

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA  
KATEDRA BIOCHEMIE



**Metabolická detoxikace karcinogenních  
aristolochových kyselin  
cytochromy P450**

**Metabolic detoxication of carcinogenic  
aristolochic acids by cytochromes P450**

*Diplomová práce*

Kateřina Levová

Školitelka: Prof. RNDr. Marie Stiborová, DrSc.

PRAHA 2009

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod odborným vedením Prof. RNDr. Marie Stiborové, DrSc. a všechny prameny jsem řádně citovala.

V Praze dne

.....

Kateřina Levová

Děkuji své školitelce Prof. RNDr. Marii Stiborové, DrSc. za zadání tématu, odborné vedení a všestrannou pomoc při vypracování této práce.

Dále bych také ráda poděkovala RNDr. Janě Šítkové a celému kolektivu laboratoře za užitečné rady, potřebnou pomoc a za vytvoření příjemného pracovního prostředí.



3.3.4. Stanovení koncentrace proteinu metodou 4,4'-dikarboxy-2,2'-bicinchoninové kyseliny (BCA) .....	39
3.3.5. Oxidace AAI cytochromy P450 jaterních mikrosomů člověka, potkana a myši a lidskými rekombinantními cytochromy P450 ...	40
3.3.6. Příprava vzorků standardu AAI pro HPLC.....	41
3.3.7. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC).....	41
<b>4. VÝSLEDKY .....</b>	<b>42</b>
4.1. ISOLACE MIKROSOMÁLNÍ FRAKCE Z JATERNÍ TKÁNĚ LABORATORNÍHO POTKANA .....	42
4.1.1. Isolace mikrosomální frakce .....	42
4.2. STUDIUM OXIDACE AAI JATERNÍMI MIKROSOMÁLNÍMI CYTOCHROMY P450 .....	43
4.2.1. Separace AAI a jejího detoxikačního metabolitu AAIa metodou HPLC .....	43
4.2.2. Vliv doby inkubace na oxidaci AAI potkaními jaterními mikrosomy .....	44
4.2.3. Vliv pH na oxidaci AAI jaterními mikrosomy .....	45
4.2.4. Efektivita oxidace AAI jaterními mikrosomy člověka, potkana a myši .....	47
4.2.5. Určení účinnosti jaterních cytochromů P450 oxidovat AAI .....	48
4.2.5.1. Vliv induktorů cytochromů P450 na oxidaci AAI jaterním mikrosomálním systémem potkana.....	48
4.2.5.2. Kinetika enzymové oxidace AAI potkaními jaterními mikrosomy .....	50
4.2.5.3. Vliv inhibitorů cytochromů P450 na oxidaci AAI jaterním mikrosomálním systémem člověka.....	53
4.2.6. Oxidace AAI lidskými rekombinantními cytochromy P450 .....	54
<b>5. DISKUSE.....</b>	<b>56</b>
<b>6. ZÁVĚR .....</b>	<b>59</b>
<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>60</b>

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

<b>A</b>	absorbance
<b>AA</b>	aristolochové kyseliny
<b>AAN</b>	nefropatie vyvolaná aristolochovémi kyselinami
<b>AAI</b>	aristolochová kyselina I
<b>AAIa</b>	aristolochová kyselina Ia
<b>AAII</b>	aristolochová kyselina II
<b>ACTH</b>	adrenokortikotropní hormon
<b>Ahr</b>	receptor pro aromatické uhlovodíky („aryl hydrocarbon receptor“)
<b>AlacI</b>	aristolaktam I
<b>AlacIa</b>	aristolaktam Ia
<b>AMP</b>	adenosinmonofosfát
<b>ARNT</b>	„AhR nuclear translocator“
<b>BCA</b>	4,4'-dikarboxy-2,2'-bicinchoninová kyselina
<b>BSA</b>	hovězí sérový albumin
<b>c</b>	koncentrace
<b>CAR</b>	„constutive androstane receptor“
<b>CHN</b>	nefropatie vyvolaná čínskými bylinami „Chinese herbs nephropathy“
<b>COX</b>	cyklooxygenasa (prostaglandin H synthasa)
<b>CPR</b>	NADPH:CYP reduktasa
<b>CYP</b>	cytochrom P450 (názvosloví viz kapitola 1.3.1.1.)
<b>DA</b>	dalton
<b>dA-AA</b>	7-(deoxyadenosin-N <sup>6</sup> -yl)-aristolaktam
<b>DDTC</b>	diethyldithiokarbamát
<b>dG-AA</b>	7-(deoxyguanosin-N <sup>2</sup> -yl)-aristolaktam
<b>DMSO</b>	dimethylsulfoxid
<b>DTT</b>	dithiothreitol
<b>EC</b>	číselný kód enzymu
<b>ER</b>	endoplasmatické retikulum
<b>HLM</b>	lidské jaterní mikrosomy

<b>HPLC</b>	vysokotlaká kapalinová chromatografie (high-pressure liquid chromatography)
<b>IC<sub>50</sub></b>	inhibiční koncentrace (koncentrace inhibitoru, kdy dochází k 50% poklesu metabolismu substrátu)
<b>K<sub>m</sub></b>	Michaelisova konstanta
<b>Kon</b>	mikrosomy izolované z nepremedikovaných zvířat
<b>MFO</b>	system monooxygenas se smíšenou funkcí („mixed function oxygenases“)
<b>M</b>	mol/l
<b>MS</b>	mikrosomy
<b>n</b>	látkové množství
<b>NADH</b>	nikotinamidadeninukleotid (redukovaný)
<b>NADPH</b>	nikotinamidadeninukleotidfosfát (redukovaný)
<b>NADP<sup>+</sup></b>	nikotinamidadeninukleotidfosfát (oxidovaný)
<b>NADPH-GS</b>	NADPH-generující systém
<b>NQO1</b>	NAD(P)H:chinon oxidoreduktasa
<b>PAH</b>	polycyklické aromatické uhlovodíky
<b>PAR</b>	„pregnane activated receptor“
<b>PB</b>	fenobarbital
<b>PCB</b>	polychlorované bifenyly
<b>PMSF</b>	fenylmethylsulfonylfluorid
<b>PPAR</b>	„peroxisome proliferator activated receptor“
<b>PXR</b>	„pregnane X receptor“
<b>P450</b>	pigment s absorpčním maximem při 450 nm (cytochrom P450)
<b>p53</b>	protein kódovaný nádorovým supresorovým genem p53
<b>P1-P3</b>	pufr 1-3
<b>Raf</b>	onkoprotein
<b>Ras</b>	onkoprotein
<b>ROH</b>	hydroxylovaný produkt
<b>R*OOH</b>	organický peroxid
<b>RP – HPLC</b>	vysokotlaká kapalinová chromatografie s reversní fází („high-pressure liquid chromatography – reverse phase“)
<b>RPM</b>	počet otáček za minutu
<b>RXR</b>	„retinoic X receptor“

<b>Sis</b>	onkoprotein
<b>Sud I</b>	Sudan I
<b>TEAA</b>	triethylaminacetát
<b>TCDD</b>	2,3,7,8,-tetrachloro-(p)-dioxin
<b>U</b>	standardní jednotka enzymové aktivity
<b>UDP</b>	uridindifosfát
<b>UV</b>	oblast vlnových délek ultrafialového světla
<b>VIS</b>	oblast vlnových délek viditelného záření
<b>β-NF</b>	β-naftoflavon
<b>ε</b>	molární absorpční koeficient

# 1. Úvod

## 1.1. Kancerogenese

**Kancerogenese** (karcinogenese) je postupný mnohastupňový proces, při kterém dochází ke kumulaci poruch (např. mutací) určitých genů, což vede k poruše normální funkce těmito geny kódovaných proteinů. Tyto proteiny se podílejí zejména na regulaci dělení, diferenciaci buňky a stabilitě genomu. Nejzávažnější jsou poruchy genů pro ty proteiny, které kontrolují expresi genů, správnost replikace DNA a chromosomů. Dále také genů, které se podílejí například na regulaci buněčného cyklu, přenosu signálů, dělení a diferenciaci buněk. Vznik určitých poruch v několika kritických genech může vést až k maligní transformaci buňky.<sup>1</sup>

### 1.1.1. Nádorová onemocnění

Nádorová onemocnění jsou v ekonomicky vyspělých zemích druhou nejčastější příčinou úmrtí.<sup>2</sup> Jako nádorové onemocnění se označuje nekontrolovaný a nediferencovaný růst buněk určité tkáně. Tyto změny na buněčné úrovni jsou geneticky podmíněné. Pozměnění genetické informace buňky vede ke změně exprese regulačních proteinů buněčného cyklu, změně buněčného dělení a diferenciaci.<sup>3</sup>

Jako **nádor** (tumor, neoplasma) je označován patologický útvar tvořený tkání, jejíž růst se vymkl kontrole organismu a roste na něm nezávisle.<sup>4</sup> Nádory vznikají u lidí všech věkových skupin a postihují širokou škálu orgánů.<sup>5</sup> Možnost maligní přeměny je u každé tkáně, ale její frekvence je u různých typů tkání rozdílná. Každá tkáň má jiné histologické složení, různou intenzitu dělení buněk a metabolismu nebo odlišné regulační mechanismy. Tkáně se také liší enzymovými systémy nebo isoenzymy (např. u detoxikačních enzymů) a tím mají i různou schopnost aktivovat nebo vylučovat kancerogenní látky. Proto některé kancerogeny působí jen na určitou tkáň či orgán.<sup>1</sup>

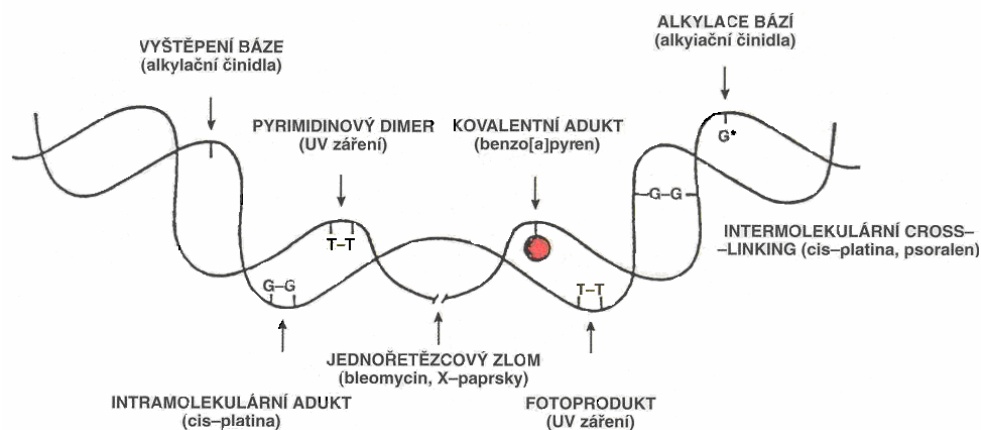
**Nádorové buňky** jsou charakteristické tím, že u nich dochází k nekontrolovanému (špatně kontrolovanému) dělení buněk – proliferaci a ztrácí schopnost diferenciaci.<sup>3</sup>

### 1.1.1.1. Faktory vzniku nádorového bujení

Faktory způsobující nádorové bujení lze rozdělit do tří skupin: na biologické, fyzikální a chemické. Mezi **biologické** faktory můžeme zahrnout onkoviry, které jsou schopné vložit svoji genetickou informaci do buňky, což může být podnětem pro změnu buněčného cyklu. Neméně významným biologickým faktorem je také snížení obranyschopnosti organismu (změna imunity) vlivem např. stresu, výživy apod. Mezi významné **fyzikální** faktory patří různé druhy záření (ultrafialové, rentgenové atd.).<sup>3</sup>, které poškozují DNA několika způsoby (např. vytvářením pyrimidinových dimerů nebo tvorbou jedno- a dvouřetězcových zlomů).<sup>5</sup> Posledním faktorem jsou **chemické** sloučeniny (karcinogeny), které různými způsoby pozměňují DNA.<sup>3</sup> Odhaduje se, že přibližně 80% lidských nádorů je způsobeno faktory vnějšího prostředí, především chemikáliemi.<sup>5</sup> K expozici těmito sloučeninami může dojít v důsledku stravy (např. aflatoxin B<sub>1</sub>, který je produkován plísní *Aspergillus flavus*), zaměstnání, životního stylu (např. kouření) nebo také jiným způsobem (např. léky, které mohou být kancerogenní).<sup>5</sup>

Podle mechanismu působení řadíme chemické karcinogeny do tří skupin (**Obr. 1**):

- genotoxické – tvoří s DNA kovalentní adukty (např. benzo-[a]-pyren)
- epigenetické – vytvářejí nekovalentní interakce s DNA (mají schopnost vmezeřit se do dvoušroubovice DNA – např. ellipticin)
- způsobující změny ve struktuře DNA – jednořetězcové zlomy (single - strand breaks), dvouřetězcové zlomy (double - strand breaks), cross - linking (propojení molekul)



**Obr. 1:** Mechanismy poškození DNA různými vnějšími faktory (Převzato z<sup>6</sup>)

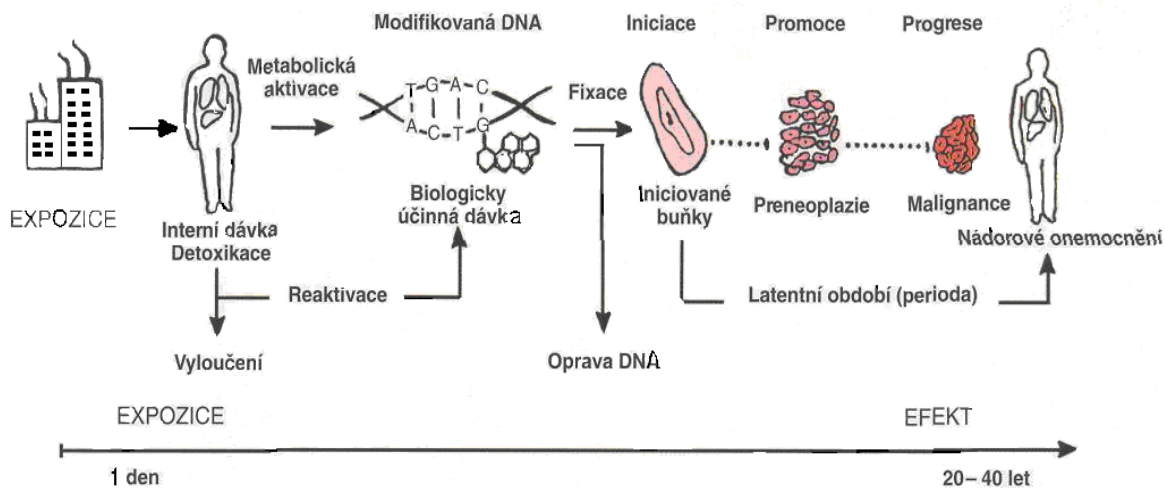
### 1.1.2. Proces kancerogenese

Kancerogenese je multifázový a multifaktoriální proces.<sup>3</sup> Jsou pro ni klíčové dva typy genů:

- onkogeny – produkují onkoproteiny (např. Ras, Raf, Sis). Tyto proteiny regulují buněčné dělení - mitosu
- tumorsupresorové geny – jejich produktem jsou proteiny omezující proliferaci buněk. Mutací v těchto proteinech se tvoří defektní buňky.<sup>3</sup>

Proces kancerogenese můžeme rozdělit do tří fází: **iniciační**, **promoční** a **progresní** (Obr. 2, str. 12).

- **iniciační fáze** – V této fázi dochází ke změně genetické informace normální buňky, která vede ke vzniku modifikace v DNA. Mutace v určitém genu přináší iniciovaným buňkám růstovou selekční výhodu.<sup>7</sup> Tato mutace buď může zůstat bez funkčních důsledků řadu let nebo může být eliminována opravnými mechanismy.<sup>8</sup> Pokud iniciovanou buňku nezničí ani imunitní systém organismu, může se v dalších stádiích vyvinout až v nádor.
- **promoční fáze** – Tato fáze může trvat různě dlouhou dobu, např. několik let nebo i několik desetiletí. Ještě více se zvyšuje proliferace primárně pozměněných buněk pod vlivem látek - promotorů. Většina z nich má pouze epigenetické vlastnosti, jejich účinek se proto může projevit až po působení genotoxických iniciátorů. Většina promotorů je tkáňově specifická (např. forbolester - specifický promotor pro vznik nádorů kůže).<sup>6</sup> Při jejich metabolismu často dochází ke vzniku aktivních forem kyslíku, které mohou vyvolat oxidativní změny v DNA, a tak aktivovat protoonkogen. Častým mechanismem účinku promotorů je rovněž aktivace protein-kinasy c.<sup>3</sup>
- **progresní fáze** – Je posledním stádiem kancerogenese. Působením progresorů, látek s genotoxickým účinkem, se pak mění dosud částečně kontrolovaný růst benigního nádoru na růst nekontrolovaný. Vzniká maligní nádor, z něhož odštěpené buňky se mohou dostat krevními nebo mízními cestami do jiných tkání nebo orgánů, a vznikají tak metastasy.<sup>6</sup> Jednou z důležitých podmínek pro růst nádoru je jeho dostatečné zásobení živinami a kyslíkem. Toho nádor dosahuje tím, že si vytvoří dostatečné cévní zásobení (nádorová neoangiogenese).



**Obr. 2:** Schéma několikastupňového procesu kancerogeneze (Převzato z <sup>6</sup>)

## 1.2. Biotransformace xenobiotik

Procesy vedoucí ke snadnému vyloučení xenobiotika z organismu nebo naopak ke zvýšení jeho toxického účinku se označují jako biotransformace. Při biotransformaci dochází ke změně struktury cizorodých látek (xenobiotik), a tím i ke změně biologické účinnosti. Ve většině případů to znamená inaktivaci tj. snížení toxicity xenobiotika. Tyto reakce se označují jako **detoxikační**. V některých případech ale může docházet k reakcím, které vedou ke zvýšení toxického účinku xenobiotika – **aktivační** reakce. Jde zejména o metabolickou aktivaci nemutagenních látek (promutagenů) na mutagenní produkty.<sup>9</sup>

V průběhu biotransformace dochází k přeměně hydrofobního xenobiotika na látku hydrofilní. Vzniká tedy látka polárnější, která po reakci s endogenními sloučeninami může být z buněk eliminována a vyloučena z těla močí nebo výkaly.<sup>10</sup>

Většina toxických látek se biotransformuje pomocí membránově vázaných nespecifických enzymů lokalizovaných v hladkém endoplasmatickém retikulu (ER). Tyto enzymy se označují jako **mikrosomální** (endoplasmatické retikulum při homogenizační destrukci buněk vytváří tělíska – frakce, označované jako **mikrosomy**).<sup>10</sup>

Existují látky, které při vstupu do organismu, mohou působit jako **induktory** enzymů, tj. stimulují jejich zvýšenou tvorbu, a to především při opakovaných dávkách.

Mezi nejznámější induktory patří polycyklické aromatické uhlovodíky, polychlorované bifenoly (PCB), fenobarbital, ethanol a další.<sup>10</sup>

Mikrosomální enzymový systém, ale na druhou stranu, může být také inhibován. Tato **inhibice** může vést ke snížení enzymové aktivity s následným snížením či zpomalením biotransformačních pochodů. Z hlediska možné otravy škodlivinou je snížení aktivity enzymové výbavy, zodpovědné za biotransformace, značným rizikem, protože nedostatek enzymů (snížená aktivita) může zabránit detoxikaci škodliviny, a tím otravu urychlit či prohloubit.<sup>10</sup>

Biotransformace xenobiotik v živočišných organismech probíhá ve dvou fázích.

