hypotézy zánětlivého stresu. Tento model byl úspěšně použit k vyvolání reprodukovatelného jaterního poškození u krys pomocí nízkých dávek několika testovaných léků, které způsobují DILI u lidí. Model je sice užitečný pro výzkum, ale jeho relevance pro lidský organismus může být omezena, zejména z důvodu aplikace LPS (McGill a Jaeschke, 2019).

„Utrecht-Pohl model“

Další model idiosynkratického DILI spočívá v potlačení imunitní tolerance v játrech. Tento přístup vychází z předpokladu, že léky, které způsobují vážné DILI, také způsobují vyšší incidenci mírného poškození jater. Většina pacientů se přizpůsobí počátečnímu mírnému poškození, což naznačuje, že se vyvíjí imunitní tolerance, která brání selhání jater. To vedlo k hypotéze, že porušení imunitní tolerance je nezbytné pro vytvoření kompletního modelu DILI. Jedná se o relativně nový přístup a vyžaduje další ověření s modelovými léky. I když existují experimentální důkazy o udržovaném poškození jater v tomto modelu, skutečné selhání jater po podání modelového léčiva doposud nebylo pozorováno. Strategie používané k narušení imunitní tolerance u myší jsou extrémní. Je tak nepravděpodobné, že zcela odráží situaci u lidí (McGill a Jaeschke, 2019).

Subklinická mitochondropatie

Přesto, že existuje obecný konsensus s tím, že idiosynkratické DILI zahrnuje adaptivní imunitní systém, bylo však popsáno, že asociace s variantami HLA jsou slabé a nedostačují k úplnému vysvětlení rizika u pacientů. V souladu s tím bylo potvrzeno, že i neimunitní mechanismy mohou hrát významnou roli. Jedna studie vedla k hypotéze, že některé případy DILI lze přisoudit subklinické dysfunkci mitochondrií. Avšak experimentální pokusy o reprodukci těchto výsledků byly nejednoznačné (McGill a Jaeschke, 2019).

Mezi dostupnými modely se jeví, že model Utrecht-Pohl vyniká jako nejpřesnější v simulaci lidských podmínek. Tento model naznačuje, že ztráta imunitní tolerance je pravděpodobně klíčovou součástí mechanismů DILI. Doposud však neexistuje kompletní model vážného idiosynkratického DILI s vývojem selhání jater. Dalším problémem je, že modely byly navrženy s ohledem na hepatocelulární formu DILI a měly by být ověřeny také pro cholestatické a smíšené formy DILI (McGill a Jaeschke, 2019).

Predikční schopnost zvířat identifikovat DILI je poměrně nízká. Uvádí se, že shoda mezi preklinickými a klinickými studiemi byla pozorována u 63 % studií na nehlodavcích, primárně na psech a ve 43 % na hlodavcích, především na potkanech. Tím pádem průměrná shoda mezi jaterní toxicitou u lidí a zvířat zůstává okolo 55 %. Falešně negativní výsledky ve studiích na zvířatech lze vysvětlit nedostatkem predispozičních faktorů, jako jsou základní onemocnění a podle živočišných druhů, i rozdíly týkající se biologické dostupnosti a metabolismu léčiva (Babai et al., 2021).

Ačkoli běžné experimentální modely (myši, krysy, psi a opice) všechny exprimují homology hlavních CYP jako u lidí, ne všechny mají stejnou substrátovou specifitu. Ve skutečnosti CYP2E1 je jediným lidským CYP, který je zachovaný napříč druhy. Obecně platí, že myši mají největší podobnost v celkové funkci CYP s lidmi mezi běžnými výzkumnými druhy, zatímco krysy jsou nejvíce odlišné. Rozdíly v expresi nebo funkci jiných enzymů mohou být také důležité. Celkově je při použití zvířecích modelů DILI zásadní vzít v úvahu

druhové rozdíly v metabolismu léčiv (McGill a Jaeschke, 2019). Z toho důvodu se preklinické strategie v posledních letech vyvinuly tak, aby zahrnovaly sofistikovanější lidské *in vitro* buněčné modely (Walker et al., 2020).

3.4.3 Klinické testování

Na preklinické testování léčiv navazuje klinické testování, které je rozděleno do 4 fází. První fáze studie je určena k testování bezpečnosti a maximální tolerované dávky (MTD, maximum tolerated dose) léku. Ve fázi jedna dochází k prvnímu podání látky člověku, obvykle se podává malému počtu zdravých nebo nemocných dobrovolníků v otevřené studii. MTD neboli dávka léčiva před dávkou toxickou bývá stanovena několika různými statistickými modely. Dochází zde také ke zvyšování dávky, které je založeno na velmi přísných kritériích a subjekty jsou pečlivě sledovány, zda se u nich po dostatečně dlouhou dobu neprojeví toxicita léčiva. Druhá fáze studie je prováděna na větší skupině dobrovolníků než fáze první. Skupina je tvořena dobrovolníky, kteří trpí daným onemocněním. Cílem je otestovat bezpečnost, farmakodynamiku a farmakokinetiku léčiva, ale také mohou být získány odpovědi na otázky, jako je stanovení optimálních dávek, četnost dávek nebo způsob podání, které jsou podstatné pro třetí fázi. Následná třetí fáze studie probíhá s vyšším počtem účastníků a také na různorodější populaci, aby bylo možné sledovat účinnost léčiva a zároveň stanovit četnost nežádoucích účinků. Vzhledem k tomu, že počet účastníků většinou nepřesahuje 300 až 3000, výsledky nemusí mít takovou vypovídací schopnost, aby byly odhaleny vzácnější nežádoucí účinky. To zdůrazňuje význam studií fáze IV při identifikaci méně častých nežádoucích účinků (Umscheid et al., 2015).

3.5 Význam a metody zjišťování DILI

3.5.1 Současné biomarkery

Riziko DILI je zjišťováno a vyhodnocováno v klinické fázi vývoje léčiva několika přístupy, které jsou uvedeny níže. Jedním z přístupů pro zjišťování možného rizika DILI jsou pracovní skupinou expertů zveřejněné pokyny pro diagnózu a klasifikaci DILI. Pokud je splněno alespoň jedno z následujících kritérií, pak je případ klasifikován jako DILI. Prvním kritériem je hladina ALT, která musí být vyšší nebo rovna pětinasobku ULN. Druhým kritériem je hodnota ALP, jejíž naměřená hodnota bude stejná nebo vyšší než hodnota odpovídající 2x ULN. Posledním kritériem je, že hladina ALT, musí být vyšší nebo rovna 3násobku ULN a zároveň hladina bilirubinu vyšší než 2násobek ULN (Unzueta a Vargas, 2013).

Riziko DILI hodnotí také tzv. „Hyův zákon“, který identifikuje riziko vzniku závažné hepatotoxicity (Temple, 2006). Zákon je založen na klinickém pozorování Hymana Zimmermana (Babai et al., 2021), který je považován za zakladatele studie hepatotoxicity léků (Unzueta a Vargas, 2013). Zákon byl Zimmermanem definován, když upozoroval, že kombinace žloutenky a hepatocelulárního poškození vyvolaného léky byla asociována s 10% až 50% úmrtností na selhání jater. Současně za předpokladu, že byly vyloučeny jiné příčiny zvýšených hladin bilirubinu (Babai et al., 2021). Hyův zákon je splněn, pokud lék způsobuje hepatocelulární typ poškození jater, který se obecně projevuje trojnásobným a větším zvýšením transaminázy nad hladinu ULN. Navíc musí být zvýšený bilirubin (nejméně 2x vyšší než ULN). Dále by u pacientů neměl být žádný jiný důvod hepatocelulárního poškození, jako je například virová hepatitida.

Je zřejmé, že každé léčivo spojené s Hyovým zákonem bude vykazovat zvýšenou míru transamináz (Temple, 2006). Míra transamináz je pak používána jako biomarker, který umožňuje identifikaci podskupiny pacientů s vysokým rizikem jaterního poškození (Unzueta a Vargas, 2013). Existují i léčiva s nápadným zvýšením transamináz, která ale nikdy nebo téměř nikdy nezpůsobují vážné

jaterní poškození. Příkladem může být takrin anebo aspirin (Temple, 2006). Hyův zákon je relevantním bezpečnostním ukazatelem predikce ALF u pacientů s DILI (Babai et al., 2021).

