

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2018

Kateřina Tkačíková

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Využití HLA antigenů jako prediktivních biomarkerů farmakologické
odpovědi

Kateřina Tkačíková

Bakalářská práce

2018

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2016/2017

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Kateřina Tkačíková**
Osobní číslo: **C14351**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Název tématu: **Využití HLA antigenů jako prediktivních biomarkerů farmakologické odpovědi**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Prostudujte a popište systém HLA antigenů a jejich základní úlohu v organismu.
2. Prostudujte a popište význam genetiky a genomiky v medicíně se zaměřením na predikci farmakologické odpovědi a výskytu nežádoucích účinků.
3. Proveďte literární rešerši významu HLA antigenů pro farmakologickou odpověď. Vyhledejte recentní avšak studiemí ověřené souvislosti mezi výskytem nežádoucích účinků a konkrétních HLA antigenů.

Rozsah grafických prací: dle potřeby

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: tištěná

Seznam odborné literatury:

Böhm, R. & Cascorbi, I., 2016. Pharmacogenetics and Predictive Testing of Drug Hypersensitivity Reactions. *Frontiers in pharmacology*, 7(OCT), p.396.
González-Galarza, F.F. et al., 2015. Allele frequency net 2015 update: new features for HLA epitopes, KIR and disease and HLA adverse drug reaction associations. *Nucleic acids research*, 43(Database issue), pp.D784-8.
Hughes, A.R. et al., 2008. Pharmacogenetics of hypersensitivity to abacavir: from PGx hypothesis to confirmation to clinical utility. *The pharmacogenomics journal*, 8(6), pp.365-74.
Charron, D., 2011. HLA, immunogenetics, pharmacogenetics and personalized medicine. *Vox sanguinis*, 100(1), pp.163-6.
Pavlos, R., Mallal, S. & Phillips, E., 2012. HLA and pharmacogenetics of drug hypersensitivity. *Pharmacogenomics*, 13(11), pp.1285-306.
Su, S.-C. et al., 2016. Severe Cutaneous Adverse Reactions: The Pharmacogenomics from Research to Clinical Implementation. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(11), p.1890.
Databáze: IMGT/HLA (<http://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/nomenclature/>)
The HLA Adverse Drug Reaction Database (<http://www.allelefrequencies.net/hla-adr/default.asp>)
PharmGKB (<https://www.pharmgkb.org>)

Vedoucí bakalářské práce: PharmDr. Antonín Libra, Ph.D.
Generi Biotech s.r.o. Hradec Králové

Datum zadání bakalářské práce: 28. listopadu 2016

Termín odevzdání bakalářské práce: 7. července 2017



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2017

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 3. 7. 2018

Kateřina Tkačíková

Poděkování

Chtěla bych tímto upřímně poděkovat vedoucímu bakalářské práce, panu PharmDr. Antonínu Librovi, Ph.D., za ochotu, připomínky, trpělivost, vedení a pomoc při tvorbě tohoto díla. Dále nesmím opomenout rodinu a přátele, i jim patří velký dík za morální, psychickou a finanční pomoc během celého studia.

Anotace

Hlavní histokompatibilitní systém (MHC) u člověka je odpovědný nejen za správné fungování imunitního systému, ale také za kompatibilitu transplantovaných tkání, či reakci organismu na léčiva. V úvodu práce je proto stručně popsána charakteristika HLA systému, jeho funkce v organismu a klasifikace antigenů dle jednotlivých tříd. Další část je věnována genetice a genomice (obor genetiky zabývající se studiem genomů), jejich úloze při predikci farmakologické odpovědi a výskytu nežádoucích účinků. V poslední části práce jsou popsány asociace mezi konkrétními HLA molekulami a nežádoucími účinky indikovanými léčivy.

Klíčová slova: HLA systém, farmakogenetika, farmakogenomika, nežádoucí účinky

Title: Use of HLA antigens as predictive biomarkers of pharmacological response

Summary

The major human histocompatibility system (MHC) is responsible not only for the correct functioning of the immune system but also for the compatibility of the transplanted tissues or the response of the body to the drug. The introduction of the thesis is therefore a brief description of the HLA system its function in the organism and classification of antigens according to individual classes. The next part is devoted to genetics and genomics (study of genetics dealing with the study of genomes) their role in prediction of pharmacological response and occurrence of undesirable effects. The last part of the thesis describes associations between specific HLA molecules and adverse drug reactions.

Keywords: HLA system, pharmacogenetics, pharmacogenomics, adverse drug reactions

Obsah

Úvod.....	14
1 HLA systém.....	15
1.1 Historie MHC.....	15
1.2 Charakteristika a polymorfismus	16
1.3 Rozdělení a klasifikace	17
1.3.1 HLA I. třídy.....	17
1.3.2 HLA II. třídy	18
1.3.3 HLA III. třídy.....	18
1.4 Názvosloví (nomenklatura).....	19
1.5 Databáze.....	19
1.5.1 Databáze Allele Frequency Net (AFND).....	19
1.5.2 EMBL-EBI a IPD-IMGT / HLA.....	21
2 Farmakogenetika a farmakogenomika	22
2.1 Vysvětlení pojmů a rozdíly	22
2.2 Využití farmakogenetiky v medicíně.....	23
2.3 Nežádoucí účinky.....	24
2.3.1 Dělení nežádoucích účinků	24
2.3.2 Nežádoucí účinky vyvolané HLA molekulami.....	25
2.3.3 Hypersenzitivita	26
3 HLA molekuly ve farmakologii	31
3.1 Význam HLA ve farmakologii.....	31
3.2 Příklady léčiv s asociacemi HLA molekul.....	31
3.2.1 Abakavir (ABC).....	32
3.2.2 Nevirapin (NVP).....	34
3.2.3 Allopurinol	35
3.2.4 Karbamazepin (CBZ, carbamazepin).....	37
4 Závěr.....	40
Reference	42

Seznam ilustrací a tabulek

Obrázek 1: <i>Počet objevených HLA molekul v průběhu let</i>	16
Obrázek 2: <i>Uspořádání genů na chromozomu</i>	17
Obrázek 3: <i>Podjednotková struktura HLA I. a II. třídy</i>	18
Tabulka 1 <i>Přípony v nomenklatuře</i>	19

Seznam použitých zkratk a značek

ABC	Abacavir (Abakavir)
ADR	Adverse Drug Reaction (nežádoucí účinky)
AFND	The Allele Frequency Net Database
AGEP	Acute Generalized Exanthemous Pustulosis (Akutní generalizovaná exanematózní pustulóza)
ALT	Enzym alaninaminotransferáza
APC	Antigen-presenting Cell (Antigen prezentující buňka)
BMI	Body Mass Index (Index tělesné hmotnosti)
CBZ	Carbamazepin (Karbamazepin)
CD1	Cluster of Differentiation 1 (označení pro diferenciační skupinu neklasických MHC molekul I. třídy)
CD4+	Označení pro pomocné T-lymfocyty
CD8+	Označení pro cytotoxické T-lymfocyty
DHS	Drug Hypersensitivity Syndrome (Hypersenzitivní syndrom vyvolaný léky)
DIHS	Drug Induced Hypersensitivity Syndrome (Hypersenzitivní syndrom vyvolaný léky)
DILI	Drug Induced Liver Injury (Poškození jater vyvolané léky)
DISI	Drug Induced Skin Reaction (Kožní reakce vyvolané léky)
DNA	Deoxyribonucleic acid (Deoxyribonukleová kyselina)
DRESS	Drug Reaction with Eosinophilia and Systemic Symptoms (Poléková reakce s eosinofilií a systematickými symptomy)
EBI	The European Bioinformatics Institute (Evropský bioinformační institut)
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid (kyselina ethylendiamintetraoctová)
EMBL	European Molecular Biology Laboratory (Evropská laboratoř molekulární biologie)
EpFreq-DB	The HLA Epitope Frequencies Database (Databáze frekvence epitopů HLA)

EPMA	The European Association for Predictive, Preventive and Personalised Medicine (Evropská asociace pro preventivní, prediktivní a personalizovanou medicínu)
FDA	U. S. Food and Drug Administration (Úřad pro kontrolu potravin a léčiv Spojených států amerických)
G6PD	Enzym glukosa-6-fosfátdehydrogenasa
H-2	Označení hlavního histokompatibilitního systému myši
HAART	Highly Active Antiretroviral Therapy (vysoce aktivní antiretrovirová léčba)
HIV	Human Immunodeficiency Virus (virus lidské imunitní nedostatečnosti)
HLA	Human Leukocyte Antigen (lidský leukocytární antigen)
HLA-A	Název skupiny klasických HLA molekul I. třídy
HLA-A*31:01	Název konkrétní HLA alely
HLA-A2	Název konkrétní HLA molekuly (alely)
HLA-B	Název skupiny klasických HLA molekul I. třídy
HLA-B*15:02	Název konkrétní HLA alely
HLA-B*35:05	Název konkrétní HLA alely
HLA-B*57:01	Název konkrétní HLA alely
HLA-B*58:01	Název konkrétní HLA alely
HLA-C	Název skupiny klasických HLA molekul I. třídy
HLA-Cw*04	Název konkrétní HLA alely
HLA-Cw8-HLA-B*14:02	Název haplotypu HLA alely
HLA-DP	Název skupiny klasických HLA molekul II. třídy
HLA-DQ	Název skupiny klasických HLA molekul II. třídy
HLA-DQA1*02:01	Název konkrétní HLA alely
HLA-DR	Název skupiny klasických HLA molekul II. třídy
HLA-DRB1*01:01	Název konkrétní HLA alely
HLA-DRB1*01:02	Název konkrétní HLA alely
HLA-DRB1*07:01	Název konkrétní HLA alely
HLA-E	Název skupiny neklasických HLA molekul I. třídy
HLA-F	Název skupiny neklasických HLA molekul I. třídy

HLA-G	Název skupiny neklasických HLA molekul I. třídy
IgE	Imunoglobulin E
IHWS	International HLA and Immunogenetics Workshops (Mezinárodní imunogenetický seminář)
IMGT	ImMunoGeneTics project (Imunogenetický projekt)
IPD	The Immuno Polymorphism Database (Databáze polymorfizmů v imunologii)
karbovir-TP	Karbovir-trifosfát
KDDB	KIR and Disease Database (KIR a databáze nemocí)
KIR	Killer-cell Immunoglobulin-like Receptors (imunoglobulinové receptory podobné zabíječským buňkám)
MAC	Původní název HLA molekuly HLA-A2
MHC	Major Histocompatibility Complex (hlavní histokompatibilitní systém)
MPE	Maculopapular exanthem (Makulopapulární exantém)
mRNA	Messenger Ribonucleic acid (mediátorová ribonukleová kyselina)
NK	Natural Killer Cell
NNRTI	Non-Nucleoside reverse transcriptase inhibitors (Nenukleosidové inhibitory reverzní transkriptázy)
NRTI	Nucleoside reverse transcriptase inhibitors (Nukleosidové inhibitory reverzní transkriptázy)
NSAID	Nonsteroidal anti-inflammatory drug (nesteroidní antiflogistika; nesteroidní antirevmatika; nesteroidní protizánětlivé léky)
NÚ	Nežádoucí účinek
NVP	Nevirapine (Nevirapin)
P450 3A4	Cytochrome P450 3A4 (Cytochrom P450 3A4)
p-i	Pharmacological Interactions (farmakologické interakce léčiv s imunitními receptory)
SCAR	Severe Cutaneous Adverse Drug Reaction (závažné kožní nežádoucí účinky)
SJS	Stevens-Johnson Syndrome (Stevens-Johnsonův syndrom)
SÚKL	Státní ústav pro kontrolu léčiv

TCR	T-cell Receptor (T-buněčný receptor)
TEN	Toxic Epidermal Necrolysis (Toxická epidermální nekrolýza)
WHO	World Health Organization (Světová zdravotnická organizace)

Úvod

HLA antigeny (z důvodu srozumitelnosti dále používáno HLA molekuly) slouží v lidském organismu jako ochrana proti chorobám. Molekuly HLA jsou u člověka kódovány geny hlavního histokompatibilního komplexu (MHC), který je velice důležitou částí imunitního systému. Výraznou roli hrají geny MHC při transplantacích, proto bývají nazývány transplantačními geny. To ale není jejich jediná funkce. Díky nim organismus dokáže rozlišit tělu vlastní a cizorodé buňky či patogeny. Uplatnění mají také při vývoji T-lymfocytů. Molekuly HLA jsou rozděleny do tří tříd. Třídy se od sebe liší strukturami i funkcemi a ovlivňují a regulují funkci imunitního systému. V první části práce je popsána charakteristika HLA systému, rozdělení do již zmíněných tříd, nomenklatura (názvosloví) HLA alel používaná od roku 2010 a jsou zde také zmíněny některé databáze využívané po celém světě.