### **1.2.1. První fáze biotransformace**

V první fázi dochází ke vnášení polárních skupin do skeletu lipofilního xenobiotika nebo demaskování již přítomných polárních funkčních skupin v molekule. Tato fáze se též označuje jako **derivatizační**.<sup>11</sup> Reakce prvé fáze jsou většinou oxidační (např. hydroxylace, dealkylace, deaminace), některé ovšem také probíhají redukčním mechanismem (např. nitro, azoredukce).<sup>9,11</sup>

### **1.2.2. Druhá fáze biotransformace**

Ve druhé fázi biotransformace dochází ke konjugaci daného xenobiotika s endogenními polárními sloučeninami (glukosiduronát, sulfát z aktivního sulfátu, glutathion, cystein, glycin apod.). Díky těmto reakcím dojde ještě ke zvýšení polaritě původně hydrofobní molekuly a tím se usnadní její eliminace z buněk a exkrece z organismu. Tato fáze se také označuje jako **konjugační**.<sup>9,11</sup>

### 1.3. Mikrosomální monooxygenasový systém (MFO systém)

Mikrosomální monooxygenasový systém (MFO systém, z angl. „mixed function oxidases“) je soubor enzymů, katalysující celou řadu reakcí.<sup>12</sup> Hlavními složkami tohoto systému jsou **cytochrom P450**, **NADPH:cytochrom P450 reduktasa** a **membrána endoplasmatického retikula**.<sup>11</sup> Cytochromy P450 působí jako terminální oxidasa tohoto systému a katalyzují přeměny mnoha exogenních i endogenních látek s rozmanitou strukturou.<sup>13</sup> Sloučeniny, které jsou substráty takovýchto enzymů, jsou v organismu biotransformovány za vzniku polárnějších produktů, které pak mohou být vyloučeny z organismu a nedochází tím k bioakumulaci příslušných xenobiotik. Jak bylo již dříve uvedeno, kromě detoxikace může biotransformačními reakcemi také vznikat látka aktivnější (reaktivnější), než byl původní substrát. Tato aktivace má dvě hlediska: **pozitivní** (např. aktivace léčiv) a **negativní** (vznik látky toxické, mutagenní či karcinogenní). Studium metabolismu xenobiotik v lidském organismu tedy napomáhá mimo jiné omezit rizika vznikající při působení potenciálně toxických a karcinogenních látek na lidskou populaci.<sup>12</sup>

#### 1.3.1. Cytochromy P450

Cytochromy P450 (EC 1.14.14.1) jsou **hemové enzymy**<sup>14</sup> působící jako terminální oxidasy MFO systému bakterií, kvasinek, rostlin, hmyzu, ryb a dalších obratlovců. Kromě oxidace a redukce širokého spektra endogenních a exogenních látek<sup>15</sup>, se také podílejí na biosyntéze cholesterolu, steroidních hormonů, žlučových kyselin, oxidačním metabolismu mastných kyselin, lipofilních léčiv a dalších látek.<sup>13</sup>

Tyto enzymy jsou zodpovědné za reakce **I. fáze biotransformace chemických látek**, které mohou vést k detoxikaci či aktivaci. V lidském těle se vyskytují především v játrech.<sup>12</sup> Tyto játerní cytochromy P450 jsou enzymy rozsáhlé genové rodiny, které hrají klíčovou roli v metabolismu mnoha xenobiotik.<sup>13</sup> Významné jsou také jejich hladiny v plicích, ledvinách, tenkém střevě, kůži, mozku nebo nadledvinkách. V buňkách jsou lokalizovány převážně v membránách hladkého endoplasmatického retikula, některé také v membráně mitochondrií.<sup>13</sup>

Garfinkel s Klingenbergem v roce 1958 objevili v jaterních mikrosomech pigment, který po redukci vykazoval v komplexu s oxidem uhelnatým absorpční **maximum při 450 nm**.<sup>16,17</sup> Hemoproteinový charakter pigmentu dokázali Omura a Sato v roce 1964 a na základě podobnosti povahy vazby hemu cytochromů b a podle netypického maxima Soretova pásu jej nazvali „cytochromem P450“.<sup>18</sup>

Ostatní hemové proteiny neabsorbují při 450 nm. Důvodem, proč cytochrom P450 absorbuje při této vlnové délce, je neobvyklá vazba hemového železa.<sup>19</sup> Porfyrinový skelet (protoporfyrin IX) je částečně vázán hydrofobními silami a také prostřednictvím sulfhydrylové skupiny cysteinu přítomného v aktivním centru enzymu. Toto uspořádání umožňuje výjimečné chování těchto hemoproteinů a odlišuje je od ostatních hemoproteinů.<sup>12</sup>

### 1.3.1.1. Nomenklatura cytochromů P450

Názvosloví systému cytochromů P450 se pravidelně mění v důsledku nepřetržitého objevování nových isoenzymů a objasňování jejich aminokyselinové sekvence. Protože se cytochromy P450 označují podle několika odlišných systémů, je jejich pojmenování mnohdy nejednoznačné a matoucí. Poslední systém názvosloví a klasifikace je založený na **homologii proteinové sekvence**.<sup>20</sup>

Cytochromy P450 se označují zkratkou „**CYP**“, následovanou arabskou číslicí udávající genovou rodinu a velkým písmenem udávajícím genovou podrodinu. Následuje další číslo, které označuje individuální gen. Aby se dalo rozlišit, zda se jedná o enzym či o příslušný gen, používá se pro označení genu *kurzíva*. Např. *CYP2E1* je gen pro CYP2E1- což je jeden z enzymů zapojených do metabolismu např. léčiva paracetamolu.<sup>21</sup>

Současná pravidla pro klasifikaci cytochromů P450 jsou taková, že:

- členové nové rodiny cytochromů P450 (CYP) musí mít > 40% homologii v aminokyselinové sekvenci
- členové jedné podrodiny musí mít > 55% homologii v aminokyselinové sekvenci<sup>21</sup>

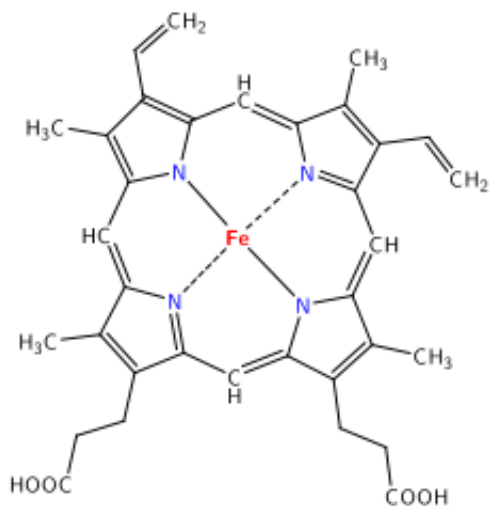
Toto původní rozdělení se v praxi celkem dobře uplatnilo, i když s určitým počtem výjimek. Např. proteiny podrodin CYP2D, 2J a 2K mají většinou menší než 40% sekvenční shodu s ostatními podrodinami CYP2.

Naopak, mitochondriální CYP11A a CYP11B jsou z 35-39% identické, přesto byly odlišeny v rámci jedné rodiny.<sup>20</sup>

V různých organismech bylo popsáno na 270 genových rodin cytochromů P450. Osmnáct genových rodin, existujících u savců, kóduje 57 individuálních genů CYP.<sup>22</sup>

### 1.3.1.2. Struktura eukaryotických cytochromů P450

Na rozdíl od prokaryotických cytochromů P450 jsou eukaryotické obvykle v membráně vázané proteiny. Většina eukaryotických cytochromů P450 jsou proteiny integrované do membrány endoplasmatického retikula (ER) rostlin, hub a živočišných buněk.<sup>23,24</sup> Nicméně, několik savčích cytochromů P450, které se účastní syntézy sterolů, steroidů a žlučových kyselin, jsou lokalizovány na matrixové straně vnitřní mitochondriální membrány.<sup>25</sup>



**Obr. 3:** Hem typu b (Převzato z<sup>27</sup>)

Eukaryotický mikrosomální cytochrom P450 je hemoprotein složený z jednoho polypeptidového řetězce o délce okolo 500 aminokyselin obsahující jednu molekulu hemu b (**Obr. 3**) vázanou koordinálně kovalentní vazbou přes –SH skupinu cysteinu, která je proximálním (pátým) ligandem železa v hemu.<sup>26</sup> Nejedná se tedy o klasický cytochrom, ale o hemthiolátový protein. Vyskytuje se většinou v podobě shluků několika molekul o relativní molekulové hmotnosti až 500 kDa hluboko zanořených do membrány.<sup>28</sup>

### 1.3.1.3. Spinové formy cytochromů P450

Cytochromy P450 díky přechodnému charakteru hemového železa existují ve dvou spinových formách.<sup>28</sup> Jejich rovnováha je ovlivněna zejména axiálními ligandy železa. V klidovém stavu je většina molekul v nízkospinové formě. Ion železa je hexakoordinován, hemové železo tedy interaguje ještě s jedním ligandem – např. s –OH, –COOH,<sup>23</sup> nebo s atomem kyslíku z molekuly vody. Při vazbě substrátu do vazebného místa se poměr obou spinových forem značně mění. Dochází k vytlačení šestého ligandu, a tedy nárůstu vysokospinové formy.

- **nízkospinová forma** (spin 1/2) je charakteristická maximem absorpce při 418 nm (Soretův pás). Ion železa je hexakoordinován a nachází se prakticky v rovině kruhu protoporfyrinu IX.
- **vysokospinová forma** (spin 5/2) vykazuje maximum Soretova pásu při 390 nm. Ion železa je pentakoordinovaný a „vytahován“ thiolátovou skupinou nad rovinu porfyrinového skeletu.<sup>28</sup>

### 1.3.1.4. Funkce cytochromu P450

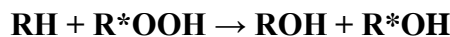
**Oxidasová funkce** - aktivace biatomické molekuly kyslíku pro dané reakce.<sup>29</sup>

Spontánní reakce organických molekul s atmosférickým kyslíkem jsou spinově zakázané. V aerobních organismech se vyskytuje řada proteinů, které nesou prosthetickou skupinu s kovem nebo flavinem, s jejichž pomocí jsou schopny oxidační potenciál kyslíku využít.<sup>29</sup>

**Oxygenasová aktivita** - zabudování kyslíku do molekuly málo reaktivního substrátu.

**Redukční reakce** - elektrony poskytnuté NADPH:cytochrom P450 reduktasou mohou redukovat přímo substrát a nejsou využity k aktivaci molekuly kyslíku. K tomu dochází, pokud je hydrofobní substrát zároveň dobrým ligandem železa porfyrinového skeletu, a je tedy vázán jako šestý ligand místo kyslíku. Tento mechanismus je popsán *in vitro* a existují i nepřímé důkazy pro jeho průběh *in vivo*.<sup>30</sup>

**Peroxidasová aktivita** - druhým substrátem je místo kyslíku organický peroxid ( $R^*OOH$ ) nebo peroxid vodíku.<sup>31</sup> Pro průběh reakce není potřeba NADPH jako zdroj elektronů.<sup>32</sup> Produktem této reakce je stejně jako při klasickém mechanismu hydroxylovaný substrát (ROH):

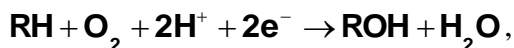


**Produkce  $H_2O_2$  a aktivních forem kyslíku** – dochází k tomu tehdy, když MFO systém interaguje s látkou, která se obtížně hydroxyluje (je pouze hydrofobní, tvoří komplex s enzymem, ale těžko se do ní zabudovává kyslík). Proběhne oxidasová fáze funkce cytochromu P450 (aktivuje se molekula kyslíku), ale už neproběhne fáze oxygenasová. Aktivní forma kyslíku je z molekuly uvolněna do okolí, kde přijme protony nebo dismutuje.<sup>11,33</sup>

#### 1.3.1.4.1. Mechanismus katalýzy cytochromu P450

Nejtypičtější reakcí katalyzovanou cytochromy P450 je monooxygenasová reakce, která zahrnuje aktivaci molekulárního kyslíku a zabudování jednoho atomu do molekuly substrátu, zatímco druhý atom kyslíku je redukován na vodu.<sup>23</sup> Cytochrom P450 spolupůsobí s dalším enzymem lokalizovaným v endoplasmatickém retikulu – **NADPH:cytochrom P450 reduktasou** – nebo dalšími enzymy mitochondrií.<sup>9</sup>

Obecný průběh monooxygenasové reakce katalyzované cytochromem P450 lze vyjádřit sumární rovnicí

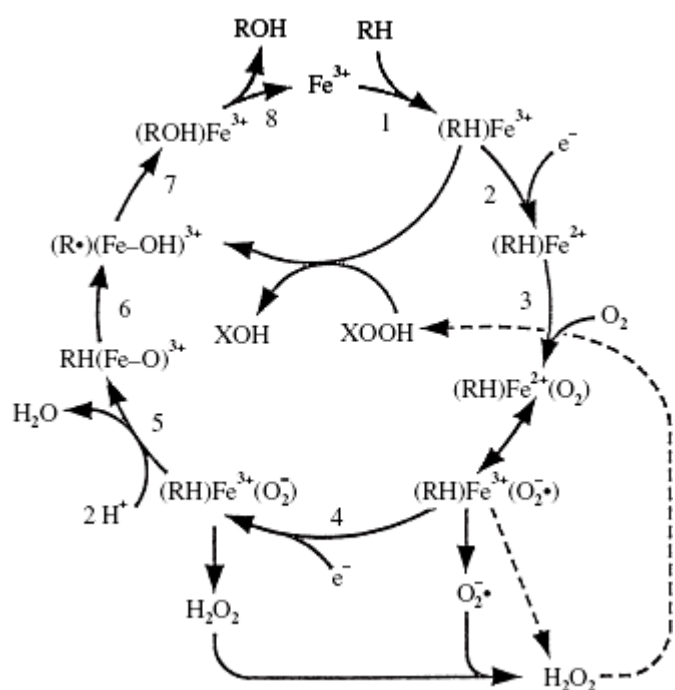


kde RH je substrát a ROH hydroxylovaný produkt reakce.

Většina reakcí začíná přenosem elektronů z NADPH buď na NADPH:cytochrom P450 reduktasu v endoplasmatickém retikulu (kde je MFO systém lokalizován) nebo na

ferredoxin reduktasu a na hemový Fe-S protein v mitochondriích, a poté na vlastní cytochromy P450.<sup>9</sup>

Reakční sled monoxygenasové reakce sestává pravděpodobně z osmi kroků<sup>34</sup> a je znázorněn na **Obr. 4**. V klidovém stavu je ion železa hemu ve ferri formě (s oxidačním číslem III) a je hexakoordinován. Šestá valence je obsazena kyslíkem vody nebo interním (aminokyselinovým) ligandem. **Navázáním substrátu [RH]** na molekulu bílkoviny (reakce 1), dojde ke konformační změně v molekule, vytlačení šestého ligandu a přechodu do pentakoordinovaného stavu. Poté dochází k přenosu jednoho elektronu z NADPH:cytochrom P450 reduktasy (reakce 2), a tím k **redukci** hemového železa na  $\text{Fe}^{2+}$  (ferro forma), přičemž zůstává stále pentakoordinováno (vysokospinový stav).



**Obr. 4:** Reakční cyklus cytochromu P450 (Převzato z<sup>35</sup>)

Tato forma enzymu je schopna vázat biatomickou molekulu kyslíku, ale i jiné ligandy (např. CO). Při reakci 3 dochází k **navázání molekuly kyslíku** a vzniká ternární ferri-superoxidový komplex, kde je ion železa opět hexakoordinován a v nízkospinové formě. Ternární komplex přechází do jiného mesomerního stavu, na ferri-superoxidový komplex, který je dále redukován NADPH:cytochrom P450 reduktasou (nebo

jiným enzymem NADH:cytochrom  $b_5$  reduktasou), za vzniku ferro-superoxidového komplexu (reakce 4). Tato **druhá redukce** je finálním stupněm tzv. aktivační fáze reakčního cyklu cytochromu P450. Vazba mezi kyslíky je dostatečně labilizovaná a dochází k jejímu **štěpení**, přičemž jeden atom kyslíku přijme dva protony a je tedy uvolněn jako molekula vody, druhý atom kyslíku zůstává vázán na iontu Fe v hemu ve formě ferrioxenového komplexu (reakce 5). Vznikající **ferrioxenový komplex** je stabilizován mesomerním posunem elektronu z thiolátové síry na kyslík. Tento reaktivní radikál je pak schopen vytrhnout vodíkový atom z molekuly substrátu za vzniku radikálu ze substrátu a hydroxylového aniontu vázaného na ion železa (reakce 6). Opět dochází

k mesomernímu posunu elektronu (reakce 7). Vznikne forma s navázanými dvěma radikály (OH a substrát) a sírou, zpět ve své thiolátové formě. Při reakci 8 dochází k rekombinaci radikálů za vzniku nativní formy cytochromu P450 a hydroxyderivátu substrátu [**ROH**]<sup>9,11,23,28,34</sup>

Kromě kyslíku může cytochrom P450 pro oxidativní reakce využívat také peroxidy a peroxikyseliny (**Obr. 4, str. 19**). Ty se stávají donorem atomu kyslíku. Reakce s organickými hydroperoxidy probíhá, na rozdíl od reakce v přítomnosti NADPH a O<sub>2</sub>, neuspořádaným mechanismem, takže vazba peroxidu není závislá na vazbě substrátu.<sup>9</sup>

### 1.3.1.5. Regulace exprese cytochromů P450

Regulace exprese cytochromů P450 je řízena několika systémy. Jedná se o regulaci na genové úrovni, zahrnující funkci specifických receptorů, rychlostí přepisu DNA do RNA či stabilizaci syntetizované mRNA. Do regulace hladin cytochromů P450 také patří i posttranslační regulace, založená především na stabilizaci syntetizované molekuly proteinu daného cytochromu P450.<sup>36</sup>

Aktivity jednotlivých lidských forem cytochromu P450 vykazují značné interindividuální rozdíly, způsobené zejména dvěma faktory:

1. **změna exprese genu (změna fenotypu)**. Regulace genové exprese je velmi komplexní a zahrnuje zvýšení transkripce, translace, stabilizaci mRNA a proteinu i ovlivnění jeho degradace. Expresa *konstitutivních forem* cytochromu P450 je determinována například věkem a pohlavím (tedy hladinou růstového hormonu) či zdravotním stavem jedince (hladovění, diabetes, obezita, vysoký tlak).<sup>37</sup> Výskyt *inducibilních forem* pak ovlivňují vnější faktory: induktory cytochromů P450 jsou například ethanol, aceton, některá antibiotika (erythromycin), steroidní látky, barbituráty (fenobarbital), aromatické látky (benzen) apod.<sup>37</sup> Negativně mohou aktivitu jednotlivých forem cytochromu P450 ovlivňovat některá léčiva<sup>38</sup> či složky

potravy.<sup>39</sup> Snížení aktivity některých forem cytochromu P450 však může způsobit také bakteriální infekce, např. meningitida.<sup>40</sup>

**2. genetický polymorfismus (změna genotypu).** Vrozené změny DNA v kódující či regulační části genu mohou vést k absenci některé formy cytochromu P450, ke změně inducibility nebo tvorbě formy s pozměněnou katalytickou aktivitou.<sup>28</sup>