V roce 2009 byla FDA zveřejněna pravidla pro ukončení vývoje léčiva, která byla navržena k prevenci hepatotoxicity v klinických studiích. V současnosti jsou tato pravidla aplikována, jak v prostředí klinických studií, tak i ve fázi po uvedení léčiva na trh, tedy i v klinické praxi. Pokud dle FDA stoupne hladina ALT u pacienta na trojnásobek ULN, a nejsou přítomny další příznaky jaterního poškození, lze v léčbě pravděpodobně bezpečně pokračovat společně s častým monitorováním jaterních funkcí. V případě, že hodnoty stoupají na pětinasobek, mělo by být prováděno intenzivnější sledování. Pokud ALT stoupne na osminásobek, měli by lékaři lék vysadit. Jedná se totiž o takzvaný práh, kdy může DILI přestoupit do ALF a stát se nevratným (Stine a Lewis, 2016).

3.5.2 Nové potenciální biomarkery

ALT, AST (aspartate aminotransferase, aspartátaminotransferáza), ALP a celkový bilirubin jsou v současnosti jediné schválené biomarkery DILI v klinické praxi. Tyto biomarkery ale nejsou specifické a zvýšení kterékoli z těchto hodnot může být detekováno prakticky u všech jaterních onemocnění. Zároveň se tyto biomarkery v játrech objevují, až když dojde k rozvoji poškození, tím pádem mají v predikci potenciálního poškození jater omezené použití (Robles-Díaz et al., 2016).

Snaha o vývoj nových citlivějších biomarkerů pro časnou predikci a diagnostiku DILI vedl k objevení několika slibných kandidátů (Robles-Díaz et al., 2016).

Glutamátdehydrogenáza

Glutamátdehydrogenáza (GLDH, glutamate dehydrogenase) je mitochondriální enzym nacházející se především v játrech, v menší míře v ledvinách a ve stopovém množství v kosterních svalech. Tento enzym je tkáňově specifitější než ALT a AST. Zdraví jedinci mají stabilní měřitelnou hladinu GLDH v séru. Vzestup cirkulující GLDH indikuje mitochondriální dysfunkci a ztrátu integrity mitochondriální membrány, která vzniká při hepatocelulární nekróze. GLDH dobře koreluje se zvýšením ALT u pacientů s různými formami klinicky prokázaného poškození jater, včetně předávkování acetaminofenem, ale není dostatečně citlivá, aby bylo možné předpovědět hepatotoxicitu před ALT (Robles-Díaz et al., 2016).

MikroRNA

MikroRNA (miRNA) jsou malé nekódující RNA, které se účastní posttranskripční regulace genové exprese. Poškození orgánů obvykle vede k uvolnění miRNA do krevního řečiště. miRNA jsou relativně stabilní v biologických tekutinách, což přispělo k tomu, že cirkulující miRNA jsou považována jako potenciální neinvazivní biomarkery DILI. Několik studií zaznamenalo změny sérové koncentrace miRNA během poškození jater. Sérová miR-122 je detekovatelná v časném stádiu hepatocelulárního poškození, což bylo potvrzeno u pacientů přijatých do nemocnice krátce po předávkování acetaminofenem, přestože hladiny ALT nebyly ještě zvýšeny. miR-122 je možné použít během klinických studií k detekci léčiv s potenciálem hepatotoxicity, který může zůstat nezjištěný pomocí konvenčních biomarkerů. Krom toho je miR-122 specifitější pro játra než ALT. Stále ale zbývá určit varovné hladiny miR-122 pro počínající idiosynkratické DILI (Robles-Díaz et al., 2016).

Exosomy

Zatímco miRNA mohou pasivně vstupovat do krevního oběhu během buněčné nekrotické a/nebo apoptotické buněčné smrti, aktivní uvolňování se vyskytuje regulovaným způsobem prostřednictvím exosomů. Exosomy jsou jedny ze struktur obklopených membránou, které jsou uvolňovány téměř všemi typy buněk. Byly přijaty jako potenciální biomarker DILI. Podle průzkumů se exosomové složky mění v přítomnosti podmínek buněčného stresu. Cirkulující exosomy, pocházející z různých tkání se mohou nacházet v mnoha typech tělesných tekutin, proto je problémem určit exosomy odvozené od hepatocytů. Složky exosomů nejsou omezeny na miRNA, zahrnují také proteiny, lipidy a další nukleové kyseliny. (Robles-Díaz et al., 2016).

Odvozené biomarkery

Od „omics“ můžeme odvodit biomarkery, které pomáhají indentifikovat DILI. Zavedení omických technologií nabízí nový přístup pro studium biomarkerů, protože umožňují zkoumat velké množství molekul současně. Studie založené na „omics“ mohou také poskytnout informace o mechanismech různých forem DILI (Robles-Díaz et al., 2016).

3.6 Příklady z praxe – stažená léčiva

Predikce a charakterizace DILI během preklinické fáze vývoje léčiva, ale i po uvedení léčiva na trh, je stále výzvou pro farmaceutický průmysl. DILI je špatně detekováno z důvodu jeho nepředvídatelnosti, nedostatku přesných biomarkerů a špatně definované patogeneze. Například Dykens a Will (2007) uvádí, že mezi lety 1994 a 2006 bylo z trhu staženo 38 léčiv, mezi nimi například cerivastatin, nefazodon, troglitazon a tolkapon. Některá další léčiva, která byla stažena z trhu jsou bromfenak, trovafloxacin (Rana et al., 2021), mibefradil, nebo fenfluramin (Rabkin et al., 1999). Na trhu však stále zůstávají také léčiva, u nichž riziko DILI hrozí, ale i tak se nadále používají, protože přínos používání převažuje nad riziky vedlejších účinků. Samozřejmě je důležité dodržovat případná omezení spojená s léčbou jako je například délka doby užívání léčiva.

Na následující stránkách budou vybraná léčiva popsána detailněji.

3.6.1 Troglitazon

Troglitazon je perorální antidiabetikum, které zlepšuje inzulinovou rezistenci tak, že působí jako ligand nukleárního receptoru PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma, receptor gama aktivovaný peroxisomovým proliferátorem). Konkrétněji se jedná o léčivo za skupiny thiazolidindionů na léčbu diabetes mellitus 2. typu (Rachek, et al., 2009). Přesto, že troglitazon úspěšně prošel preklinickým testováním na zvířatech, byl krátce po uvedení na trh z trhu opět stažen kvůli závažné hepatotoxicitě. Tato situace vyvolala rozsáhlé obavy o druhově specifické toxicitě. Preklinické studie prokázaly pouze přijatelné vedlejší účinky, včetně mikrovezikulární steatózy a zvětšení jater opic a myší. U potkanů se neprokázala žádná jaterní toxická reakce. Studie na psech prokázala zvýšení ALT v klinicky relevantních dávkách (Babai et al., 2021). Klinické studie byly provedeny u 2510 pacientů a odhalily, že zvýšení koncentrací ALT na více než trojnásobek ULN bylo zjištěno u 1,9 % pacientů, na více než pětinasobek u 1,7 % a na více než třicetinásobek u 0,2 %, což odpovídá pěti pacientům. Poté, co byly hlášeny závažné případy poškození jater

po uvedení léčiva na trh, bylo doporučeno měsíční monitorování transamináz. Navzdory těmto opatřením nebylo monitorování transamináz v praxi pravidelně prováděno. Celkový výskyt trvalého poškození jater byl odhadován na 1 případ na 50 000 až 60 000 pacientů léčených troglitazonem v USA. Sice bylo provedeno několik změn v označení a doporučení pro odborníky ve zdravotnictví, ale nedošlo ke zlepšení prevence rizika jaterního selhání a troglitazon byl stažen (Babai et al., 2021).