Druhá část práce se zabývá podobnými, ale přece jen rozdílnými obory – farmakogenetikou a farmakogenomikou. První ze jmenovaných se zabývá vlivem genetické výbavy člověka na účinnost léčiv a výskyt nežádoucích účinků. Cílem druhého oboru je nalézt souvislosti mezi odpověďmi na lék a proměnlivostí genomu. Farmakogenetika i farmakogenomika úzce souvisí s personalizovanou medicínou. Jak název napovídá, jedná se o obor medicíny, kde lékař přistupuje k pacientovi jako jednotlivci od anamnézy, po konečnou farmakoterapii. Pokud se po podání léčiva vyskytnou nežádoucí účinky, je nutné s indikací přestat a zjistit příčinu jejich vzniku. Jejich vznik může být ovlivněn genetickými i negenetickými faktory.

V poslední době se zvýšil počet publikací a odborných článků spojujících nežádoucí účinky s konkrétními HLA molekulami. Proto se poslední část práce zabývá výskytem nežádoucích účinků indikovaných léčivy či jejich metabolity v důsledku přítomnosti konkrétních HLA molekul. Na základě genetických screeningových vyšetření se dá, i když ne se 100% určitostí, předpovědět, zdali se u pacienta nežádoucí účinky vyskytnou, či nikoli. Je zde vypsáno několik konkrétních léčivých látek, např. abakavir, karbamazepin, nevirapin a allopurinol, při jejichž indikaci je výskyt nežádoucích účinků velice častý, především u pacientů s danými HLA molekulami. Abakavir a nevirapin jsou antiretrovirové látky indikované při léčbě HIV. Karbamazepin patří do skupiny antikonvulzivních látek a allopurinol je předepisován při vysokých hodnotách kyseliny močové.

1 HLA systém

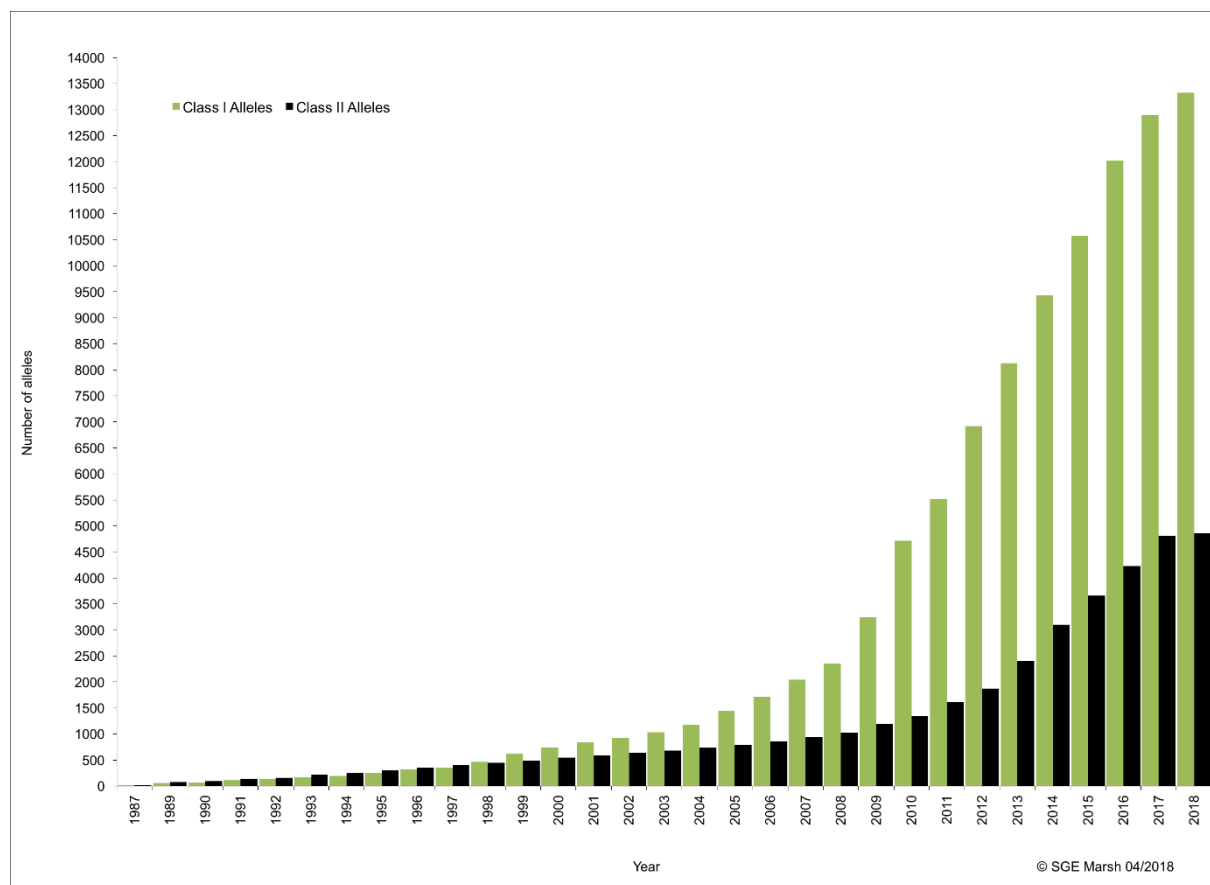
1.1 Historie MHC

Prvotní pozorování probíhalo mezi třicátými a padesátými lety minulého století. Bylo zjištěno, že histokompatibilitní komplex (H-2) je odpovědný za odmítnutí transplantace kožního štěpu u myši. V roce 1958 byla objevena u lidí první alela s původním názvem MAC. Dnes je známá jako alela HLA-A2. V šedesátých a sedmdesátých letech bylo odhaleno, že geny tohoto komplexu se účastní imunitní odpovědi. Byly známy tři lokusy klasických HLA molekul: HLA-A, HLA-B a HLA-C. Krátkou dobu nato se ukázalo, že k produkci B-lymfocytů je nutná účast T-lymfocytů a HLA molekul. Vymezila se restrikce MHC, což je schopnost cytotoxických T-lymfocytů likvidovat pouze buňky, které exprimují na svém povrchu cizí antigen pouze v komplexu s molekulami HLA I. nebo II. třídy. V osmdesátých letech přišly na řadu objevy lokusů HLA-DR, HLA-DQ a HLA-DP. Poznala se hlavní funkce MHC systému v imunitní odpovědi. Neklasické antigeny byly objeveny až v devadesátých letech. [26, 27]

Brzy po objevu restrikce MHC bylo zřejmé, že molekuly MHC působí nejen při rozpoznávání antigenů, ale také při vývoji T-lymfocytů. Následovalo zjištění, že MHC molekuly váží peptidy. Tyto peptidy hrají klíčovou roli jak v autotoleranci, tak v případě infekcí, což vyvolává imunitní odpovědi T-lymfocytů. Zkoumaly se rentgenové struktury molekul MHC I. a II. třídy. Z těchto molekul byly eluovány (tzn. vyluhovány, vymývány) peptidy s vazbou, které poskytly další informace o jejich biologii. [26, 27]

V roce 1980 získali Baruj Benacerraf (venezuelsko-americký patolog a imunolog), Jean Dausset (francouzský lékař a imunolog) a George Davis Snell (americký genetik) Nobelovu cenu za fyziologii a medicínu „za objevy týkající se geneticky určených struktur na povrchu buněk, které regulují imunologické reakce“. Další Nobelovu cenu za fyziologii a medicínu dostali v roce 1996 Peter Charles Doherty (australský imunolog a veterinární lékař) a Rolf Martin Zinkernagel (švýcarský biolog a imunolog) „za objevy týkající se specifčnosti buněčné imunitní obrany“. [29]

Tyto objevy ještě zdaleka nejsou konečné, protože vyvstala spousta otázek zaměřených na to, jakou úlohu má MHC ve zdravém i v nemocném organismu pacienta.



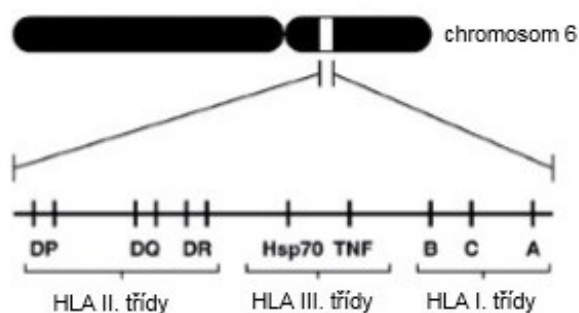
Obrázek 1: Počet objevených HLA molekul v průběhu let [30]

1.2 Charakteristika a polymorfismus

Hlavním histokompatibilitním systémem u člověka (MHC) je HLA systém. Glykoproteinové molekuly MHC, nazývány transplantačními antigeny, mají významnou roli v imunitním systému. Podílí se na jeho funkci a regulaci, zajišťují rozpoznávání vlastních i cizích buněk a patogenů. V případě přítomnosti cizí látky, dokáží molekuly zesílit kontakty mezi buňkami. Výhodou těchto molekul je jejich vysoká afinita. Základní funkcí tohoto systému je vázání a následné vystavení peptidových fragmentů na povrchu buňky tak, aby T-lymfocyty pomocí specifických receptorů pro antigen (TCR) dokázaly tyto fragmenty rozeznat. Neklasické molekuly mohou místo peptidů navázat a prezentovat lipidové molekuly. Počet HLA molekul se liší podle typu i funkce buňky. Buňky předkládající antigen (APC) mají na svém povrchu mnohonásobně více HLA znaků, oproti jiným somatickým buňkám. Kromě

ochrany organismu vůči chorobám, jsou HLA molekuly spojovány i s jejich zvýšeným výskytem, např. hypersenzitivitou vyvolanou léky. [1-6, 14, 20]

HLA systém se nachází na krátkém raménku 6. chromosomu, v oblasti 6p21. Zahrnuje více než 200 genů, z nichž kolem 40 genů kóduje antigeny leukocytů. Geny MHC jsou multialelické a výrazně polymorfni. Znamená to tedy, že jednotliví členové populace, mohou mít různé alely na daném lokusu. Sekvence ve vazebném místě peptidu (drážce či žlábků) je polymorfni proto, že každý alotyp HLA molekuly představuje jedinečné kombinace peptidů, které jsou nabízeny T-lymfocytům. Jejich přítomnost v organismu je podmíněna genetickou výbavou rodičů. Jsou kombinovány maternálními a paternálními alelami současně (kodominantně). Tím se rozšiřuje pravděpodobnost zachycení a rozpoznání patogenů. Děděny jsou podle 2. Mendelova zákona. Některé haplotypy HLA mají v určitých populacích častější výskyt. Jedná se o tzv. *linkage disequilibrium*, což znamená vazebnou nerovnováhu. [1-6, 14, 20]



Obrázek 2: Uspořádání genů na chromozomu [1]

1.3 Rozdělení a klasifikace

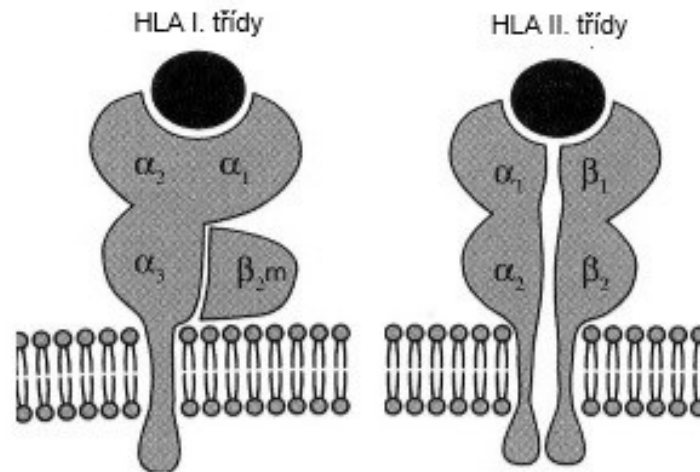
Geny HLA molekul jsou rozděleny do tří tříd lišících se funkcemi i strukturami.

