

UNIVERSITA KARLOVA V PRAZE  
FAKULTA PŘÍRODOVĚDECKÁ  
KATEDRA BIOCHEMIE



Bakalářská práce

**Aristolochové kyseliny zvyšují expresi cytochromů P450 a jejich aktivity  
v experimentálním modelu laboratorního potkana**

Aristolochic acids increase expression of cytochromes P450 and their activities in a rat  
experimental model

*Alena Hudecová*

Vedoucí práce: *prof. RNDr. Marie Stiborová, DrSc.*

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením prof. RNDr. Marie Stiborové, DrSc. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

V Praze, dne

.....  
Alena Hudecová

Děkuji paní prof. RNDr. Marii Stiborové, DrSc. za zadání tématu, trpělivost, rady a pomoc, které jsou pro tuto práci klíčové.

Dále bych ráda poděkovala RNDr. Františku Bártovi, PhD. za jeho pomoc při zpracování dat a všestranné připomínky.

Děkuji také Dr. Jaroslavu Mrázovi a Ing. Šárce Duškové (SZÚ) za pomoc při práci s laboratorními zvířaty.

Tato práce byla vypracována za podpory grantu GAČR 17-12816 S.

## Abstrakt

Aristolochové kyseliny (AA) jsou přírodní látky obsažené v rostlinách čeledi podražcovitých (*Aristolochiaceae*). Tyto rostliny jsou běžně využívány v lidové medicíně pro léčbu různých chorob. Nicméně aristolochové kyseliny byly prokázány jako mutageny a karcinogeny.

Aristolochové kyseliny jsou původci onemocnění zvané nefropatie vyvolaná aristolochovými kyselinami (Aristolochic Acid Nephropathy, AAN), která byla dříve nazývána jako nefropatie vyvolaná čínskými bylinami (Chinese Herbs Nephropathy, CHN). AAN (dříve CHN) je onemocnění končící úplným selháním funkce ledvin. V pozdním stádiu onemocnění dochází také k vývoji nádorů urotheliální tkáně pacientů. AA se totiž váže na DNA, a to tak, že vytváří kovalentní adukty, které se vyznačují dlouhodobou persistencí. Tyto adukty jsou prekuzory pro vznik mutace v tumorovém supresorovém genu *p53* (AT→TA transversní mutace), která iniciuje nádorové procesy.

Dále jsou AA spojovány se vznikem dalšího onemocnění, balkánská endemická nefropatie (BEN). Nicméně s tímto onemocněním může být spojeno více činitelů např. mykotoxiny, těžké kovy a aromatické uhlovodíky. Skutečnost, že AA jsou nejspíše hlavním z činitelů vzniku BEN, je i ta, že v tkáních pacientů trpících BEN byly nalezeny shodné adukty AA s DNA jako v tkáních pacientů s AAN.

V organismu podléhají AA metabolické aktivační a detoxikační přeměně. Na aktivaci AA vedoucí k tvorbě kovalentních aduktů s DNA se podílejí hlavně jaterní a renální enzymy: cytochromy P450, cyklooxygenasa, NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasa a NAD(P)H:chinon oxidoreduktasa. Na detoxikaci za tvorby *O*-demethylačního produktu AAI na AAIA se pak podílejí cytochromy P450 1A1, 1A2 a 2C11. Expres některých z těchto enzymů v tkáních laboratorního potkana vystavených působení AAI, AAI a směsi AAI s AAI byla sledována v předkládané bakalářské práci.

### Klíčová slova:

aristolochové kyseliny, balkánská endemická nefropatie, nefropatie vyvolaná aristolochovými kyselinami, nefropatie vyvolaná čínskými bylinami, urotheliální rakovina, *Aristolochiaceae*

## **Abstract**

Aristolochic acids (AA) are natural products of plant species of the family Aristolochiaceae. These plants are commonly used in folk medicine to treat various diseases. Nevertheless, aristolochic acids have mutagenic and carcinogenic properties. Even though AA is a human carcinogen a natural plant extract AA is still used for treatment of human patients.

AA were proved to be the cause of kidney disease designated Aristolochic Acid Nephropathy (AAN), known also as Chinese Herbs Nephropathy (CHN). AAN (formerly CHN) is the disease leading to a complete failure of kidney function. In the end-stage of this disease, development of tumours in urothelial tissue of patients also occurs. During metabolism of AAI and AAI, they bind to DNA and form covalent adducts, which are characterized by a long persistence. These adducts lead to a mutation in the *p53* tumor suppressor gene causing AT→TA transverse mutation that initiates tumor processes.

AA is also associated with the similar disease as AAN, Balkan Endemic Nephropathy (BEN). However, this disease might also be caused by other factors: mycotoxins (ochratoxin A, OTA), heavy metals and aromatic hydrocarbon. The fact that AA is probably the main factor causing BEN follows from finding that in the tissues of BEN patients, the identical DNA adducts as in AAN patients were found.

In organisms, AA are metabolized by activation and/or detoxification reactions. Renal and hepatic enzymes contributing mainly to activation of AA are cytochromes P450, cyclooxygenase, NADPH:cytochrome P450 oxidoreductase, NAD(P)H:quinone oxidoreductase. In AAI detoxification, cytochromes P450 1A1, 1A2 and 2C11 are involved. Expression of these enzymes in tissues of rats treated with AAI, AAI and a mixture of these compounds was investigated in this thesis.

### **Key words:**

aristolochic acid, Balkan Endemic Nephropathy (BEN), Aristolochic Acid Nephropathy (AAN), Chinese Herbs Nephropathy (CHN), urothelial cancer, Aristolochiaceae

## Obsah

Abstrakt.....	4
Abstract.....	5
Použité zkratky .....	8
1. Úvod.....	10
1.1 Karcinogeneze.....	10
1.1.1 Faktory podmiňující vznik nádorů.....	11
1.2 Vznik nádorové buňky.....	11
1.2.1 Vlastnosti rakovinné buňky .....	12
1.3 Aristolochové kyseliny .....	12
1.3.1 Rostliny čeledi podražcovitých.....	12
1.3.2 Aristolochové kyseliny .....	13
1.4 Balkánská endemická nefropatie .....	14
1.5 Další onemocnění vyvolané aristolochovými kyselinami .....	17
1.5.1 Nefropatie vyvolaná aristolochovými kyselinami .....	17
1.5.2 Uroteliální rakovina .....	20
1.6 Biotransformace xenobiotik.....	22
1.6.1 Biotransformace aristolochových kyselin.....	23
2. Cíl bakalářské práce .....	26
3. Materiál a metody.....	27
3.1 Použitý materiál .....	27
3.2 Přístroje.....	27
3.3 Metody.....	29
3.3.1 Izolace mikrosomální frakce z orgánů zvířecích modelů .....	29
3.3.2 Oxidace AAI cytochromy P450 v potkaních jaterních mikrosomech .....	30

3.3.3	Stanovení aktivity cytochromů P450 1A1 v potkaních jaterních a ledvinných mikrosomech .....	31
3.3.4	Stanovení aktivity NADPH:cytochrom P450 reduktasy (POR) v potkaních jaterních a ledvinných mikrosomech.....	31
3.3.5	Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE) potkaních jaterních a ledvinných mikrosomů izolovaných z tkání potkanů premedikovaných AAI, AAI a směsí AAI s AAI.....	32
3.3.6	Analýza mikrosomálních proteinů (enzymů) pomocí metody „Western blot“	32
3.3.7	Imunochemická detekce cytochromů P450 .....	33
4.	Výsledky a diskuze.....	34
4.1	Oxidace AAI jaterními a ledvinnými mikrosomy potkanů premedikovaných AAI, AAI a směsí AAI s AAI .....	34
4.2	Vliv premedikace potkanů AAI, AAI a směsí AAI s AAI na aktivity enzymů systému oxidace se smíšenou funkcí (MFO systém) .....	36
4.2.1	Vliv premedikace potkanů AAI, AAI a směsí AAI s AAI na enzymovou aktivitu cytochromů P450 1A1 a 1A2.....	36
4.2.2	Vliv premedikace potkanů AAI, AAI a směsí AAI s AAI na enzymovou aktivitu cytochromů P450 2C11 .....	38
4.2.3	Vliv premedikace potkanů AAI, AAI a směsí AAI s AAI na enzymovou aktivitu NADPH:cytochromu P450 oxidoreduktasy (POR).....	39
4.3	Vliv premedikace potkanů AAI, AAI a směsí AAI s AAI na proteinovou expresi cytochromů P450 .....	39
4.3.1	Vliv premedikace potkanů AAI, AAI a směsí AAI s AAI na proteinovou expresi cytochromů P450 1A1 a 1A2.....	39
5.	Závěr.....	42
	Použitá literatura .....	43