#### ***1.3.1.5.1. Regulace hladiny cytochromů P450 indukci enzymu***

Organismy jsou nepřetržitě vystavené působení různých chemikálií či xenobiotik. U vyšších eukaryot se vyvinuly mechanismy, díky kterým jsou schopné tyto látky odhalit a zvýšením jejich metabolismu napomoci k jejich eliminaci. Enzymy, které v první řadě zajišťují tuto metabolickou odpověď, jsou, jak již bylo dříve uvedeno, cytochromy P450. Tyto enzymy katalyzují první krok v metabolismu lipofilních xenobiotik, přeměňují je na ve vodě více rozpustné sloučeniny, které mohou být snadno vyloučeny. Vystavení organismu cizorodému substrátu, má za následek zvýšení exprese příslušných enzymů, které jsou schopné tento substrát metabolisovat. Tato adaptivní schopnost, známá jako indukce, je přísně regulovaný proces, kontrolovaný primárně na úrovni transkripce. Umožňuje buňkám regulovat expresi cytochromů P450 podle potřeby a usnadnit tím tak eliminaci toxických látek.<sup>41</sup>

Indukce cytochromů P450 obvykle zvyšuje biotransformaci xenobiotika, která by měla vést k jeho detoxifikaci a k vyloučení z organismu. Jedná se tedy především o obranný mechanismus. Role indukovaných cytochromů P450 však není v toxicitě xenobiotik jednoznačná. Indukce cytochromů P450 na jedné straně zvyšuje inaktivaci potenciálně toxických cizorodých látek. Na druhé straně mohou některé cytochromy P450 aktivovat nereaktivní sloučeninu na chemicky reaktivní intermediáty nebo na intermediáty toxické. Některé z nich mohou dokonce vykazovat karcinogenní aktivitu.<sup>11</sup>

Cytochromy P450 jsou regulovány řadou mechanismů. Mnoho z těchto enzymů může být „zapnuto“ nebo indukováno pomocí chemického signálu. Příkladem může být indukce cytochromů P450, podílejících se na biosyntéze steroidů, pomocí adrenokortikotropního hormonu (ACTH). ACTH stimuluje produkci cyklického AMP,

keré pravděpodobně aktivuje proteinkinasu, fosforylující některé dosud nezjištěné proteiny, což vede ke zvýšení transkripce.<sup>19</sup>

Mechanismus indukce cytochromů P450 je předmětem intenzivního zkoumání. Dříve byla pozornost zaměřena především na CYP1A, zejména potom, kdy bylo zjištěno, že jsou zapojené do metabolismu karcinogenních látek. Bylo ukázáno, že indukce CYP1A1 zvyšuje transkripci genu *CYP1A1*, který má za následek zvýšení hladin příslušné mRNA, a tím zvýšení produkce enzymu CYP1A1. V těchto indukčních procesech byl studován význam cytosolického receptoru Ah (aryl nebo aromatický uhlovodík), a u celé řady polycyklických aromatických uhlovodíků (PAH), jakými jsou např. 3-methylcholanthren, 3,4-benzo[a]pyren a 2,3,7,8-tetrachloro-(p)-dioxin (TCDD), byla prokázána jejich vysoká afinita pro Ah receptor. Všechny jsou navíc účinnými induktory CYP1A1.<sup>42</sup>

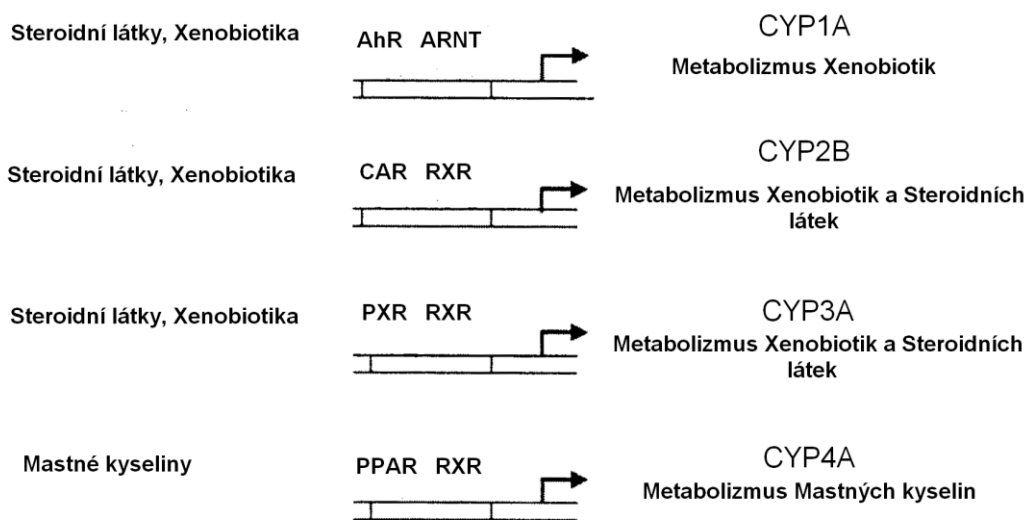
Geny *CYP* jsou schopné reagovat na endogenní i exogenní signály změnami v genové expresi, regulovat intezitu a délku těchto signálů a dokonce vytvářet nové signalizační molekuly pomocí metabolismu, který je na cytochromech P450 závislý. Tyto signalizační molekuly potom působí pomocí tzv. „ligand-dependentních jaderných receptorů“.<sup>43</sup>

#### 1.3.1.5.1.1. Regulace exprese cytochromů P450 intracelulárními receptory

Hlavním mechanismem enzymové indukce je zvýšení hladiny transkripce. Sloučeniny indukující expresi genů *CYP*, jedním ze čtyř „receptor-dependentních mechanismů“ (**Obr. 5, str. 23**), aktivují mnoho genů *CYP*, které kódují proteiny především genových rodin cytochromů 1-4.<sup>44</sup> Tyto čtyři genové rodiny cytochromů P450 jsou nejdůležitější z hlediska metabolismu xenobiotik. Jejich geny jsou transkripčně aktivovány cizorodými látkami, prostřednictvím mechanismů závislých na receptorech.<sup>43</sup> Receptory rozdělujeme do dvou skupin na cytosolární a jaderné receptory.

Regulace genové exprese na transkripční úrovni pomocí AhR a jaderných receptorů hraje klíčovou roli v metabolismu a vyrovnání hladin léčiv a xenobiotik z organismu, která jsou vnesena do těla za účelem ochrany před enviromentálními škodlivinami.<sup>45</sup>

## Transkripční faktory Cytochromů P450



**Obr. 5:** Transkripční faktory zahrnuté v indukci cytochromů P450 (Upraveno podle <sup>43</sup>)

- **AhR receptor** – jedná se o **cytosolický receptor**. Tento cytosolický protein, společně se svým jaderným dimerizačním partnerem **ARNT** stimuluje transkripci genů *CYP1* v přítomnosti vhodného induktoru.<sup>43</sup> Kromě nejmarkantnější indukce CYP1A1 dochází prostřednictvím AhR také ke zvýšení exprese CYP1A2, CYP1B1, a např. enzymů druhé fáze biotransformace (glutathion S-transferasy a UDP-glukuronosyltransferasy).<sup>34</sup>
- **CAR, PXR, PPAR** – tyto **jaderné receptory** jsou proteiny se „zinc finger“ DNA vazebnou doménou, které primárně ovlivňují regulaci enzymů podrodin CYP2B, CYP3A a CYP4A.<sup>43</sup> Jaderné receptory jsou transkripční faktory, aktivované navázáním ligandu, a každý z nich spolupracuje v komplexu ještě s dalším jaderným receptorem (**RXR**). Následuje aktivace a vazba komplexu na odpovídající tzv. rozpoznávací element genu, kódující oblasti daného *CYP*. Jaderné receptory nejsou zodpovědné pouze za regulaci genů *CYP*. Byla nalezena řada enzymů metabolisujících léčiva, které jsou regulovány pomocí těchto receptorů.<sup>43</sup>

### 1.3.1.5.2. Regulace hladiny cytochromů P450 inhibicí enzymu

Látky ovlivňující rychlost enzymové reakce tím, že snižují katalytickou aktivitu daného enzymu, se označují jako **inhibitory**. Míra inhibice závisí jak na koncentraci inhibitoru, tak také na délce jeho působení. Při reversibilní inhibici dochází po odstranění působení inhibitoru na enzym k obnovení funkce enzymu. Velké množství inhibitorů může ale způsobit také ireversibilní (nevratnou) deaktivaci enzymu. Inhibitorů cytochromů P450 je známa celá řada. Některé z nich jsou dokonce specifické pro jednotlivé isoformy (**Tab. 1, str. 25**). V katalytickém cyklu cytochromu P450 jsou z hlediska inhibice významné především tři kroky, které jsou k inhibici náchylné: vazba substrátu na enzym, vazba molekulárního kyslíku, následovaná prvním elektronovým transferem a v neposlední řadě také krok, kdy je substrát skutečně oxidován.<sup>46</sup>

Inhibitory cytochromů P450 můžeme rozdělit do třech skupin:

- *inhibitory, které se váží reversibilně*
- *inhibitory, které vytváří „kvazi“-ireversibilní komplex s atomem železa v hemu (např. ketokonazol), tyto inhibitory jsou pomocí CYP transformovány na metabolické intermediáty, které se váží pevně na atom železa a mohou být odstraněny pouze za zvláštních experimentálních podmínek*
- *inhibitory, které se váží ireversibilně na hemovou část nebo na proteinovou složku a urychlují degradaci a oxidační rozpad prosthетické skupiny<sup>46</sup>*

Reversibilní inhibitory „soutěží“ se substrátem o vazbu do aktivního místa a interagují s ním třemi způsoby: mohou se vázat na hydrofobní oblasti aktivního místa, nebo jsou koordinovány na atom železa v hemu, či vytváří specifické vodíkové a iontové vazby s aminokyselinovými zbytky v aktivním centru.

Ireversibilní („kvazi“-ireversibilní) inhibitory jsou sloučeniny, které působí při přenosu kyslíku v katalytickém cyklu. Většina z nich patří do skupiny označované jako tzv. „**sebevražedné**“ **substráty**.<sup>46</sup> Tyto látky, jsou enzymem katalyticky přeměněny na reaktivní intermediáty, které reagují s aktivním centrem enzymu a tím jej inaktivují, aniž by aktivní centrum opustili. Přestože je tento způsob inhibice poměrně neobvyklý, bylo zjištěno, že u reakcí katalyzovaných cytochromy P450 se vyskytuje s větší frekvencí. To může být vysvětleno tím, že při katalýze cytochromy P450 vznikají reaktivní kyslíkové intermediáty.<sup>47</sup> Inhibitory působící mechanismem „sebevražedného substrátu“, mají

vysokou specifitu vůči danému enzymu. To je dané tím, že se nejprve musí reversibilně navázat na enzym (musí tedy splňovat všechny podmínky jako normální substrát), dále u nich musí proběhnout katalytická aktivace, a až výsledný reaktivní meziprodukt ireversibilně modifikuje daný enzym, a tím jej inhibuje.<sup>46</sup>

**Tab. 1:** Příklady specifických inhibitorů některých cytochromů P450

CYP	Inhibitor
1A1/2	$\alpha$ - naftoflavon
1A2	Furafyllin
2B6	Diamantan
2C9	Sulfafenazol
2D6	Quinidin
2E1	Diethyldithiokarbamat
3A4	Ketokonazol

### 1.3.1.6. Polymorfismus cytochromů P450

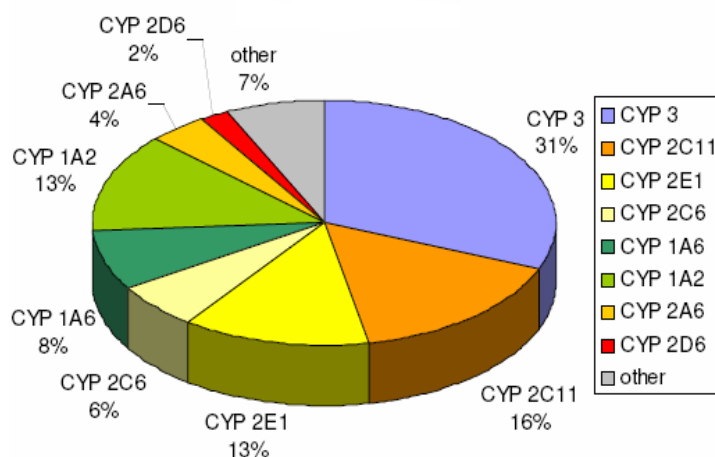
Proměnlivost obsahu jednotlivých cytochromů P450 v různých tkáních je dána jednak již zmíněnou možností indukce, ale hlavní roli hraje především genetický polymorfismus. Genetický polymorfismus je faktorem, kdy vrozené změny DNA vedou k absenci cytochromu P450, k nemožnosti indukce cytochromu P450 nebo i k tvorbě takové formy cytochromu P450, která má změněnou katalytickou aktivitu.<sup>48</sup>

Polymorfismus je obecně definován jako více než 2% frekvence výskytu alelických variant (odlišností v sekvenci DNA) v populaci. Pod touto hranicí se mluví o ojedinělém genetickém znaku či ojedinělé alele, a v případě velmi „škodlivé alely“, se hovoří o mutantní či vrozené chybě metabolismu. Polymorfismus cytochromů P450 se velmi podstatně liší u různých lidských ras a populací. Tyto změny v genech cytochromů P450 jsou významné, protože mohou vést například ke změnám v metabolismu xenobiotik.<sup>28</sup>

Jak již bylo dříve uvedeno, vrozené změny DNA v kódující či regulační části genu mohou vést k absenci některé formy cytochromu P450, ke změně inducibility nebo k tvorbě formy cytochromu P450 s pozměněnou katalytickou aktivitou.<sup>28</sup> U genů kódujících cytochromy P450 s klíčovou fyziologickou funkcí může mít výskyt defektní alely katastrofální následky. U genů pro enzymy přeměňující xenobiotika nemá variabilita alel přímé patologické důsledky, může však způsobit zvýšení citlivosti vůči škodlivým účinkům některých xenobiotik či léčiv.<sup>49</sup> Nejvýznamnější variabilita vyplývající z genetického polymorfismu byla pozorována u forem CYP2D6 a 2C19, dále pak u forem CYP1A1, 1A2, 1B1, 2A6, 2C9, 2E1 a 3A4.<sup>50</sup>

### 1.3.1.7. Význam cytochromů P450 v metabolismu xenobiotik

Cytochromy P450 jsou hlavní enzymy účastníci se metabolismu xenobiotik. Velkou mírou se na jejich metabolismu podílí CYP3A(4), 2C, 2E a 1A, které jsou exprimovány ve vysokých hladinách v játrech (**Obr. 6**) a v tenkém střevě. Mají širokou substrátovou specifitu a přeměňují tedy velké množství látek.

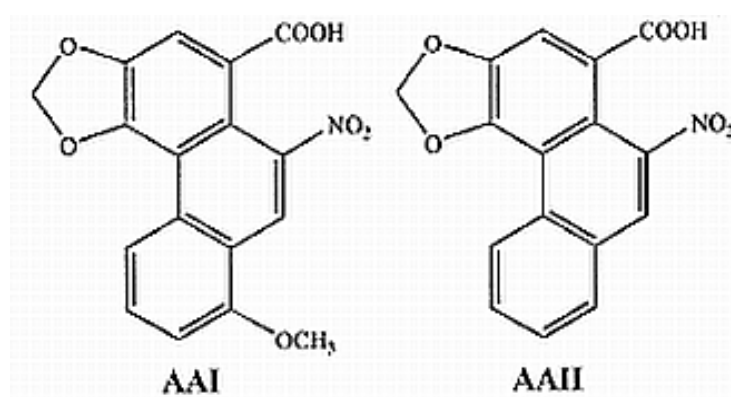


**Obr. 6:** Distribuce cytochromů P450 v játrech. (Převzato z<sup>51</sup>)

Enzym CYP3A4, nacházející se především v játrech, se podílí na metabolismu xenobiotik nejvíce. Jeho enzymová aktivita je však více ovlivněna faktory prostředí (dieta, užívané léky) než dědičností. Naproti tomu enzymová aktivita CYP2D6 může být z velké části ovlivněna jak dědičností, tak např. i užívanými léky, které mohou enzymovou aktivitu snižovat.<sup>28</sup> Rozdíly v enzymové aktivitě cytochromů P450 bez ohledu na jejich příčiny (dědičné vlivy nebo faktory prostředí, užívané léky, pohlaví, věk, hormony, jaterní nemoci, záněť, výživa, těhotenství a jiné) výrazně ovlivňují to, zda-li a do jaké míry se cizorodé látky v organismu detoxikují či aktivují.

## 1.4. Aristolochové kyseliny

Aristolochové kyseliny (AA) jsou látky rostlinného původu, které jsou obsažené především v rostlinách čeledi *Aristolochiaceae* (např. *Aristolochia clematitis*, *Aristolochia fanghi*, *Aristolochia manshuriensis*). Jde o směs strukturně podobných nitrofenantrenových karboxylových kyselin, 8-methoxy-6-nitro-fenantro-(3,4-*d*)-1,3-dioxolo-5-karboxylové kyseliny (AAI) a 6-nitro-fenantro-(3,4-*d*)-1,3-dioxolo-5-karboxylové kyseliny (AAII).<sup>52</sup> Obě tyto kyseliny se liší pouze přítomností methoxy - skupiny na aromatickém kruhu u AAI (**Obr. 7**). Majoritní podíl v těchto rostlinných součástech má aristolochová kyselina I (AAI), aristolochová kyselina II (AAII) je zastoupena v menší míře.