1.3.1 HLA I. třídy

Molekuly I. třídy se nachází na všech somatických jaderných buňkách organismu. Nejvíce však na buňkách imunitního systému. Jsou odpovědné za aktivaci CD8⁺ cytotoxických T-lymfocytů. Exprese na jiných buňkách je ovlivňována cytokiny. Mezi klasické molekuly patří HLA-A, HLA-B a HLA-C. Mezi neklasické se řadí HLA-E, HLA-F, HLA-G a také molekuly skupiny CD1, které mají jiný lokus než MHC, ale podobnou strukturu a funkci. Vysoký stupeň polymorfismu u klasických genů MHC umožňuje vazbu nejrůznějších antigenních peptidů. Neklasické geny jsou na rozdíl od klasických méně polymorfni, exprimují pouze na některých buňkách a váží na sebe především zvláštní ligandy.

Molekuly HLA první třídy se skládají z jednoho těžkého α řetězce a jednoho lehkého β řetězce. Řetězec α je transmembránový a polymorfni. Skládá se ze tří domén – α_1 , α_2 a α_3 . Nopolymorfni řetězec β tvořený β_2 -mikroglobulinem je kódován na dlouhém raménku 15. chromozomu, v oblasti 15q21 – 15q22. Důležitá je také sekundární struktura řetězců.

Domény α_1 a α_2 jsou N-terminální a vytváří vazebné místo pro peptidy, zvané také jako vazebná rýha či žlábek. Tyto řetězce mají strukturu alfa šroubovice (alfa helix) a tvoří boční stěny žlábků. Dno vazebného místa tvoří α_3 a β_2 . Oba tyto řetězce mají strukturu skládaného listu. Z důvodu uzavření obou konců vazebného místa, se zde mohou vázat pouze takové peptidy, které mají velikost 8-10 aminokyselin. Většina peptidů je navázána na vazebném místě aminokyselinami jdoucími za sebou. V případě delších peptidů jsou navázány pouze koncové aminokyseliny. [1-6, 15, 20]



Obrázek 3: Podjednotková struktura HLA I. a II. třídy [3]

1.3.2 HLA II. třídy

Na buňkách prezentujících antigeny, např. B-lymfocyty, makrofágy, monocyty, dendritické buňky, jsou fyziologicky přítomny molekuly II. třídy. Na T-lymfocytech se molekuly II. třídy exprimují po aktivaci antigenem, či po působení imunomodulačních látek. Pro svou účast na regulaci imunitní odpovědi jsou označovány jako antigeny Ia (immune response associated antigens) a odpovídají za aktivaci CD4⁺ pomocných T-lymfocytů. Tato třída obsahuje D oblast, která se dále dělí na tři podoblasti: DR, DQ a DP. Molekuly HLA druhé třídy se liší od molekul HLA první třídy podjednotkovou strukturou. HLA druhé třídy se skládá ze dvou těžkých řetězců α a dvou lehkých řetězců β . Vazebné místo pro peptidy je tvořeno N-terminálními doménami řetězců α_1 a β_1 . Dno žlábků, tvořeno řetězci ve formě skládaného listu, přechází do šroubovice, která vytváří boční stěny. Z důvodu otevřených konců vazebného místa, HLA II. třídy dokážou vázat peptidy o délce 15-35 aminokyselin, popř. i delší. [1-4, 6, 15, 20]

1.3.3 HLA III. třídy

Geny pro HLA molekuly třetí třídy se nachází mezi lokusy HLA-B a HLA-DR. I když je tato třída zahrnuta do HLA komplexu, strukturně ani funkčně se HLA molekulám nepochodá.

Oblast lokusu třetí třídy nese geny pro funkce související s imunitním systémem, např. tumor nekrotizující faktor alfa, lymfotoxin alfa, proteiny teplotního šoku. [1-4, 6, 15]

1.4 Názvosloví (nomenklatura)

V roce 1968 Světová zdravotnická organizace (WHO) založila Nomenklaturní výbor, který měl za úkol přehledné pojmenování jednotlivých alel. Názvosloví bylo postupně zdokonalováno, ale v průběhu času počet HLA alel výrazně vzrostl. V roce 2010 bylo nutno tuto nomenklaturu zlepšit. Mezi jednotlivá číselná označení se přidal separátor, který usnadňuje orientaci. [1, 7, 8]

V dnešní době má každá alela své jedinečné označení. To je složeno až ze čtyř sad čísel, která mají dané pořadí i význam. Vysvětlení jednotlivých částí označení je uvedeno na příkladu HLA-DRB1*13:01:01:02. Název začíná označením genu pro *HLA* oblast a následuje lokus genu *-DRB1*. Po separátoru je číslo skupiny alel kódujících antigen - 13. Za tímto číslem pak následují separátory, které oddělují jednotlivá pole v pořadí: specifická HLA alela, alela lišící se od specifické alely a alela obsahující mutaci mimo kódující oblast. Na konci označení se také mohou vyskytovat písmenné přípony, jejichž význam je v následující tabulce 1. [8]

Tabulka 1 Přípony v nomenklatuře
(Upraveno podle [8])

Značka	Význam	
N	null	alela není exprimována
L	low	alela exprimována méně oproti normálním hladinám
S	secreted	alela vyjádřena, ale je nepřítomna na povrchu buňky
C	cytoplasm	alely přítomny v cytoplasmě, nepřítomny na povrchu buňky
A	aberrant	exprese aberantní alely
Q	questionable	diskutabilní exprese alely

1.5 Databáze

1.5.1 Databáze Allele Frequency Net (AFND)

Databáze Allele Frequency Net (AFND) byla spuštěna v roce 2003. Zpočátku se skládala pouze z několika sekcí a během své existence se stále vyvíjela a měnila. Byla navržena tak, aby se stala bezplatným centralizovaným zdrojem informací pro širokou odbornou i laickou veřejnost. Je nejkomplexnější celosvětovou databází týkající se počtu či frekvence alel a genů. Uchovávají se zde on-line data o alelických frekvencích v jednotlivých populacích z celého světa, např. o frekvencích genů HLA systému, receptorech NK buněk KIR,

genech souvisejících s hlavním histokompatibilním systémem nebo informace o počtu genů cytokinů s polymorfismem. Dále zde můžeme najít výsledky studií identifikující asociace jednotlivých HLA molekul a nežádoucích účinků vyvolaných léky nebo sekci infekčních a autoimunitních onemocnění spojených s polymorfismem KIR. Informace pocházejí z více než 1500 populací a necelých 10,5 mil. zdravých jedinců. Data poskytují tři hlavní zdroje: recenzované články a publikace (tvoří přibližně 80 % dat), populace analyzované IHWS a individuální laboratoře. [24, 25]

Databáze EpFreq-DB je nová sekce AFND pro uchovávání a shromažďování dat o epitopových HLA frekvencích napříč celosvětovou populací. Epitopy HLA jsou specifické oblasti molekuly HLA. Těmito oblastmi se liší molekuly HLA transplantačních pacientů. Znalost epitopů je velice důležitá při transplantacích a je rozhodujícím faktorem souvisejícím s hojením tkáně a štěpů. Současná snaha o přizpůsobení transplantace, především ledvin, minimalizuje počet neshod v HLA molekulách. Velmi zřídka se dosahuje dokonalé shody. Přesto však toto porovnání nezohledňuje mezi molekulami strukturální rozdíly nebo podobnosti. Názvy epitopů musí být podle nomenklatury, zavedené v roce 2010, alespoň čtyřmístné (např. B*57:01). Dvoustupňové názvy (dvě číslice) mají o daném epitopu málo rozlišovacích údajů, protože zde nejsou zahrnuty i rozdílné sekvence proteinů HLA molekul. Data alelických frekvencí nemohou být použity pro přesné odvození HLA molekul, protože stejný epitop se může nacházet u stejného jednotlivce na různých alelách. [24, 25]

K dalším novým sekcím databáze patří KDDB. Obsahuje informace o asociacích, které byly identifikovány mezi polymorfismem KIR a autoimunitními nebo infekčními nemocemi. Z důvodu mnoha studií a malé velikosti vzorku jsou tato data výzkumnými pracovníky stále prověřována a porovnávána např. mezi populacemi. [24, 25]

Jedním z největších problémů, s nimiž se potýkají lékaři a farmaceutické společnosti, je riziko, že se u pacientů po podání léků vyvinou nežádoucí účinky. Přibližně < 20 % všech nežádoucích účinků je imunologicky zprostředkováno a nejvýznamnější asociace z genetického hlediska se vážou k HLA molekulám. Proto byla v AFND vytvořena i sekce pro nežádoucí účinky - ADR database. Ve výzkumech studujících asociace mezi HLA molekulami a nežádoucími účinky bývá v populacích pouze malý počet jedinců. Proto jsou zde umístěna data shromážděna z různých článků a publikací. To umožňuje uživatelům databáze např. zkoumat kvalitu těchto dat porovnáváním výsledků studií jednotlivých skupin se studiemi populací z celého světa. Jsou zde zahrnuty informace o etnickém původu, asociacích

konkrétních HLA molekul a léčivých látek nebo o typu nejčastějšího nežádoucího účinku. [24, 25]

1.5.2 EMBL-EBI a IPD-IMGT / HLA

The European Bioinformatics Institute (Evropský bioinformační institut) je centrum pro výzkum a služby v oblasti bioinformatiky. Jeho nadřazenou organizací je European Molecular Biology Laboratory (Evropská laboratoř molekulární biologie). Jako první na světě začali v roce 1980 shromažďovat data o nukleotidových sekvencích DNA. Původním cílem bylo vytvoření centrální databáze těchto sekvencí. V současné době je poskytován komplexní sortiment molekulárních databází včetně vzdělávacích programů. Data na EMBL-EBI zahrnují informace o genomice, proteinech, expresi či o proteinových strukturách. V úzké spolupráci s EMBL-EBI byla v roce 2003 vyvinuta databáze IPD, která poskytuje centralizovaný systém pro studium polymorfismu genů imunitního systému. V sekcích databáze IPD najedeme i databázi IPD-IMGT / HLA, která je součástí mezinárodního imunogenetického projektu – ImMunoGeneTics project. Tato část se specializuje na sekvence hlavního lidského histokompatibilitního komplexu. Zahrnuje oficiální sekvence uvedené ve Výboru pro nomenklaturu WHO pro faktory systému HLA a zajišťuje pojmenování nově publikovaných sekvencí, aby nedocházelo k nedorozuměním a problémům (např. více názvů pro totožnou sekvenci). Výhodou této databáze je i častá aktualizace nomenklatury HLA molekul jak v odborných časopisech, tak on-line. [8, 25]

2 Farmakogenetika a farmakogenomika

2.1 Vysvětlení pojmů a rozdíly

Farmakogenetika i farmakogenomika jsou vědní obory patřící do oblasti farmakologie. Snaží se zlepšit způsob užívání léků, ať už na základě znalostí reakcí pacienta na lék, tak znalostmi toho, kdy je dosaženo maximálního účinku a minimální toxicity. Farmakogenetika studuje vliv polymorfismu jednotlivců na různé účinky farmak či jiných biochemických látek. Často zaměňovaným pojmem je farmakogenomika, což je novější a širší vědní oblast zabývající se studiemí expresí genů ve tkáních, fenotypu a jeho odpovědí na léčivo. [9 - 13]

První zmínku o farmakogenetice můžeme nalézt již v období starověkého Řecka. Tehdy si Pythagoras všiml, že u některých populací žijících v okolí Středozevního moře, se může po požití bobů (*Vicia faba*) rozvinout hemolytická anémie. V dnešní době je onemocnění známo pod pojmem favismus. Způsobuje jej deficit enzymu glukosa-6-fosfátdehydrogenasa (G6PD) a patří mezi nejčastější enzymová onemocnění. [13]