Přesný mechanismus účinku stále zůstává nedostatečně objasněn, ale rostoucí množství důkazů naznačuje, že troglitazon způsobuje mitochondriální dysfunkci a indukci apoptózy v lidských hepatocytech. Předpokladem je, že poškození mitochondriální DNA a snížená produkce ATP je iniciační událostí startující troglitazonem indukovanou mitochondriální dysfunkci a hepatotoxicitu. Také kapacita buňky detoxifikovat ROS se výrazně snižuje, což naznačuje zapojení ROS do pozorované cytotoxicity (Rachek, et al., 2009).

3.6.2 Tolkapon

Tolkapon je reverzibilní inhibitor katechol O-methyltransferázy, který byl v kombinaci s levodopou používán v Evropě a USA pro léčbu Parkinsonovy choroby.

Během preklinických studií nebyly identifikovány žádné známky vážné jaterní dysfunkce. Nicméně ve fázi 3 klinické studie byla incidence zvýšení sérového ALT přibližně o 1 % vyšší než u placebo při dávce 100 mg a přibližně o 3 % vyšší při dávce 200 mg. Z toho vyplývají požadavky na monitorování funkce jater při použití tolkaponu. Mechanismus hepatotoxicity by mohl souviset s odpojením jaterní mitochondriální oxidativní fosforylace a s inhibicí exportní pumpy žlučových kyselin. Tolkapon byl později stažen z trhu (Babai et al., 2021).

3.6.3 Trovafloxacin

Trovafloxacin patří do skupiny fluorochinolonových antibiotik. V roce 1997 byl schválen v USA a v červenci dalšího roku i v Evropě. Odhadem bylo vydáno asi 2,5 milionu receptů na celém světě. Preklinické studie na potkanech ukázaly minimální až mírnou změnu obsahu tuku v játrech čtyři týdny po léčbě trovafloxacinem. Při nejvyšší dávce trovafloxacinu u psů byly v 6měsíční studii pozorovány zvýšené hladiny jaterních enzymů, které korelovaly s centrilobulární hepatocelulární vakuolární degenerací a nekrózou. Několik měsíců po schválení v USA bylo hlášeno 140 případů klinicky symptomatického poškození jater, 8 z nich vedlo k úmrtí a dva k transplantaci. Studie spontánních hlášení ukázaly, že relativní riziko poškození jater trovafloxacinem se zvyšovalo s prodlužující se délkou expozice, i když délka stanovené medikamentózní terapie byla dodržena v 95 % případů. Regulační zdravotnické úřady varovaly před vážnou hepatotoxicitou a omezily jeho použití pouze na některé závažné infekce, ale tato opatření byla nedostatečná a trovafloxacin byl nakonec stažen z trhu (Babai et al., 2021).

3.6.4 Nefazodon

Nefazodon byl používán v Evropě a v USA v roce 1994 k léčbě deprese, agresivního chování a panické poruchy. Jedná se o antagonistu serotoninu a inhibitor jeho zpětného vychytávání. Nefazodon inhibuje mitochondriální dýchání v izolovaných játrech potkana, což vede ke zhroucení mitochondriálního membránového potenciálu a k vyvolání oxidačního stresu. Tento stres je spojen s deplecí GSH a následnou buněčnou smrtí. K jaterní toxicitě nefazodonu může přispívat také řada dalších mechanismů včetně inhibice transportu zprostředkovaného BSEP. Incidence poškození nefazodonem byla hlášena v jednom případě za 250 000 až 300 000 pacientoroků. Ve většině případů došlo k nástupu poškození jater v rámci 1 až 8 měsíců. Nefazodon byl později stažen z trhu (Babai et al., 2021).

3.6.5 Ximelagatran

Ximelagatran, jako antikoagulační lék, patří mezi přímé inhibitory trombinu. Přestože byl tento lék uveden na evropský trh v roce 2004, v USA byl FDA odmítnut kvůli obavám z možné toxicity jater.

V preklinických studiích na zvířatech byli potkani, psi a opice vystaveni vysokým dávkám ximelagatranu. Výsledky ale neprokázaly zvýšení jaterních transamináz. Zároveň během klinických studií nebyl v krátkodobé ortopedické studii pozorován žádný případ vážného poškození jater. Zvýšené hladiny jaterních enzymů byly s vyšší frekvencí poprvé pozorovány ve studiích při hodnocení dlouhodobého užívání, 35 dnů nebo více. Nástup obtíží byl zpožděn v rozmezí 1 až 6 měsíců po zahájení léčby a u většiny pacientů byl asymptomatický. Byla zavedena strategie řízení rizik založená na monitorování transamináz v prvních 6 měsících léčby. U pacientů se však několik týdnů po ukončení léčby objevilo DILI. Tak se projevila neúčinnost prevence založené na monitorování jaterních testů během léčby. V únoru 2006 byl ximelagatran stažen z evropského trhu. Farmakogenetický výzkum ximelagatranu odhalil silnou genetickou asociaci mezi pacienty, u kterých se zvýšila hladina ALT, a alely hlavního histokompatibilního komplexu, což naznačuje možný vliv imunitního systému na vývoj DILI (Babai et al., 2021).

3.6.6 Fialuridin

Fialuridin, analog pyrimidinového nukleosidu, byl vyvinutý pro léčbu chronické hepatitidy B. Reprezentuje příklad léčiva, u kterého neadekvátní translace výsledků z preklinického hodnocení do klinické praxe, vedla k fatálním důsledkům. Studie provedené na hlodavcích a primátech prokázaly uspokojivý profil toxicity fialuridinu. Klinické hodnocení (II.fáze) však bylo ve 13. týdnu léčby ukončeno z důvodu náhlého nástupu multisystémového poškození u subjektů zkoušky, které zahrnovalo játra, slinivku břišní, svaly i nervy. Progresivní laktátová acidóza a těžká hepatotoxicita vyústily v 5 úmrtí a 2 urgentní transplantace jater. Analýza jaterních biopsií odhalila akumulaci hepatocelulárních lipidů, cholestázu a mitochondriální abnormality, které byly pravděpodobně důsledkem mitochondriální toxicity vyvolané fialuridinem. Bylo provedeno retrospektivní vyšetřování na hlodavcích, kde se ale neprokázala toxicita ani po 10 týdnech léčby při dávkách 100krát vyšších, než byly podávány pacientům v druhé fázi klinického hodnocení. Až pomocí chimérických myší s humanizovanými játry byla detekována hepatotoxicita fialuridinu a tím byl podán definitivní důkaz o mezidruhovém rozdílu v citlivosti vůči jeho toxicitě. Bylo prokázáno, že lidský ekvilibrativní nukleosidový transportér 1 (ENT1, equilibrative nucleoside transporter 1), který je exprimován v mitochondriální membráně člověka, ale ne u myší, zprostředkovává transport fialuridinu. Fialuridin a jeho metabolity jsou monofosforylovány enzymem thymidinkinázou 2 (TK2, thymidine kinase 2), která je převážně tvořena lokálně v mitochondriích. Následná fosforylace na trifosforylovaný fialuridin a trifosforylované metabolity fialuridinu je zprostředkována pomocí thymidylátkinázy (TMPK, thymidylate kinase) a nukleosid difosfát kinázy (DPK, nucleoside diphosphate kinase). Ve výzkumu provedeném na lidské buněčné linii HepG2 bylo prokázáno, že tyto trifosfátové formy mají vysokou afinitu k DNA polymerázám, zejména k polymeráze C mtDNA (Hendriks et al., 2019).