## Použité zkratky

AA	aristolochové kyseliny
AAI	aristolochová kyselina I
AAIa	aristolochová kyselina Ia
AAII	aristolochová kyselina II
AAN	nefropatie vyvolaná aristolochovou kyselinou ( <i>Aristolochic Acid Nephropathy</i> )
AlacI	aristolaktam I
AlacIa	aristolaktam Ia
BEN	Balkánská endemická nefropatie ( <i>Balkan Endemic Nephropathy</i> )
COX	cyklooxygenasa (prostaglandin H synthasa)
CYP	cytochrom P450
dA-AAI	7-(deoxyadenosin- $N^6$ -yl)aristolaktam I
dA-AAII	7-(deoxyadenosin- $N^6$ -yl)aristolaktam II
dG-AAI	7-(deoxyguanosin- $N^2$ -yl)aristolaktam I
HPLC	vysokotlaká (vysokoučinná) kapalinová chromatografie
<i>H-ras</i>	onkogen
CHN	nefropatie vyvolaná čínskými bylinami ( <i>Chinese Herbs Nephropathy</i> )
IARC	Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny ( <i>International Agency for Research on Cancer</i> )
MFO	system oxidas (oxygenas) se smíšenou funkcí ( <i>mixed-function oxidases</i> )
NADP <sup>+</sup>	nikotinamidadeninukleotidfosfát (oxidovaná forma)
NADPH	nikotinamidadeninukleotidfosfát (redukovaná forma)
NADPH-GS	NADPH-generující systém
NQO1	NAD(P)H:chinonoxidoreduktasa (DT-diaforasa)
OTA	ochratoxin A
PBS	fyzilogický fosfátový pufr ( <i>Phosphate Buffer Saline</i> )
<i>p53</i>	tumor supresorový gen
RP-HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie s reversní fází
RPM	počet otáček za minutu
SDS	dodecylsírán sodný

SDS-PAGE

SDS elektroforéza na polyakrylamidovém gelu

TEAA

triethylaminacetát

UV

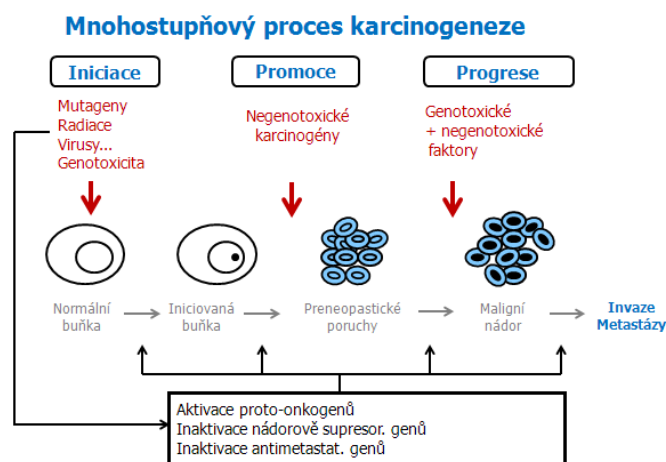
ultrafialové světlo

# 1. Úvod

## 1.1 Karcinogeneze

Karcinogeneze je mnohastupňový proces, který sestává minimálně ze tří následujících kroků: iniciace, promoce a progres<sup>1</sup>. Při karcinogenezi dochází k poruchám určitých genů, které vedou k porušení funkce proteinů, které jsou uvedenými geny kódovány. Takové proteiny se mohou podílet například na regulaci dělení a diferenciaci buňky či stabilitě genomu. Pokud vzniknou poruchy v několika kritických genech, může dojít k maligní transformaci buněk<sup>2</sup>.

První krok tohoto vícefázového procesu je iniciace. Při iniciaci dochází ke změně genetické informace „normálních“ zdravých buněk. Dochází k tvorbě prekarcinogenní léze<sup>3</sup>. Zahájení maligní tvorby tkáně je prakticky nevratné. Ke stabilní buněčné změně může dojít spontánně či působením karcinogenů<sup>1</sup>. Často jsou napadené buňky eliminovány opravnými mechanismy<sup>3</sup>. Transformovaná buňka může zůstat neškodná, pokud nedojde k porušení buněčné rovnováhy. Iniciovaná buňka musí být vystavena dlouhodobé expozici různým látkám, včetně dalších karcinogenů, aby nastala promoční fáze karcinogeneze. Dochází ke zvýšení buněčného růstu vlivem působení jiných onkogenních mutantů či působení faktorů, které mohou dočasně změnit „vzory“ specifické genové exprese. Omezuje se tak koordinace „údržby“ buňky<sup>1</sup>. Poslední fází karcinogeneze je progres. V této fázi dochází k přeměně benigního nádoru v nádor maligní<sup>3</sup>. Podstatou molekulárního mechanismu progresu jsou mutace a chromosomové aberace. Progresní fáze karcinogeneze může probíhat rychleji, pokud je buňka vystavena opakovaným expozicím karcinogenů. Proliferující buňky se rychle množí do různých velikostí zhoubného nádoru<sup>1</sup>. Fáze karcinogeneze jsou shrnuty v obrázku č. 1.



**Obr. 1:** Schématické znázornění karcinogeneze (převzato z <sup>4</sup>)

### 1.1.1 *Faktory podmiňující vznik nádorů*

Rozlišujeme několik faktorů, které způsobují vznik nádorů. Mezi vnější faktory můžeme zahrnout stravování a životní styl, individuální zvyky jako je kouření a alkoholismus. Také vystavení toxickým chemikáliím a radiaci je považováno za vnější faktory. Některé z těchto faktorů mohou působit nejen jako karcinogeny, ale i jako promotory karcinogeneze<sup>1</sup>. Mezi vnější faktory zahrnujeme i biologické a fyzikální působení na buňky<sup>3</sup>. Působení biologických faktorů závisí na věku a hormonálním stavu lidského organismu a na genetické predispozici jedince. Onkoviry, které se řadí mezi biologické faktory, hrají důležitou roli ve vývoji nádoru. Viry mohou být podle působení rozděleny do dvou typů: (1) DNA-viry, které interagují s buněčným genomem a (2) retroviry, které způsobují maligní změny buňky<sup>1</sup>. Fyzikálními faktory mohou být různé typy záření (např. UV, Rentgenovo)<sup>3</sup>. Ionizující záření je fyzikálním faktorem působícím jako prokazatelný karcinogen, jež může způsobit iniciaci a promoci buňky. Nádory vyvolané radiací mají obvykle dlouhou dobu latence<sup>1</sup>.

Chemické karcinogeny jsou látky, které způsobují nádorové bujení. Můžeme je dělit do tří skupin:

- 1) Genotoxické karcinogeny, které se váží na DNA a tvoří tak kovalentní adukty,
- 2) Karcinogeny působící strukturní změny DNA, a
- 3) Epigenetické karcinogeny modifikující DNA nekovalentními vazbami<sup>3</sup>

Karcinogeny jsou dále například také volné kyslíkové radikály a další radikály produkované organismem např.: superoxidové anionty, hydroxylové radikály, peroxyradikály a hyperoxydy. Tyto radikály interakcí s DNA produkují genové mutace a chromosomové aberace<sup>1</sup>.

Karcinogeny nalezneme i v potravě, obvykle jako přirozené složky, kontaminanty nebo vzniknou při tepelné úpravě potravin. Většinou se jedná o mutagenní látky, které jsou doprovázeny karcinogenními účinky.

### 1.2 Vznik nádorové buňky

Jak již bylo uvedeno, nádorové bujení je způsobeno patologickými změnami v DNA<sup>5</sup>. Aby se z normálně pracující buňky stala buňka rakovinná, musí dojít k více než jedné mutaci. Rakovinné buňky mají dvě vlastnosti: (1) buňky se rychle rozmnožují a (2) vyplňují místo, které je určeno pro jiné buňky<sup>5</sup>. Tím, že nádorové buňky nadměrně proliferují, mohou se tvořit dva typy nádorů: benigní a maligní<sup>5,6</sup>. Benigní nádory jsou nádory nezhooubné (např.

bradavice, mateřská znaménka). Málokdy mohou ohrozit člověka na životě<sup>6</sup>. Maligní nádory mají schopnost šířit se do okolních tkání, jsou původcem metastáz<sup>5,6</sup>.

Existují dva druhy regulačních genů, které jsou zapojeny do procesu karcinogeneze. Jsou jimi onkogeny a antionkogeny<sup>1</sup>. Onkogeny obvykle vznikají aktivací protoonkogenu<sup>5</sup>. Onkogeny jsou pozitivními regulátory karcinogeneze. Antionkogeny neboli také tumorové supresorové geny jsou negativními regulátory karcinogeneze. Mnoho lidských tumorů (např. retinoblastom) je způsobeno mutacemi, které vedou k jejich vývoji. Nejčastěji studované tumorové supresorové geny jsou např. geny *Rb* a *p53*. Pokud dojde k mutaci genu *Rb*, dochází ke ztrátě kontroly buněčného cyklu a k nárůstu proliferace<sup>1</sup>.