Vznik farmakogenetiky jako vědního oboru předpovídal už ve své knize z roku 1931 Sir Archibald Garrod. Následně v roce 1949 J. B. S. Haldane předpověděl na základě biochemické individuality výskyt neobvyklých farmakologických odpovědí a v roce 1959 farmakolog Friedrich Vogel zavedl termín *farmakogenetika*. Ta se zabývá vztahy mezi různými genetickými variacemi a jejich individuálními reakcemi na daná léčiva. Cílem tohoto vědního oboru je identifikace jednoho genetického markeru či celé skupiny genetických markerů, které by sloužily jako predikce, jak bude daný pacient pravděpodobně reagovat na léčbu. Identifikace genetických determinant je důležitá především pro správné dávkování léčebné látky a má také vliv na účinnost a bezpečnost léčby. Většina farmakogenetických studií došla k závěru, že rozdílné farmakologické odpovědi mezi jednotlivými pacienty či mezi populacemi nejsou způsobeny mutací jediného genu, ale změnou četných genů interagujících s environmentálními faktory. Tímto se ovšem dostáváme k tomu, že většina odpovědí je multifaktoriálních a toto zjištění vedlo ke zvýšenému zájmu o farmakogenomiku. [11-13]

Termín *farmakogenomika* byl zaveden p. Marshalllem v roce 1997. Stoupajícímu zájmu napomohlo také vylouštění lidského genomu v roce 2003. Farmakogenomická vyšetření vyžadují zvýšené využití metod určených ke studiu více genů či genetických vzorků. Metody mají současně sledovat strukturu a expresi genu nebo celého souboru genů. Díky nově získaným znalostem a technologickému pokroku jsme v dnešní době schopni vyhodnocovat a pozorovat více genů a jejich reakcí na léčivo současně. Zvýšenou pozornost o farmakogenomiku také

způsobil fakt, že genová exprese může být pozměňována mRNA a je tudíž variabilní. To znamená, že množství genu může být změněno. K tomuto jevu dochází díky proměně jeho transkribovaného proteinu v tkáni, čímž se změní funkční vliv genu. Jeden genový produkt může nejen snížit nebo zvýšit expresi jiných genů, ale může také dojít k epigenetickým změnám. Expresie může být ovlivněna také faktory, mezi něž se řadí například spánek, emoce, strava, fyzická námaha aj. [11, 13]

Předpokládá se, že v budoucnu výsledky farmakogenomických výzkumů budou nápomocny u preklinických zkoušek, u aplikací léčiv a při výběru optimální léčby. Toto vše by mělo zajistit zvýšení bezpečnosti pacientů. [20]

Souhrnně tedy můžeme říct, že farmakogenetika se zabývá skutečností, že se v organismech vyskytují geny, které mají za následek různé farmakologické odpovědi. Oproti tomu farmakogenomika se mimo jiné také zabývá druhotnými změnami genové funkce. [11]

2.2 Využití farmakogenetiky v medicíně

Prudký růst nových poznatků a vývoj inovativních a moderních technologií v molekulární genetice, dále také rozvoj chemie, fyziky, anatomie a dalších vědních oborů zapříčinil vývoj *personalizované medicíny*. Základem tohoto multidisciplinárního oboru je farmakogenetika, jako obor studující vliv genů na účinnost léčiv a výskyt nežádoucích účinků, a farmakogenomika, jejímž cílem je nalezení souvislostí mezi lékovými odpověďmi a proměnlivostí genomu. [16-19]

Pojem personalizovaná medicína se poprvé objevuje v roce 1998 v knize, kterou napsal K. K. Jain. Autor se zde především zabývá definicí personalizované medicíny, jejím historickému vývoji a využití. O dvacet let později, v roce 2008, je založena Evropská asociace pro preventivní, prediktivní a personalizovanou medicínu (EPMA). Cílem asociace je kromě sdružování zástupců zemí Evropské unie také provádění výzkumu a zavádění jejich výstupů do rutinní praxe. Touto činností ekonomicky pomáhá efektivnějšímu vývoji léčiv i zpřesnění diagnostiky. [16, 18, 19]

Jak již název napovídá, personalizovaná medicína je odvozena od personalizovaného přístupu lékaře k jednotlivým pacientům od přesné anamnézy, přes příznaky (subjektivní i objektivní), stanovení diagnózy až po farmakoterapii. [16]

Reakce lidského organismu na aplikovanou farmakoterapii a farmakologickou odpověď je závislá jak na faktorech negenetických, tak genetických. Mezi negenetické faktory se řadí např. věk, hmotnost, pohlaví a jiné souběžné nemoci, což jsou faktory rutinně zvažovány

lékařem. Faktory genetické studuje právě farmakogenetika a nejsou součástí rutinní praxe. Je důležité poznamenat, že screening, prováděný z nesrážlivé krve odebrané do EDTA, nezjišťuje genetickou výbavu, která souvisí s onemocněním, ale s geny, jejichž přítomnost dokáže změnit odpověď organismu na podané léčivo. Na výsledcích farmakogenetických vyšetření (na znalosti genetické výbavy pacienta) závisí volba a dávkování léčiva. Jsou identifikováni pacienti, kteří mají farmakogeneticky významný genotyp či fenotyp a tím mohou léčiva rozdílně metabolizovat či eliminovat. Tyto rozdíly způsobují výskyt nežádoucích účinků farmakoterapie nebo její neúčinnost. Indikací farmakologického screeningu před zahájením farmakoterapie je možné předejít výskytu nežádoucích účinků, předpovědět odpověď organismu na terapii i omezit vznik toxicity léčiva. Pokud se vyskytne u pacienta léková odpověď s neočekávaným průběhem, či na léčbu nereaguje a léčba je tedy neúčinná, je možné vyšetření provést i v průběhu terapie a dle výsledků a možností změnit podávané léčivo. [11, 16 - 19]

2.3 Nežádoucí účinky

Nežádoucími účinky léků rozumíme všechny účinky léků a reakce pacienta na jemu podávaný lék, které jsou nepříznivé. Mezi závažné nežádoucí účinky se řadí takové, které pacienta ohrožují na životě, popřípadě mohou mít za následek jeho smrt. Za bezpečné léky se považují všechny, u kterých přínosy léčby převažují nad riziky a poškozením pacienta. Další snaha, předcházet nežádoucím účinkům, je přínosná nejen pro předcházení zdravotních rizik, ale také i pro snížení nemalých ekonomických nákladů spojených např. s následnou léčbou a péčí o postiženého pacienta. [20,21]

2.3.1 Dělení nežádoucích účinků

Podle Rawlinse a Thompsona byly v roce 1977 nežádoucí účinky rozděleny do dvou skupin – A a B. Nežádoucí účinky typu A jsou ve srovnání s nežádoucími účinky typu B častější, na základě farmakologických vlastností a velikosti dávky předvídatelné. Nežádoucí účinky typu B, které nejsou předvídatelné, mohou a nemusí být přímo imunologicky zprostředkované nezávisle na dávce. Ze všech nežádoucích účinků imunologicky zprostředkované nežádoucí účinky tvoří < 20 %. Tyto reakce jsou dále klasifikovány podle Gelle a Coombse do čtyř skupin. Typy I-III jsou závislé na protilátkách, kde T-lymfocyty mohou a nemusí být přítomny a typ IV je zpožděná reakce zcela zprostředkovaná T-lymfocyty. Typ I je charakteristický okamžitou reakcí v průběhu jedné hodiny po podání léku, za kterou je zodpovědná přítomnost IgE. Jedná se např. o alergickou reakci na penicilin a patří zde

symptomy jako kopřivka, angioedém či anafylaxe. Typ IV je zcela zprostředkovaný reaktivními T-lymfocyty. Tyto reakce mohou být vyvolané i silnými asociacemi s HLA molekulami. Do tohoto typu nežádoucích účinků patří klinické fenotypy od makulopapulárního exantému až po závažné kožní nežádoucí účinky (SCAR), jako je např. Stevens-Johnsonův syndrom/Toxická epidermální nekrolýza (SJS/TEN), akutní generalizovaná exanthematózní pustulóza (AGEP), poléková reakce s eosinofilií a systematické symptomy (DRESS). Mimo jiné tento typ také zahrnuje postižení jednotlivých orgánů vyvolané léky, jako např. poškození jater (DILI), pankreatitida nebo agranulocytóza. [20, 21]

Vzhledem k závažnosti nežádoucích účinků je velice žádoucí znalost mechanismů imunitního systému, které vedou k patogenezi. Při reálné opožděné hypersenzitivní reakci (nebo reakce IV. typu) se symptomy obvykle vyskytují po expozici antigenu nebo léčiva nejméně po dobu tří dnů. Protože HLA molekuly I. jsou odpovědné za aktivaci CD8+ a HLA molekuly II. třídy jsou odpovědné za aktivaci CD4+ T-lymfocytů, studie zkoumaly mechanismy hypersenzitivní reakce vyvolané léky *ex vivo*. Prokázalo se, že T-lymfocyty jsou aktivované léčivy nebo jejich metabolity způsobujícími hypersenzitivní reakci a vymezily roli antigen prezentujících buněk u pacientů trpící HSR. [23]

Od nástupu přesnější typizace HLA molekul i důkladnějším preklinickým testům, bylo zaznamenáno několik asociací mezi HLA molekulami I. i II. třídy a nežádoucími účinky typu B, tj. výskytem syndromů hypersenzitivity (DRESS, DIHS, SJS/TEN). Přítomnost určité HLA molekuly v genetické výbavě pacienta ovšem nemusí nutně znamenat, že tato HLA molekula je odpovědná za vývoj vzniklé hypersenzitivní reakce. [20, 23]

2.3.2 Nežádoucí účinky vyvolané HLA molekulami

Imunologicky zprostředkované nežádoucí účinky byly tradičně klasifikovány jako nepředvídatelné na základě farmakologického účinku léčiv. Tento typ NÚ je spojen se závažnými kožními problémy (např. Stevens-Johnsonův syndrom), vysokým procentem hospitalizací pacientů a značnou morbiditou. V poslední době se díky vývoji komunikačních technologií a dostupností informací přišlo na několik možných asociací mezi léčivy a molekulami HLA I. i II. třídy. Dosud zjištěné informace o asociacích mezi HLA a léčivy byly použity pro preklinické testování. Klinicky a epidemiologicky jsou nežádoucí účinky klasifikovány jako reakce typu A, které jsou předvídatelné na základě známých farmakologických účinků léčiv, nebo jako reakce typu B, které jsou méně časté, nezávislé na dávce a nepředvídatelné na základě známého farmakologického účinku a pravděpodobně souvisí i s farmakogenetickými faktory. Mezi reakce typu B se řadí například alergické reakce.