**Obr. 7:** Chemická struktura aristolochové kyseliny I (AAI) a II (AAII) (Převzato z<sup>52</sup>)

Aristolochové kyseliny byly od starověku používány v léčitelství, např. k léčbě hadího uštknutí.<sup>53</sup> Později se tyto rostlinné drogy („drug“) používali také k léčení různých zánětlivých procesů, revmatu nebo k léčbě artritidy<sup>54</sup> až do roku 1982, kdy

Mengs a jeho spolupracovníci prokázali, že aristolochové kyseliny jsou silným karcinogenem pro potkany.<sup>55</sup> Později bylo řadou výzkumných skupin prokázáno, že se také jedná o genotoxický mutagen a všechny produkty obsahující AA byly v řadě zemí staženy z trhu, včetně České republiky.<sup>52</sup>

#### **1.4.1. Nefropatie vyvolaná čínskými bylinami (CHN)**

Ve spojení s aristolochovými kyselinami se hovoří o dvou chorobách. První z nich je označovaná jako nefropatie vyvolaná čínskými bylinami (CHN z angl. „Chinese herbs nephropathy“). Jde o ledvinnou intersticiální fibrosu, která vede až k totálnímu selhání ledvin. Tato choroba byla poprvé zjištěna v roce 1991 u pacientek jedné bruselské kliniky.<sup>56</sup> Tyto ženy se podrobily léčebné kúře sledující redukci jejich tělesné hmotnosti, jejíž součástí bylo i přidávání čínských bylin. Později bylo prokázáno, že právě tyto byliny obsahovaly AA.<sup>57</sup> Ledvinné selhání vedlo u řady pacientek až k transplantaci ledvin. Onemocnění ale i přesto pokračuje dále. A dokonce u žen, které transplantaci ledvin prošly, došlo k vývoji nádorů močových cest.<sup>58-60</sup> Výskyt této choroby byl popsán i v jiných zemích Evropy, ale také v Asii a v USA.<sup>61</sup> Vždy ale bylo prokázáno, že vznik tohoto onemocnění má souvislost s konzumací AA, především AAI. Proto se toto onemocnění nyní označuje také jako **nefropatie vyvolaná aristolochovými kyselinami (AAN, z angl. „Aristolochic acid nephropathy“)**.<sup>52,62,63</sup>

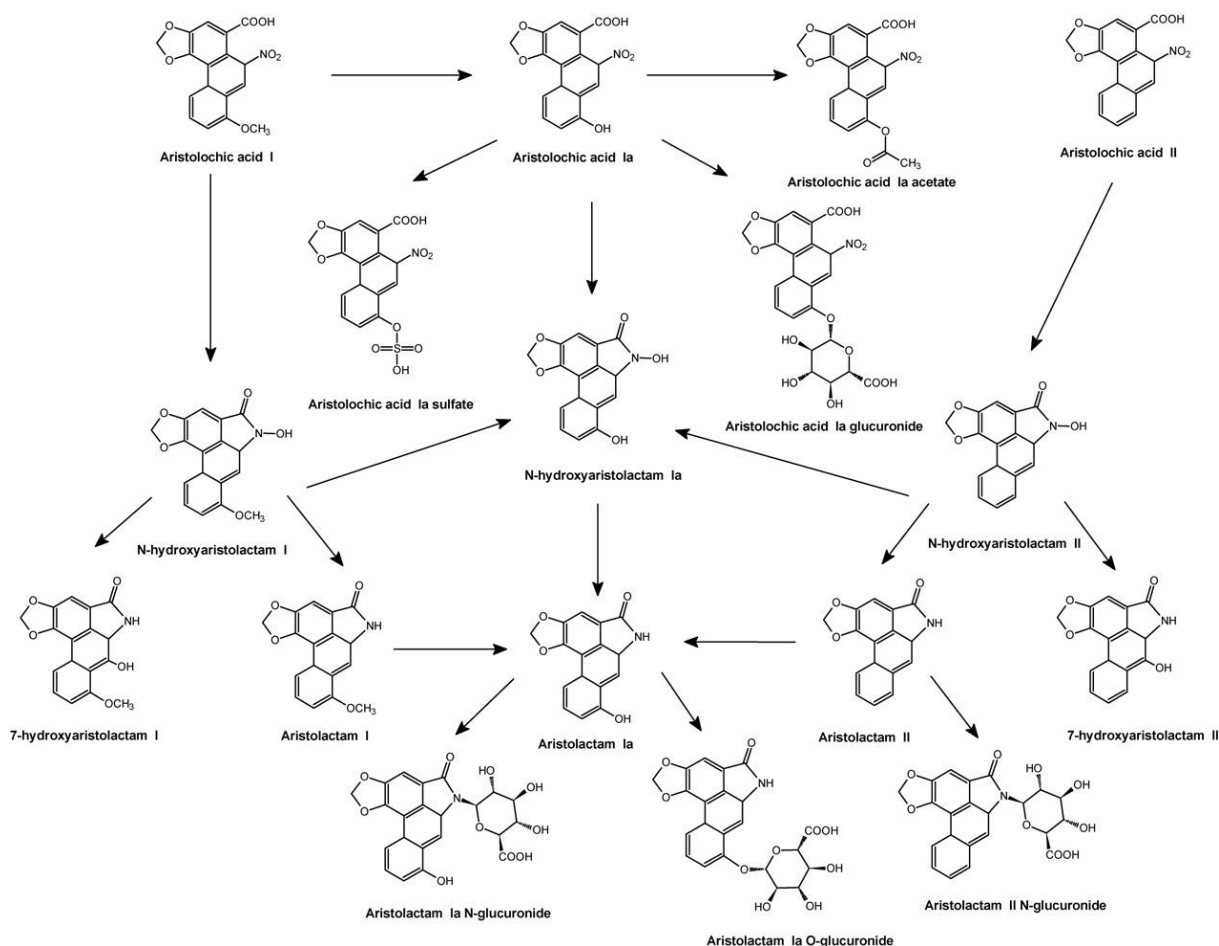
#### **1.4.2. Balkánská endemická nefropatie**

Druhým onemocněním, o kterém se významně hovoří ve spojení s aristolochovými kyselinami je Balkánská endemická nefropatie (BEN). Toto onemocnění se projevuje postupujícím zánětem intersticia ledviny, který vede až k totálnímu selhání funkce orgánu. Tento proces je ireversibilní a pacienti musí být léčeni pomocí dialýzy či musí podstoupit transplantaci ledvin.<sup>64-66</sup> Průběh choroby je nápadně podobný „Chinese herbs nephropathy“. Toto onemocnění postihuje značnou část balkánské populace žijící v oblasti podél řeky Dunaje – především Bulharsko, Rumunsko a země bývalé Jugoslávie.<sup>67,68</sup> Dosud nejsou zcela vyjasněné příčiny tohoto onemocnění. Prováděné studie ukazují na multifaktoriální původ. Předpokládá se, že tato nefropatie by mohla být

vyvolána konzumací potravin kontaminovaných látkami přírodního původu. Za jedny z těchto látek jsou považované aristolochové kyseliny a dále např. některé mykotoxiny, především ochratoxin A.<sup>67</sup>

### 1.4.3. Biotransformace aristolochových kyselin

Na základě několika studií bylo prokázáno, že majoritními metabolity aristolochových kyselin tvořenými *in vitro* a *in vivo* jsou aristolaktamy. Tyto redukční produkty byly objeveny v moči a výkalech savců, včetně člověka. A to jak v konjugované tak i v nekonjugované formě.<sup>52,69</sup>



**Obr. 8:** Navržená cesta biotransformace AAI a AAII u potkanů a člověka (Převzato z<sup>70</sup>)

Obě aristolochové kyseliny jsou převážně redukovány na své *N*-hydroxyaristolaktamy, u kterých buď dochází k přesmyku na 7-hydroxyaristolaktamy nebo jsou ještě dále redukovány až na aristolaktamy (**Obr. 8, str. 29**).<sup>71</sup> Hlavním metabolitem aristolochové kyseliny I je aristolaktam Ia (AlacIa), který je produkován dvěma cestami. Při jedné z nich je AAI demetylována na **aristolochovou kyselinu Ia (AAIa)** a následně přeměněna až na aristolaktam Ia. Druhá cesta vede přes již zmíněný aristolaktam I (AlacI). Schmeiser a jeho spolupracovníci<sup>72</sup> prokázali, že aristolaktamy I a II vznikají *in vitro* za anaerobních podmínek. Pokud reakce probíhá za přístupu vzduchu, vzniká z aristolochové kyseliny I (AAI) aristolochová kyselina Ia (AAIa), zatímco aristolochová kyselina II (AAII) není metabolisována.<sup>72</sup>

Ačkoliv je *in vivo* hlavním metabolitem aristolochové kyseliny aristolaktam I (AlacIa), *in vitro* nebyl detekován.<sup>69,73</sup> Koncentrace kyslíku v tkáních (tzn. *in vivo*) může ovlivnit relativní míru nitroredukce a *O*-dealkylace AAI, zatímco u AAII může být koncentrací kyslíku ovlivněna pouze nitroredukce.<sup>74</sup>

Aristolochová kyselina I je **aktivována** jednoduchou nitroredukcí na *N*-hydroxyaristolaktam, ze kterého vzniká reaktivní cyklický *N*-acylnitreniový ion. Bylo zjištěno, že tato sloučenina je ultimální (okamžitý) karcinogen, který se váže na DNA jak *in vivo*, tak také *in vitro*.<sup>70</sup> Nejvýznamnější lidský a potkaní enzym aktivující AAI *in vitro* je jaterní a ledvinný cytosolický enzym NAD(P)H:chinon oxidoreduktasa (NQO1). Významné jsou ale také jaterní mikrosomální cytochromy P450 1A1/2 a ledvinná mikrosomální NADPH:CYP reduktasa (CPR).<sup>70</sup>

Jako **detoxikační** cesta byla v literatuře popsána právě oxidace (demethylace) aristolochové kyseliny I na aristolochovou kyselinu Ia.<sup>52,70,75</sup>

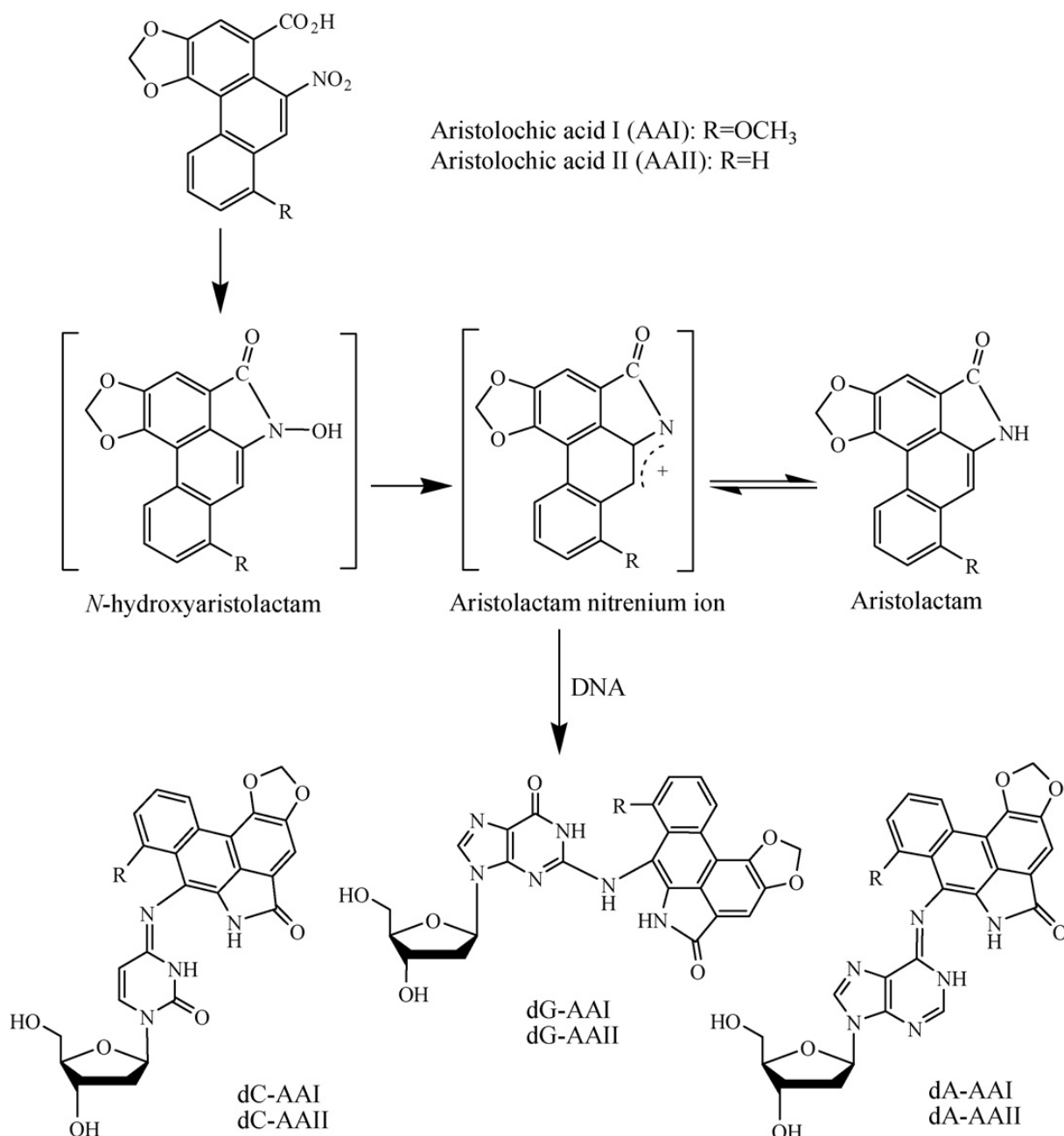
Velké množství metabolitů aristolochových kyselin nalezených v moči a fétu potkanů se nacházelo v konjugované formě, a to ve formě glukuronidů a sulfátů.<sup>69,71,73</sup>

#### **1.4.4. Kancerogeneze vyvolaná aristolochovými kyselinami**

Bylo prokázáno, že AA vytváří kovalentní adukty na DNA, a to jak u potkanů<sup>76-78</sup>, tak také u pacientů s nefropatií vyvolanou aristolochovými kyselinami.<sup>52,79,80</sup>

Při redukci aristolochových kyselin, jak již bylo řečeno, vzniká reaktivní cyklický *N*-acylnitreniový ion, který má delokalizovaný pozitivní náboj a jako ultimální

karcinogen se váže na DNA (**Obr. 9**). A to především na exocyklické aminoskupiny purinových nukleotidů. Takto se tvoří adukty s deoxyadenosinem [7-(deoxyadenosin-N<sup>6</sup>-yl)-aristolaktam] (**dA-AA**) a s deoxyguanosem [7-(deoxyguanosin-N<sup>2</sup>-yl)-aristolaktam] (**dG-AA**). *N*-acylnitreniový ion může také být konvertován na 7-hydroxyaristolaktam (**Obr. 9**).<sup>77,78,81</sup>



**Obr.9:** Metabolická aktivace aristolochových kyselin I a II (AAI, AAIi) a tvorba aduktů s DNA (Převzato z<sup>70</sup>)

Převládajícím aduktem tvořeným aristolochovými kyselinami na DNA *in vivo* je 7-(deoxyadenosin-N6-yl)aristolaktam I (dA-AAI) (**Obr. 9**, *str. 31*). Jeho dlouhá doba persistence je zásadní pro iniciaci karcinogeneze vyvolané aristolochovými kyselinami. Tento adukt byl nalezen u pacientů jako persistentní léze vedoucí k transverzní mutaci A → T.<sup>82,83</sup> Tato mutace byla nalezena s vysokou frekvencí v tumorech v kodonu 61 onkogenu H – *ras* u potkanů, kterým byla podávána AAI. Několika studiemi bylo potvrzeno, že obě aristolochové kyseliny se váží na adeniny v kodonu 61 myšního genu H – *ras*<sup>82,83</sup> a přednostně na purinové báze v lidském tumor supresorovém genu p53.<sup>52,84,85</sup>

Geny kódující enzymy, které metabolisují karcinogeny, jsou známé tím, že mohou existovat ve více „variantních formách“ nebo se u nich může vyskytovat polymorfismus. Z toho vyplývají různé aktivity jejich genových produktů. Zdá se, že tyto genetické variace jsou důležitým faktorem určujícím riziko rakoviny.<sup>86</sup>

## **2. Cíl diplomové práce**

Cílem předkládané diplomové práce bylo studovat metabolickou detoxikaci aristolochové kyseliny I cytochromy P450. Konkrétně bylo zjišťováno, které enzymy jsou zodpovědné za detoxikaci aristolochové kyseliny I.

Pro studium této problematiky byly použity:

- jaterní mikrosomy modelových organismů (potkana a myši).
- lidské jaterní mikrosomy
- studie využívající specifických induktorů a inhibitorů cytochromů P450
- lidské rekombinantní cytochromy P450

Diplomová práce byla řešena jako součást grantových vědeckých projektů podporovaných GAČR (303/09/0472, 305/09/H008) a MŠMT (MSM 00211620808)

### 3. Materiál a metody

#### 3.1. Použitý materiál a chemikálie

Chemikálie a materiál, které byly použity v experimentech, pocházejí z těchto zdrojů:

- **Chemopetrol, Česká republika**  
suchý led
- **Fluka, Švýcarsko**  
fenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), tokoferol (vitamin E)
- **Gentest BD Bioscience, USA**  
lidské rekombinantní cytochromy P450 v Supersomech™  
lidské jaterní mikrosomy (mužské, ženské) „slité“ (HLM male, female pooled)
- **Lachema Brno, Česká republika**  
β-naftoflavon (β-NF), CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O, dithioničitan sodný, dithiothreitol (DTT), EDTANa<sub>2</sub> (chelaton 3), ethanol, glycerol, HCl, KCl, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, kyselina octová, methanol, MgCl<sub>2</sub>, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> · H<sub>2</sub>O, NaHCO<sub>3</sub>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2 H<sub>2</sub>O, Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> · 10H<sub>2</sub>O, sacharosa, vinan sodný, 4,4'-dikarboxy-2,2'-bicinchoninová kyselina (BCA)
- **Linde, Česká republika**  
kapalný dusík, oxid uhelnatý
- **Merck, Německo**  
acetonitril
- **Penta, Česká republika**  
ethylacetát, NaOH

➤ **Sevapharma a.s., Česká republika**

hovězí sérový albumin (BSA)

➤ **Sigma, USA**

$\alpha$ -naftoflavon ( $\alpha$ -NF), diethyldithiokarbamát (DDTC), dimethylsulfoxid (DMSO), furafyllin, glukosa-6-fosfát, glukosa-6-fosfát dehydrogenasa, ketokonazol, NADPH, triethyl-aminacetát (TEAA)

➤ **Velaz, Česká republika**

laboratorní potkani kmene Wistar

➤ AAI sodná sůl: dar - Německé centrum pro výzkum rakoviny v Heidelbergu

➤ Jaterní mikrosomy izolované z potkanů premedikovaných induktory jednotlivých isoform CYP byly izolovány v laboratoři katedry biochemie PřF UK. Za možnost jejich využití jim tímto děkuji. To platí i pro mikrosomy z potkanů kontrolních.

➤ Jaterní mikrosomy potkana indukovaného  $\beta$ -naftoflavonem ( $\beta$ -NF) byly izolovány ve spolupráci s kolegy naší laboratoře jako součást diplomové práce (*kap. 3.3.2.*).

➤ Myší jaterní mikrosomy byly izolovány v laboratořích Německého centra pro výzkum rakoviny v Heidelbergu.

## 3.2. Přístroje

- **Automatické mikropipety:**  
Nichiryo Nichipet EX (Japonsko)
  
- **Centrifugy:**  
K23, Janetzki, výkyvný rotor (Německo)  
K24, Janetzki, úhlový rotor (Německo)  
Optima LE-80K Ultracentrifuge, Beckman Coulter, úhlový rotor Ti 45 (USA)  
Microcentaur MSE, Sanyo, úhlový rotor (Velká Británie)
  
- **Inkubátor:**  
Thermomixer Eppendorf compact Eppendorf (Německo)
  
- **Magnetická míchačka**  
Variomag, Monotherm (Německo)
  
- **pH metr:**  
ATI Orion 370 s kombinovanou elektrodou (USA) - kalibrace přístroje pomocí standardů Hamilton (Švýcarsko)
  
- **Sonikátor:**  
ELMAsonic E 30 H, P-Lab (Česká republika)
  
- **Spektrofotometry:**  
Hewlett Packard E8453 (USA)  
SPECORD M42 Carl-Zeiss Jena (Německo)  
Spektromom 195D (MOM) (Maďarsko)
  
- **System HPLC:**  
pumpa: Dionex pump P580  
ASI-100 Automated Sample Injector  
UV/VIS Detector UVD 170S/340S (USA)  
Degasys DG-1210 Dionex

termobox pro kolonu: COLUMN OVEN LCO 101

kolona: Macherey-Nagel, Nukleosil 100-5 C18 HD; 4 x 250 mm (Německo)

program: Chromeleon™ 6.11 build 490

➤ **Další přístroje:**

analytické váhy PESA 40SM-200A (Švýcarsko), homogénizátor dle Pottera a Elvehjema, Mikroshaker type ML-1, MS 2 Minishaker, Schoeller Pharma Praha (Česká republika), termostatovaná lázeň KL1 (Laboratorní přístroje Praha), ultrafiltrační cela (Amicon, Lexington),

### 3.3. Metody

#### **3.3.1. Premedikace laboratorních potkanů $\beta$ -naftoflavonem (Stiborová**

##### **M., ústní sdělení)**

Všechny experimenty s laboratorními potkany byly prováděny v laboratořích firmy RCD s.r.o. (Dobřichovice). K premedikaci byli použiti samci laboratorních potkanů kmene Wistar o hmotnosti 100 až 120 gramů, kteří byli drženi při teplotě  $22 \pm 2$  °C. Voda a granulovaná strava jim byly podávány *ad libitum*. Premedikace byla zahájena po zhruba týdenní aklimatizaci. Den před usmrcením byla potkanům odebrána strava.