### 1.2.1 Vlastnosti rakovinné buňky

Rakovinné buňky se vyznačují určitými vlastnostmi, kterými se odlišují od normálních buněk. Jako ostatní buňky, i rakovinné buňky obsahují plasmatickou membránu, která má vyšší fluiditu a také jiné složení povrchových molekul. Buňka má méně uspořádaný cytoskelet, což může vysvětlovat kulatý tvar takových buněk<sup>6</sup>. Dále se vyznačují značnou dediferenciací tzn., že v průběhu karcinogeneze se z diferenciovaných buněk stávají znovu nediferenciované<sup>7</sup>. V nádorových buňkách slouží jako zdroj energie zejména glykolýza<sup>6</sup>. Rakovinnými buňkami se již zabýval Otto Warburg, který popsal, že (1) nádorové buňky mají nedostatečné dýchání, které podporuje tvorbu tumorů, (2) energii tohoto nedostatečného dýchání nahrazují energií z glykolýzy, která probíhá až 200x rychleji, než v normálních buňkách, (3) rakovinné buňky za anaerobních podmínek produkují laktát a (4) může dojít k postupnému útlumu dýchání buňky<sup>7,8,9</sup>.

## 1.3 Aristolochové kyseliny

### 1.3.1 Rostliny čeledi podražcovitých

Aristolochové kyseliny jsou produkty rostlin čeledi podražcovitých, které se řadí do třídy nižších dvouděložných rostlin a spadají do řádu pepřotvarých (*Piperales*)<sup>10</sup>. Mezi podražcovité se řadí přibližně 550 druhů, přičemž většina z nich se vyskytuje v tropických nebo subtropických oblastech. Řád *Piperales* můžeme rozdělit do dalších dvou podčeledí, které jsou tvořeny zástupci rodu *Samura*, vyskytující se převážně v Číně, a zástupci rodu *Asarum*, který nalezneme v Severní Americe, Evropě a Asii. Další podčeledí jsou rostliny podražcovité, mezi které patří rod *Thottea*, vyskytující se v tropických oblastech Asie, a rod *Aristolochia* (podražec), což je největší rod z této čeledi<sup>10</sup>.

Rostliny *Aristolochia* mají souměrné okvěti a jsou primárně pantropické. Najdou se ale i takové odnože, které rostou i v subtropických a mírných oblastech<sup>10</sup>. Mezi

nejznámější zástupce patřící do rodu podražcovitých jsou *Aristolochia fangchi*, *Aristolochia clematitis* (obr. 2) a *Aristolochia manshurien*<sup>12</sup>.

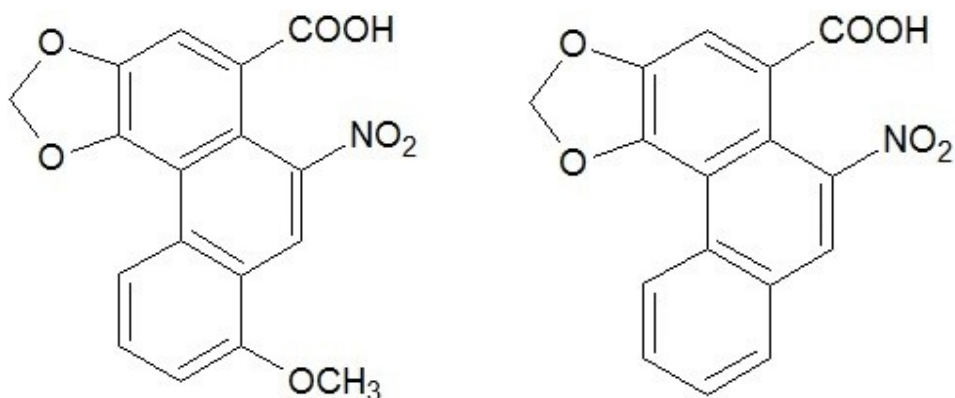


**Obr.2:** *Aristolochia clematitis* jako jeden ze zástupců podčeledi *Aristolochia* (převzato z <sup>11</sup>)

### 1.3.2 Aristolochové kyseliny

Aristolochové kyseliny jsou přírodní látky, které se vyskytují v rostlinách čeledi podražcovitých<sup>12-15</sup>. Hlavními zástupci této čeledi jsou rostliny podčeledi *Aristolochia*, které se používají v tradiční čínské medicíně, ale i v jiných zemích jako je Střední Amerika a Indický poloostrov<sup>16,18,20</sup>. Většina druhů podražců je používána k léčbě různých zdravotních problémů (např. průjem, hadí uštknutí či gynekologické problémy). Vystavení organismu aristolochovým kyselinám je však spojeno s vysokým rizikem poškození ledvin a vzniku nádoru horních močových cest<sup>14,15,17,18,20</sup>. Ukázalo se, že tyto kyseliny jsou pravděpodobně zodpovědné za vznik tumorů<sup>14,15,19</sup>.

Existuje mnoho typů aristolochových kyselin, ale v této práci se budeme zabývat zejména aristolochovou kyselinou I (AAI) a aristolochovou kyselinou II (AAII) (obr. 3)<sup>12,14,15</sup>.



**Obr. 3:** Strukturní vzorce aristolochových kyselin (zleva AAI, AAII)

Obě tyto kyseliny jsou považovány za látky způsobující nefrotoxické a karcinogenní působení podražců<sup>13,15,16,18</sup>. Po chemické stránce jsou aristolochové kyseliny nitrofenantrenové karboxylové kyseliny, které se liší pouze methoxy skupinou ve své molekule<sup>12-18</sup>. Aristolochové kyseliny jsou metabolizovány za vzniku *N*-hydroxyaristolaktamu, který je dále přeměňován na reaktivní *N*-acylnitreniový ion. Tento reaktivní meziprodukt je schopný tvořit adukty s DNA, zejména s purinovými bázemi<sup>13,14,17,18,20</sup>. Tímto způsobem aristolochové kyseliny způsobují poškození DNA. Výsledně způsobují mutace, přičemž dochází k transverzi A:T na T:A<sup>13-20</sup>.

#### 1.4 Balkánská endemická nefropatie

Balkánská endemická nefropatie (BEN) je onemocnění projevující se pomalým nástupem fibrózy intersticia ledviny, vedoucí až k uroteliální malignitě<sup>20,21</sup>. Toto onemocnění je nejvíce rozvinuto v zemích, které obklopují údolí řeky Dunaje, hlavně Rumunsko, Bulharsko, Srbsko, Bosna a Chorvatsko<sup>20,21,22</sup>. Zasažené oblasti jsou znázorněny na obrázku č. 4. Onemocnění je doprovázeno zvýšenou anémií, proteinurií, hypertenzí a glukosurií, přičemž se výrazně sníží velikost ledvin, což může předcházet výraznému poklesu rychlosti glomerulární filtrace<sup>21,23</sup>.



**Obr. 4:** Znáznornění oblastí s výskytem BEN (převzato z <sup>22</sup>)

Je zajímavé, že pacienti postižení balkánskou nefropatií byly nejčastěji zemědělci<sup>23</sup>. V průběhu sledování vývoje této choroby bylo navrženo několik hypotéz, které by mohly předpovídat její vznik a vývoj<sup>20,21,24</sup>. Uvažuje se, že vznik onemocnění závisí na genetických a environmentálních faktorech. Nejvíce se přikláníme k faktu, že balkánská endemická nefropatie má multifaktoriální původ<sup>21,24,25</sup>.

První z navrhovaných hypotéz bylo působení polycyklických aromatických uhlovodíků a aromatických aminů, které jsou známy jako prokazatelné karcinogeny<sup>20,21,23,24</sup>. Tyto látky se do životního prostředí dostávají z ložisek lignitu a uhlí. Jejich přítomnost byla prokázána v pitné vodě konzumované obyvateli v endemických oblastech<sup>20,21,24</sup>. Polycyklické aromatické uhlovodíky a aromatické aminy vykazují karcinogenní a nefrotoxické účinky a řada z nich má schopnost vyvolávat tvorbu nádorů močových cest<sup>21,23,24</sup>. Jejich působením dochází ke kovalentní modifikaci DNA cílových orgánů, které pak mohou iniciovat patologické procesy<sup>21,24</sup>.

Další hypotéza vývoje BEN je založená na působení iontů těžkých kovů. Prokázalo se, že ve složkách životního prostředí endemických oblastí se vyskytla zvýšená koncentrace iontů kadmia, chromu, hořčíku, kobaltu, niklu a mědi. U některých pacientů byly v moči nalezeny zvýšené hodnoty těchto iontů. Protože některé tyto ionty jsou nefrotoxické, byly uvažovány jako jedny z možných původců vzniku onemocnění<sup>21,24</sup>.