Nesteroidní antiflogistika

Velkou skupinou léčiv, která se široce používá a je spojena s rizikem DILI, jsou nesteroidní antiflogistika. Jedná se o třídu látek, která může být příčinou idiosynkratické hepatotoxicity. K nejčastějším nežádoucím účinkům nesteroidních antiflogistik (NSAID, non-steroidal anti-inflammatory drugs) však patří žaludeční a renální toxicita (Rabkin et al., 1999). Původně byl výskyt případů hepatotoxicity NSAID považován za velmi vzácný. Přesto však s rozšířením užívání těchto léků, jak volně prodejných, tak na předpis, bylo hlášeno několik případů ALF vedoucí k transplantaci jater nebo dokonce smrti. Většina případů DILI způsobená NSAID je asymptomatická nebo mírná. Z důvodu závažné hepatotoxicity bylo několik přípravků jako je bromfenak, benoxaprofen a lumirakoxib staženo z trhu. Tyto přípravky byly staženy na základě postmarketingového sledování. Pro bezpečné užívání NSAID jsou uplatňovány různé předpisy a omezení. Příkladem je nimesulid, který má omezenou délku užívání s cílem minimalizovat riziko hepatotoxicity. Doporučení jsou však založena na kazuistikách, protože epidemiologické studie nepřinesly jasné důkazy o závažné hepatotoxicitě většiny NSAID (Unzueta a Vargas, 2013).

3.6.7. Bromfenak

Bromfenak patří mezi NSAID. Byl schválen FDA v roce 1997 pro krátkodobé zvládnutí akutní bolesti. Preklinické studie naznačily, že lék může vést k depleci GSH v buňkách ledvin a gastrointestinálního traktu, ale u potkanů léčených až 13 měsíců nebyly pozorovány žádné jaterní léze. Preklinické studie na opicích trvající 12 měsíců ukázaly gastrointestinální vředy s mírným zvýšením jaterních enzymů. Závažné DILI bylo většinou pozorováno u pacientů užívajících lék déle než 30 dní, což je období léčby, které nebylo studováno v kontrolovaných klinických studiích (Babai et al., 2021).

Případ bromfenaku představuje idiosynkratickou hepatotoxicitu související s léčivem. Nekróza byla také spojena s kumulativními dávkami tohoto

NSAID (Unzueta a Vargas, 2013). Bromfenak byl schválen pouze pro krátkodobou léčbu, nikdy nebyl indikován k dlouhodobé léčbě bolesti. Přesto, že během druhé a třetí fáze klinické studie nebyl hlášen žádný případ jaterního selhání, bylo zaznamenáno zvýšení hladin transamináz u 15 % pacientů. Výskyt rostl s délkou léčby. Po vysazení však došlo k normalizaci transamináz bez dalších následků (Rabkin et al., 1999).

Po uvedení bromfenaku na trh v USA byly hlášeny případy závažné hepatotoxicity u pacientů léčených déle než 10 dnů včetně 12 případů poškození jater, 8 transplantací jater a 4 smrtelných případů (Babai et al., 2021). V únoru 1998 vydal výrobce varovný dopis poskytovatelům zdravotní péče, aby znovu zdůraznili, že bromfenak by neměl být používán déle než 10 dní. Navzdory tomu však docházelo k hlášení DILI po jeho užívání. Z toho důvodu byl nakonec bromfenak stažen z trhu, přibližně po 4 měsících od prvního hlášení DILI (Rabkin et al., 1999).

3.6.8. Lumirakoxib

Lumirakoxib byl lék používaný pro úlevu od symptomů osteoartrózy kyčle a kolene (Babai et al., 2021). Jedná se o selektivní inhibitor COX-2 (cyclooxygenase 2, cyklooxygenáza 2) strukturně podobný dikofenaku (Unzueta a Vargas, 2013). V roce 2006 byl schválen v evropských zemích, ale FDA ho odmítla (Babai et al., 2021), takže nikdy nebyl schválen pro použití v USA (Unzueta a Vargas, 2013). V průběhu klinických studií se u 2,6 % pacientů objevily koncentrace sérových transamináz nad trojnásobkem ULN. Později bylo hlášeno 8 případů závažné hepatotoxicity včetně dvou úmrtí a dvou transplantací. Lumirakoxib byl stažen z trhu v několika zemích kvůli potenciálu vyvolat selhání jater. Informace o přípravku byly následně aktualizovány o kontraindikace pro pacienty s potenciálním poškozením jater. I tak se stále objevovala spontánní hlášení o závažném DILI. V reakci na to EMA (European Medicines Agency, Evropská agentura pro léčivé přípravky) doporučila stažení lumirakoxibu z trhu ve všech zemích EU (Babai et al., 2021).

Stejně tak jako v případě bromfenaku nebo benoxaprofenu se i v případě lumirakoxibu ukazuje důležitost postamrketingového sledování v detekci závažných případů DILI, které nebyly odhaleny v klinickém hodnocení před schválením léčiva (Unzueta a Vargas, 2013). Mechanismus poškození naznačuje, že bioaktivace lumirakoxibu může vést k depleci GSH, kovalentní vazbě na proteiny a oxidačnímu stresu (Babai et al., 2021).

3.6.9. Benoxaprofen

Benoxaprofen je další zástupce NSAID. Byl schválen v USA v roce 1982 a stažen z trhu o čtyři měsíce později po četných zprávách o závažné hepatotoxicitě (Unzueta a Vargas, 2013).

3.7. Příklady z praxe – stále používaná léčiva

3.7.7. Isoniazid

Isoniazid (INH) je lékem volby latentní tuberkulózy přesto, že může vyvolat DILI. Ve většině případů je onemocnění jater asymptomatické a lze ho poznat pouze dle detekovaných markerů jako je ALT a AST. U většiny pacientů dojde k obnovení normální funkce jater i přes pokračující podávání léčiva díky hepatální adaptaci. INH je hydrazid a snadno se oxiduje (Metushi et al., 2016). Za INH navozené poškození jater jsou zodpovědné pravděpodobně tři metabolity, konkrétně acetylhydrazin, hydrazin a acetylisoniazid (Wang et al., 2016). Zjistilo se, že reaktivní metabolity odvozené od INH tvoří kovalentní vazby s jaterními makromolekulami. Vzniklé adukty vedou k imunitní odpovědi (Metushi et al., 2016).

K prevenci DILI způsobené INH je nezbytné provádět klinické monitorování příznaků akutní hepatitidy. Americká společnost pro plicní onemocnění (The American Thoracic Society) doporučuje sledování vybraných klinických příznaků u pacientů s podezřením na hepatotoxicitu. Bylo zaznamenáno, že mnoho pacientů (55 %), kteří splňovali kritéria pro ukončení léčby INH, pokračovalo v užívání tohoto léku. Nedodržení těchto pokynů vedlo k rozvoji akutního DILI u některých z nich. Tyto údaje podporují přístup, kdy je snaha zabránit vzniku vážného poškození tím, že je testování ALT kombinováno s klinickým sledováním symptomů (Stine a Lewis, 2016).

3.7.8. Naproxen

Naproxen je lék ze skupiny NSAID. Na více než 6000 případů hepatotoxicity vyvolané NSAID, připadá 11 % na naproxen. Symptomatické onemocnění jater se objevuje u 9 až 12 případů na 100 000 pacientů ročně, zatímco ALF u 3,8 případu na 100 000 pacientů ročně. Přesný mechanismus poškození jater není znám. Pravděpodobně jde o idiosynkratickou reakci vyvolanou toxickým metabolitem naproxenu. Obvykle dochází k uzdravení pacientů po vysazení léku, ale toto zotavení může trvat i několik měsíců (Unzueta a Vargas, 2013).

3.7.9. Diklofenak

Diklofenak je často užívané NSAID, které způsobuje DILI. Většina případů hepatotoxicity však není závažná nebo je asymptomatická. Bezpečnostní profil, založený na počtu ročně vyplněných receptů ve vztahu k počtu případů závažné hepatotoxicity, je dobrý. Na druhou stranu, v průzkumu zabývajícím se léky spojenými s jaterním poškozením a úmrtím, byl diklofenak jediným NSAID mezi dvaceti nejrizikovějšími léčivy. Přibližně 15 % chronických uživatelů diklofenaku má zvýšené hladiny AST, přičemž u 3,5 % těchto případů je zvýšení AST více než trojnásobné ULN. Rizikové faktory pro hepatotoxicitu diklofenaku zahrnují ženské pohlaví, vyšší dávky, dlouhodobé užívání a diagnózu osteoartrózy. Typ hepatotoxicity spojené s diklofenakem je převážně hepatocelulární. Mechanismy spojené s poškozením jater po podání diklofenaku zahrnují mitochondriální poškození, imunologické adukty a toxické meziprodukty. Genetické studie polymorfismů genů kódujících UGT2B7, CYP2C8 a ABCC2 identifikovali alelické varianty, které korelovaly s poškozením jater, neboť tyto geny se podílejí na metabolismu a vylučování diklofenaku (Unzueta a Vargas, 2013).