$\beta$ -naftoflavon byl rozpuštěn v rostlinném oleji Vegetol (4 mg/ml). Premedikace byla prováděna intraperitoneálně, po dobu tří za sebou následujících dnů v dávkách 60 mg  $\beta$ -naftoflavonu na 1 kg hmotnosti zvířete. Čtvrtý den byla zvířata usmrcena a provedena izolace subcelulárních frakcí z jaterní tkáně.

### **3.3.2. Isolace mikrosomální frakce z jaterní tkáně laboratorního potkana<sup>87</sup>**

Vyjmutá a opláchnutá játra byla vložena do předem zváženého ledového roztoku pufru **P1** (153 mM KCl; 10 mM EDTANa<sub>2</sub>; 0,5 mM fenylmethylsulfonylfluorid (PMSF); 50 µM vit E; pH 7,5) a z nárůstu hmotnosti byla určena hmotnost tkáně. Jaterní tkáň byla nastříhána na malé kousky a několikrát promyta puftrem **P1** pro co nejdokonalejší odkrvení. Poté byla po malých dávkách homogenisována nejdříve ve volnějším, následně v těsnějším homogenisátoru dle Pottera a Elvehjema s roztokem **P1**, jehož celkový objem v ml odpovídal 4 x hmotnosti jaterní tkáně (g). Homogenát byl filtrován přes čtyřikrát složenou gázu.

Získané homogenáty byly odstředěny 10 minut při 2000 RPM (centrifuga Janetzki K-23, Německo) ve výkyvném rotoru 4 x 70 ml za chlazení na 4 °C. Supernatant byl uchován v chladu a sediment rehomogenisován s 1/4 původního objemu roztoku **P1** a zpracován za výše uvedených podmínek.

Spojené supernatanty byly centrifugovány po dobu 20 minut při 13 000 RPM (centrifuga Janetzki K-24, Německo) v úhlovém rotoru 6 x 35 ml za chlazení na 4 °C. Kyvety mohou být plněny maximálně do 2/3 výšky. Supernatant byl velmi opatrně odlit přes sediment bez kontaminace tzv. lehce sedlou vrstvou (mitochondrie). Z takto získaného supernatantu byla připravena mikrosomální frakce ultracentrifugací 65 minut při 45 000 RPM (centrifuga Beckman LE-80K, úhlový rotor 45 Ti, 6 x 94 ml).

Supernatant po centrifugaci je cytosolární frakce. Bílý tukový povlak ze stěn kyvet byl setřen smotkem gázy. Peleta mikrosomů byla resuspendována v asi dvojnásobném množství pufru **P2** (100 mM Na<sub>2</sub>P<sub>4</sub>O<sub>7</sub> · 10 H<sub>2</sub>O; 100 mM KCl; 1 mM EDTANa<sub>2</sub>; pH 7,5).

Z homogenní suspenze byla připravena finální mikrosomální frakce ultracentrifugací 65 minut při výše uvedených podmínkách. Mikrosomální sediment byl resuspendován v pufru **P3** (0,25 mM sacharosa; 10 mM EDTANa<sub>2</sub>; 1 mM PMSF; 250 µM vit. E; 1 mM dithiothreitol (DTT); pH 7,5) v objemu odpovídajícím 1/5 původní hmotnosti jater a rehomogenisován pomocí malého homogenisátoru. Výsledný mikrosomální preparát byl pipetován po alikvotech (1 ml) do mikrozkušavek eppendorf a zmražen v kapalném dusíku. Následně byly alikvoty uloženy do mrazicího boxu a skladovány při -80°C.

### **3.3.3. Stanovení obsahu cytochromu P450**

Principem metody pro stanovení obsahu cytochromu P450 v mikrosomálních preparátech je využití charakteristické absorpce komplexu cytochromu P450 v redukovaném stavu s oxidem uhelnatým při 450 nm.<sup>88</sup> Na základě tohoto jevu se provádí stanovení koncentrace cytochromu P450 metodou diferenčních spekter.<sup>88</sup>

#### ***Postup:***

Do zkumavky bylo pipetováno 1960 µl pufru (0,1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 2% glycerol; pH 7,5) a bylo přidáno 40 µl vzorku mikrosomů. Redukce cytochromu P450 byla uskutečněna přidáním malého množství (~5 mg) dithioničitanu sodného. Směs byla opatrně promíchána tak, aby v ní nevznikaly bubliny. Následně byl vzorek rozdělen po 1 ml do dvou křemenných kyvet o optické dráze 1 cm a na dvoupraprskovém přístroji Specord M42 (Carl Zeiss Jena, Německo) byla proměřena základní linie („base line“) v rozmezí 400 až 500 nm. Vzorková kyveta byla následně sycena po dobu 60 sekund proudem oxidu uhelnatého a proměřeno diferenční spektrum.

Koncentrace cytochromu byla vypočtena z následujícího vztahu:

$$c_{P450} = A_{450} - A_{490} / \varepsilon_{P450} \cdot \text{ředění} \quad [\mu M]$$

$c_{P450}$	koncentrace cytochromu P450
$A_x$	absorbance při vlnové délce x nm
$\varepsilon_{P450}$	molární absorpční koeficient cytochromu P450; ( $\varepsilon = 0,091 \text{ mmol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{cm}^{-1}$ )

### **3.3.4. Stanovení koncentrace proteinu metodou 4,4'-dikarboxy-2,2'-bicinchinové kyseliny (BCA)**

Koncentrace proteinu byla zjišťována metodou dle Wiechelmana a kol.<sup>89</sup>, při které se využívá tvorby modře zabarveného komplexu měďných iontů s 4,4'-dikarboxy-2,2'-bicinchinovou kyselinou (BCA) v alkalickém prostředí. Postranní skupiny některých aminokyselin totiž redukují měďnaté ionty přítomné v činidle (stabilisované jako

vínanový komplex) na měďné, intenzita zabarvení, stanovená spektrofotometricky ( $A_{562}$ ), je pak přímo úměrná koncentraci bílkoviny.

Činidlo potřebné pro stanovení koncentrace proteinu bylo připraveno rozpuštěním BCA ve 49 dílech **roztoku A** (0,4% NaOH; 0,95% NaHCO<sub>3</sub>; 2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> · H<sub>2</sub>O; 0,16% tartarát sodný; pH 11,25) tak, aby výsledná koncentrace byla 1% BCA v 50 dílech. Po rozpuštění BCA byl dále přidán 1 díl **roztoku B** (4% CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O v destilované vodě). Činidlo bylo připraveno těsně před upotřebením.

Do čistých, vyžíhaných centrifugačních zkumavek bylo pipetováno 20  $\mu$ l vzorku (v případě potřeby zředěného destilovanou vodou) a přidáno 980  $\mu$ l činidla. Pro sestrojení kalibrační křivky bylo do zkumavek pipetováno 1, 2, 5, 10, 15, 20  $\mu$ l standardu BSA (1 mg/ml), doplněno destilovanou vodou do 20  $\mu$ l a přidáno 980  $\mu$ l činidla. Po inkubaci při teplotě 60 °C po dobu 30 minut a následném zchladnutí byla změřena absorbance standardů při 562 nm proti „slepému“ vzorku, který obsahoval místo roztoku bílkoviny 20  $\mu$ l destilované vody. Stejným způsobem byla měřena i absorbance vzorků. Byla sestrojena kalibrační křivka a z ní určena koncentrace proteinu ve vzorcích. Měření vzorků bylo prováděno na přístroji Hewlett Packard 8453 E ve skleněné kyvetě o optické dráze 1 cm.

### **3.3.5. Oxidace AAI cytochromy P450 jaterních mikrosomů člověka, potkana a myši a lidskými rekombinantními cytochromy P450**

Oxidace AAI byla prováděna její inkubací s enzymovými mikrosomálními systémy člověka, potkana, myši a s lidskými rekombinantními cytochromy P450. Inkubační směsi byly připraveny vždy v „dubletech“ o celkovém objemu 500  $\mu$ l (250  $\mu$ l) a následujícím složení:

*Složení inkubačních směsí:*

- fosfátový pufr (100 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), pH = 5,4; 6,4; 7,4; 8,4
- 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 10 mM glukosa-6-fosfát; 1 mM NADP<sup>+</sup>; 1 U/ml glukosa-6-fosfát dehydrogenasa (NADPH-GS) nebo 1 mM NADPH
- AAI (1, 5, 10, 11, 20  $\mu$ M)
- 1. mikrosomy jaterní potkan : 0,1; 0,25; 0,5; 0,75 ;1 mg<sub>proteinu</sub>/ml

0,1; 0,2; 0,3 nmol CYP

myš (WT) c = 0,5 mg<sub>proteinu</sub>/ml

## 2. mikrosomy lidské jaterní (HLM male, HLM female)

$$c = 0,5 \text{ mg}_{\text{proteinu}}/\text{ml}$$

3. lidské rekombinantní cytochromy P450  $c = 50 \text{ nM}$ 

Všechny potřebné složky byly do směsi vždy přidávány v takovém množství, aby jejich zastoupení ve vzorku odpovídalo výše uvedeným koncentracím. Směs byla doplněna fosfátovým pufrem do 500  $\mu\text{l}$  (250  $\mu\text{l}$ ), zamíchána a inkubována (0, 5, 10, 15, 20 minut) za stálého třepání (400 RPM) v otevřených zkumavkách při 37 °C. Probíhající reakce byla zastavena přidáním 1 ml ethylacetátu a produkty reakce extrahovány do tohoto organického rozpouštědla 2 min třepáním (Mikroshaker type ML-1). Pro následné důkladné oddělení fází byla směs centrifugována 3 minuty při 13 000 RPM (minicentrifuga MicroCentaur MSE, úhlový rotor). Po oddělení organické fáze obsahující produkty reakce byl k vodné fázi přidán opět 1 ml ethylacetátu a provedena další extrakce stejným postupem. Spojené extrakty byly odpařeny a vzorky byly před analýzou uchovány při teplotě -20°C. Těsně před analýzou byly odparky rozpuštěny ve 30  $\mu\text{l}$  methanolu a vzorky byly analyzovány pomocí HPLC (aplikováno 20  $\mu\text{l}$ ).

**3.3.6. Příprava vzorků standardu AAI pro HPLC**

Ke 28  $\mu\text{l}$  methanolu byly přidány 2  $\mu\text{l}$  2,75  $\mu\text{M}$  AAI, směs byla důkladně promíchána a analyzována dle podmínek HPLC uvedených v *kap.3.3.7.*

**3.3.7. Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)**

Látky obsažené v jednotlivých inkubačních směsích a standardní vzorky v experimentech sledujících oxidaci AAI byly separovány a jejich obsah stanoven pomocí metody RP-HPLC na koloně C<sub>18</sub> (Macherey-Nagel, SRN) při teplotě 35°C. Jako mobilní fáze byla použita směs: (A) 100 mM triethylaminacetát (pH 7,0; úprava pH kyselinou octovou) a (B) 80% acetonitril. Po aplikaci vzorku na kolonu bylo složení mobilní fáze 80% A, 20% B a gradient se měnil až na konečné složení mobilní fáze 40% A a 60% B v čase 55 min. Obě mobilní fáze byly připraveny do skleněných lahví a před použitím byly vždy odstraněny bubliny sonikací v ultrazvukové lázni. Eluce probíhala gradientově při průtoku mobilní fáze 0,5 ml/min. Jednotlivé složky inkubačních směsí byly detekovány při vlnové délce 250 nm a vzorky byly na kolonu aplikovány vždy v množství 20  $\mu\text{l}$ .

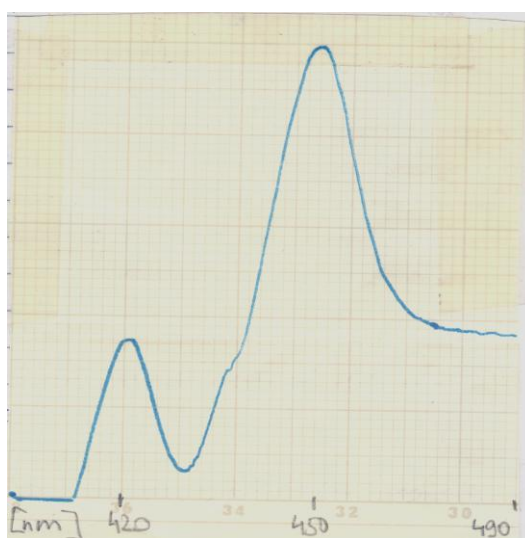
## 4. Výsledky

### 4.1. Isolace mikrosomální frakce z jaterní tkáně laboratorního potkana

První část diplomové práce byla věnována izolaci mikrosomů jater z potkanů premedikovaných  $\beta$ -naftoflavonem. Mikrosomy z potkanů premedikovaných fenobarbitalem, Sudanem I a mikrosomy zvířat nepremedikovaných (mikrosomy kontrolní) byly v laboratoři izolovány již v rámci předchozích studií.

#### 4.1.1. Isolace mikrosomální frakce

K izolaci byly použity mikrosomy jater potkana premedikovaného  $\beta$ -naftoflavonem (*kap. 3.3.1.*). Koncentrace cytochromu P450 v izolovaných mikrosomech byla stanovena dle postupu popsaném v *kap. 3.3.3. (str. 39)* a byla **32,3  $\mu$ M**. Koncentrace proteinů byla stanovena metodou dle Wiechelmana a kol.<sup>89</sup> (*kap. 3.3.4., str. 39*) a měla hodnotu **54,3 mg/ml**.



**Obr. 10:** Diferenční spektrum komplexu redukováného cytochromu P450 oxidem uhelnatým v mikrosomech potkana premedikovaného  $\beta$ -naftoflavonem ( na ose x je vynesena vlnová délka v nm a na ose y absorbance )

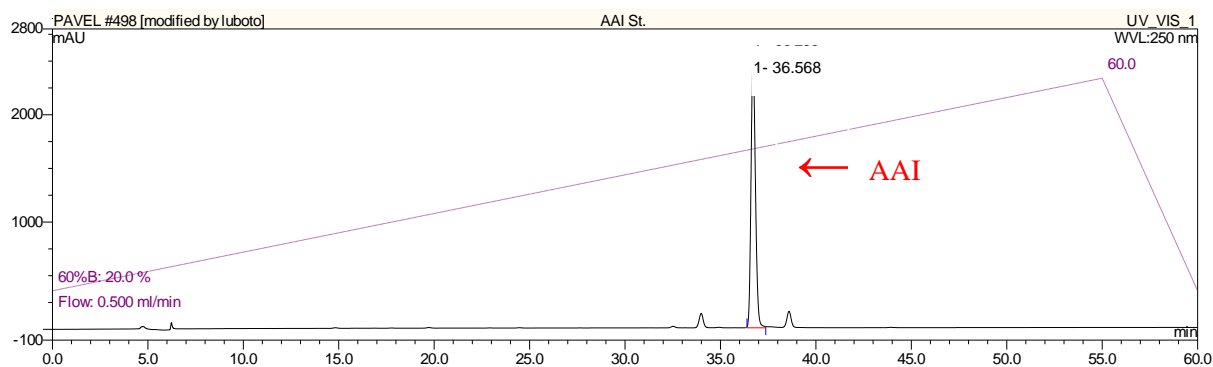
## 4.2. Studium oxidace AAI jaterními mikrosomálními cytochromy P450

Jako detoxikační metabolická přeměna aristolochové kyseliny I (AAI) byla v literatuře popsána její oxidace. Bylo zjištěno, že AAI je oxidována za tvorby jednoho metabolitu, aristolochové kyseliny Ia (AAIa).<sup>52,70,75</sup> Tento majoritní metabolit tvořený demethylací methoxy skupiny, byl separován pomocí HPLC a detekován při vlnové délce 250 nm. Detailní výsledky jsou uvedeny v následujících kapitolách. V experimentech byly pro studium oxidace AAI použity potkaní, myší a lidské jaterní mikrosomální systémy a lidské rekombinantní CYP.

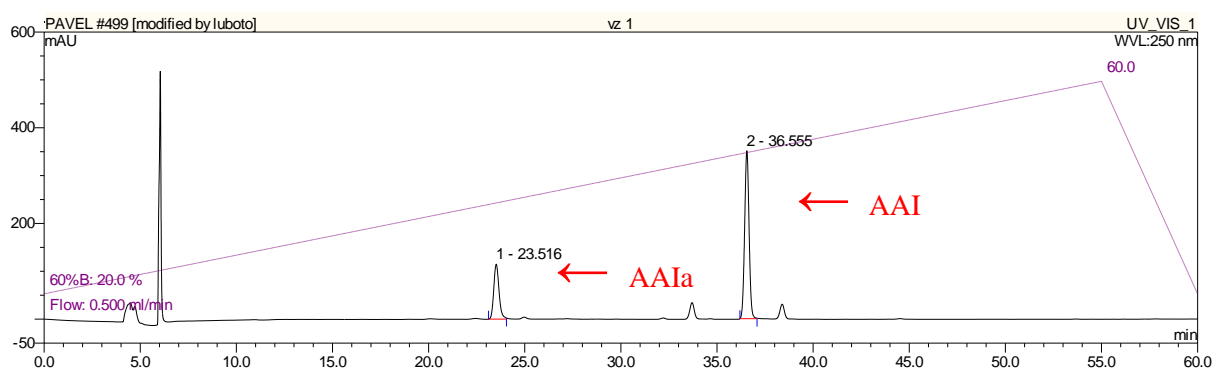
### **4.2.1. Separace AAI a jejího detoxikačního metabolitu AAIa metodou HPLC**

Optimální podmínky separace AAI od jejího metabolitu pomocí HPLC byly navrženy již dříve.<sup>90</sup> V předkládané diplomové práci byly podmínky separace drobně modifikovány. Konkrétní postup separace je uveden v *kap. 3.3.7.*

V metabolických studiích, a také jako standard pro HPLC, byla používána sodná sůl aristolochové kyseliny I (AAI). AAI je oxidována enzymy přítomnými v jaterních mikrosomech experimentálních živočišných modelů na demethylační metabolit AAIa (**Obr. 12, str. 44**). AAI je při podmínkách užitých pro HPLC (viz *kap 3.3.7.*) eluována v retenčním čase 36,5 minut (**Obr. 11,12, str. 44**) a její oxidační metabolit (AAIa) v retenčním čase 23,5 minut (**Obr. 12, str. 44**). Ostatní „píky“ v chromatogramech na **Obr. 11, 12 (str. 44)** byly detekovány i v kontrolních vzorcích. Jejich původ tedy netkví v metabolismu AAI.



**Obr. 11: HPLC AAI.** Experimentální podmínky HPLC: mobilní fáze 80 % acetonitril a 100 mM TEAA (80% A a 20% B → 40% A a 60% B), průtok 0,5 ml/min, kolona C18 Macherey-Nagel, teplota 35°C, aplikováno 20 µl vzorku, detekce při 250 nm.