Mezi neopomenutelnou hypotézu vývoje BEN patří působení mykotoxinu ochratoxinu A (OTA)<sup>14,20,21,23</sup>. Bylo prokázáno, že tento mykotoxin působí toxicky na řadu organismů např. hlodavce, ale i na člověka. IARC klasifikuje OTA jako možný lidský karcinogen<sup>20-24</sup>. Ochratoxin A je uvažován za původce BEN hlavně proto, že byly nalezeny vyšší koncentrace OTA v potravinách konzumovaných obyvatelstvem z postižených oblastí<sup>24</sup>. Přestože není znám přesný mechanismus toxického působení OTA v organismu, předpokládá se, že participuje na tvorbě reaktivních kyslíkových radikálů, které podporují oxidační poškození DNA<sup>21,24,26</sup>. Pomocí Randerathovy metody (<sup>32</sup>P-postlabeling)<sup>27</sup> byly zkoumány vzorky tkání pacientů z chorvatských endemických oblastí. U pacientů adukty ochratoxinu A s DNA prakticky nebyly nalezeny, ale v několika případech ano, což by u těchto pacientů mohlo vést k rozvoji malignity v horních močových cestách<sup>23,24,26,27</sup>. Nefropatie vyvolaná ochratoxinem A je provázána intersticiální fibrózou, patologickými změnami v glomerulech a dalšími příznaky, které jsou nápadně podobné s příznaky, které pozorujeme u BEN<sup>24</sup>. Avšak proti celé této hypotéze bylo vysloveno a dále potvrzeno několik výhrad. Dosud nebyly popsány případy, že by OTA způsoboval ledvinné onemocnění nebo karcinogenesi v lidském organismu. Dále musí být bráno v úvahu, že adukty s DNA derivované z OTA nebyly detekovány v orgánech potkanů nebo v buněčných kulturách, jimž byl OTA podáván, a to v dávkách OTA vyšších, než kterým bylo vystaveno obyvatelstvo z endemických oblastí<sup>28</sup>.

Poslední, ale za to velmi důležitou hypotézou, je předpoklad role aristolochových kyselin, jako původce balkánské nefropatie<sup>20-28</sup>. Jak již bylo zmíněno v kapitole 1.3.2., aristolochové kyseliny jsou přírodními látkami čeledi *Aristolochiaceae*<sup>10-15,17,28</sup>. Tato hypotéza je založená na epidemiologickém a environmentálním výzkumu<sup>22</sup>. Ukázalo se, že *Aristolochia clematitis*, rostlina, přírodně se vyskytující v endemických oblastech, hojně roste v polích obilovin (pšenice), která je používána obyvatelstvem k přípravě potravin. Přítomnost rostlin obsahujících aristolochové kyseliny pak způsobuje kontaminaci těchto obilovin. Jak je v uvedených oblastech zvykem, chléb lidé připravovali z pšeničné mouky, ale právě takto nešťastně kontaminované semeny rostlin obsahujících AA. Takto tedy mohly aristolochové kyseliny začít působit na lidský organismus<sup>21-24,28</sup>. AA byly prokázány jako nefrotoxické a karcinogenní sloučeniny pro všechny typy testovaných zvířat, ale i pro lidskou populaci<sup>13,20,21,22</sup>. Aristolochové kyseliny se po metabolické aktivaci vážou na DNA za tvorby aduktů, které způsobují mutace – transverze AT→TA, jež byly nalezeny v genu *p53* pacientů s nádorovým onemocněním<sup>20,21</sup>.

Z uvedených hypotéz je nejpravděpodobnější právě ta, která předpokládá, že původcem balkánské endemické nefropatie jsou aristolochové kyseliny. Avšak nelze opomíjet i další vlivy, které mohou onemocnění ovlivňovat<sup>23,24</sup>.

## 1.5 Další onemocnění vyvolané aristolochovými kyselinami

Kromě Balkánské endemické nefropatie, vyvolávají aristolochové kyseliny i další onemocnění, které mohou způsobovat nefropatie vedoucí až k uroteliální rakovině.

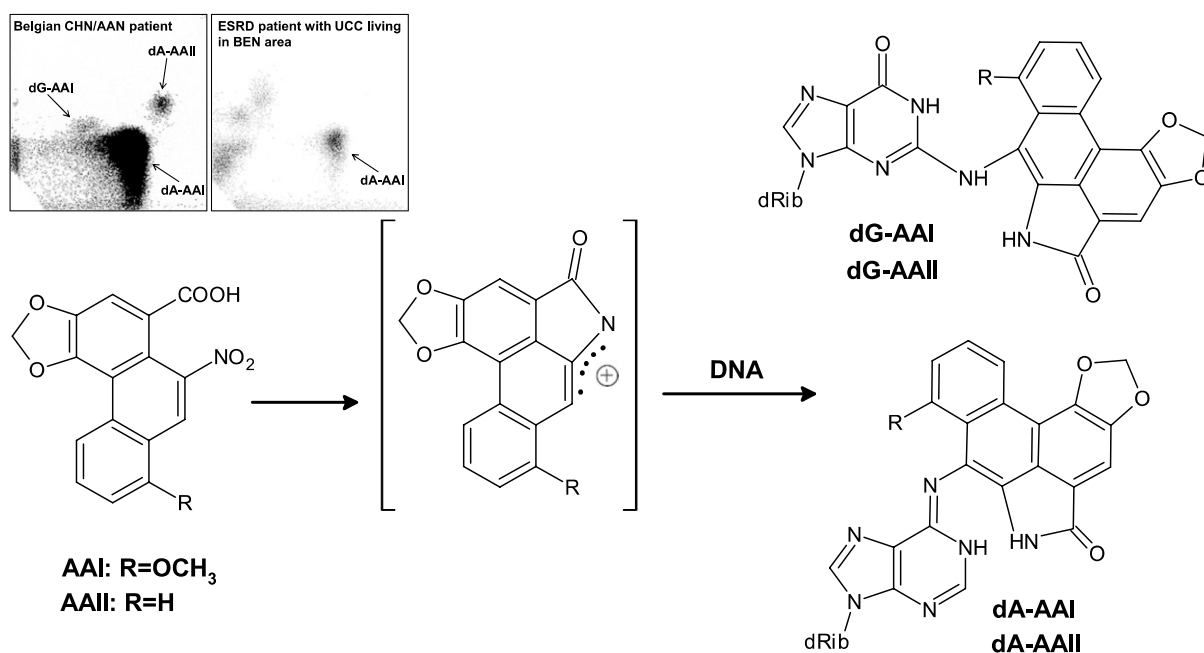
### 1.5.1 Nefropatie vyvolaná aristolochovými kyselinami

Nefropatie vyvolaná aristolochovými kyselinami, původně nazývána jako nefropatie vyvolaná čínskými bylinami, se projevuje jako rychle progresivní selhání ledvin bez poškození glomerulů, vedoucí nejčastěji k terminálnímu stádiu onemocnění ledvin<sup>14,29</sup>. První zmínka o nefropatii se objevila v roce 1992 u žen, které podstoupily „zeštíhlující“ terapii na jedné soukromé bruselské klinice<sup>14,19,29,30</sup>. Tato netypická fibróza vedla k iniciaci studie, kterou prošlo v období 1.1 1989 do 30.6 1992 624 pacientů se selháním funkce ledvin. Mezi pacienty bylo 40 žen ve věku okolo padesáti let, které trpěly intersticiální nefropatií. Později, v roce 1998 bylo v Belgii evidováno kolem dalších 100 případů. Většina těchto pacientů je léčena dialýzou a/nebo transplantací ledvin<sup>29</sup>. Onemocnění bylo doprovázeno vadou srdečních chlopní, která byla nejspíše způsobena fenfluraminem, který byl obsažen ve směsi léčiv podávaných pacientům<sup>31</sup>. Ženám podstupujícím redukci hmotnosti byla poskytována obvyklá léčba zahrnující nízkokalorickou dietu a psychickou podporu. Léky, které pacientky dostávaly, byly ve dvou uspořádání<sup>29,30</sup>. V prvé byl obsažen v malých dávkách amfetamin a preparáty obsahující acetoazolamid, ale také další živočišné či rostlinné extrakty. Druhé uspořádání zahrnovalo rostliny *Stephania tetrandra* a *Magnolia officinalis*. Poté, co byla provedena analýza vzorků tkání postižených pacientek, bylo zjištěno, že vzorky neobsahovaly alkaloidy tetrandrin a fangchinolin (*Stephania tetrandra*) ani alkaloidy magnokuranin či magnoliol (*Magnolia officinalis*). Nicméně bylo prokázáno, že ve vzorcích byly přítomny aristolochové kyseliny. Tedy přírodní produkty rostliny *Aristolochia fangchi*. Lze tedy předpokládat, že došlo k záměně rostlin *S. tetrandra* za *A. fangchi*, a to pravděpodobně z toho důvodu, že v Číně mají obě rostliny velmi podobný název (Fangji × Fangchi)<sup>14,19,29,30,32</sup>. Potvrzení této hypotézy bylo spojeno s výsledky fytochemické analýzy, která měla určit přítomnost tetrandrinu či aristolochové kyseliny. Pouze dva z dvanácti vzorků obsahovaly tetrandrin (alkaloid *S. tetrandra*), nicméně většina vzorků obsahovala aristolochovou kyselinu (Tab. 1)<sup>33</sup>.