3.7.10. Nimesulid

Nimesulid je NSAID patřící strukturně do skupiny sulfonamidů. Původně byl schválen v Itálii v roce 1985 a je dostupný ve více než 50 zemích světa. Některé země jako USA, Kanada, Anglie, Japonsko nebo Nový Zéland nikdy nimesulid neschválily. Několik evropských zemí jako je Finsko, Španělsko a Portugalsko, lék stáhly z trhu kvůli obavám ze závažné hepatotoxicity na základě publikovaných zpráv. Nimesulid se i tak v řadě zemí nadále široce předepisuje a běžně se používá. Epidemiologické studie nepotvrdily zvýšené riziko těžké hepatotoxicity ve srovnání s jinými běžně používanými NSAID. Byl zjištěn pozitivní poměr mezi rizikem a přínosem z hlediska gastrointestinálních vedlejších účinků. V roce 2007 však EMA vydala omezení pro předepisování nimesulidu z důvodu hepatotoxicity a zařadila ho do terapie druhé linie. (Unzueta a Vargas, 2013). Maximální délka léčebného cyklu nimesulidem je 15 dní (Web 4).

3.7.11. Alopurinol

Alopurinol je inhibitor xantinoxidázy, který se široce používá k léčbě hyperurikémie. Chronická léčba alopurinolem je spojena s mírným zvýšením sérových aminotransferáz u 2 do 6 % léčených pacientů, které obvykle vymizí spontánně nebo po vysazení léku. Alopurinol je vzácnou, ale známou příčinou potenciálně závažného poškození jater. Předpokladem je, že hepatotoxicita alopurinolu vzniká na podkladě přecitlivělosti (Fontana et al., 2021).

3.7.12. Nevirapin

Nevirapin je antivirotikum patřící do skupiny NNRTI (non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor, nenukleosidový inhibitor reverzní transkriptázy) a využívá se k léčbě HIV. NNRTI první generace, která zahrnuje kromě nevirapinu i delaviridin a efavirenz, působí významně hepatotoxicky na rozdíl od druhé generace, která se zdá být pro játra bezpečnější. Hepatotoxicita byla hlášena u nevirapinu mnohem častěji než

u jiných antiretrovirálních léků. U značného počtu jedinců vystavených nevirapinu se vyvinou časně a krátkodobé hypersenzitivní reakce, které se mohou projevit jako hepatotoxicita a/nebo kožní nežádoucí reakce v rozsahu od vyrážky po závažné kožní reakce. Mechanismy jaterní toxicity navržené studiiemi *in vitro* a *in vivo* pro nevirapin jsou takové, že nevirapin vede k uvolňování DAMP hepatocyty a k tvorbě hepatocytárních inkluzí. Tyto dvě události přispívají ke spuštění imunitní odpovědi. Další teorií je, že nevirapin způsobuje mitochondriální dysfunkci a vede ke zvýšení syntézy žlučových kyselin (Benedicto et al., 2021).

4. Diskuse

Nežádoucí léková reakce (ADR, adverse drug reaction) je definována jako reakce na léčivý přípravek, která je nepříznivá a nezamýšlená. Tyto nežádoucí účinky představují zátěž nejen pro pacienty, ale také zvyšují náklady ve zdravotnictví. Farmakovigilance umožňuje identifikaci a prevenci rizik spojených s užíváním léků, zejména těch, které byly nedávno uvedeny na trh. Tyto kontrolní systémy analyzují signály z globálních databází nežádoucích lékových reakcí a poskytují podporu pro rozhodování regulačních orgánů v různých zemích. Pokud jsou léčiva stažena z trhu, je to zejména kvůli hepatotoxicitě. ADR se dělí na několik typů. Prvním jsou reakce typu A (zvětšené), které jsou výsledkem zvýšení farmakologického účinku podávaného léku, proto závisí na jeho mechanismu účinku a obecně jsou předvídatelné, běžné, závislé na dávce a mají nízkou úmrtnost. Reakce typu B (bizarní) jsou reakce, které nesouvisí s mechanismem účinku léku, a proto jsou obecně nepředvídatelné, neobvyklé a mají vysokou mortalitu. Právě mezi reakce typu B patří i idiosynkratické reakce. Reakce typu C (chronická) souvisí s délkou léčby nebo s kumulací dávek. Reakce typu D (opožděné) se vyskytnou až dlouho po užití léku. Příkladem může být karcinogeneze a teratogeneze. Posledním typem reakcí jsou reakce typu E (souvisí s ukončením léčby), které se objevují po náhlém vysazení léku a lze se jim vyhnout postupným snižováním dávky. Léky navozené poškození se může projevit nejen na játrech, ale také na zažívacím systému, srdci, ledvinách nebo plicích (Montané a Santesmases, 2020).

Hlavním cílem farmaceutického průmyslu je uvádět na trh bezpečnější léky s méně častým výskytem nežádoucích účinků, s předvídatelnými farmakokinetickými vlastnostmi a kvantifikovanými lékovými interakcemi. Proto je hodnocení potenciální hepatotoxicity kritickým krokem ve vývoji nových léků (Gomez-Lechon et al., 2010). Játra jsou nejčastěji postiženým orgánem při toxickém působení léků. Jejich zranitelnost je důsledkem funkčních vlastností jater a jejich role v metabolické eliminaci xenobiotik (Gomez-Lechon et al., 2010). Včasná identifikace potenciálně hepatotoxických léků umožňuje farmaceutickým firmám přijímat opatření pro minimalizaci rizik hepatotoxicity a maximalizaci bezpečí pacientů. To může zahrnovat další vývojové práce na modifikaci struktury léčiva, optimalizaci dávkování nebo zastavení vývoje léku, pokud je hepatotoxicita příliš vysoká.

Idiosynkratická poléková hepatotoxicita je vzácný a nepředvídatelný jev, který obvykle postihuje méně než 1 z 10 000 pacientů. Jedná se však o závažný klinický problém, protože představuje 10 % všech jaterních selhání vyvolaných léky. Idiosynkratické reakce na léky nejsou obvykle detekovány v preklinickém testování a většina z nich ani v průběhu klinických studií. Problém se obvykle objeví až po schválení léčiva, kdy už jsou jím léčeny tisíce pacientů. Idiosynkratická hepatotoxicita je momentálně hlavním důvodem pro FDA vydat varování, omezit užívání nebo dokonce stáhnout konkrétní léčivo z trhu (Kaplowitz, 2005).

Mechanismy, kterými většina léků způsobuje poškození jater, jsou stále nedostatečně objasněny, což brání detekci hepatotoxického potenciálu léků během preklinického a časného klinického vývoje (Dragovic et al., 2016). Mezi doposud popsané mechanismy DILI patří mitochondriální dysfunkce, formování reaktivních metabolitů, stres endoplazmatického retikula, lysosomální poškození, inhibice transportu žlučových kyselin a aktivace imunitní odpovědi. Zároveň vznik DILI nemusí být způsoben pouze jedním mechanismem a mechanismy se mohou různě kombinovat.

Korelace hepatotoxicity mezi preklinickými modely a lidmi je nízká. V důsledku snah používat nižší počet zvířat v toxikologických testech je stále těžší odhalovat hepatotoxicitu vyskytující se s malou četností. Redukce počtu zvířat je motivována důvody nejen ekonomickými, ale také etickými. Při interpretaci výsledků preklinických testů je potřeba vzít v úvahu druhové rozdíly v metabolismu léků, cílových molekulách a patofyziologii (Gomez-Lechon et al., 2010).