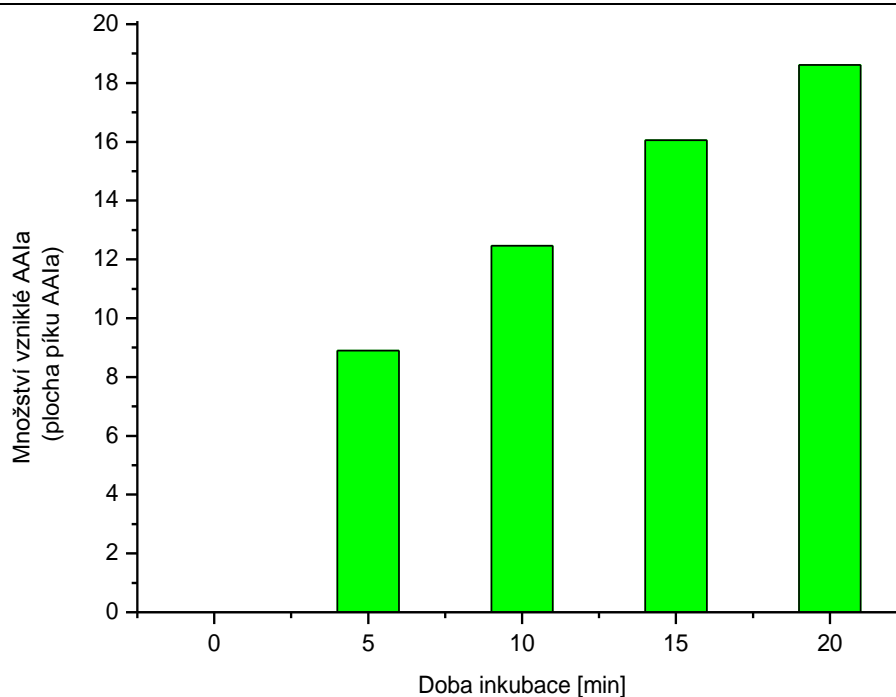


**Obr. 12: HPLC oxidace AAI.** Experimentální podmínky HPLC: mobilní fáze 80 % acetonitril a 100 mM TEAA (80% A a 20% B → 40% A a 60% B), průtok 0,5 ml/min, kolona C18 Macherey-Nagel, teplota 35°C, aplikováno 20 µl vzorku, detekce při 250 nm.

#### **4.2.2. Vliv doby inkubace na oxidaci AAI potkaními jaterními mikrosomy**

Nejdříve byl sledován vliv doby inkubace na oxidaci AAI na AAIa. Ke sledování časové závislosti tvorby tohoto metabolitu byly použity mikrosomy (MS) potkanů premedikovaných fenobarbitalem (PB).

Výsledky analýzy využívající HPLC jsou uvedené na **Obr. 13** (str. 45). Doba inkubace byla 0, 5, 10, 15 a 20 minut. Vzorky byly připraveny o celkovém objemu 500 µl a jejich příprava je popsána v kap. 3.3.5..



**Obr. 13:** Závislost přeměny AAI na době inkubace s jaterními mikrosomy potkanů premedikovaných fenobarbitalem (PB). Sloupce uvedené v obrázku udávají množství vzniklé AAIA. Uvedené hodnoty jsou průměr ze dvou měření. Složení inkubační směsi: 11  $\mu\text{M}$  AAI; 0,5  $\text{mg}_{\text{proteinu/ml}}$  MS PB; 1  $\text{mM}$  NADPH; fosfátový pufr pH 7,4

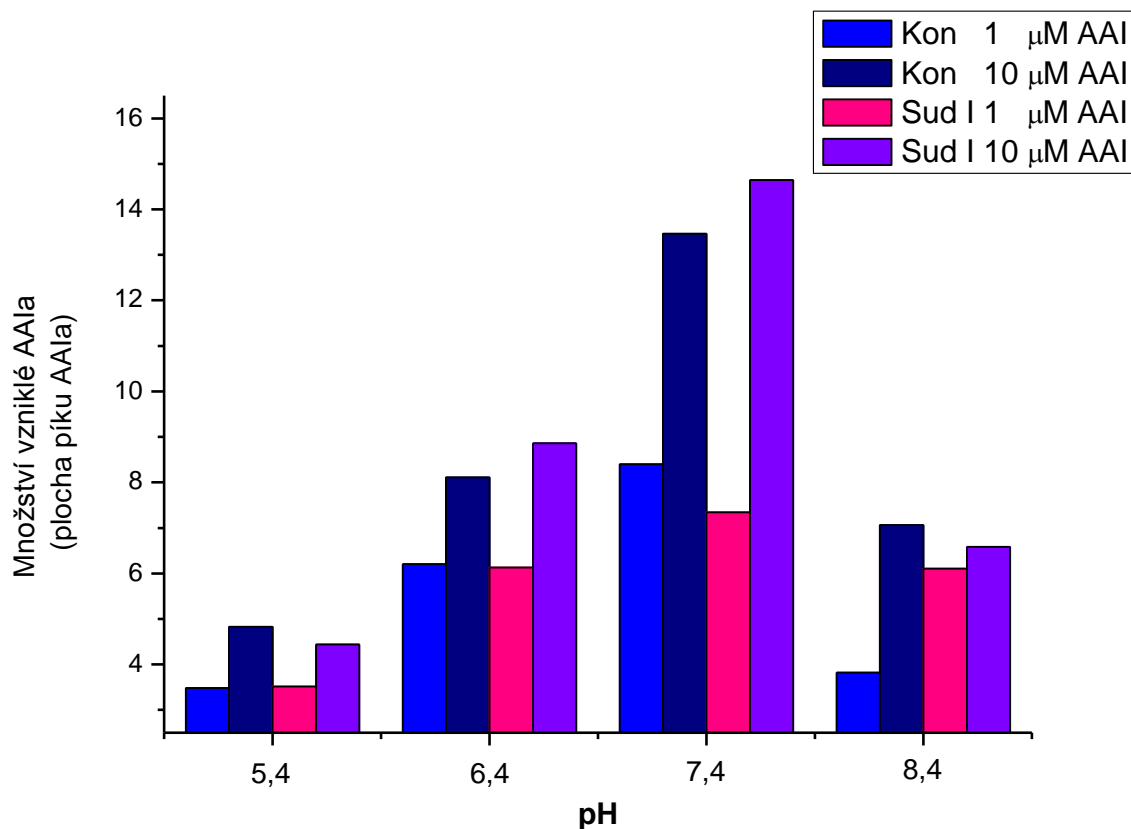
Oxidace AAI na AAIA vzrůstá s dobou inkubace do 20 minut. Při delší době inkubace je přeměna AAI na AAIA snížena (výsledky nejsou uvedeny). Pro další experimenty byla užita doba inkubace 10 minut, kdy je oxidace AAI téměř lineárně závislá na době inkubace.

#### **4.2.3. Vliv pH na oxidaci AAI jaterními mikrosomy**

Pro zjištění optimálních podmínek oxidace AAI byl také sledován vliv pH na množství vzniklého oxidačního metabolitu AAIA. Při studiu byly použity mikrosomy potkanů premedikovaných Sudanem I (Sud I), který je induktorem cytochromů P450 podrodiny 1A, a mikrosomy nepremedikovaných (kontrolních) zvířat (Kon).

V experimentech byly použity fosfátové pufrы o pH 5,4; 6,4; 7,4; 8,4. Jako zdroj NADPH pro reakci byl použit NADPH - generující systém (NADPH - GS). Pomocí orientačních experimentů bylo ověřeno, že používání 1  $\text{mM}$  NADPH nebo jeho záměna za NADPH - generující systém nemá na reakci žádný vliv (výsledky nejsou uvedeny).

Inkubační směsi o celkovém objemu 500  $\mu\text{l}$  byly připraveny podle postupu popsaného v kap. 3.3.5. Výsledky experimentů jsou uvedeny v **Obr. 14**.

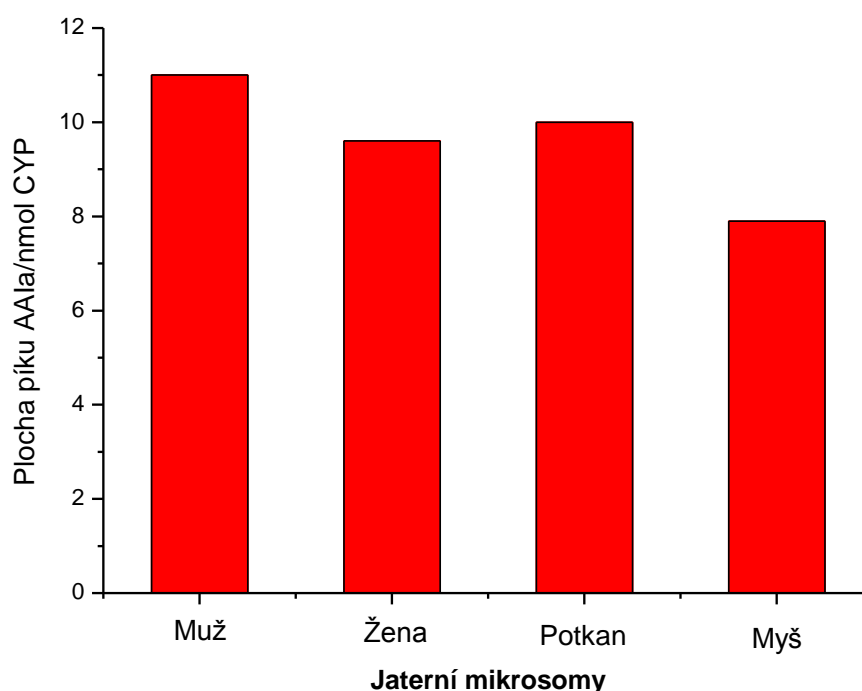


**Obr. 14:** Vliv pH na oxidaci AAI jaterními mikrosomy. Inkubace s jaterními mikrosomy potkanů premedikovaných Sudanem I a nepremedikovaných potkanů (kontrolních). Sloupce uvedené v obrázku udávají množství vzniklé AAIa. Uvedené hodnoty jsou průměr ze dvou měření. Složení inkubační směsi: 1, 10  $\mu\text{M}$  AAI; 0,2 nmol CYP MS; 10 mM glukosa-6-fosfát; 1 mM NADP<sup>+</sup>; 1 U/ml glukosa-6-fosfát dehydrogenasa (NADPH-GS); fosfátový pufr pH 7,4

Jak je z **Obr. 14** patrné, pH optimum oxidace AAI leží v oblasti pH okolo pH 7,4. A to jak v reakci katalyzované mikrosomy potkanů premedikovaných Sudanem I, tak také mikrosomy nepremedikovaných zvířat (kontrolních).

#### **4.2.4. Efektivita oxidace AAI jaterními mikrosomy člověka, potkana a myši**

V rámci této diplomové práce byla rovněž sledována efektivita oxidace AAI jaterními mikrosomy různých biologických druhů. Konkrétně člověka, potkana a myši. Pro pokusy byly použity potkaní jaterní mikrosomy z nepremedikovaných zvířat (kontrolní), lidské jaterní mikrosomy mužské a ženské (HLM male, HLM female) a myší jaterní mikrosomy. Postup experimentu je popsán v *kap. 3.3.5.*



**Obr. 15:** Oxidace AAI na AAIA jaterními mikrosomy člověka, potkana a myši. Uvedené hodnoty jsou průměr ze dvou měření. Složení inkubační směsi: 11  $\mu$ M AAI; 0,5 mg<sub>proteinu</sub>/ ml MS; 1 mM NADPH; fosfátový pufr pH 7,4

Z **Obr. 15** je patrné, že lidské a potkaní jaterní mikrosomy mají podobnou schopnost oxidovat aristolochovou kyselinu I na AAIA, zatímco myší jaterní mikrosomy jsou méně efektivní. Pokud nebyl do inkubací přidán NADPH (NADPH – GS), který je kofaktorem NADPH:cytochrom P450 reduktasy, spolupracující enzym s cytochromy P450, tak AAI oxidována nebyla. Tyto výsledky poukazují na to, že za oxidaci AAI na AAIA jsou zodpovědné cytochromy P450.

#### **4.2.5. Určení účinnosti jaterních cytochromů P450 oxidovat AAI**

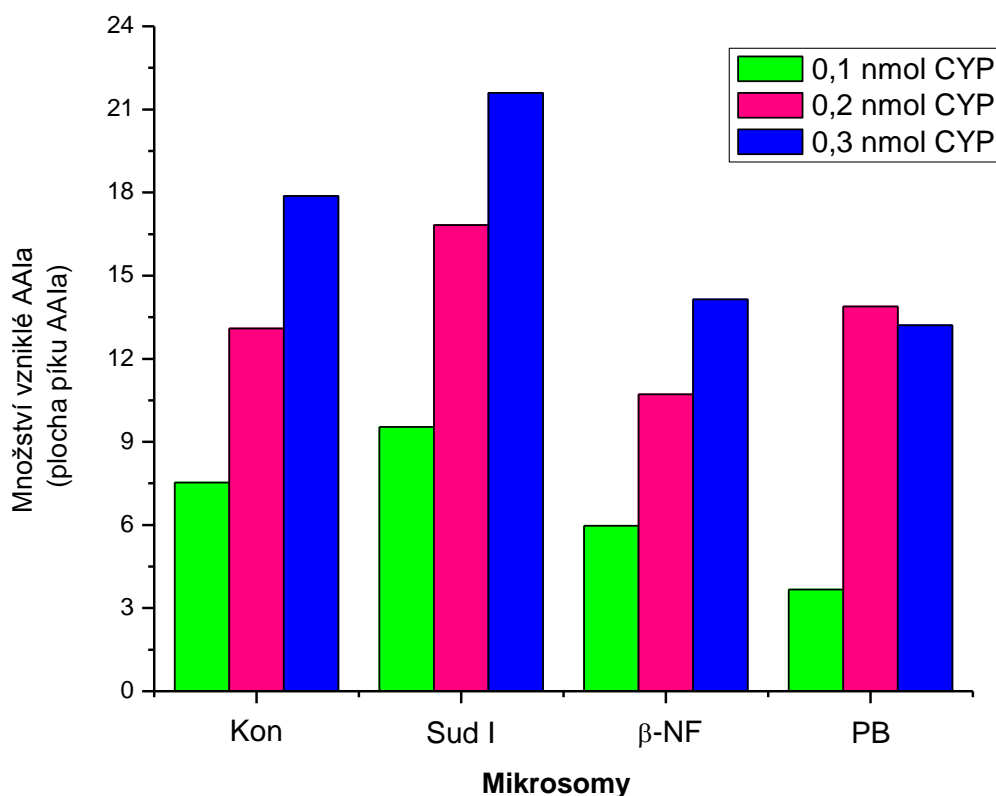
V předkládané diplomové práci byl dále sledován vliv specifických induktorů cytochromů P450, kdy byly použity mikrosomy izolované z experimentálních zvířat, které byly „nabohaceny“ příslušnou isoformou cytochromu P450 indukcí specifickými induktory. Jako modelový organismus pro tyto experimenty byl použit laboratorní potkan.

##### **4.2.5.1. Vliv induktorů cytochromů P450 na oxidaci AAI jaterním mikrosomálním systémem potkana**

V diplomové práci byl konkrétně studován vliv induktorů cytochromů P450  $\beta$ -naftoflavonu (indukuje především CYP1A1/2), fenobarbitalu (indukuje především CYP2B) a Sudanu I (indukuje CYP1A1/2) na oxidaci AAI.

Ke sledování přeměn AAI byly použity mikrosomy potkanů premedikovaných výše uvedenými induktory CYP a také mikrosomy kontrolní (Kon), izolované z jater nepremedikovaných zvířat.

Inkubační směsi se všemi typy mikrosomů byly připraveny ve třech sériích tak, aby výsledné látkové množství CYP obsažených v mikrosomech odpovídalo vždy 0,1; 0,2; 0,3 nmol CYP. Všechny typy použitých mikrosomálních frakcí za přítomnosti NADPH-generujícího systému (*kap.3.3.5.*) oxidují AAI na AAIA (**Obr. 16, str. 49**).



**Obr. 16:** Oxidace AAI na AAIa jaterními mikrosomy potkanů premedikovaných fenobarbitalem (PB), Sudanem I (Sud I),  $\beta$ -naftoflavonem ( $\beta$ -NF) a potkanů nepremedikovaných (Kon). Sloupce uvedené v obrázku udávají množství vzniklé AAIa. Uvedené hodnoty jsou průměr ze dvou měření. Složení inkubační směsi: 11  $\mu$ M AAI; 0,1; 0,2; 0,3 nmol CYP; 10 mM glukosa-6-fosfát; 1 mM NADP<sup>+</sup>; 1 U/ml glukosa-6-fosfát dehydrogenasa (NADPH-GS); fosfátový pufr pH 7,4

Z výsledků experimentů uvedených na **Obr. 16** je patrné, že všechny typy mikrosomů jsou schopné oxidovat AAI. Množství vzniklého metabolitu, AAIa, bylo ovlivněno premedikací zvířat induktory CYP. Premedikace potkanů Sudanem I vedla k výrazné stimulaci tvorby metabolitu. Společně s  $\beta$ -naftoflavonem oba shodně indukují CYP1A, ale Sudan I je silnějším induktorem této podrodiny než  $\beta$ -naftoflavon. V jeho případě byla také pozorována větší efektivita v tvorbě AAIa. Jaterní mikrosomy potkanů premedikovaných fenobarbitalem (indukce CYP2B) byly prakticky za všech třech koncentracích CYP méně účinné oproti mikrosomům kontrolním (Kon), tedy jaterním mikrosomům izolovaným ze zvířat nepremedikovaných.