Batch	Tetraandrine	Aristolochic acid
1	-	+
2	+	-
3	-	+
4	-	+
5	-	+
6	-	+
7	-	+
8	-	+
9	-	+
10	-	+
11	-	+
12	+	+

**Tab. 1:** Výsledky fytochemické analýzy sledující výskyt tetrandrinu a aristolochové kyseliny ve vzorcích podávané pacientkám (převzato z <sup>33</sup>)

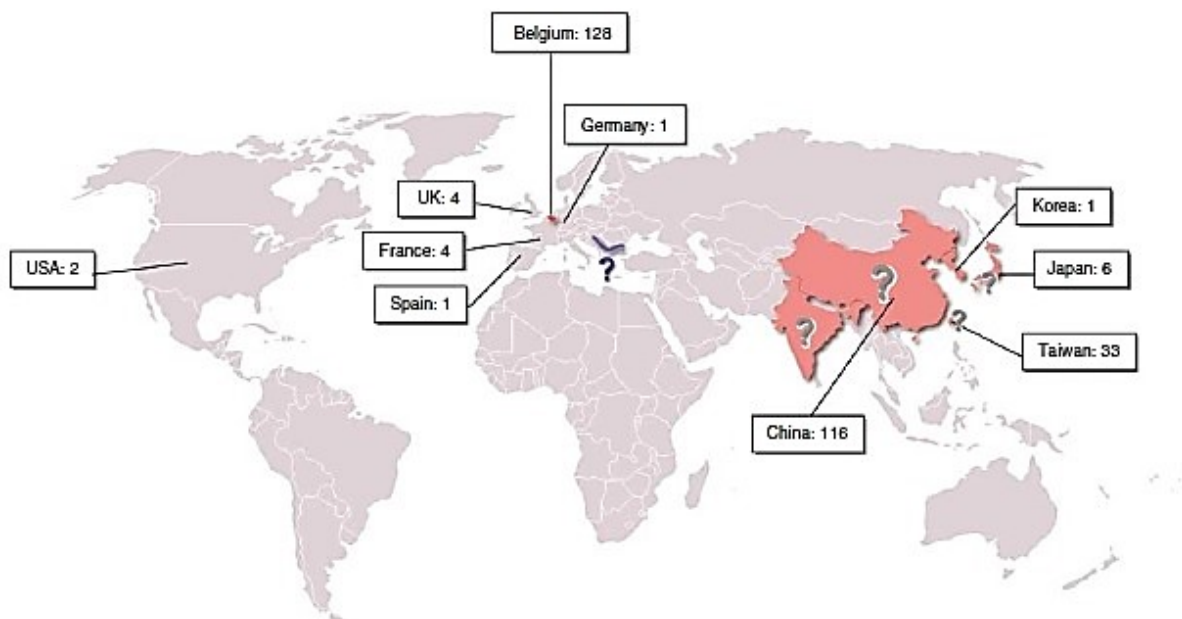
Jak již bylo zmíněno v kapitole 1.3.2, aristolochové kyseliny tvoří po metabolické aktivaci kovalentní adukty s DNA, a to adukty zejména s deoxyadenosinem a deoxyguanosinem<sup>13,14,18,24</sup>. K detekci těchto aduktů byla využita Randerathova metody (<sup>32</sup>P-Postlabelling) (obr. 5)<sup>27</sup>. Uvedené adukty jsou specifickými markery signalizujícími vystavení působení aristolochových kyselin a směřující ke vzniku malignity<sup>14,20,30</sup>. Výsledkem tohoto zkoumání bylo zjištění, že hlavním reaktantem zodpovědným za vznik nefropatie jsou aristolochové kyseliny. Proto došlo ke změně názvu této choroby z nefropatie vyvolané čínskými bylinami (CHN) na název nefropatie vyvolaná aristolochovými kyselinami (AAN)<sup>14,18,20,29</sup>.



**Obr. 5:** Aktivace a tvorba aduktu DNA s aristolochovými kyselinami; autoradiografický profil aduktů DNA z ledvinné DNA pacienta trpící CHN/AAN v Belgii, a pacienta s konečným stádiem ledvinné choroby (ESRD, end-stage renal disease) a UCC, žijícím v endemických oblastech s výskytem BEN. (převzato z <sup>21</sup>)

Jak již bylo výše zmíněno, existuje velice blízký vztah mezi nefropatií vyvolanou aristolochovými kyselinami a balkánskou endemickou nefropatií. V případě AAN se jednalo striktně o pacienty z řad žen, ale v případě BEN mluvíme o pacientech z řad obou pohlaví<sup>20,34</sup>. U balkánské endemické nefropatie je známo několik hypotéz, naznačujících jak mohlo být onemocnění rozvinuto a které jsou detailně popsány v kapitole 1.4<sup>24</sup>. Jedna tato hypotéza je založena na působení ochratoxinu A. Na základě toho byla provedena analýza vzorků na přítomnost ochratoxinu A. Později se však ukázalo, že jen některé vzorky obsahovaly velmi zanedbatelné množství OTA, v ostatních OTA nebyl nalezen vůbec. Tudíž lze říci, že OTA nehraje v tomto typu nefropatie klíčovou roli<sup>20,30</sup>.

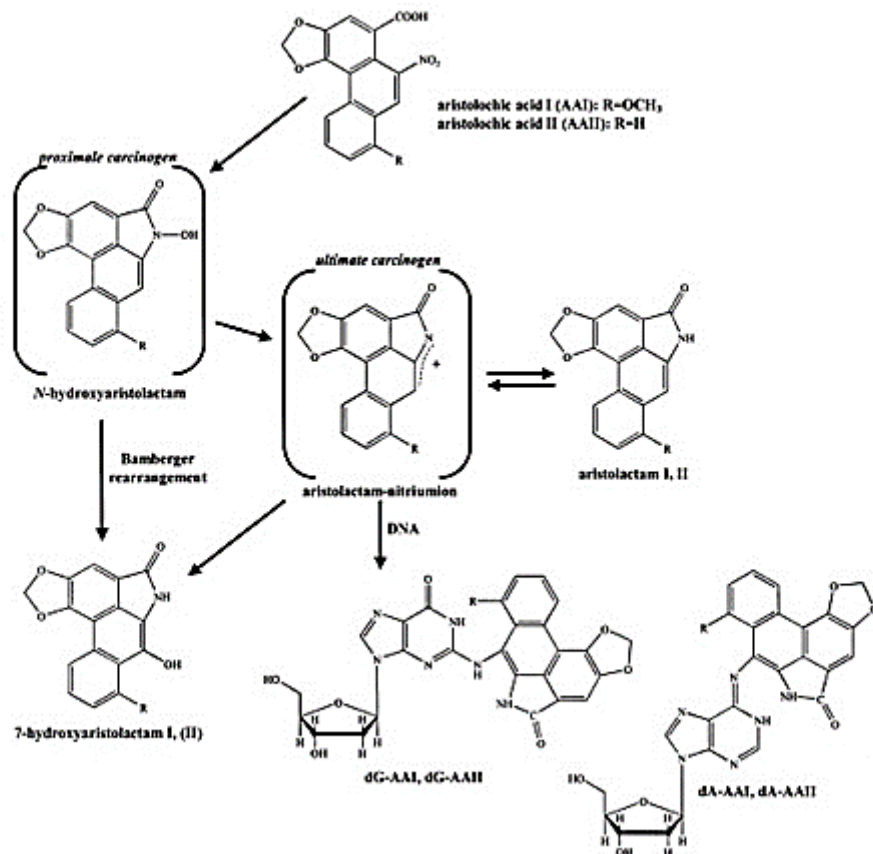
Nefropatie vyvolaná aristolochovými kyselinami není problémem popsaným pouze na belgické klinice. Pacienti s příznaky této nefropatie byly nalezeny i ve Francii, Španělsku, Německu, Velké Británii, USA a velká část případů také v Asii (obr. 6)<sup>19</sup>.