Klinické testování také nezaručuje odhalení DILI. Interpretace případů hepatotoxicity v klinických studiích je složitá, protože zvýšená hladina transamináz ještě nemusí nutně předpovídat výskyt vážných problémů. Pokud léčiva vykazují během klinických studií trojnásobné zvýšení transamináz nad ULN ve srovnání s placeboem, je třeba takové zvýšení považovat za klinicky významné. Problémem klinických studií jsou i „skleníkové podmínky“. V klinických studiích je lék podáván vybrané populaci. Některé skupiny pacientů tak nejsou zastoupeny (například děti, těhotné ženy, pacienti s poškozením ledvin nebo jater) a výsledky tak mohou být

nereprezentativní. Třetí fáze studie jsou prováděny na obvykle 300 až 3000 pacientech a tím pádem pravděpodobnost pozorování vzácných nežádoucích reakcí je velmi omezená (Babai et al., 2021). „*Pokud je frekvence výskytu AR 1/10 000 je nutné, aby velikost vzorku byla 30 000 pro pozorování alespoň jedné nežádoucí příhody (Babai et al. 2021).*“ Z toho vyplývá důležitost postmarketingového sledování léčiv.

Omezené možnosti studií před uvedením léčiv na trh jsou zřejmé ze statistiky, podle níž zhruba 20 % léků v postmarketingové fázi získá varování (“black box warning”) a zhruba 4 % léků jsou nakonec stažena z trhu z bezpečnostních důvodů (Umscheid et al., 2015).

Jak bylo výše uvedeno, na manifestaci idiosynkratického DILI u lidí se podílí více faktorů. Jedna skupina přispívajících faktorů je specifická pro léčivo a potenciálně může být studována ve specializovaných systémech *in vitro*. Druhou skupinou jsou faktory specifické pro pacienta, které mohou být těžko studovány pomocí *in vitro* studií (Funk a Roth, 2017). Toto velmi komplikuje situaci při hledání vhodných preklinických modelů, ale i následné klinické testování léčiv.

Mezi léky, které byly staženy z trhu po zjištění závažné hepatotoxicity patří například bromfenak, mibefradil nebo fenfluramin. Všechna tato léčiva byla nejdříve schválena FDA a následně stažena z trhu přesto, že během klinických studií nebyla zjištěna závažná toxicita, což naznačuje, že před uvedením na trh jsou s léčivem omezené zkušenosti a dostupné informace nejsou dostatečné. Lékové agentury by měly využít tyto případy k tomu, aby byly vyžadovány rozsáhlejší postmarketingové studie po schválení nových léčiv a včas zasáhnuto v okamžiku, kdy se objeví podezření na toxicitu. (Rabkin et al., 1999).

Při výzkumu léčiv jsou na úkor dřívějšího přístupu k novým lékům zpožděny informace o vzácných nežádoucích účincích, které se často dozvídáme až po zavedení léčiva na trh (Umscheid et al., 2015). Farmakogenomické studie představují nadějný přístup k posouzení sklonů k DILI, jak na úrovni jednotlivců, tak v populacích (Unzueta a Vargas, 2013). K personalizaci léků, při které se maximalizují příznivé

účinky a minimalizuje se riziko toxicity, by měl přispět pokrok v oblastech genomiky, proteomiky a metabolomiky (Gomez-Lechon et al., 2010).

Představované vědecké články citované v diplomové práci se shodují na tom, že DILI je oblast, která stále vyžaduje další zkoumání a že současně dostupné informace nejsou dostačující. Další studium problematiky a lepší porozumění mechanismům DILI by mělo pomoci při vývoji preklinických testů. Problémem zůstává ale i klinické testování, které není pro identifikaci idiosynkratické hepatotoxicity ideální. Vzhledem k tomu, že je někdy malý výskyt případů DILI, není možné ho během klinického testování vždy odhalit, ať už z důvodu omezeného množství dobrovolníků v jednotlivých klinických fázích anebo z důvodu, že ke vzniku DILI je nutná souhra více faktorů. Jedna skupina přispívajících faktorů je specifická pro léčivo a může být studována v *in vitro* studiích. Další faktory spočívají na straně pacienta. Ty ale zatím nejsou plně objasněny a mohou být z těchto důvodů obtížně studovány. Určitou nadějí v tomto ohledu by mohla být personalizovaná medicína. Ta by však zatím znamenala velkou ekonomickou zátěž pro společnost.

5. Závěr

Hlavním cílem práce bylo shrnutí dosavadních poznatků týkajících se mechanismů vzniku DILI a možností zjišťování DILI v preklinickém a klinickém testování a přinést přehled léčiv způsobujících DILI. Před schválením nového léku je třeba určit stupeň rizika DILI, vzhledem k tomu, že je to nejčastější důvod ke stažení léku z trhu nebo k vydání varování o jeho použití. Nicméně patogeneze DILI stále není úplně objasněna. Zatím se nepodařilo vytvořit *in vitro* model nebo zvířecí model, který by spolehlivě DILI odhalil. Určité rezervy má i klinické testování. Z toho důvodu je potřeba pokračovat v postmarketingových studiích léčiv, aby byla případná hepatotoxicita odhalena co nejdříve a dále se věnovat výzkumu v tomto oboru a zlepšovat stávající metody detekce DILI. Mezi doposud popsané mechanismy DILI se řadí mitochondriální dysfunkce, formování reaktivních metabolitů, stres endoplazmatického retikula, lysosomální poškození, inhibice transportu žlučových kyselin a aktivace imunitní odpovědi. Ani tyto mechanismy však nejsou dokonale objasněny a je potřeba jejich další výzkum.

6. Zdroje

Seznam Literatúry

1. ALEMPIJEVIC, Tamara; ZEC, Simon a MILOSAVLJEVIC, Tomica. Drug-induced liver injury: Do we know everything? Online. *World Journal of Hepatology*. 2017, roč. 9, č. 10. [cit. 2023-10-15]. ISSN 1948-5182.
Dostupné z: <https://doi.org/10.4254/wjh.v9.i10.491>.
2. ALLISON, Rebecca; GURAKA, Asha; SHAWA, Isaac Thom; TRIPATHI, Gyan; MORITZ, Wolfgang et al. Drug induced liver injury – a 2023 update. Online. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*. 2023, roč. 26, č. 8, s. 442-467. [cit. 2023-11-17]. ISSN 1093-7404.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/10937404.2023.2261848>.
3. ALMAZROO, Omar Abdulhameed; MIAH, Mohammad Kowser a VENKATARAMANAN, Raman. Drug Metabolism in the Liver. Online. *Clinics in Liver Disease*. 2017, roč. 21, č. 1, s. 1-20. [cit. 2023-11-12]. ISSN 10893261.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.cld.2016.08.001>.
4. BABAI, Samy; AUCLERT, Laurent a LE-LOUËT, Hervé. Safety data and withdrawal of hepatotoxic drugs. Online. *Therapies*. 2021, roč. 76, č. 6, s. 715-723. [cit. 2023-10-24]. ISSN 00405957.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.therap.2018.02.004>.
5. BALLOTIN, Vinícius Remus; BIGARELLA, Lucas Goldmann; BRANDÃO, Ajacio Bandeira de Mello; BALBINOT, Raul Angelo; BALBINOT, Silvana Sartori et al. Herb-induced liver injury: Systematic review and meta-analysis. Online. *World Journal of Clinical Cases*. 2021, roč. 9, č. 20, s. 5490-5513. [cit. 2024-04-25]. ISSN 2307-8960.
Dostupné z: <https://doi.org/10.12998/wjcc.v9.i20.5490>.
6. BLEIBEL, Wissam; KIM, Stephen; D'SILVA, Karl a LEMMER, Eric R. Drug-Induced Liver Injury: Review Article. Online. *Digestive Diseases and Sciences*. 2007, roč. 52, č. 10, s. 2463-2471. [cit. 2023-10-02]. ISSN 0163-2116.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s10620-006-9472-y>.