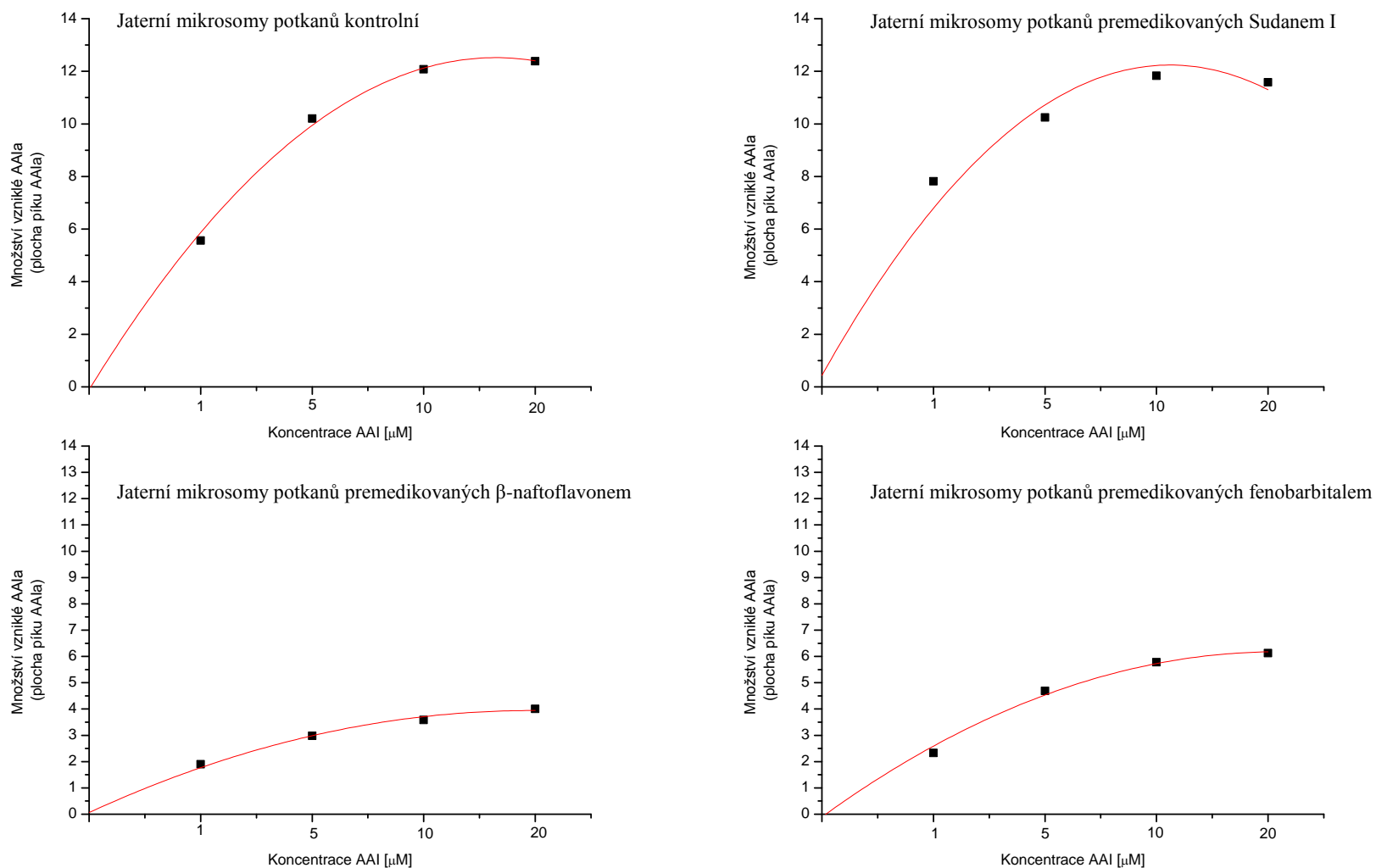
Z **Obr. 16** (str. 49) je také zřejmé, že se zvyšujícím se množstvím CYP v inkubačních směsích stoupalo i množství vznikajícího metabolitu AAIA. Tato skutečnost opět naznačuje, že jsou za oxidaci AAI na AAIA zodpovědné cytochromy P450. Z uvedených výsledků navíc vyplývá, že majoritními cytochromy P450 oxidujícími AAI v jaterních mikrosomech potkana jsou cytochromy P450 1A.

#### **4.2.5.2. Kinetika enzymové oxidace AAI potkaními jaterními mikrosomy**

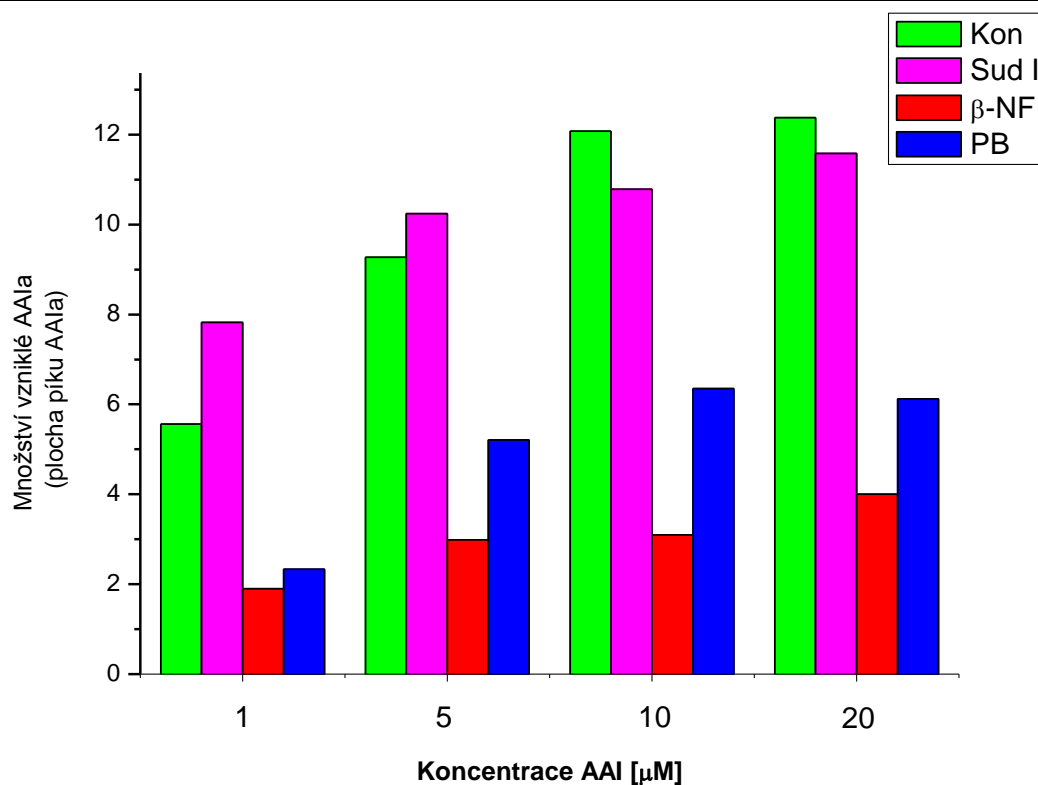
Pro studium kinetiky oxidace AAI byly použity mikrosomy potkanů premedikovaných fenobarbitalem,  $\beta$ -naftoflavonem, Sudanem I a kontrolní mikrosomy nepremedikovaných zvířat. Byl sledován vliv množství vznikajícího metabolitu AAIA v závislosti na koncentraci substrátu (AAI). Doba inkubace byla zvolena 10 min, protože v tomto čase je oxidace AAI v zásadě lineární funkcí doby inkubace. Rychlost reakce lze tedy považovat za počáteční rychlost, využitelnou pro kinetické studie. Podrobný postup experimentů je popsán v *kap. 3.3.5.*

Z výsledků ilustrovaných na **Obr. 17** (str. 51) a **Obr. 18** (str. 52) je patrné, jak byla AAI na AAIA jaterními mikrosomy potkana v závislosti na rozdílné koncentraci AAI v reakční směsi oxidována. S rostoucí koncentrací AAI v inkubacích rostlo množství vznikajícího metabolitu AAIA u všech typů jaterních potkaních mikrosomů. S rostoucí koncentrací AAI rostla i přeměna této sloučeniny. Kinetika oxidace AAI, sledující závislost na koncentraci této látky, vykazuje se všemi typy mikrosomálních systémů hyperbolickou (saturační) závislost (**Obr. 17**).

Ze zjištěných hodnot množství přeměněné AAI byly určeny hodnoty Michealisovy konstanty ( $K_M$ ) (**Tab. 2**, str. 52).



**Obr. 17:** Kinetika oxidace AAI jaterními mikrosomy potkanů premedikovaných fenobarbitalem (PB), Sudanem I (Sud I),  $\beta$ -naftoflavonem ( $\beta$ -NF) a potkanů nepremedikovaných (Kon). Složení inkubační směsi: 1, 5, 10, 20  $\mu\text{M}$  AAI; 0,2 nmol CYP; 10 mM glukosa-6-fosfát; 1 mM NADP<sup>+</sup>; 1 U/ml glukosa-6-fosfát dehydrogenasa (NADPH-GS); fosfátový pufr pH 7,4



**Obr. 18:** Souhrnná data zjištěná při studiu oxidace AAI jaterními potkaními mikrosomy z potkanů premedikovaných fenobarbitalem (PB), Sudanem I (Sud I),  $\beta$ -naftoflavonem ( $\beta$ -NF) a potkanů nepremedikovaných (Kon). Sloupce uvedené v obrázku udávají množství vzniklé AAIa. Uvedené hodnoty jsou průměr ze dvou měření. Složení inkubační směsi: 1, 5, 10, 20  $\mu$ M AAI; 0,2 nmol CYP; 10 mM glukosa-6-fosfát; 1 mM NADP<sup>+</sup>; 1 U/ml glukosa-6-fosfát dehydrogenasa (NADPH-GS); fosfátový pufr pH 7,4

**Tab. 2:** Hodnoty  $K_M$  pro oxidaci AAI mikrosomy potkanů premedikovaných fenobarbitalem (PB), Sudanem I (Sud I),  $\beta$ -naftoflavonem ( $\beta$ -NF) a kontrolními mikrosomy nepremedikovaných potkanů (Kon).

MS	$K_M$ [ $\mu$ M]
Kon	1,4
Sud I	0,52
$\beta$ -NF	1,09
PB	2,12

### 4.2.5.3. Vliv inhibitorů cytochromů P450 na oxidaci AAI jaterním mikrosomálním systémem člověka

Abychom specifikovali, které lidské jaterní cytochromy P450 oxidují AAI, byl v další části diplomové práce sledován vliv specifických inhibitorů těchto enzymů na oxidaci studované sloučeniny. Pro tyto experimenty byly použity lidské jaterní mikrosomy (HLM male). Konkrétně se jednalo o inhibitory cytochromů P450:  $\alpha$  – naftoflavon (inhibice CYP 1A1/2), furafyllin (inhibice CYP1A2), diethyldithiokarbamát (inhibice CYP2E1) a ketokonazol (inhibice CYP3A4). Efektivita inhibice byla kvantifikována pomocí hodnoty  $IC_{50}$  (koncentrace inhibitoru, při které za daných podmínek dochází k 50% poklesu metabolismu substrátu).

Oproti postupu uvedeném v *kap. 3.3.5.* bylo do inkubačních směsí přidáno navíc vždy 5  $\mu$ l roztoku inhibitoru a koncentrace inhibitoru ve vzorcích byla 1,10,100  $\mu$ M. Směs byla doplněna fosfátovým puforem na celkový objem 500  $\mu$ l.

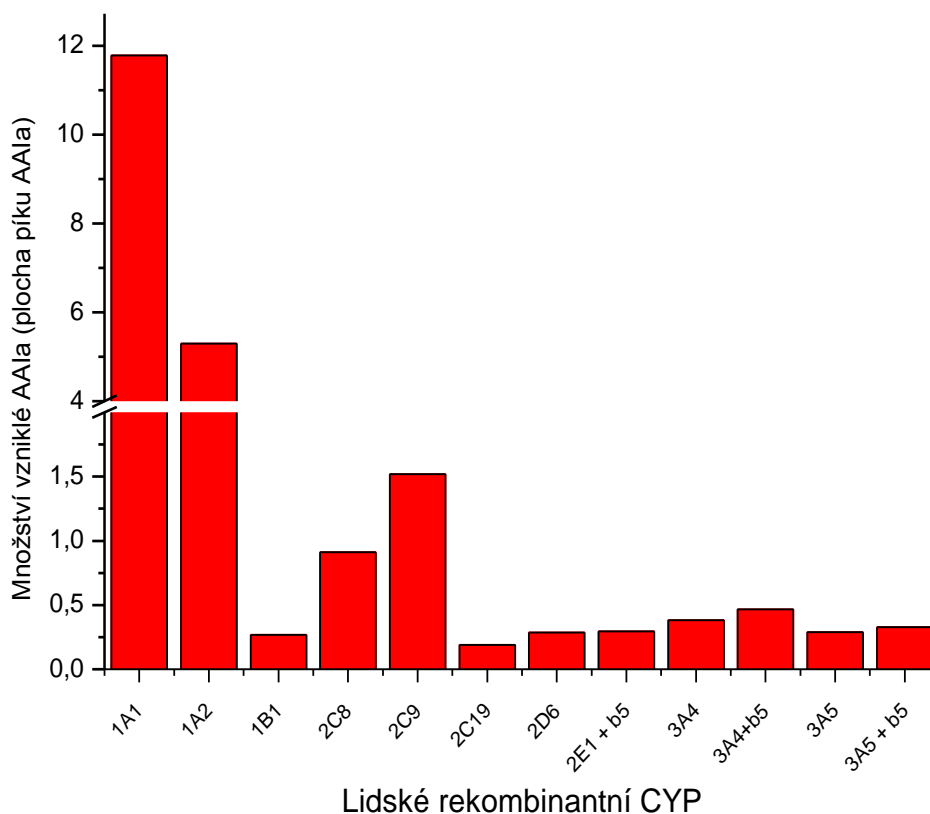
**Tab. 3:** Hodnoty  $IC_{50}$  pro inhibici oxidace AAI lidskými jaterními mikrosomy.

Inhibitor	CYP	$IC_{50}$ [ $\mu$ M]
$\alpha$ - naftoflavon	1A1/2	80,9
Furafyllin	1A2	26,8
Diethyldithiokarbamát	2E1	> 100
Ketokonazol	3A4	23,5

Všechny čtyři použité inhibitory snižovaly rychlost oxidace AAI na AA1a. Nejsilněji působí inhibitory enzymů CYP3A4 a 1A2, ketokonazol a furafyllin (**Tab. 3**). Tyto výsledky napovídají, že jak CYP1A2, tak také CYP3A4 hrají úlohu v oxidaci AAI v lidských jaterních mikrosomech.

#### 4.2.6. Oxidace AAI lidskými rekombinantními cytochromy P450

Pro další identifikaci, které lidské cytochromy P450 jsou v oxidaci AAI efektivní, byly použity lidské rekombinantní cytochromy P450. A to konkrétně: CYP1A1, 1A2, 1B1, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1 za přítomnosti cytochromu b<sub>5</sub>, CYP3A4 a 3A4 za přítomnosti cytochromu b<sub>5</sub>, CYP3A5 a 3A5 za přítomnosti cytochromu b<sub>5</sub>. Cytochrom b<sub>5</sub> je fakultativně součástí MFO systému a má schopnost stimulovat řadu reakcí katalyzovaných cytochromy P450.<sup>91</sup> Inkubační směsi byly připraveny dle postupu uvedeného v kapitole 3.3.5. tak, aby výsledná koncentrace CYP v inkubacích byla 50 nM a posléze byly inkubační směsi doplněny fosfátovým pufrům na celkový objem 250  $\mu$ l.



**Obr. 19:** Oxidace AAI lidskými rekombinantními CYP. Sloupce uvedené v grafu udávají množství vzniklé AAIA. Uvedené hodnoty jsou průměr ze dvou měření. Složení inkubačních směsí: 10  $\mu$ M AAI; 50 nM CYP; 10 mM glukosa-6-fosfát; 1 mM NADP<sup>+</sup>; 1 U/ml glukosa-6-fosfát dehydrogenasa (NADPH-GS); fosfátový pufr pH 7,4

Z výsledků uvedených na **Obr. 19** (str. 54) je patrné, že nejefektivnější při přeměně AAI na AAIA z testovaných enzymů je lidský CYP1A1, následovaný CYP1A2. Ostatní testované lidské cytochromy P450 také oxidují AAI, ale s mnohem menší efektivitou.

## 5. Diskuse

Aristolochové kyseliny jsou karcinogeni<sup>55,92</sup> a mutagení sloučeniny<sup>52</sup> rostlinného původu, které jsou příčinou onemocnění označovaného jako nefropatie vyvolaná aristolochovými kyselinami (AAN, z angl. „Aristolochic acid nephropathy“)<sup>52,62,63</sup> a jednou z možných příčin vzniku Balkánské endemické nefropatie.<sup>67</sup>

Poznání enzymů, které participují na metabolismu jedné z těchto kyselin, AAI, která je považována za nejtoxičtější z nich, je esenciální pro evaluaci vnímavosti lidských jedinců vůči tomuto karcinogenu. Cílem výzkumné práce laboratoře, kde byla předkládaná diplomová práce vypracována je poznání, zda metabolismus AAI a enzymy participující na tomto procesu, determinují její pathofysiologické efekty. Záměrem studia této problematiky je poznání účinnosti enzymů, které jak aktivují AAI za tvorby karcinogenních lézí v DNA (AAI-DNA aduktů), tak i detoxikují tuto sloučeninu, a vliv exprese i aktivit těchto enzymů na vývoj ledvinného poškození a nádorů močových cest.

Cílem předkládané diplomové práce bylo studium metabolické detoxikace aristolochové kyseliny I (AAI) cytochromy P450. V rámci této práce jsme se zabývali jednak identifikací mikrosomálních cytochromů P450 jater potkana a člověka oxidujících aristolochovou kyselinu I, a také studiem lidských rekombinantních cytochromů P450. Cílem tady bylo přispět k objasnění, které cytochromy P450 v těchto biologických druzích jsou za detoxikaci AAI především zodpovědné.

Ve své práci jsem navázala na předchozí studie prováděné v naší laboratoři, kde byla jako možná detoxikační cesta aristolochové kyseliny I popsána právě její oxidace (demethylace) na aristolochovou kyselinu Ia.<sup>52,70</sup>

Sledováním efektivity oxidace AAI jaterními mikrosomy různých živočišných druhů (konkrétně člověka, potkana a myši) bylo zjištěno, že potkaní jaterní mikrosomy mají podobnou schopnost oxidovat AAI na AAIA jako lidské jaterní mikrosomy. Laboratorní potkan je vhodnějším modelovým organismem pro přiblížení metabolického osudu AAI v lidském organismu než organismus myši. Rozdíly v efektivitě oxidace jaterními mikrosomy jednotlivých biologických druhů mohou být způsobené např. tím, že každá isoforma cytochromu P450, ikdyž se jedná o stejné cytochromy P450, je poněkud odlišná. Výše uvedené výsledky také mohlo ovlivnit různé zastoupení jednotlivých cytochromů P450 v jaterních mikrosomech různých organismů.

Vzhledem k tomu, že cytochromy P450 patří mezi inducibilní enzymy, premedikací experimentálních zvířat specifickými induktory těchto enzymů je možné docílit odlišného zastoupení jednotlivých forem tohoto enzymu v mikrosomech. Další experimenty sledující oxidaci aristolochové kyseliny I byly proto prováděny s mikrosomy z jaterní tkáně potkanů premedikovaných známými induktory forem cytochromu P450. Použity byly mikrosomy jater potkana indukovaného  $\beta$ -naftoflavonem (indukuje především CYP1A1/2), fenobarbitalem (indukuje především CYP2B) a Sudanem I (indukuje CYP1A1/2), a rovněž mikrosomy kontrolní, tedy izolované z nepremedikovaných zvířat. Premedikace potkanů Sudanem I, a tedy nabohacení jaterních buněk cytochromy P450 1A1/2, vedla k výrazné stimulaci tvorby metabolitu AAI. Podobně jako Sudan I, také  $\beta$ -naftoflavon indukuje CYP1A, ale tato sloučenina je silnějším induktorem této podrodiny cytochromů P450 než  $\beta$ -naftoflavon. V případě mikrosomů takto premedikovaných potkanů byla pozorována větší efektivita v tvorbě metabolitu AAI, AAIA. Tato skutečnost silně napovídá, že cytochromy P450 podrodiny 1A hrají v oxidaci AAI významnou úlohu. Jaterní mikrosomy potkanů premedikovaných fenobarbitalem (indukce CYP2B) byly oproti kontrolním mikrosomům méně účinné. Cytochromy P450 podrodiny 2B tedy hrají v oxidaci AAI minoritní roli, což koresponduje s poznatky již popsány v dřívějších studiích.<sup>93</sup>

Pro přiblížení, které cytochromy P450 oxidují AAI v lidských jaterních mikrosomech, byl v této práci sledován vliv specifických inhibitorů těchto enzymů. Konkrétně byly použity inhibitory:  $\alpha$  – naftoflavon (inhibice CYP 1A1/2), furafyllin (inhibice CYP1A2), diethyldithiokarbamat (inhibice CYP2E1) a ketokonazol (inhibice CYP3A4). Efektivita inhibice byla kvantifikována pomocí hodnot  $IC_{50}$  a bylo zjištěno, že nejsilněji působí inhibitory enzymů CYP3A4 a 1A2. Tyto výsledky poukazují na to, že oba enzymy, jak CYP1A2, tak také CYP3A4 hrají úlohu v oxidaci AAI v lidských jaterních mikrosomech. V další fázi našeho výzkumu bude testován i vliv inhibitorů dalších cytochromů P450, jako je sulfafenazol (inhibitor CYP2C) nebo chinidin (inhibitor CYP2D6). Taková studie je předmětem výzkumu laboratoře na katedře biochemie, kde byla diplomová práce vypracována.