Mezi opožděné hypersenzitivní reakce patří DIHS, DRESS a SJS/TEN, které se někdy zahrnují do společné klasifikace závažných kožních příznaků SCAR. Dále zde patří DILI, jako jednoorgánové onemocnění vyvolané léky. Konkrétně se jedná o onemocnění jater. [23]

Nejběžnější z nežádoucích účinků je DIHS, který má celou řadu klinických projevů. Charakterizován je například horečkou, hepatitidou nebo abnormalitami bílých krvinek. Velice často se objevuje vyrážka či jiné postižení kůže a může být doprovázen i selháním orgánů (jater, plic, ledvin nebo srdce). Vyskytuje se u pacientů všech populací, kteří byli léčeni antiretrovirovými látkami (abakavir, nevirapin, fosamprenavir), allopurinolem, antikonvulzními látkami (karbamazepin, fenytoin, fenobarbital, lamotrigin), β -laktamovými antimikrobiálními látkami, NSAID – nesteroidními protizánětlivými léky nebo antimikrobiálními sulfáty (aromatické sulfonamidy). [23]

Nejčastější hypersenzitivní syndrom DHS postihující pouze jeden orgán je DILI. Toto jednoorgánové onemocnění postihuje játra. Může být spojováno s fulminantním jaterním selháním (virová hepatitida), s geny regulujícími transport a metabolismus léčiv, homeostázu žlučové kyseliny nebo s imunologickými mechanismy. DILI se vyskytuje u pacientů, kterým byla indikována farmakoterapie flucloxacilinem, amoxicilin/klavulanátem nebo tetracyklinovými antibiotiky. [23]

SJS/TEN sdílí některé klinické a laboratorní znaky s DIHS/DRESS. Také mají opožděný nástup, spojitost s horečkou a postižením orgánů. Navíc jsou SJS/TEN charakterizovány výskytem puchýřů na kůži. Přestože je jejich výskyt poměrně neobvyklý, oba nežádoucí účinky mají vysokou morbiditu a mortalitu (1-5% mortalita u SJS, 30-50% mortalita u TEN). Onemocnění jsou klasifikována podle stupně postižení kůže a procentuálního postižení na celém povrchu těla. Stevens-Johnsonův syndrom je označení onemocnění při postižení 10 % tělesného povrchu, při toxické epidermální nekrolýze je postiženo více než 30 %. Z toho vyplývá, že SJS/TEN se vzájemně překrývají a postižení se pohybuje mezi 10 – 30 %. Syndromy může trpět pacient, jemuž byly podány stejné léky, které způsobují DIHS/DRESS. Jedná se o allopurinol, aromatické aminové antikonvulziva, antiretrovirotika (nevirapin) nebo NSAID. [23]

2.3.3 Hypersenzitivita

Hypersenzitivní reakce vyvolaná léky prezentuje celou skupinu nežádoucích účinků typu B. Projevuje se širokou škálou klinických příznaků a tyto příznaky mohou být iniciovány velkým množstvím strukturálně různorodých chemických sloučenin. Patofyziologické mechanismy hypersenzitivity nejsou dobře známy, ale předpokládá se, že jsou zprostředkovány

imunologicky. Jednou z nejčastějších reakcí je opožděná hypersenzitivita, která je zprostředkována T-lymfocyty. [14]

Opožděná hypersenzitivita může být vyvolána velkým množstvím léků. Příznaky se mohou objevit od několika hodin nebo až několika týdnů po užití léčiva. Klinické projevy se pohybují od mírných kožních vyrážek, které nevyžadují žádný terapeutický zásah, až po kožní reakce doprovázené systémovými příznaky, jakožto i postižením několika životně důležitých orgánů. Vzhledem k různorodosti příznaků a nedostatku jednoduchých a spolehlivých testů je velice obtížné lékovou hypersenzitivitu diagnostikovat. [14]

Klinické využití testů *in vivo* a *in vitro* je velice nízké. Testy slouží především k potvrzení diagnózy. V souvislosti s výskytem hypersenzitivních reakcí při užívání antikonvulzivních látek bylo provedeno testování pomocní kožních náplastí. Toto testování pomocí náplastí se používá k měření přítomnosti aktivovaných T-lymfocytů, které by způsobily lékem vyvolanou opožděnou hypersenzitivní reakci. Lymfocytární odpověď se projevuje erytémem (zarudnutím) a indurací (zatvrdnutím) kůže v oblasti, kde je náplast na kůži přilepena a dochází ke styku s podezřelým lékem. Testování náplastí může být použito jako potvrzení hypersenzitivity např. abakaviru. [14]

Mezi rizikové faktory vzniku hypersenzitivní reakce patří také etnikum. U pacientů s různým genetickým původem mohou být významným rizikovým faktorem pro vznik hypersenzitivní reakce vyvolanou léky různé HLA molekuly. Pro názornost uvedu příklad se SJS/TEN indukovaným karbamazepinem. Silná asociace byla potvrzena u čínské populace Han a u thajské populace s alelou HLA-B*15:02. Stejná asociace ale nebyla potvrzena u kavkazské a japonské populace, pravděpodobně kvůli malé frekvenci výskytu alely v těchto populacích. Oproti tomu abakavirem indukovaná hypersenzitivita, spojená s alelou HLA-B*57:01, se vyskytuje u všech etnických skupin (včetně kavkazských a afrických). [14]

2.3.3.1 Modely hypersenzitivní reakce

Jsou zavedeny tři modely popisující hypersenzitivní reakce zprostředkované T-lymfocyty:

- haptén/prohaptén
- model p-i
- modifikovaný model p-i

Model haptén/prohaptén popisuje kovalentní vazbu haptenu (léčivá látka v nezměněné formě) nebo prohaptenu (metabolit léku) na endogenní protein. Původně neimunogenní

hapten/prohapten je intracelulárně zpracován a jako neoantigen vystaven na molekule MHC. Neoantigen je nový antigen, vzniklý modifikací původního, např. navázáním léku nebo části jiné molekuly. Je rozpoznán T-lymfocyty, což indukuje imunitní odpověď.

Model p-i navrhuje, aby se léčivo nezávisle na zpracování antigenu mohlo přímo vázat na receptory T-lymfocytů nebo na molekuly MHC. Tím pak přímo a s dostatečnou afinitou stimulovat T-buňky. Tento model může vysvětlit, proč některé podané léky v organismu pacienta mohou imunologicky vyvolat nežádoucí účinky během několika sekund již po první expozici léčiva.

Třetím je modifikovaný model p-i. Léčivá látka se naváže na vazebné místo molekuly HLA, začlení se a změní tvar. Tato molekula HLA poté zobrazuje změněnou množinu vlastních peptidů, jež T-lymfocyty považují za cizí. Jako příklad je tedy uváděná asociace abakaviru a molekuly HLA-B*57:01. Abakavir se na vazebné místo molekuly HLA-B*57:01 váže nekovalentně, specificky se začleňuje a mění tvar. Molekula HLA-B*57:01, na kterou se abakavir takto navázal, poté vystavuje vlastní změněné peptidy, které T-lymfocyty nedokáží rozpoznat a nepovažují je za tělu vlastní, ale za cizorodé. [20]

Mezi další hypersenzitivní reakce spojené s HLA molekulami I. třídy se řadí karbamazepinem (CBZ) indukovaný SJS/TEN s přítomností alely HLA-B*15:02 a allopurinolem indukovaný SJS/TEN a DRESS s alelou HLA-B*58:01. Přestože přítomnost těchto dvou výše zmiňovaných alel – HLA-B*15:02 a HLA-B*58:01 má vysokou pravděpodobnost výskytu syndromů hypersenzitivity, stále mají menší prediktivní hodnotu než výskyt hypersenzitivní reakce abakaviru u alely HLA-B*57:01. Prediktivní hodnota karbamazepinem a allopurinolem indikovaných hypersenzitivních syndromů u těchto specifických alel je < 3 %, u abakaviru je to téměř 55 %. [20]

2.3.3.2 DILI

Poškození jater vyvolané léky může být výsledkem přímé toxicity z podaného léku nebo jeho metabolitů, případně může být poškození zprostředkované imunologicky. Větší pravděpodobnost vzniku DILI je spojována s léky, které jsou podávány perorálně, protože jejich metabolismus probíhá především v játrech. Bioaktivní metabolity léků se vážou na buněčné proteiny a následně jsou vystaveny molekulám hlavního histokompatibilního komplexu na buňkách prezentujících antigen. Tato interakce vyvolává imunitní reakci namířenou proti hepatocytům, ve které hrají roli i molekuly HLA. [31]

Většina případů DILI patří mezi akutní onemocnění a dá se vyřešit ukončením léčby. Klinické příznaky DILI jsou velice podobné jiným formám onemocnění jater (hepatitidy nebo

choleestázy) – únava, nauzea (nevolnost), malátnost či žloutenka. V souvislosti s imunitními mechanismy, mohou být přítomny i klinické příznaky hypersenzitivity – horečka, vyrážka a eozinofilie. [31]

Diagnostikovat DILI by měl lékař na základě důkladné anamnézy a vývoje v časové posloupnosti od podání léku po vznik prvních příznaků jaterního poškození. Nezbytné je vyloučení jiných onemocnění jater – autoimunitní či infekční. Poškození jater vyvolané pouze v závislosti na dávce se objeví během několika hodin až dnů, oproti poškození vyvolanému imunitní reakcí, které se projeví i několik týdnů po podání léku. Důležitým faktorem správné diagnózy DILI je zlepšení stavu pacienta po ukončení indikace léčiva. Z důvodu bezpečnosti není vhodné pacienta opětovně vystavovat působení dříve indikovaného léku a pozorovat, zda se jeho zdravotní stavlepší, či nikoliv. DILI je také spojován se zvýšenou hladinou jaterních enzymů a bilirubinu. [31]

Až u 18 % pacientů léčených vysoce aktivní antiretrovirovou terapií (HAART) se vyvinul DILI. Riziko se zvyšuje při konzumaci alkoholu, u pacientů staršího věku a ženského pohlaví. Kromě toho souběžná infekce virem hepatitidy B a hepatitidy C zvyšuje frekvenci a závažnost poškození jater. Ačkoliv všechny antiretrovirotika mohou indukovat vznik hepatotoxicity, mezi nejpravděpodobnější léčiva patří nenukleosidové inhibitory reverzní transkriptázy, např. nevirapin. Ten je spojován s vysokým výskytem jaterní toxicity a pozitivitou alely HLA-DRB*01:01. Klinicky se DILI indukovaný nevirapinem objevuje buď časně, nebo po několika měsíční léčbě. Dalším rizikovým faktorem pro DILI indukovaného abakavirem je pozitivita HLA B*57:01. Proto před indikací tohoto léku je vhodný genetický screening pacienta. [31]

2.3.3.3 SJS a TEN

Stevens-Johnsonův syndrom a toxická epidermální nekrolýza, známá též jako Lyellův syndrom, jsou nežádoucí hypersenzitivní reakce postihující kůži a sliznice. I když jsou poměrně vzácné, jsou natolik závažné, že v některých případech mohou končit smrtí pacienta. Nástup příznaků může nastat během několika dnů až osmi týdnů od zahájení terapie. SJS a TEN jsou rozdělovány podle stupně postižení povrchu těla. Stevens-Johnsonův syndrom je klasifikován jako postižení do 10 % kůže, toxická epidermální nekrolýza je při postižení okolo 30 % tělesného povrchu. Překrytí SJS/TEN tedy znamená, že bylo postiženo mezi 10 – 30 % povrchu. [32]

Výskyt SJS je přibližně třikrát častější, než výskyt TEN. Postižen jimi může být kterýkoliv pacient, jež má genetické predispozice. Nezáleží tedy na pohlaví ani na věku či rase.