7. BENEDICTO, Ana M.; FUSTER-MARTÍNEZ, Isabel; TOSCA, Joan; ESPLUGUES, Juan V.; BLAS-GARCÍA, Ana et al. NNRTI and Liver Damage: Evidence of Their Association and the Mechanisms Involved. Online. *Cells*. 2021, roč. 10, č. 7. [cit. 2024-03-17]. ISSN 2073-4409.
Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/cells10071687>.
8. CHANG, C. Y. a SCHIANO, T. D. Review article: drug hepatotoxicity. Online. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 2007, roč. 25, č. 10, s. 1135-1151. [cit. 2024-01-31]. ISSN 0269-2813.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2007.03307.x>.
9. DING, Wen-Xing a YIN, Xiao-Ming (ed.). *Molecules, Systems and Signaling in Liver Injury*. Online. Cham: Springer International Publishing, 2017. [cit. 2023-11-14]. ISBN 978-3-319-58105-7.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/978-3-319-58106-4>.
10. DRAGOVIC, Sanja; VERMEULEN, Nico P. E.; GERETS, Helga H.; HEWITT, Philip G.; INGELMAN-SUNDBERG, Magnus et al. Evidence-based selection of training compounds for use in the mechanism-based integrated prediction of drug-induced liver injury in man. Online. *Archives of Toxicology*. 2016, roč. 90, č. 12, s. 2979-3003. [cit. 2024-04-21]. ISSN 0340-5761.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1845-1>.
11. FONTANA, Robert J.; LI, Yi-Ju; PHILLIPS, Elizabeth; SAEED, Naba; BARNHART, Huiman et al. Allopurinol hepatotoxicity is associated with human leukocyte antigen Class I alleles. Online. *Liver International*. 2021, roč. 41, č. 8, s. 1884-1893. [cit. 2024-03-17]. ISSN 1478-3223.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/liv.14903>.
12. FOUFELLE, Fabienne a FROMENTY, Bernard. Role of endoplasmic reticulum stress in drug-induced toxicity. Online. *Pharmacology Research & Perspectives*. 2016, roč. 4, č. 1 [cit. 2024-02-14]. ISSN 2052-1707.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/prp2.211>.

13. FUNK, Christoph a ROTH, Adrian. Current limitations and future opportunities for prediction of DILI from in vitro. Online. *Archives of Toxicology*. 2017, roč. 91, č. 1, s. 131-142. [cit. 2024-03-14]. ISSN 0340-5761.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1874-9>
14. GOMEZ-LECHON, M.J.; LAHOZ, A.; GOMBAU, L.; CASTELL, J.V. a DONATO, M.T. In Vitro Evaluation of Potential Hepatotoxicity Induced by Drugs. Online. *Current Pharmaceutical Design*. 2010, roč. 16, č. 17, s. 1963-1977. [cit. 2023-10-25]. ISSN 13816128.
Dostupné z: <https://doi.org/10.2174/138161210791208910>.
15. HENDRIKS, Delilah F G; HURRELL, Tracey; RIEDE, Julia; VAN DER HORST, Muriëlle; TUOVINEN, Sarianna et al. Mechanisms of Chronic Fialuridine Hepatotoxicity as Revealed in Primary Human Hepatocyte Spheroids. Online. *Toxicological Sciences*. 2019, roč. 171, č. 2, s. 385-395. [cit. 2023-11-08]. ISSN 1096-6080. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfz195>.
16. HOLT, Michael P. a JU, Cynthia. Mechanisms of drug-induced liver injury. Online. *The AAPS Journal*. 2006, roč. 8, č. 1, s. E48-E54. [cit. 2024-04-25]. ISSN 1550-7416. Dostupné z: <https://doi.org/10.1208/aapsj080106>.
17. HOSACK, Tom; DAMRY, Djamil a BISWAS, Sujata. Drug-induced liver injury: a comprehensive review. Online. *Therapeutic Advances in Gastroenterology*. 2023, roč. 16. [cit. 2024-03-17]. ISSN 1756-2848.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1177/17562848231163410>.
18. KAPLOWITZ, Neil. Idiosyncratic drug hepatotoxicity. Online. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2005, roč. 4, č. 6, s. 489-499. [cit. 2023-10-19]. ISSN 1474-1776. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/nrd1750>.
19. KUBITZ, Ralf; DRÖGE, Carola; STINDT, Jan; WEISSENBERGER, Katrin a HÄUSSINGER, Dieter. The bile salt export pump (BSEP) in health and disease. Online. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*. 2012, roč. 36, č. 6, s. 536-553. [cit. 2023-10-11]. ISSN 22107401.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.clinre.2012.06.006>.

20. KUNA, Lucija; BOZIC, Ivana; KIZIVAT, Tomislav; BOJANIC, Kristina; MRSO, Margareta et al. Models of Drug Induced Liver Injury (DILI) – Current Issues and Future Perspectives. Online. *Current Drug Metabolism*. 2018, roč. 19, č. 10, s. 830-838. [cit. 2024-04-25]. ISSN 13892002.
Dostupné z: <https://doi.org/10.2174/1389200219666180523095355>.
21. LEISE, Michael D.; POTERUCHA, John J. a TALWALKAR, Jayant A. Drug-Induced Liver Injury. Online. *Mayo Clinic Proceedings*. 2014, roč. 89, č. 1, s. 95-106. [cit. 2024-04-25]. ISSN 00256196.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2013.09.016>.
22. LIU, Xiaoying a GREEN, Richard M. Endoplasmic reticulum stress and liver diseases. Online. *Liver Research*. 2019, roč. 3, č. 1, s. 55-64. [cit. 2023-11-22]. ISSN 25425684. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.livres.2019.01.002>.
23. LUZIO, J. Paul; PRYOR, Paul R. a BRIGHT, Nicholas A. Lysosomes: fusion and function. Online. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2007, roč. 8, č. 8, s. 622-632. [cit. 2023-11-29]. ISSN 1471-0072.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/nrm2217>.
24. MCGILL, Mitchell R. a JAESCHKE, Hartmut. Animal models of drug-induced liver injury. Online. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2019, roč. 1865, č. 5, s. 1031-1039. [cit. 2023-11-20]. ISSN 09254439.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.08.037>.
25. METUSHI, Imir; UETRECHT, Jack a PHILLIPS, Elizabeth. Mechanism of isoniazid-induced hepatotoxicity: then and now. Online. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 2016, roč. 81, č. 6, s. 1030-1036. [cit. 2023-10-12]. ISSN 0306-5251. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/bcp.12885>.
26. MONTANÉ, Eva a SANTESMASES, Javier. Adverse drug reactions. Online. *Medicina Clínica (English Edition)*. 2020, roč. 154, č. 5, s. 178-184. [cit. 2024-03-17]. ISSN 23870206.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.medcle.2019.08.005>.

27. NORMAN, Bryan H. Drug Induced Liver Injury (DILI). Mechanisms and Medicinal Chemistry Avoidance/Mitigation Strategies. Online. Journal of Medicinal Chemistry. 2020, roč. 63, č. 20, s. 11397-11419. [cit. 2023-09-29]. ISSN 0022-2623.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c00524>.
28. RABKIN, John M; SMITH, Megan J; ORLOFF, Susan L; CORLESS, Christopher L; STENZEL, Peter et al. Fatal Fulminant Hepatitis Associated with Bromfenac Use. Online. Annals of Pharmacotherapy. 1999, roč. 33, č. 9, s. 945-947.[cit. 2023-10-31]. ISSN 1060-0280.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1345/aph.18364>
29. RACHEK, Lyudmila I.; YUZEFOVYCH, Larysa V.; LEDOUX, Susan P.; JULIE, Neil L. a WILSON, Glenn L. Troglitazone, but not rosiglitazone, damages mitochondrial DNA and induces mitochondrial dysfunction and cell death in human hepatocytes. Online. Toxicology and Applied Pharmacology. 2009, roč. 240, č. 3, s. 348-354. [cit. 2023-10-19] ISSN 0041008X.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.07.021>.
30. RANA, Payal; ALEO, Michael D.; WEN, Xuerong a KOGUT, Stephen. Hepatotoxicity reports in the FDA adverse event reporting system database: A comparison of drugs that cause injury via mitochondrial or other mechanisms. Online. Acta Pharmaceutica Sinica B. 2021, roč. 11, č. 12, s. 3857-3868. [cit. 2023-10-23]. ISSN 22113835.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2021.05.028>.
31. REAL, Mark; BARNHILL, Michele S.; HIGLEY, Cory; ROSENBERG, Jessica a LEWIS, James H. Drug-Induced Liver Injury: Highlights of the Recent Literature. Online. Drug Safety. 2019, roč. 42, č. 3, s. 365-387. [cit. 2023-11-14]. ISSN 0114-5916. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s40264-018-0743-2>.
32. ROBLES-DÍAZ, Mercedes; MEDINA-CALIZ, Inmaculada; STEPHENS, Camilla; ANDRADE, Raúl J. a LUCENA, M. Isabel. Biomarkers in DILI: One More Step Forward. Online. Frontiers in Pharmacology. 2016, roč. 7. [cit. 2024-03-11]. ISSN 1663-9812.
Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00267>.