**Obr. 6:** Země s výskytem onemocnění AAN (převzato z <sup>19</sup>)

### 1.5.2 Uroteliální rakovina

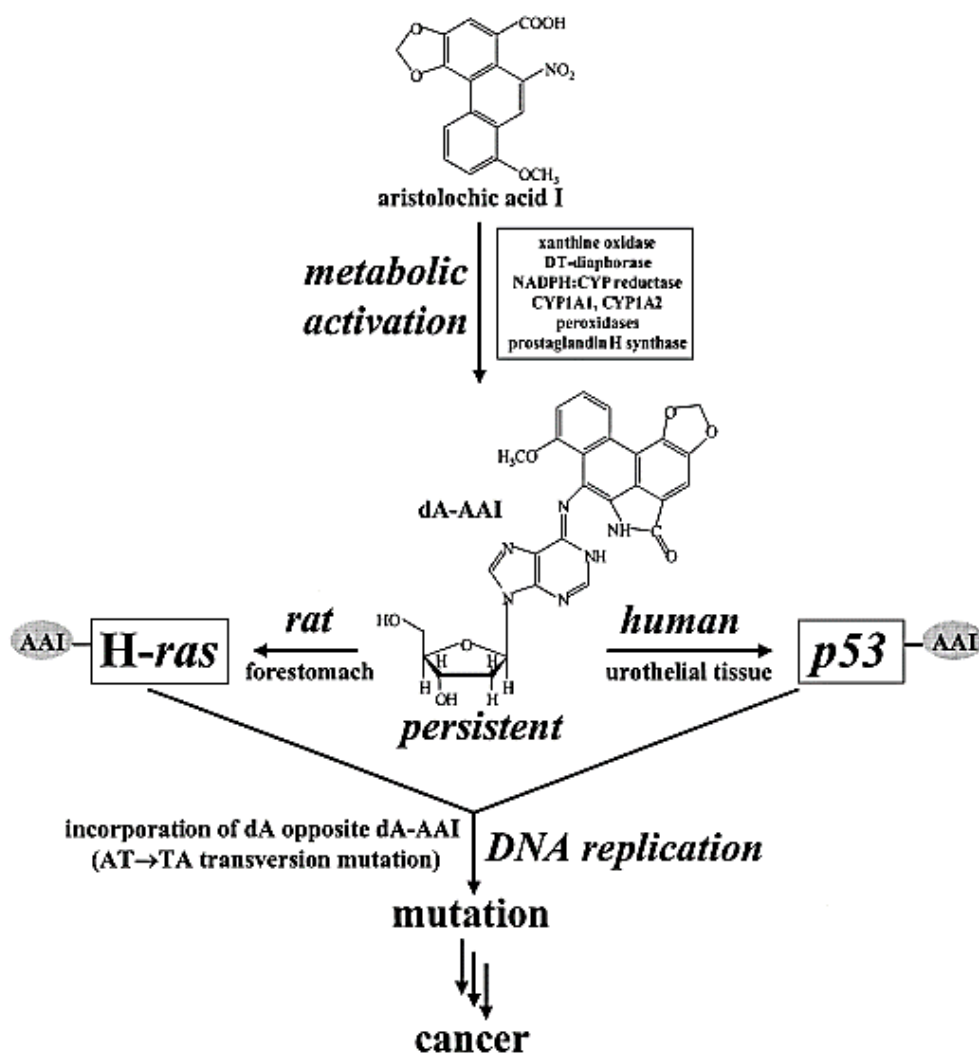
K tvorbě uroteliálních nádorů dochází většinou v konečném stádiu nefropatie vyvolané aristolochovými kyselinami. I několik let po přerušení procesu pro redukci hmotnosti existují pacienti, u kterých hrozí riziko vzniku nádorového onemocnění<sup>30</sup>. Za vývojem uroteliálních nádorů stojí především metabolická aktivace aristolochových kyselin. Biotransformací dochází ke vzniku *N*-hydroxyaristolaktamu, který je dále přeměňován na cyklický *N*-acylnitreniový ion, který může interagovat s DNA a tvořit tak kovalentní adukty s deoxyadenosinem, 7-(deoxyadenosin-*N*<sup>6</sup>-yl)aristolaktam (**dA-AA**) a deoxyuanosinem, 7-(deoxyguanosin-*N*<sup>2</sup>-yl)aristolaktam (**dG-AA**)<sup>13,14,18</sup>. Vzhledem k těmto aduktům vedoucím k vývoji nádorů, jsou aristolochové kyseliny potvrzeným karcinogenem. V ledvinné tkáni pacientů AAN byly nalezeny specifické adukty s DNA, a to majoritní dA-AAI a dva minoritní dA-AAII a dG-AAI<sup>35</sup>. Vazba aristolochových kyselin po jejich metabolické aktivaci s DNA je znázorněna na obr. 7.



**Obr. 7:** Schéma aktivace AA a vznik aduktů s DNA (převzato z<sup>18</sup>)

Ukázalo se, že aristolochová kyselina I tvoří adukty s DNA efektivněji než aristolochová kyselina II<sup>36</sup>. Nejvýznamější roli z ve vývoji nádorů hraje především adukt 7-(deoxyadenosin-N<sup>6</sup>-yl)aristolaktam I. Vykazuje totiž dlouhodobou persistenci v tkáních<sup>35,36</sup>.

Působením aristolochových kyselin na hlodavce bylo zjištěno, že vyvolávají mutace v kodonu 61 (CAA) *H-ras* onkogenu, přičemž se jedná o specifickou transverzi AT→TA<sup>20,37</sup>. Podobná mutace byla pozorována na kodonu 139 – exon 5- (AAG) v lidském tumorovém supresorovém genu *p53*<sup>20,21,38,39</sup>. Pokud dojde ke tvorbě aduktů aristolochových kyselin s DNA, dochází po procesu replikace k mutaci a následně ke změně aminokyseliny. U onkogenu *H-ras* dojde ke změně Gln → Leu, v případě lidského tumorového supresorového genu dojde ke změně Lys → Stop. Takto může vzniknout iniciovaná buňka<sup>17,40</sup>. Mechanismus takto popsané karcinogeneze je nastíněn na obr. 8.



**Obr. 8:** Mechanismus karcinogeneze působením AA u hlodavců a člověka (převzato z<sup>18)</sup>)

## 1.6 Biotransformace xenobiotik

Pojmem xenobiotika se označují látky, které jsou pro intermediární metabolismus organismu nedůležité a přirozeně se v organismu nevyskytují. Mezi xenobiotika lze v dnešní době zařadit řadu známých látek. Tyto látky jsou běžně používány v prostředí okolo nás a za primární zdroj takových látek je nejčastěji považován chemický průmysl<sup>41</sup>. Za biotransformaci xenobiotik označujeme procesy, vedoucí ke snadnému vyloučení xenobiotika nebo potlačení negativního působení na organismech. Během biotransformace dochází k detoxikaci xenobiotika, což znamená, že je snížena toxicita sloučeniny. V jiném případě dochází k jejich aktivaci, což znamená, že se naopak zvýší toxicita sloučeniny. Jde zejména o metabolickou aktivaci promutagenů na mutageny a prokarcinogenů na karcinogeny<sup>42</sup>.

Biotransformace xenobiotik zahrnuje dvě fáze, během nichž dochází k již zmíněné detoxikaci či aktivaci. V první fázi biotransformace dochází ke vnášení nebo odkrývání polárních funkčních skupin, na které se vážou endogenní sloučeniny. Tím dochází ke zvýšení hydrofilicity xenobiotika<sup>43</sup>. Jedná se hlavně o tyto reakce: oxidace, redukce, a reakce hydrolytické. Produkty těchto reakcí jsou pak schopny konjugace s endogenními látkami s polárními vlastnostmi jako je např. kyseliny glukuronová či glutathion. Endogenní látky v organismu jsou metabolizovány enzymy s vysokou specifitou k substrátu. Naproti tomu jsou xenobiotika metabolizována enzymy se širokou substrátovou specifitou. V lidském organismu hrají v tomto směru důležitou roli enzymy jako jsou: monooxygenasy (obsahující cytochrom P450 nebo flaviny), dioxygenasy, další oxidoreduktasy jako peroxidasy a dále hydrolasy<sup>41</sup>.

Cytochromy P450 jsou hemthiolátové proteiny, které v lidském organismu najdeme v membránách endoplasmatického retikula či mitochondrií. V orgánech je pak nalezneme ve větším množství v buňkách jater<sup>43</sup>.

Peroxidasy jsou enzymy, které redukují peroxid vodíku a oxidují xenobiotikum (ale i endogenní látky). Asi nejznámější peroxidasou je v tomto směru protaglandin H synthasa<sup>42</sup>.

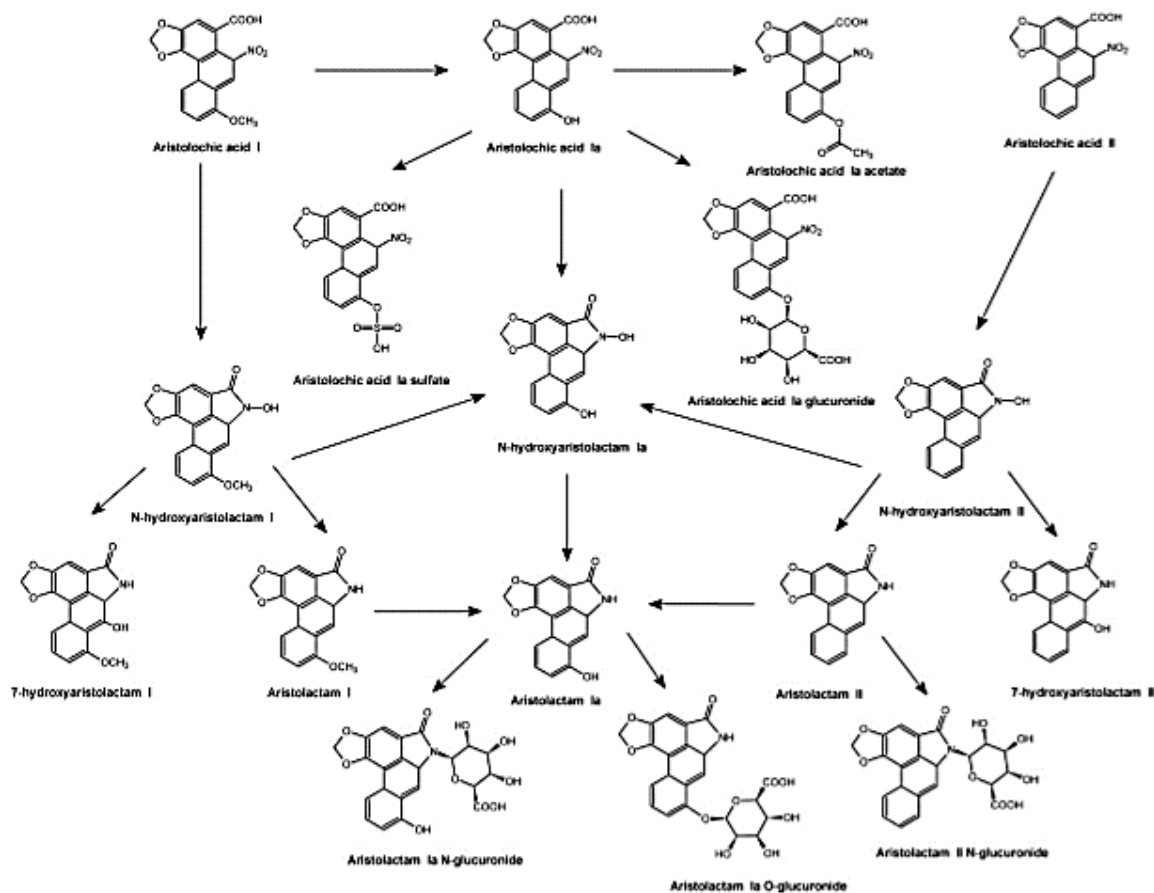
Ve druhé fázi biotransformace dochází ke konjugačním reakcím. Konjugát se tak stává rozpustnějším ve vodě než původní nepozměněná látka. Sloučenina, která podlehl první fázi biotransformace má tak na své molekule skupinu, vhodnou pro reakci s konjugačním činidlem. Většina konjugačních reakcí je katalyzována enzymy ze třídy transferas<sup>41,43</sup>.