Oxidace aristolochové kyseliny I lidskými rekombinantními cytochromy P450 potvrdila výsledky s inhibitory a z dřívějších studií.<sup>93,94</sup> Bylo potvrzeno, že v oxidaci AAI je nejefektivnější lidský CYP1A1, následovaný CYP1A2. Ostatní použité cytochromy P450 také přeměňují AAI na AAIA, ale s mnohem menší efektivitou. Otevřenou otázkou však zůstává, jak se jednotlivé cytochromy P450 podílejí na oxidaci AAI v lidských

tkáních, konkrétně játrech či ledvinách. Zde může být míra přeměny AAI určitým enzymem značně ovlivněna jeho zastoupením v jednotlivých tkáních. Konkrétně CYP3A4 je v játrech exprimován ve vysokých hladinách. Přestože efektivita oxidace AAI tímto enzymem je mnohem menší než CYP1A1 a 1A2, ve výsledku může hrát v detoxikaci AAI zásadní roli. Tyto předpoklady byly podpořeny nalezenou inhibicí oxidace AAI lidskými jaterními mikrosomy ketokonazolem, inhibítorem CYP3A4. Vysoké hladiny cytochromů P450 3A4 a 1A mohou efektivně katalyzovat detoxikaci aristolochové kyseliny I v játrech, což může následně vést i k její snížené koncentraci v ledvinách, a tedy i ke snížení její toxicity.<sup>75</sup> Lidské cytochromy P450 1A vykazují genetický polymorfismus.<sup>95,96</sup> Jedinci, kteří mají nízkou hladinu exprese CYP1A mohou tedy být náchylní k vývoji nefropatie vyvolané aristolochovými kyselinami, a také Balkánské endemické nefropatie. Tento předpoklad však musí být potvrzen komplexní studií sledující vztah mezi polymorfismem CYP1A1 a onemocněními jako jsou nefropatie vyvolaná aristolochovými kyselinami (AAN) a Balkánská endemická nefropatie (BEN).

## 6. Závěr

Výsledky získané při vypracování předkládané diplomové práce indikují, že zvolené cíle byly splněny. Zjistili jsme, že aristolochová kyselina I je oxidována jaterními mikrosomálními systémy obsahujícími cytochromy P450 na O-demethylační produkt, aristolochovou kyselinu Ia (AAIa).

Základní výsledky lze shrnout následovně:

- Nejeftektivnějším mikrosomálním systémem z užitých pro testování oxidace AAI je lidský jaterní mikrosomální systém. Potkaní jaterní mikrosomy vykazují podobnou efektivitu v oxidaci AAI jako mikrosomy lidské, avšak myší jaterní mikrosomy jsou méně efektivní.
- Množství metabolitu AAIa, tvořeného jaterními potkaními mikrosomy, je výrazně ovlivněno induktory cytochromů P450. Studie využívající jaterní mikrosomy potkanů indukovaných specifickými induktory cytochromů P450 signalizovala, že na detoxikaci aristolochové kyseliny I v potkaních jaterních mikrosomálních systémech participují především cytochromy P450 1A.
- Studie využívající specifické inhibitory jednotlivých cytochromů P450 signalizuje, že v lidských jaterních mikrosomech je AAI oxidována na AAIa zejména cytochromy P450 1A2 a 3A4.
- Experimenty využívajícími lidské rekombinantní cytochromy P450 pro studium oxidace AAI bylo zjištěno, že nejeftektivnějšími enzymy při této přeměně jsou lidské CYP1A1 a 1A2.

Výsledky získané při vypracování diplomové práce jsou významným příspěvkem k poznání detoxikačního metabolismu studovaného lidského karcinomu (AAI) a budou využity pro další studium participace enzymů biotransformujících AAI na vývoji ledvinných onemocněních AAN (nefropatie vyvolaná aristolochovými kyselinami, z angl. „Aristolochic acid nephropathy“) a BEN (Balkánská endemická nefropatie).

## Seznam použité literatury

- (1) Stratil, P.; Kubáň, V. *Chem. Listy* 98, 379-387, **2004**.
- (2) Parkin, D. M.; Bray, F.; Ferlay, J.; Pisani, P. *Int. J. Cancer* 94, **2001**.
- (3) Stiborová, M. *Biochemie chemické karcinogeneze*, přednáška na PřF UK, katedra biochemie, Praha, **2008**.
- (4) Vokurka, M. *Praktický slovník medicíny* Maxdorf: Praha, **1994**.
- (5) Murray, R. K.; Granner, D. K.; Mayes, P. A.; Rodwell, V. W. *Harperova Biochemie*, H&H: Jinočany, **1993**.
- (6) Stiborová, M.; Mikšanová, M. *Živa* 4, 146, **1999**.
- (7) Masopust, J. *Patobiochemie buňky*, ČSKB a 2. LF UK: Praha, **2003**.
- (8) Klener, P. *Klinická onkologie*, Galén: Praha, **2002**.
- (9) Chromá, L.; Macková, M.; Macek, T.; Martínek, V.; Stiborová, M. *Chem. Listy* 95, 212-222, **2001**.
- (10) Rusek, V., <http://webak.upce.cz/~uozp/skripta/uozp-skripta-tox-rusek.pdf>, 1.3.2009.
- (11) Stiborová, M.; *Xenobiochemie* přednáška na PřF UK, katedra biochemie, Praha, **2007**.
- (12) Stiborová, M.; Hudeček, J.; Hodek, P.; Frei, E. *Chem. Listy* 93, 229-237, **1999**.
- (13) Sheweita, S. A. *Curr. Drug Metab.*, 1, 107-132, **2000**.
- (14) Groves, J. T. In *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry*; 3 ed.; Ortiz de Montellano, P. R., Ed.; Kluwer Academic/Plenum Publishers: New York, **2005**.
- (15) Costas, I.; Dennis, V. P. *Biochem. Pharmacol.* 24, 4197-4207, **1987**.
- (16) Garfinkel, D. *Arch. Biochem. Biophys.* 77(2), 493-509, **1958**.
- (17) Klingenberg, M. *Arch. Biochem. Biophys.* 75, 376-386, **1958**.
- (18) Omura, T.; Sato, R. *J. Biol. Chem.* 239, 2370-2385, **1964**.
- (19) Nelson, D.R. <http://drnelson.utmem.edu/P450lect.html>, 19.3.2007
- (20) Lewis, D. F. V. In *Cytochromes P450: Structure, Function and Mechanism*; Taylor&Francis Ltd: London, **1996**.
- (21) Nelson, D. R.; Koymans, L.; Kamataki, T. *Pharmacogenetics* 6, 1-42, **1996**.
- (22) Nebert, D. W.; Russell, D. *Lancet* 360, 1155-1162, **2002**.
- (23) Gut, I.; Souček, P.; Hodek, P. *Prac. Lek.* 1, 15-20, **1992**.
- (24) Williams, P. A.; Cosme, J.; Sridhar, V.; Johnson, E. F.; McRee, E. *Mol. Cell* 5, 121-131, **2000**.

- (25) Poulos, T. L.; Johnson, E. F. In *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry*; 3 ed.; Ortiz de Montellano, P. R., Ed.; Kluwer Academic/Plenum Publishers: New York, **2005**.
- (26) Guidice, J. M.; Marez, D.; Sabbagh, N.; Legrand-Andreoletti, M.; Spire, C.; Alcaide, E.; Lafitte, J. J.; Broly, F. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1997**, *241*.
- (27) <http://commons.wikimedia.org/wiki/Image:Heme.svg#file>. 13.4.2009
- (28) Guengerich, F. P. In *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry*; 3 ed.; Ortiz de Montellano, P. R., Ed.; Kluwer Academic/Plenum Publishers: New York, **2005**.
- (29) Benel, J. R.; Foureman, C. L. *Mol. Environ. Res.* **14**, 405, **1984**.
- (30) Aimová, D. *Diplomová práce* **2001**, PřF UK Praha.
- (31) Anari, M. R.; Khan, S.; Jatoe, S. D.; O'Brien, P. J. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* **22**, 305, **1997**.
- (32) Dahl, A. R.; Hadley, W. M. *Toxicol. Appl. Pharm.* **67**, 200, **1983**.
- (33) Šístková, J. *Diplomová práce* **2007**, PřF UK Praha.
- (34) Aimová, D. *Disertační práce* **2005**, PřF UK Praha.
- (35) Coon, M. J.; Ding, X.; Pernecky, S. J.; Vaz, A. D. N. *Faseb J.* **6**, 669-73, **1992**.
- (36) Dlouhá, T. *Diplomová práce* **2003**, PřF UK Praha.
- (37) Souček, P.; Gut, I. *Čas. Lék. čes.* **132**, 353, **1993**.
- (38) Ortiz de Montellano, P. R.; Correia, M. A. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **23**, 481, **1983**.
- (39) Bailey, D. G.; Spence, J. D.; Munoz, C.; Arnold, J. M. O. *Lancet* **337**, 268, **1991**.
- (40) Shimamoto, Y.; Kitamura, H.; Hoshi, H.; Kazusaka, A.; Funae, Y.; Imaoka, S.; Saito, M.; Fujita, S. *Arch. Toxicol.* **72**, 492, **1998**.
- (41) Williams, S. N.; Dunham, E.; Bradfield, C. A. In *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry*; 3 ed.; Ortiz de Montellano, P. R., Ed.; Kluwer Academic/Plenum Publishers: New York, **2005**.
- (42) Poland, A.; Glover, E.; Kende, A. S. *J. Biol. Chem.* **251**, 4936-4946, **1976**.
- (43) Dickins, M. *Curr. Top. Med. Chem.* **4**, 1745-1766, **2004**.
- (44) Roberts, B. J.; Song, B. J.; Soh, Y.; Park, S. S.; Shoaf, S. E. *J. Biol. Chem.* **270**, 29632-29635, **1995**.
- (45) Li, W.; Harper, P. A.; Tang, B. K.; Okey, A. B. *Biochem. Pharmacol.* **56**, 599-612, **1998**.

- (46) Ortiz de Montellano, P. R.; Correia, M. A. In *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry*; 3 ed.; Ortiz de Montellano, P. R., Ed.; Kluwer Academic/Plenum Publishers: New York, **2005**.
- (47) Kent, U. M.; Jushchhyshyn, M. I.; Hollenberg, P. F. *Curr. Drug Metab.* **2**, 215-243, **2001**.
- (48) Stiborová M., H. J., Hodek P., Frei E. *Chem. Listy* **93**, 229-237, **1999**.
- (49) Nedelcheva, V.; Gut, I. *Xenobiotica* **24**, 1151-1175, **1994**.
- (50) Ingelman-Sundberg, M.; Sim, S.C.; Gomez, A.; Rodriguez-Antona, C. *Pharmacol. Ther.* **116**, 496-526, **2007**.
- (51) <http://gepard.bioinformatik.uni-saarland.de/html/ModMethDrugDiscWS0607> 2.3. **2009**
- (52) Arlt, V. M.; Stiborová, M.; Schmeiser, H. H. *Mutagenesis* **17**, 265-277, **2002**.
- (53) Rosenmund, H.; Reichstein, T. *Pharm. Acta. Helv.* **18**, 243-261, **1943**.
- (54) Rücker, G.; Chung, B. S. *Planta Med.* **27**, 68-71, **1975**.
- (55) Mengs, U.; Lang, W.; Poch, J. A. *Arch. Toxicol.* **51**, 107-119, **1982**.
- (56) Vanherweghem, J. L.; Depierreux, M.; Tielemans, C.; Abramowicz, D.; Dratwa, M.; Jadoul, M.; Richard, C.; Vandervelde, D.; Verbeelen, D.; Vanhaelen-Fastre, R.; Vanhaelen, M. *Lancet* **341**, 387-391, **1993**.
- (57) Vanhaelen, M.; Vanhaelen-Fastre, R.; But, P.; Vanherweghem, J. L. *Lancet* **343**, 174, **1994**.
- (58) Vanherweghem, J. L. *J. Altern. Complement. Med.* **4**, 9-13, **1998**.
- (59) Violon, C. *J. Pharm. Belg.* **52**, 7-27, **1997**.
- (60) Stiborová, M.; Frei, E.; Schmeiser, H. H. *Chem. Listy* **94**, 186-189, **2000**.
- (61) Debelle, F. D.; Vanherweghem, J. L.; Nortier, J. L. *Kidney Int.* **74**, 158-169, **2008**.
- (62) Gillerot, G.; Jadoul, M.; Arlt, V. M.; Ypersele de Strihou van, C.; Schmeiser, H. H.; But, P.; Bieler, C. A.; Cosyns, J.-P. *Am. J. Kidney Dis.* **38**, E26, **2001**.
- (63) Solez, K.; Daugirdes, J.; Gregory, M. C.; Frohnert, P. P.; Blownik, D. M.; Iha, V.; Cosyns, J.-P.; *Am. J. Kidney Dis.* **38**, 1141-1142, **2001**.
- (64) Ikomonov, V.; Melzer, H.; Neonov, V.; Stoicheva, A.; Stiller, S.; Mann, H. *Artif. Organs* **23**, 7, **1999**.
- (65) Castegnaro, M.; Chernozemsky, I. N.; Hietanen, E.; Bartsch, H. *Arch. Geschwulstforsch.* **60**, 295, **1990**.
- (66) Pfohl-Leszkowicz, A.; Petkova-Bocharova, T.; Chernozemsky, I. N.; Castegnaro, M. *Food Additiv. Contamin.* **19**, 282, **2002**.
- (67) Stiborová, M.; Patočka, J.; Frei, E.; Schmeiser, H. H. *Chem. Listy* **99**, 782-788, **2005**.
- (68) Tatu, C. A.; Orem, W.H.; Finkelman, R.B.; Feder, G.L. *Environ. Health Perspect.* **106**, 689-700, **1998**.
- (69) Chan, W.; Cu, L.; Xu, G.; Cai, Z. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **20**, 171-177, **2006**.

- (70) Stiborová, M.; Frei, E.; Arlt, V. M.; Schmeiser, H. H. *Mutat. Res.* 658, 55-67, **2008**.
- (71) Chan, W.; Luo, H.-B.; Zheng, Y.; Cheng, Y.-K.; Cai, Z. *Drug Metab. Dispos.* 35, 866-874, **2007**.
- (72) Schmeiser, H. H.; Pool, B. L.; Wiessler, M. *Carcinogenesis* 7, 59-63, **1986**.
- (73) Krumbiegel, G.; Hallensleben, J.; Mennicke, W. H.; Rittmann, N. *Xenobiotica* 17, 981-991, **1987**.
- (74) Maier, P.; Schawalder, H.; Weibel, B. *Environ. Mol. Mutagen.* 10, 275-284, **1987**.
- (75) Xiao, Y.; Ge, M.; Xue, X.; Wang, H.; Wu, X.; Li, L.; Liu, L.; Qi, X.; Zhang, Y.; Li, Y.; Xie, T.; Gu, J.; Ren, J. *Kidney Int.* 73, 1231-1239, **2008**.
- (76) Schmeiser, H. H.; Schoepe, K.-B.; Wiessler, M. *Carcinogenesis* 9, 297-303, **1988**.
- (77) Pfau, W.; Schmeiser, H. H.; Wiessler, M. *Carcinogenesis* 11, 1627-1633, **1990**.
- (78) Stiborová, M.; Fernando, R. C.; Schmeiser, H. H.; Frei, E.; Pfau, W.; Wiessler, M. *Carcinogenesis* 15, 1187-1192, **1994**.
- (79) Schmeiser, H. H.; Bieler, C. A.; Wiessler, M.; Ypersele de Strihou, C.; Cosyns, J.-P. *Cancer Res.* 56, 2025-2028, **1996**.
- (80) Stiborová, M.; Frei, E.; Breuer, A.; Bieler, C. A.; Schmeiser, H. H. *Exp. Toxic. Pathol.* 51, 421-427, **1999**.
- (81) Lord, G. M.; Hollstein, M.; Arlt, V. M.; Roufosse, C. C.; Pusey, D.; Cook, T.; Schmeiser, H. H. *Am. J. Kidney Dis.* 43, e11-e17, **2004**.
- (82) Schmeiser, H. H.; Janssen, J. W. G.; Lyons, J.; Scherf, H. R.; Pfau, W.; Buchmann, A. Bartram, C.R.; Wiessler, M. *Cancer Res.* 50, 5464-5469, **1990**.
- (83) Arlt, V. M.; Wiessler, M.; Schmeiser, H. H. *Carcinogenesis* 21, 235-242, **2000**.
- (84) Arlt, V. M.; Schmeiser, H. H.; Pfeifer, G. P. *Carcinogenesis* 22, 133-140, **2001**.
- (85) Cosyns, J.-P. *Drug Saf.* 26, 33-48, **2003**.
- (86) Smith, G.; Stanley, L. A.; Sim, E.; Strange, R. C.; Wolf, R. *Cancer Surv.* 25, 27-65, **1995**.
- (87) Lindström-Seppä, P.; Koivusaari, U.; Hänninen, O. *Aquatic. Toxicol.* 3, 35, **1983**.
- (88) Taniguchi, H.; Imai, Y.; Sato, R. *Arch. Biochem. Biophys.* 232, 585, **1984**.
- (89) Wiechelman, K. J.; Braun, R. D.; Fitzpatrick, J. D. *Anal. Biochem.* 175, 231, **1988**.
- (90) Burda, P. *Diplomová práce* **2006**, PŘF UK Praha.
- (91) Yamazaki, H.; Shimada, T.; Martin, M. V.; Guengerich, F. P. *J. Biol. Chem.* 276, **2001**.
- (92) Nortier, J. L.; Muniz, M.-C.; Schmeiser, H. H.; Arlt, V. M.; Bieler, C. A.; Petein, M.; Depierreux, M. F.; de Pauw, L.; Abramowicz, D.; Vereerstraeten, P.; Vanherweghem, J.-L. *N. Engl. J. Med.* 342, 1686-1682, **2000**.

- (93) Šístková, J.; Hudeček, J.; Hodek, P.; Frei, E.; Schmeiser, H. H.; Stiborová, M. *Neuroendocrinol. Lett.* 29, 101-105, **2008**.
- (94) Stiborová, M.; Frei, E.; Wiessler, M.; Schmeiser, H. H. *Chem. Res. Toxicol.* 14, 1128-1137, **2001**.
- (95) Autrup, H. *Mutat. Res.* 464, 65-76, **2000**.
- (96) Eaton, D. L.; Gallagher, E. P.; Bammler, T. K. *Pharmacogenetics* 5, 259-274, **1995**.

Souhlasím se zapůjčením této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence o vypůjčovatelích

<b>Jméno a příjmení</b>	<b>Adresa</b>	<b>Číslo OP</b>	<b>Datum výpůjčky</b>	<b>Poznámka</b>