33. RODRÍGUEZ-PÉREZ, Raquel a GEREBTZOFF, Grégori. Identification of bile salt export pump inhibitors using machine learning: Predictive safety from an industry perspective. Online. *Artificial Intelligence in the Life Sciences*. 2021, roč. 1. [cit. 2024-02-15]. ISSN 26673185.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ailsi.2021.100027>.
34. ROTH, Alexander D. a LEE, Moo-Yeal. Idiosyncratic Drug-Induced Liver Injury (IDILI): Potential Mechanisms and Predictive Assays. Online. *BioMed Research International*. 2017, roč. 2017, s. 1-23. [cit. 2023-10-02]. ISSN 2314-6133.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1155/2017/9176937>.
35. SAGINI, Krizia; BURATTA, Sandra; DELO, Federica; PELLEGRINO, Roberto Maria; GIOVAGNOLI, Stefano et al. Drug-Induced Lysosomal Impairment Is Associated with the Release of Extracellular Vesicles Carrying Autophagy Markers. Online. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021, roč. 22, č. 23. [cit. 2023-11-23]. ISSN 1422-0067.
Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms222312922>.
36. STINE, Jonathan G. a LEWIS, James H. Current and future directions in the treatment and prevention of drug-induced liver injury: a systematic review. Online. *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology*. 2016, roč. 10, č. 4, s. 517-536. [cit. 2023-10-16]. ISSN 1747-4124.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1586/17474124.2016.1127756>.
37. SUH, Jeong Ill. Drug-induced liver injury. Online. *Yeungnam University Journal of Medicine*. 2020, roč. 37, č. 1, s. 2-12. [cit. 2024-01-31]. ISSN 2384-0293.
Dostupné z: <https://doi.org/10.12701/yujm.2019.00297>.
38. TEMPLE, Robert. Hy's law: predicting serious hepatotoxicity. Online. *Pharmacoepidemiology and Drug Safety*. 2006, roč. 15, č. 4, s. 241-243. [cit. 2023-10-22]. ISSN 1053-8569.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/pds.1211>.
39. TESCHKE, Rolf. Treatment of Drug-Induced Liver Injury. Online. *Biomedicines*. 2023, roč. 11, č. 1. [cit. 2024-03-17]. ISSN 2227-9059.
Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/biomedicines11010015>.

40. UMSCHIED, Craig A.; MARGOLIS, David J. a GROSSMAN, Craig E. Key Concepts of Clinical Trials: A Narrative Review. Online. *Postgraduate Medicine*. 2015, roč. 123, č. 5, s. 194-204. [cit. 2023-11-20]. ISSN 0032-5481.
Dostupné z: <https://doi.org/10.3810/pgm.2011.09.2475>.
41. UNZUETA, Alberto a VARGAS, Hugo E. Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drug–Induced Hepatotoxicity. Online. *Clinics in Liver Disease*. 2013, roč. 17, č. 4, s. 643-656. [cit. 2023-11-02]. ISSN 10893261.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.cld.2013.07.009>.
42. VILLANUEVA-PAZ, Marina; MORÁN, Laura; LÓPEZ-ALCÁNTARA, Nuria; FREIXO, Cristiana; ANDRADE, Raúl J. et al. Oxidative Stress in Drug-Induced Liver Injury (DILI): From Mechanisms to Biomarkers for Use in Clinical Practice. Online. *Antioxidants*. 2021, roč. 10, č. 3.[cit. 2023-04-05] ISSN 2076-3921.
Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/antiox10030390>.
43. WALKER, Paul A.; RYDER, Stephanie; LAVADO, Andrea; DILWORTH, Clive a RILEY, Robert J. The evolution of strategies to minimise the risk of human drug-induced liver injury (DILI) in drug discovery and development. Online. *Archives of Toxicology*. 2020, roč. 94, č. 8, s. 2559-2585. [cit. 2023-10-16]. ISSN 0340-5761. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02763-w>.
44. WANG, Pengcheng; PRADHAN, Komal; ZHONG, Xiao-bo a MA, Xiaochao. Isoniazid metabolism and hepatotoxicity. Online. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 2016, roč. 6, č. 5, s. 384-392. [cit. 2024-03-09]. ISSN 22113835.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2016.07.014>.
45. YEW, Wing Wai; CHANG, Kwok Chiu a CHAN, Denise P. Oxidative Stress and First-Line Antituberculosis Drug-Induced Hepatotoxicity. Online. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2018, roč. 62, č. 8, s. e02637-17. [cit. 2023-11-15]. ISSN 0066-4804. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/AAC.02637-17>.
46. ZHANG, Charles J.; MEYER, Sophia R.; O’MEARA, Matthew J.; HUANG, Sha; CAPELING, Meghan M. et al. A human liver organoid screening platform for DILI risk prediction. Online. *Journal of Hepatology*. 2023, roč. 78, č. 5, s. 998-1006. [cit. 2024-03-16]. ISSN 01688278.
Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2023.01.019>.

47. ZHANG, Chunyan; ZHAO, Yabin; YU, Mengli; QIN, Jianru; YE, Bingyu et al. Mitochondrial Dysfunction and Chronic Liver Disease. Online. Current Issues in Molecular Biology. 2022, roč. 44, č. 7, s. 3156-3165. [cit. 2024-04-25]. ISSN 1467-3045. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/cimb44070218>.
48. ZHANG, Zhiguo; ZHOU, Shanshan; JIANG, Xin; WANG, Yue-Hui; LI, Fengsheng et al. The role of the Nrf2/Keap1 pathway in obesity and metabolic syndrome. Online. Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders. 2015, roč. 16, č. 1, s. 35-45. [cit. 2024-04-24]. ISSN 1389-9155. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s11154-014-9305-9>.

Webové odkazy

Web 1. SPRINGER LINK. The Critical Role of Mitochondria in Drug-Induced Liver Injury. Online.

Dostupné z: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-58106-4_8/figures/1. [cit. 2024-01-22].

Web 2. NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. LiverTox. Online.

Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK547852/>. [cit. 2023-09-03].

Web 3. FDA. Drug Induced Liver Injury Rank (DILIRank) Dataset. Online.

Dostupné z: <https://www.fda.gov/science-research/liver-toxicity-knowledge-base-ltkb/drug-induced-liver-injury-rank-dilirank-dataset>. [cit. 2023-12-02].

Web 4. MEDIATELY. AULIN 100MG Granule pro perorální suspenzi. Online.

Dostupné z:

<https://mediately.co/cz/drugs/PAYzy0WEpuEzquj0K1s1OwAb6VU/aulin-100mg-granule-pro-peroralni-suspenzi>. [cit. 2023-10-24].

Rejstřík obrázků

Obr. 1. Mechanismus mitochondriálního poškození.	16
Obr. 2. Schématické znázornění osy Keap1/Nrf2.....	19
Obr. 3. Mechanismus stresu ER.....	21
Obr. 4. Popis UPR cesty.	23
Obr. 5: Mechanismus lysozomálního poškození.....	24
Obr. 6. Mechanismus inhibice transportu žlučových kyselin.	26
Obr. 7 Mechanismus aktivace imunitní odpovědi.	30
Obr. 8 Souhrnný obrázek mechanismů souvisejících s DILI s uvedenými modelovými hepatotoxickými léčivy.	33