#### 1.6.1 *Biotransformace aristolochových kyselin*

Hlavními metabolity aristolochových kyselin jsou aristolaktamy. Zdá se, že hlavním metabolitem AAI je aristolaktam I (AlacI) a dále pak aristolochová kyselina Ia (AAIa). Ta vzniká demethylací AAI<sup>14,18,40,44</sup>. Zajímavostí je, že v experimentech *in vivo* byla pozorována tvorba aristolaktamu Ia (AlacIa), ale v experimentech prováděných *in vitro* nikoli<sup>45</sup>. Podle koncentrace kyslíku v tkáních může dojít k ovlivnění nitroredukce AAI, ale i *O*-demethylaci, v případě AAI je koncentrací kyslíku ovlivněna jen nitroredukce<sup>20,46</sup>.

Aristolochové kyseliny nejprve podléhají redukci na *N*-hydroxyaristolaktamy a tato redukce může dále pokračovat až na aristolaktamy<sup>40</sup>. Během druhé fáze biotransformace jsou metabolity AA konjugovány s kyselinou glukuronovou, acetátem a sulfátem. Jedná se o tyto konjugáty AAIa: *O*-glukosiduronát, *O*-acetát a *O*-sulfát<sup>45,47</sup>. Nalezneme také

konjugáty aristolaktamů, a to: *N*-glukosiduronát, *O*-glukosiduronát aristolaktamu Ia a *N*-glukosiduronát aristolaktamu II<sup>45</sup>.



**Obř. 9:** Schéma biotransformace aristolochových kyselin (převzato z <sup>40</sup>)

#### 1.6.1.1 Aktivace aristolochových kyselin

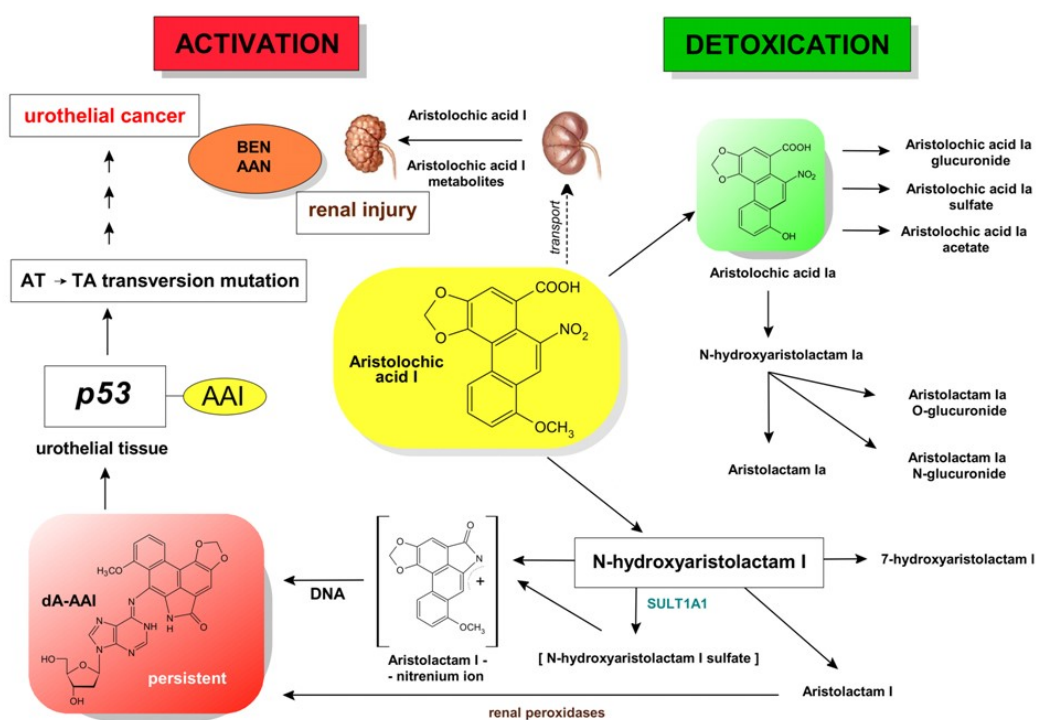
K aktivaci aristolochové kyseliny I dochází nitroredukcí za vzniku *N*-hydroxyaristolaktamu I, ze kterého dále vzniká cyklický *N*-acylnitreniový ion, který je tzv. okamžitým karcinogenem schopným se vázat na DNA<sup>18,40,48</sup>. Enzymy, které se podílejí na aktivaci AAI, jsou především NADPH:chinonoxidoreduktasa 1 (NQO1) a cytochromy P450 (CYP) 1A1 a 1A2. Pro potvrzení této skutečnosti byly k aktivaci použity lidské rekombinantní cytochromy P450, zejména CYP1A1 a 1A2, a NADPH:chinonoxidoreduktasa<sup>13,14,21,40,49</sup>.

CYP1A1 vykazuje nižší efektivitu v aktivaci AAI než CYP1A2<sup>20,40,49</sup>. Dále bylo provedeno porovnání mezi efektivitou aktivovat AAI jaterní a ledvinným mikrosomy, přičemž je známo, že v ledvinné tkáni je cytochromů P450 méně než v játrech. Avšak ledvinné mikrosomy obsahují NADPH: chinonoxidoreduktasu a COX, které se podílejí na aktivaci AAI<sup>40, 50</sup>. Aktivace u AAI v ledvinné tkáni je tedy výsledně rovněž velmi efektivní.

V dřívějších studiích bylo zjištěno, že cytosolární vzorky lidských jater a ledvin aktivují AAI, přičemž dochází k tvorbě aduktů s DNA. Enzymy, které se na tomto procesu efektivně podílejí, jsou cytosolární enzymy NAD(P)H:chinonoxidoreduktasa (NQO1) a xanthinoxidasa<sup>40,49, 51</sup>. Při porovnání mikrosomálních a cytosolárních enzymů se ukázalo, že v aktivaci AA je NQO1 efektivnější než CYP1A1 a 1A2<sup>20,40</sup>.

### 1.6.1.2 Detoxikace aristolochových kyselin

Aristolochové kyseliny jsou metabolicky nejen aktivovány, ale i detoxifikovány. Při detoxikaci dochází k přesmyku *N*-hydroxyaristolaktamu I na 7-hydroxyaristolaktam I<sup>48,49,52-54</sup>. Základní detoxikační cestou aristolochové kyseliny I je však její oxidace na aristolochovou kyselinu Ia (AAIa), která dále tvoří konjugáty nalezené v moči<sup>47</sup>. Reakce, které vedou ke tvorbě AAIa jsou detoxikační, neboť prozatím nebyly nalezeny adukty AAIa s DNA<sup>48</sup>. Velkou roli při detoxikaci AAI hrají především CYP1A1 a 1A2<sup>49,54</sup>.



**Obr. 10:** Schéma aktivace a detoxikace aristolochových kyselin (převzato a upraveno z<sup>53</sup>)

## **2. Cíl bakalářské práce**

Cílem předkládané bakalářské práce bylo shromáždit informace o aristolochových kyselinách, jejich účincích a biotransformaci.

Experimentální část práce byla věnována studiu enzymů, které se podílejí na aktivaci či detoxikaci aristolochových kyselin. Konkrétně byl zjišťován vliv AAI, AAII a směsi AAI s AAII na expresi těchto enzymů a jejich aktivity v modelovém organismu laboratorního potkana.