Pravděpodobnější rozvoj SJS/TEN je u starších osob, žen a u pacientů infikovaných virem HIV. Mezi genetické faktory patří konkrétní molekuly HLA systému, které vedou ke zvýšení rizika výskytu SJS/TEN u pacientů léčených aromatickými antikonvulzivy a allopurinolem. Studie prokázaly častý výskyt SJS/TEN u pacientů čínské populace Han, thajské a malajské populace, kteří byli léčeni aromatickými antikonvulzivy a byla u nich prokázána pozitivita HLA-B*15:02. Dále opět u jedinců čínské populace Han s molekulou HLA-B*58:01, kteří byli léčeni allopurinolem. Nakonec také v evropské populaci u nositelů HLA-A*31:01 léčených karbamazepinem a nositelů HLA-B*57:01 užívajících abakavir. [32]

Počáteční příznaky jsou velice nespecifické – horečka, malátnost, bolest očí, kašel, rýma a myalgie (bolest svalů). Během následujících několika dní se na obličeji, trupu, dlaních a chodidlech vyskytnou puchýřky. V dalších fázích onemocnění jsou postiženy sliznice rtů a úst, gastrointestinální trakt (hltan, jícn), oblast genitálií a horní cesty dýchací. Zasaženy mohou být i orgány, jako např. játra, ledviny a plíce. K horečce a malátnosti se může také připojit faryngitida, což je zánět hltanu, bolest hlavy a symptomy způsobené dysfunkcemi zasažených orgánů. [32]

Pokud je u pacienta SJS nebo TEN diagnostikován, je potřeba ukončit indikaci léku způsobujícího SJS/TEN. Úmrtí pacienta je způsobeno především sepsí či multiorgánovým selháním - gastrointestinálním krvácením, plicní embolií, plicním edémem či infarktem myokardu. Mezi následky SJS/TEN patří např. kožní zjizvení, dystrofie nehtů, zánět dásní, zjizvení oční rohovky, snížená zraková ostrost až slepota a další. [32]

3 HLA molekuly ve farmakologii

3.1 Význam HLA ve farmakologii

Význam typizace HLA molekul v medicíně je velice široký. Standardní typizace probíhá například před transplantacemi ledvin. Dále také jako pomocné vyšetření u podezření na autoimunitní onemocnění, mezi něž se řadí např. Bechtěrevova choroba a revmatoidní artritida. V současné době se typizuje i v případě nádorové imunoterapie. Samozřejmě se nesmí opomenout ani typizace HLA molekul indikovaná před zahájením farmakoterapie pro případ, že u pacientů, jež jsou nositeli konkrétní alely HLA, se vyskytnou závažné nežádoucí účinky. Na základě doporučení Úřadu pro kontrolu potravin a léčiv Spojených států amerických (FDA) by měl pacient před zahájením léčby abakavirem a karbamazepinem podstoupit genetické testování. Klíčem k úspěšné celosvětové implementaci screeningu HLA molekul, je především efektivita a dostupnost testů. [22]

3.2 Příklady léčiv s asociacemi HLA molekul

Počet léčiv, v jejichž souhrnu údajů o přípravku je obsažena i informace o farmakogenomických biomarkerech, se neustále zvyšuje. V databázi FDA jsou například zmíněna níže vypsána léčiva včetně HLA molekul. [28]

- **Lapatinib**
V seznamu registrovaných léčiv SÚKL je prodávána pod názvem Tyverb a používá se v onkologii při léčbě pacientů s karcinomem prsu. Při užití tohoto přípravku je u pacientů, kteří jsou nositeli molekul HLA-DQA1*02:01 a HLA-DRB1*07:01 vyšší pravděpodobnost výskytu hepatotoxicity. Tyto alely se vyskytují v 15 – 25 % u kavkazské, asijské, africké a hispánské populaci a pouze 1% výskyt je u populace japonské. [21, 28]
- **Pazopanib**
K dostání v ČR je pod registrovaným názvem Votrient. Používá se při léčbě karcinomu ledvin a sarkomu měkkých tkání. U pacientů, kteří jsou nositeli alely HLA-B*57:01, je zvýšené riziko vyšší hadiny ALT. [21, 28]
- **Fenytoin**
Léčivá látka fenytoin se prodává v ČR pod názvem Epilan D Gerot. Indikován je podobně jako karbamazepin – při epileptických záchvatech a jako prevence rozvoje záchvatů po neurochirurgických zákrocích či po úrazech mozku.

Přítomnost alely HLA-B*15:02 může být spojena se vznikem syndromů SJS a TEN. Nástup nežádoucích účinků nastává do 28 dnů po podání přípravku, někdy i později. Zvýšené riziko vzniku SJS a TEN je u jedinců thajské nebo čínské populace. [21, 28]

3.2.1 Abakavir (ABC)

3.2.1.1 Indikace abakaviru

Abakavir lékaři terapeuticky indikují pacientům, kteří se nakazili virem lidské imunodeficiency (HIV).

V databázi léků Státního ústavu pro kontrolu léčiv je abakavir obsažen např. v těchto léčích:

- Ziagen (*abacavirum* jako *abacaviri sulfas*),
- Trizivir (*abacavirum* jako *abacaviri sulfas*, *lamivudinum*, *zidovudinum*),
- Triumeq (*abacavirum* jako *abacaviri sulfas*, *lamivudinum*, *dolutegravirum* jako *dolutegravirum natriicum*),
- Kivexa (*abacavirum* jako *abacaviri sulfas*, *lamivudinum*),
- Iviverz (*abacavirum*, *lamivudinum*)
- Abacavir/Lamivudine (*abacavirum*, *lamivudinum*)

Před zahájením léčby abakavirem je nutné provést screeningové vyšetření na přítomnost alely HLA-B*57:01 bez ohledu na rasový původ pacienta. Pokud se screeningem prokáže, že pacient je nositelem alely HLA-B*57:01, abakavir pacientovi nemá být podán. [21]

3.2.1.2 Farmakodynamika abakaviru

Abakavir se řadí mezi inhibitory reverzní transkriptázy (NRTI). Je to antivirotikum se silnou selektivní inhibicí replikace HIV-1 a HIV-2. Metabolizací intracelulárními kinázami je abakavir přeměněn na jeho aktivní formu – karbovir-TP, což je trifosfátová forma abakaviru. Mechanismus účinku je založen na inhibici enzymu HIV reverzní transkriptázy aktivní formou abakaviru. Antivirotický účinek spočívá především ve včlenění monofosfátové formy do virového řetězce DNA, což vede k ukončení tohoto řetězce. [21]

3.2.1.3 Farmakokinetika abakaviru

Abakavir se při perorálním podání rychle a dobře vstřebává v zažívacím traktu. Na lidské plazmatické proteiny se váže malou až střední měrou, proniká do centrální nervové soustavy, do mozkomíšního moku a dokáže procházet také placentou. Biotransformace abakaviru probíhá v játrech, kde je metabolizován alkoholdehydrogenázou a glukuronyltransferázou. Eliminován je renálně močí. Více než 83 % podané látky je vyloučeno ve formě metabolitů a intaktního abakaviru. Zbytek je eliminován z organismu pacienta stolicí. [21]

3.2.1.4 Abakavir a HLA-B*57:01

Syndrom hypersenzitivity indukovaný abakavirem, je jedním z nejlépe charakterizovaným vedlejším účinkem léků s asociací HLA, přestože je jeho diagnostika velice obtížná. Příznaky hypersenzitivity na abakavir mohou napodobovat infekce, které se u HIV pacientů často vyskytují. Vzhledem k velkému množství léků, které tito pacienti užívají, je těžké určit konkrétní lék, který hypersenzitivitu způsobuje, protože spousta léků může mít příznaky podobné. Hypersenzitivní reakce je spojená s alelou HLA-B*57:01. Screeningové vyšetření na přítomnost alely před zahájením léčby abakavirem je široce zavedeno v rutinní klinické praxi a je součástí mezinárodních směrnic pro léčbu HIV. Dříve bylo o nutnosti screeningových testů pochybováno. Důvodem byla snížená citlivost u hispánských a černošských populací, kde se frekvence této alely pohybuje na nízké úrovni. Tak malá citlivost u obou populací byla důsledkem vysokého počtu falešně pozitivních testů. Použitím specifického kožního testu pomocí náplasti byl problém s falešně pozitivními testy vyřešen, protože kožní testy identifikovaly pacienty s imunologicky vyvolanou hypersenzitivitou bez falešně pozitivních výsledků. Pozitivum testování HLA-B*57:01 je jeho 100% negativní prediktivní hodnota a celkem vysoká 55% pozitivní prediktivní hodnota. Současné výsledky studií naznačují, že samotná alela HLA-B*57:01 není nezbytná k vývoji hypersenzitivního syndromu. Důvodem je, že 100 % T-lymfocytů, které byly identifikovány *in vitro*, bylo HLA-B*57:01 pozitivních, ale u pouze 55 % pacientů se rozvinula hypersenzitivní reakce. [14, 20]

3.2.2 Nevirapin (NVP)

3.2.2.1 Indikace nevirapinu

Léčivá látka nevirapin je farmakoterapeuticky indikována pacientům, jež jsou nakaženi virem lidské imunodeficience (HIV), konkrétně HIV-1.

V České republice je léčivá látka nevirapin v seznamu SÚKL registrována pod těmito názvy léčiv:

- Nevirpine Teva (*nevirapinum*)
- Viramune (*nevirapinum*)

I když v Souhrnu údajů o přípravku není zmínka o asociacích s molekulami HLA I. třídy i HLA II. třídy, dle studií se tyto asociace mohou vyskytnout rozdílně v různých populacích. Jde o molekuly HLA-DRB*01:01 u populace západní Austrálie, haplotyp HLA-Cw8-HLA-B*14:02 u populace Sardů, haplotyp HLA-Cw8 u japonské populace a molekuly HLA-B*35:05 a HLA-Cw*04 u čínské populace Han a Afroameričanů. [23]

3.2.2.2 Farmakodynamika nevirapinu

Nevirapin se řadí mezi antiretrovirová léčiva. Je to nenukleosidový inhibitor reverzní transkriptázy (NNRTI). Používá v kombinaci s jinými antiretrovirovými jako součást vysoce aktivní antiretrovirové terapie. Nekompetitivně inhibuje reverzní transkriptázu viru HIV-1, ale neinhibuje reverzní transkriptázu viru HIV-2 či polymerázy DNA eukaryotických buněk alfa (α), beta (β), gama (γ) a delta (δ). [14, 21]

3.2.2.3 Farmakokinetika nevirapinu

Nevirapin je při perorálním podání snadno absorbován. V prostředí s fyziologickým pH, které zahrnuje úzké rozmezí hodnot (okolo 7,40), je neionizovaný. Tato lipofilní látka snadno prostupuje skrze placentu a při užití je možné jej nalézt i mateřském mléku. Nevirapin je metabolizován oxidativně cytochromem P450 na hydroxylované metabolity. Z organismu pacienta je okolo 80 % eliminováno renálně močí a okolo 11 % stolicí. Eliminovány jsou především glukuronidované metabolity nevirapinu (80 %) a pouze malá část původní sloučeniny (5 %). Clearance nevirapinu nezáleží na tělesné hmotnosti, indexu tělesné hmotnosti (BMI - Body Mass Index), pohlaví, věku ani rase. [21]

3.2.2.4 Nevirapin a HLA molekuly

Nežádoucí účinky vyvolané nevirapinem jsou závislé na genetice, imunologii i na metabolických drahách. Například u pacientů neinfikovaných HIV se častěji vyskytují závažnější jaterní reakce spojené s vyrážkami, než u jedinců HIV infikovaných. Nevirapin má v různých populacích rozdílné asociace s molekulami HLA I. i II. třídy. Nejvyšší riziko výskytu nevirapinem indukovaných kožních nežádoucích účinků (SJS/TEN, MPE) je u populace Afroameričanů a u jedinců čínské populace Han, jež jsou nositeli alely HLA-Cw*04. Studie v populaci Sardů ukázala asociaci HLA-DRB1*01:01 a HLA-DRB1*01:02 s nevirapinem indukovanými DISI a DILI, přičemž DILI je charakterizován žloutenkou. Alela HLA-B*35:05 v asociaci s nevirapinem vyvolala u pacientů DIHS. Další studie také ukázaly, že geny mimo lokus MHC spojené s vývojem konkrétních fenotypů mohou mít souvislost s hypersenzitivní reakcí vyvolanou nevirapinem. [14, 20]

3.2.3 Allopurinol

3.2.3.1 Indikace allopurinolu

Léčivá látka allopurinol je lékaři předepisována pacientům, jejichž zdravotní problémy souvisí s nadměrnou hladinou kyseliny močové nebo s jejími solemi (uráty, močany). Dospělým pacientům se podává při všech formách hyperurikémie a s tím související onemocnění, jakými jsou dna a urátová nefropatie. U dětí a dospívajících je navíc allopurinol indikován při Lesch-Nyhanovu syndromu a dalších enzymatických deficitech. Dále je užíván profylakticky u pacientů, jejichž léčba může v organismu zvýšit hladinu kyseliny močové. Jsou to pacienti s leukémií nebo lymfomy, kteří jsou ozařováni nebo léčeni cytotoxickými látkami. Užíváním allopurinolu se předchází tomu, aby se uráty ukládaly v tkáních či vznikaly ledvinové kameny.

V seznamu registrovaných léčiv se allopurinol v České republice prodává např. pod těmito názvy:

- Allopurinol Apotex (*allopurinolum*)
- Allopurinol Medreg (*allopurinolum*)
- Allopurinol Mylan (*allopurinolum*)
- Allopurinol Warren (*allopurinolum*)
- Allopurinol Glenmark (*allopurinolum*)
- Allopurinol Sandoz (*allopurinolum*)

- APO-ALLOPURINOL (*allopurinolum*)
- Milurit (*allopurinolum*)
- Purinol (*allopurinolum*)

Pokud se uvažuje o terapii allopurinolem, je vhodné, aby lékař zvážil screeningové vyšetření na přítomnost alely HLA-B*58:01. Toto opatření se týká především takových populací a etnických skupin, u jakých se tato alela vyskytuje s vyšší četností. Jedná se o čínskou populaci Han, thajskou a korejskou populaci. Pokud screening potvrdí přítomnost této alely, je doporučeno léčbu allopurinolem nezačít, případně zvážit jiné terapeutické možnosti. [21]

3.2.3.2 Farmakodynamika allopurinolu

Allopurinol patří do farmakoterapeutické skupiny léčiv, které inhibují tvorbu kyseliny močové. Je to tedy antiuraticum a inhibuje enzym xanthinoxidázu. Tento enzym katalyzuje oxidaci hypoxanthinu na xanthin, který je následně přeměněn na kyselinu močovou. Kompetitivní inhibicí enzymu allopurinolem a nekompetitivní inhibicí metabolitem allopurinolu – oxipurinolem (resp. aloxanthinem) – se dá farmakoterapeuticky snížit hladina koncentrace kyseliny močové nejen v plazmě, ale také v moči. [21]

3.2.3.3 Farmakodynamika allopurinolu

Po perorálním podání je léčivo allopurinol rychle absorbováno v gastrointestinálním traktu, konkrétněji v jeho horní části. Téměř nezatelně se váže na plazmatické proteiny. Do tkání je distribuován přibližně rovnoměrně vyjma mozkové tkáně. Ve vyšších koncentracích jej nalezneme v tkáních s vyšší aktivitou enzymu xanthinoxidázy. Mezi ně se například řadí játra či střevní sliznice. Allopurinol je eliminován močí, v níž v nezměněné formě je vylučováno > 10 % allopurinolu a okolo 75 % léčiva ve formě metabolitů, stolicí pak okolo 20 %. Eliminační poločas oxipurinolu je oproti nezměněné formě allopurinolu delší. V ledvinových tubulech totiž podléhá reabsorpci. Allopurinol i jeho metabolit oxipurinol se při užívání vylučuje do mateřského mléka. [21]

3.2.3.4 Allopurinol a HLA-B*58:01

Alela HLA-B*58:01 byla v čínské populaci Han identifikována jako genetický marker pro SJS/TEN indikovaný allopurinolem. I když je výskyt skutečné hypersenzitivní reakce velice nízký (přibližně 0,1 %), následné studie prokázaly asociaci této alely a allopurinolu v thajské, korejské a japonské populaci. Zhruba 60 % nežádoucích účinků allopurinolu v evropské a japonské populaci je způsobeno přítomností alely HLA-B*58:01. Nízká hodnota alely jako prediktivního biomarkeru naznačuje, že kromě přítomnosti této alely je v organismu

pacienta zapotřebí dalších faktorů, které by k vývoji nežádoucích účinků přispěly. Není znám přesný mechanismus účinku allopurinolu způsobující hypersenzitivitu. Bylo prokázáno, že delší poločas oxipurinolu je dostatečně malý na to, aby se mohl navázat na více míst na HLA molekule a přímo aktivovat T-lymfocyty. Tato skutečnost byla demonstrována *in vitro*, kde proběhla rychlá proliferace během několika sekund po expozici léčiva, což naznačuje zpracování nezávislých mechanismů. Zvýšená koncentrace allopurinolu v séru přispívá ke zvýšenému riziku vzniku nežádoucích účinků vyvolaných allopurinolem v závislosti na fenotypu pacienta. [20]

3.2.4 Karbamazepin (CBZ, carbamazepin)

3.2.4.1 Indikace karbamazepinu

Léčba karbamazepinem je indikována pacientům, kteří trpí např. epilepsiemi, jako léčba i prevence při různých typech epilepsie. Dále pak neuralgiemi, což jsou neepileptické záchvaty u roztroušené sklerózy a bolestivou diabetickou neuropatií. U bipolární afektivní poruchy je indikován jako léčba i jako profylaxe. Další užití je u alkoholového abstinčního syndromu při prevenci záchvatů a nemocí diabetes insipidus centralis.

V seznamu registrovaných léčivých přípravků Státního ústavu pro kontrolu léčiv lze účinná látka karbamazepin nalézt např. v těchto lécích:

- Biston (*carbamazepinum*)
- Neurotop (*carbamazepinum*)
- Tegretol CR (*carbamazepinum*)
- Timonil (*carbamazepinum*)

Jestliže pacient je thajské nebo čínské národnosti (čínská populace Han), je doporučováno, aby podstoupil testy na přítomnost alely HLA-B*15:02. Tato alela je spojována se zvýšeným rizikem vzniku nežádoucích účinků SJS a TEN. Při pozitivním výsledku screeningového testu na přítomnost této alely by léčba karbamazepinem neměla být zahájena a je-li to možné, měla by být nahrazena.

Zvýšený výskyt nežádoucích účinků je mimo alely HLA-B*15:02 spojován také s alelou HLA-A*31:01. Tato alela se vyskytuje především v evropské a japonské populaci. Screeningové vyšetření na přítomnost alely HLA-A*31:01 před zahájením farmakoterapie v tuto dobu ještě není doporučováno. [21]

3.2.4.2 Farmakodynamika karbamazepinu

Karbamazepin je řazen do skupiny antiepileptik a antikonvulziv 2. generace. Konkrétněji patří mezi iminostilbeny a řadí se mezi neurotropní a psychotropní deriváty diabenzazepinu. Je to tricyklická látka, která snižuje aktivitu thalamo-kortikálního a diencefalo-temporálního systému. Také do značné míry ovlivňuje amygdalo-hippokampový systém a tímto psychotropním účinkem přispívá k vyrovnaní emocionální lability. Jeho neurotropní účinky jsou využívány při léčbě neurologických poruch, např. idiopatické a sekundární neuralgie trigeminu a postherpetické neuralgie. Díky analgetickým účinkům také pacientům napomáhá od neuralgických bolestí. Při onemocnění diabetes insipidus centralis pomáhá pacientům se zmírněním pocitu žízně a snižováním objemu moče. Psychotropních účinků karbamazepinu se využívá při léčbě mánií a bipolárních afektních poruch. [21]

Mechanický účinek karbamazepinu spočívá v blokaci sodíkových kanálků, čímž se stabilizuje hyperexcitovaná nervová membrána, zabraňuje se opakujícím se neuronálním výbojům, mezi synaptickými spoji se snižuje šíření excitačních impulsů a je také sníženo uvolňování glutamátu. Díky tomu působí tato léčivá látka v organismu pacienta antiepilepticky. [21]

3.2.4.3 Farmakokinetika karbamazepinu

Na rozdíl od výše zmiňovaných léčiv je karbamazepin po perorálním podání absorbován pomalu a pomalá je i jeho distribuce. Váže se na plazmatické proteiny a prochází i placentou do plodu či do mateřského mléka. Z karbamazepinu vzniká pomocí izoenzymu cytochrom P450 3A4 farmakologicky aktivní metabolit karbamazepin-10, 11-epoxid (antikonvulzivum). V játrech je tato léčivá látka oxidována, deaminována, hydroxylována a nakonec esterifikována s kyselinou glukuronovou. Při tomto ději také vzniká glukuronid karbamazepinu. Epoxidován je hydrolázou na 10, 11-transdiolový derivát. Eliminace karbamazepinu probíhá renálně močí, kde se vyloučí okolo 70 % metabolitů karbamazepinu, a stolicí, jíž je vyloučeno zbylých 30 %. Nezměněné formy se vyloučí pouze okolo 2 – 3 %. [21]

3.2.4.4 Karbamazepin a HLA-B*15:02 a HLA-A*31:01

S karbamazepinem jsou spojovány imunologicky vyvolané nežádoucí účinky jako makulopapulární exantém, DRESS a SJS/TEN. Poslední ze jmenovaných je často spojován s molekulou HLA-B*15:02. Tato alela má vysokou alelickou frekvenci ve většině asijských populací. Konkrétně v čínské populaci Han se SJS/TEN rozvinul u všech pacientů, kteří byli nositeli alely HLA-B*15:02. Asociace karbamazepinu s alelou HLA-B*15:02 je specifická pouze pro SJS/TEN. Souvislost této alely s kožními reakcemi (DRESS) nebyla prokázána.

Další aromatická antikonvulziva (oxkarbazepin, fenytoin, lamotrigin) jsou slaběji asociována s alelou HLA-B*15:02, což naznačuje, že podobná struktura těchto léčiv přispívá riziku vzniku nežádoucích účinků. Studie potvrdily tuto hypotézu na základě testů u jiných čínských populací, nicméně stejná asociace nebyla potvrzena u japonských a evropských populací z důvodu nízkých alelických frekvencí (HLA-B*15:02 se vyskytuje < 0,1 % a < 1 %). Silnější asociace výskytu antikonvulzivně indikovaného DRESS má alela HLA-A*31:01. Studiemi se ukázalo, že alela HLA-A*31:01 vyskytující se přibližně u 7 % jedinců populace Han, u 7-12 % Japonců, 5 % Korejců a pouze u 2-5 % osob severoevropské populace má silnější asociaci s výskytem DRESS v tchajwanské, japonské a evropské populaci než s výskytem SJS/TEN. Karbamazepinem indukovaný SJS/TEN u pacientů pozitivních na přítomnost alely HLA-A*31:01 je omezen především na evropskou a japonskou populaci. [20]

4 Závěr

Bakalářská práce na téma *Využití HLA antigenů jako prediktivních biomarkerů farmakologické odpovědi* se zabývá problematikou nežádoucích účinků vyvolaných indikovanými léčivými na základě genetické výbavy pacienta.

První kapitola stručně popisuje historii MHC od prvních objevů, až po současnost. Zmiňují se zde jména několika vědců, kteří získali v letech 1980 a 1996 Nobelovy ceny za fyziologii a medicínu. Výše jmenovaní vědci ale nebyli jediní, kteří se podíleli na výzkumech MHC a HLA systému. Mnoho jich oceněno nebylo a jejich jména upadla v zapomnění. Také jim patří velký dík a obdiv za přínos medicíně. Kromě historie je zde popsána i charakteristika a hlavní funkce HLA systému v lidském organismu. Jsou zde popsány dvě databáze, ve kterých se dají dohledat přesná a aktuální data jak o počtech HLA alel, tak o alelických frekvencích v jednotlivých populacích či o asociacích mezi HLA a konkrétními léčivými v závislosti na etniku. Díky sjednocené nomenklatuře zavedené v roce 2010 je hledání a porovnávání alel pro odbornou i laickou veřejnost přehlednější a snazší. Další výhodou je srovnávání nově objevených alel s již existujícími. Takže je velice malá pravděpodobnost, že dvě totožné alely budou mít různá označení.

Objevem MHC a HLA započala éra nových poznatků o imunitním systému lidského těla a o jeho fungování. Proto jsou v druhé kapitole popsány nové obory, které slučovaly obory již existující, aby se dopátralo nových vědomostí a pomohlo se rozvoji medicíny a farmakologie. Mezi tyto obory se řadí farmakogenetika a farmakogenomika. I když je jejich název velice podobný a v mnohých publikacích je často zaměňován či brán jako tentýž obor, jejich náplně jsou rozdílné. Personalizovaná medicína, neboli též individuálně cílená medicína farmakogenetiku a farmakogenomiku spojuje a přidává k nim personalizovaný přístup lékaře k pacientovi, což přináší pro nemocné pacienty šanci na bezproblémový proces léčby. Současné zdravotnictví bere pacienty sjednoceně, farmakoterapie je předepisována dle potřeb většiny pacientů, díky čemuž se projevují nežádoucí účinky. Lepší, byť nákladnější, by byl individuální přístup.

Vývojem farmakogenetiky s přispěním moderních analytických metod se dá předpokládat široké uplatnění nejen v oblasti protinádorové léčby, ale také i v případě predikce nežádoucích účinků závislých na genetické výbavě pacienta. Pro mnoho léčivých přípravků ještě stále chybí přesvědčivé farmakogenetické důkazy o asociacích s HLA, nicméně ve spoustě Souhrnech údajů o přípravku nalezneme informace o farmakogenetických biomarkerech. Pokud tyto důkazy existují, je vhodné, aby před indikací farmakoterapie pacient

podstoupil screeningové testování. V závislosti na výsledcích vyšetření je na zvážení, zda je zamýšlená terapie vhodná, či nikoli. Jak můžeme vidět na příkladu abakaviru a karbamazepinu, screeningem se dá u konkrétních léčiv předcházet velkému množství závažných nežádoucích účinků, které byly dříve nepředvídatelné.

Výzkum a vývoj nových léčivých látek jde stále kupředu, stejně jako počet nově objevených HLA alel. Z toho se dá předpokládat, že se v budoucnu objeví nové asociace, a s nimi spojený i výskyt dalších nežádoucích účinků. Aby se potvrdily či vyvrátily hypotézy např. o hypersenzitivitě konkrétního farmaka, bude zapotřebí vyvinout nové jednoduché a účelné testovací metody využitelné i v klinické praxi. Pochopení asociací mezi léky a HLA může pomoci s výběrem optimální léčby, což vede ke zvýšení jak bezpečnosti pacientů, tak k účinnosti léčby.

Dle mého názoru je výzkum v oblasti farmakogenetiky a farmakogenomiky velice přínosný. Díky současným znalostem v těchto oborech jsme schopni určit, i když ne se 100% přesností, jak bude pacient na daný lék reagovat. Velice mě zaujalo, že konkrétní léčivé látky v asociaci s určitou alelou způsobovaly u různých etnických skupin rozdílné nežádoucí účinky. Znamená to tedy, že nezáleží pouze na léku a přítomnosti dané alely, ale také na dalších faktorech.

Znalosti z této oblasti mohou pomoci ochránit pacienta před případnými následky nevhodně podaného léku. Tímto se dá pomoci i zdravotnickému systému. Nežádoucími účinky postižení pacienti již nebudou potřebovat dodatečnou lékařskou péči, která může být věnována jiným pacientům.

Reference

- [1] DOBROVOLNÁ, Marie, Milena VRANÁ a Jan Evangelista DYR. Polymorfismus hlavního histokompatibilitního systému člověka: funkce - indikace - detekce - interpretace. *Chemické listy* [online]. Praha, ČR: Asociace českých chemických společností, 2015, **109**(1), 45-50 [cit. 2017-02-28]. ISSN 00092770. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2015_01_45-50.pdf
- [2] BUC, Milan a Miroslav FERENČÍK. *Imunogenetika*. Bratislava: Alfa plus, 1994. ISBN 80-967-1342-6.
- [3] HOŘEJŠÍ, Václav a Jiřina BARTUŇKOVÁ. *Základy imunologie*. 4. vyd. Praha: Triton, 2009. ISBN 978-80-7387-280-9.
- [4] BODMER, W F. The HLA system: structure and function. *Journal of Clinical Pathology* [online]. 1987, **40**(9), 948-958 [cit. 2017-03-10]. DOI: 10.1136/jcp.40.9.948. ISSN 0021-9746. Dostupné z: <http://jcp.bmj.com/cgi/doi/10.1136/jcp.40.9.948>
- [5] BJORKMAN, P. J., M. A. SAPER, B. SAMRAOUI, W. S. BENNETT, J. L. STROMINGER a D. C. WILEY. Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature* [online]. 1987-10-8, **329**(6139), 506-512 [cit. 2017-03-10]. DOI: 10.1038/329506a0. ISSN 0028-0836. Dostupné z: <http://www.nature.com/doi/finder/10.1038/329506a0>
- [6] KLEIN, Jan a Akie SATO. The HLA System. *New England Journal of Medicine* [online]. 2000, **343**(10), 702-709 [cit. 2017-02-15]. DOI: 10.1056/NEJM200009073431006. ISSN 0028-4793. Dostupné z: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJM200009073431006>
- [7] MARSH, S. G. E., E. D. ALBERT, W. F. BODMER, et al. Nomenclature for factors of the HLA system, 2010. *Tissue Antigens* [online]. 2010, **75**(4), 291-455 [cit. 2017-02-28]. DOI: 10.1111/j.1399-0039.2010.01466.x. ISSN 00012815. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1399-0039.2010.01466.x>
- [8] ROBINSON, J, J. A. HALLIWELL, J. H. HAYHURST, P. FLICEK, P. PARHAM a S. G. E. MARSH. The IPD and IMGT/HLA database: allele variant databases. *Nucleic Acids Research* [online]. 2015, **43**,D423-431 [cit. 2018-05-21]. Dostupné z: <http://hla.alleles.org/nomenclature/index.html>
- [9] SLÍVA, Jiří a Martin VOTAVA. *Farmakologie*. Praha: Triton, 2011. Lékařské repetitorium. ISBN 978-80-7387-500-8.
- [10] PRITCHARD, D. J. a Bruce R. KORF. *Základy lékařské genetiky*. Praha: Galén, c2007. ISBN 978-80-7262-449-2.
- [11] KALOW, W. Pharmacogenetics and pharmacogenomics: origin, status, and the hope for personalized medicine. *The Pharmacogenomics Journal* [online]. 2006, **6**(3), 162-165 [cit. 2017-03-29]. DOI: 10.1038/sj.tpj.6500361. ISSN 1470-269x. Dostupné z: <http://www.nature.com/doi/finder/10.1038/sj.tpj.6500361>

- [12] GROSSMAN, Iris a David B. GOLDSTEIN .Pharmacogenetics and pharmacogenomics. *Essentials of genomic and personalized medicine*. Amsterdam: Elsevier/Academic Press, 2010, 175 - 190. ISBN 9780123749345.
- [13] PIRMOHAMED, Munir. Pharmacogenetics: past, present and future. *Drug Discovery Today* [online]. 2011, 16(19-20), 852-861 [cit. 2017-04-26]. DOI: 10.1016/j.drudis.2011.08.006. ISSN 13596446. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359644611002571>
- [14] ALFIREVIC, Ana a Munir PIRMOHAMED. Drug Induced Hypersensitivity and the HLA Complex. *Pharmaceuticals* [online]. 2011, 4(1), 69-90 [cit. 2017-02-10]. DOI: 10.3390/ph4010069. ISSN 1424-8247. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1424-8247/4/1/69/>
- [15] HLA Alleles Numbers: Assigned as of December 2017. *HLA Nomenclature* [online]. [cit. 2018-02-01]. Dostupné z: <http://hla.alleles.org/nomenclature/stats.html>
- [16] TOPOLČAN, Ondřej a Judita KINKOROVÁ. Personalizovaná medicína. *Klin Farmakol Farm* [online]. 2012, 26(3), 121-122 [cit. 2018-03-16]. ISSN 1803-5353. Dostupné z: <https://www.klinickafarmakologie.cz/pdfs/far/2012/03/04.pdf>
- [17] BARTOŠOVÁ, Olga, Ondřej SLANAŘ a Irena NETÍKOVÁ. Farmakogenetika v práci klinického farmakologa a farmaceuta. *Prakt. lékáren.* [online]. 2016, 12(3), 102-104 [cit. 2018-03-16]. ISSN 1803-5329. Dostupné z: <https://praktickelekarenstvi.cz/pdfs/lek/2016/03/05.pdf>
- [18] ANZENBACHER, Pavel a Jana NEKVIDOVÁ. Perzonalizovaná medicína - současná praxe a přísliby do budoucna. *Klin Farmakol Farm* [online]. 2012, 26(3), 123-125 [cit. 2018-03-16]. ISSN 1803-5353. Dostupné z: <https://www.klinickafarmakologie.cz/pdfs/far/2012/03/05.pdf>
- [19] SLANAŘ, Ondřej. Farmakogenomika - současnost, budoucnost, perspektiva. *Klin Farmakol Farm* [online]. 2012, 26(3), 126-130 [cit. 2018-03-16]. ISSN 1803-5353. Dostupné z: <https://www.klinickafarmakologie.cz/pdfs/far/2012/03/06.pdf>
- [20] GARON, Sarah L., Rebecca K. PAVLOS, Katie D. WHITE, Nancy J. BROWN, Cosby A. STONE a Elizabeth J. PHILLIPS. Pharmacogenomics of Off-target ADRs. *British Journal of Clinical Pharmacology* [online]. 2017, , - [cit. 2017-03-28]. DOI: 10.1111/bcp.13294. ISSN 03065251. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/bcp.13294>
- [21] SÚKL: *Státní ústav pro kontrolu léčiv* [online]. [cit. 2018-04-08]. Dostupné z: <http://www.sukl.cz/>

- [22] ŠPÍŠEK, Radek. Typizace HLA. BARTUŇKOVÁ, Jiřina a Milan PAULÍK a kol. *Vyšetřovací metody v imunologii*. 2., přeprac. a dopl. vyd. Praha: Grada, 2011, s. 120-121. ISBN 978-80-247-3533-7.
- [23] PAVLOS, Rebecca, Simon MALLAL a Elizabeth PHILLIPS. HLA and pharmacogenetics of drug hypersensitivity. *Pharmacogenomics* [online]. 2012, 13(11), 1285-1306 [cit. 2017-02-28]. DOI: 10.2217/pgs.12.108. ISSN 1462-2416. Dostupné z: <http://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/pgs.12.108>
- [24] GONZALEZ-GALARZA, F. F., L. Y. C. TAKESHITA, E. J. M. SANTOS, et al. Allele frequency net 2015 update: new features for HLA epitopes, KIR and disease and HLA adverse drug reaction associations. *Nucleic Acids Research* [online]. 2015, 43(D1), D784-D788 [cit. 2017-02-20]. DOI: 10.1093/nar/gku1166. ISSN 0305-1048. Dostupné z: <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gku1166>
- [25] ROBINSON, J., J. A. HALLIWELL, H. MCWILLIAM, R. LOPEZ a S. G. E. MARSH. *IPD - the Immuno Polymorphism Database: Nucleic Acids Research* [online]. 2010, 41,D1234-40 [cit. 2018-05-21]. Dostupné z: <https://www.ebi.ac.uk/ipd/>
- [26] NIKOLICH-ZUGICH, J., D. H. FREMONT, M. J. MILEY a MESSAOUDI. The role of mhc polymorphism in anti-microbial resistance. *Microbes and Infection* [online]. 2004, 6(5), 501-512 [cit. 2018-05-23]. DOI: 10.1016/j.micinf.2004.01.006. ISSN 12864579. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1286457904000553>
- [27] THORSBY, E. A short history of HLA. *Tissue Antigens* [online]. 2009, 74(2), 101-116 [cit. 2018-05-23]. DOI: 10.1111/j.1399-0039.2009.01291.x. ISSN 00012815. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1399-0039.2009.01291.x>
- [28] FDA. *Biomarker Table: Table of Pharmacogenomic Biomarkers in Drug Labeling* [online]. U. S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. 2017-12 [cit. 2018-05-24]. Dostupné z: <https://www.fda.gov/downloads/drugs/scienceresearch/ucm578588.pdf>
- [29] MLA STYLE: "ABOUT NOBELPRIZE.ORG". *Nobelprize.org* [online]. Nobel Media AB 2014 [cit. 2018-05-25]. Dostupné z: http://www.nobelprize.org/nobel_organizations/nobelmedia/nobelprize_org/
- [30] Nomenclature for Factors of the HLA System. *HLA Nomenclature* [online]. [cit. 2018-05-26]. Dostupné z: <http://hla.alleles.org/nomenclature/index.html>
- [31] DAVID, S. a J. P. HAMILTON. Drug-induced Liver Injury. *US Gastroenterology & Hepatology Review*[online]. 2010, (6), 73-80 [cit. 2018-05-28]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3160634/>

- [32] OAKLEY, A. M., KRISHNAMURTHY, K., ed. Stevens Johnson Syndrome (Toxic Epidermal Necrolysis). In: *StatPearls: Treasure Island (FL): StatPearls Publishing* [online]. 2017-04-10 [cit. 2018-05-28]. Dostupné z: <http://knowledge.statpearls.com/chapter/0/30294/>