### 3. Materiál a metody

#### 3.1 Použitý materiál

Použitý materiál a chemikálie pochází z následujících zdrojů:

##### **AbCam, USA**

Primární polyklonální králičí protilátka proti potkaním CYP1A1 a CYP1A2 (1:1000)

##### **BIO-Rad, USA**

Acrylamide kit 10 %, TGX™FastCast™

Precision Plus Protein™WesternC™Standards

Trans blot®Turbo™-Transfer systém

Nitrocellulose Membranes, 0,2 µm (Germany)

##### **Fluka, Švýcarsko**

1,1,1-tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS), tokoferol (vitamin E)

##### **Lachema Brno, Česká Republika**

Kyselina octová, methanol, ethanol, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>P<sub>4</sub>O<sub>7</sub>·10H<sub>2</sub>O, KCl, glycerol

##### **Linde, Česká republika**

Kapalný dusík

##### **Merck, Německo**

Acetonitril

##### **Penta, Česká republika**

Ethylacetát

##### **Promega, USA**

BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-fosfát)

NBT (nitroblue tetrazolium)

##### **Sigma, USA**

glukosa-6-fosfát, glukosa-6-fosfátdehydrogenasa, NADPH, NADP<sup>+</sup>, Anti-Rabbit IgG s navázanou alkalickou fosfatasou (1:1428,6)

##### **Whatman, USA**

Chromatografický papír č. 3

#### 3.2 Přístroje

##### **Automatické mikropipety**

Eppendorf (Německo)

Nichipet, Nichiryō (Japonsko)

### **Centrifugy**

K-23, Janetzki, výkyvný rotor (Německo)

K-24, Janetzki, úhlový rotor (Německo)

Optima LE-80K Ultracentrifuge Beckman Coulter, úhlový rotor Ti 45 (USA)

Centrifuge 5418, Eppendorf, úhlový rotor (Německo)

### **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)

### **Systém 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), homogenisátor dle Pottera a Elvehjema,

Mikroshaker type ML-1, odparka Labconco (BioTech, Česká republika), SNAP i.d.

Millipore (USA)

### 3.3 Metody

#### 3.3.1 *Izolace mikrosomální frakce z orgánů zvířecích modelů*

Experimenty s laboratorními potkany probíhaly v laboratořích Státního zdravotního ústavu a byly prováděny Dr. Jaroslavem Mrázem a Ing. Šárkou Duškovou. Mikrosomální frakce ledvinné a jaterní tkáně potkanů premedikovaných AAI, AAI a směsí AAI s AAI, a potkanů bez premedikace (kontroly), byly izolovány následujícím způsobem. Pomocí frakční centrifugace byly získány jaterní mikrosomální frakce. Celý postup byl prováděn za chladu při teplotě 5 °C. Při práci byly použity stejně vychlazené přístroje a použité chemikálie. Pro jednotlivé kroky izolace byly použity tyto roztoky pufrů:

**P1:** 153 mM KCl; 50 mM TRIS; pH = 7,4

**P2:** 100 mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> · 10 H<sub>2</sub>O; pH = 7,4

**P3:** 20% glycerol; 153 mM KCl; 50 mM TRIS; 50 μM vit. E; pH = 7,4

Vyjmuté orgány byly opláchnuty roztokem pufru **P1**, dále byly vloženy do vychlazeného roztoku pufru **P1**, který byl předem zvážen. Poté byla zvážena i tkáň. Jaterní, ledvinné a plicní tkáně byly rozděleny na menší díly (nastříhány) a několikrát propláchnuty pufrům **P1**, pro dokonalé „odkrvení“. Dále byly tkáně homogenizovány v homogenizátoru dle Pottera a Elvehjema v roztoku pufru **P1**, a to v takovém objemu, aby odpovídal čtyřnásobku hmotnosti tkáně. Získané homogenáty byly centrifugovány (3000 RPM, 10 min., *centrifuga Janetzki K-23, výkyvný rotor 4×70 ml*) při teplotě 4 °C. Supernatant byl uchován a získaná peleta byla znovu homogenizována s jednou čtvrtinou původního objemu pufru **P1**. Poté byla peleta opět centrifugována za výše uvedených podmínek.

Takto získané supernatanty byly spojeny a odstředěny při teplotě 4 °C (13 000 RPM, 20 min., *centrifuga Janetzki K-23, úhlový rotor 6×35 ml*). Tato získaná peleta představovala mitochondriální frakci. Dále byl využíván jen supernatant, který byl opatrně oddělen.

Mikrosomální frakce byla získána vysokoobrátkovou centrifugací při teplotě 4 °C (45 000, 65 min., *centrifuga Beckman LE-80K, úhlový rotor 45 Ti, 6×94 ml*). Získaná peleta byla znovu homogenizována přibližně v dvojnásobku objemu pufru **P2**. Zbýlý supernatant představoval cytosolární frakci a byl uchován při -80 °C pro další použití

Pomocí ultracentrifugace byla získána výsledná mikrosomální frakce. Podmínky centrifugace byly při teplotě 4 °C (60 000 RPM, 65 min., *centrifuga Beckman LE-80K, úhlový rotor 45 Ti, 6×94 ml*). Usazený sediment byl homogenizován v roztoku pufru **P3** o objemu (ml), který odpovídá jedné čtvrtině původní hmotnosti tkáně v gramech. Získaná

výsledná mikrosomální frakce byla zmrazena v tekutém dusíku a uchována při teplotě -80 °C pro další experimenty.

### 3.3.2 Oxidace AAI cytochromy P450 v potkaních jaterních mikrosomech

Pomocí metody HPLC byla sledována oxidace aristolochové kyseliny I (AAI) potkaními jaterními a ledvinnými mikrosomy. Stanovení bylo provedeno vždy v „tripletových“ provedeních. Celkový objem inkubačních směsí byl 500 µl.

Složení inkubačních směsí:

1. Fosfátový pufr (100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), pH = 7,4
2. Potkaní jaterní/ledvinné mikrosomy  $c_{proteinů} = 0,5$  mg/ml
3. AAI (10 µM) rozpuštěná v destilované vodě
4. NADPH generující systém (NADPH-GS): 1 mM NADP<sup>+</sup>, 10 mM, MgCl<sub>2</sub> · 6 H<sub>2</sub>O, 10 mM glukosa-6-fosfát, 1 U/ml glukosa-6-fosfátdehydrogenasa

Reagencie byly do inkubačních směsí přidávány v takovém množství a takovém pořadí, jak je naznačeno výše. Reakční směs byla míchána a inkubována po dobu 10 minut za stálého třepání (400 RPM) při teplotě 37 °C. Reakce byla zastavena přidáním 1 ml ethylacetátu a pro lepší extrakci metabolitu AAIa byla reakční směs 2 minuty třepána (*Mikroshaker type ML-1*). Následně byla organická fáze oddělena centrifugací (13 000 RPM, 3 min., *centrifuga 5418, Eppendorf, úhlový rotor*). Po odebrání organické fáze byl k vodné fázi přidán další 1 ml ethylacetátu a stejným postupem byla provedena další extrakce. Spojené extrakty byly odpařeny v digestoři (přes noc) a následně uchovány při teplotě -20 °C. Před analýsou byly extrakty rozpuštěny v 30 µl methanolu. Připravené vzorky byly následně analysovány metodou HPLC s reversní fází, RP-HPLC.

#### 3.3.2.1 Vysokotlaká (vysokoúčinná) kapalínová chromatografie AAI a jejích metabolitů

Látky obsažené v extraktech byly separovány metodou RP-HPLC. Ke stanovení byla použita kolona C18 (*Macherey-Nagel, SRN*) při teplotě 35 °C. Separace probíhala v gradientovém uspořádání, kdy se měnilo složení mobilní fáze z 80% A a 20% B na konečné složení 40% A a 60% B. Mobilní směs byla složena ze směsi látek (**A**) 100 mM triethyleaminacetátu (pH = 7,0; úprava pH kyselinou octovou) a (**B**) 80% acetonitrilu. Roztoky byly připraveny před analýsou a byly sonikovány pro odstranění vzduchu. Standard AAI byl připraven tak, že k 28 µl methanolu byly přidány 2 µl AAI o koncentraci 1 mg/ml. Na kolonu bylo vždy nanášeno 20 µl vzorku. Jedna eluce probíhala po dobu 55 minut při

průtoku mobilní fáze 0,5 ml/min a tlaku cca 80 bar. Separované látky obsažené v extraktech byly detekovány při vlnové délce 250 nm.

### 3.3.3 Stanovení aktivity cytochromů P450 1A1 v potkaních jaterních a ledvinných mikrosomech

Enzymová aktivita cytochromu P450 1A1 byla měřena jako schopnost katalyzovat oxidaci 1-fenylazo-2-hydroxynaftolu (Sudan I)<sup>54</sup>. Sudan I je oxidován na tři hlavní metabolity: 4'-hydroxy-Sudan I, 6-hydroxy-Sudan I a 4',6-dihydroxy-Sudan I, které můžeme stanovit pomocí RP-HPLC<sup>56</sup>.

Příprava inkubačních směsí byla provedena ve skleněných zkumavkách. Celkový objem inkubačních směsí byla 500  $\mu$ l.

Složení inkubačních směsí:

1. 50 mM sodno-fosfátový pufr (pH = 7,4)
2. Jaterní/ledvinné mikrosomy (0,5 mg/ml)
3. 100  $\mu$ M Sudan I (v methanolu)
4. 1 mM NADPH

Nejprve byly inkubační směsi pre-inkubovány při 37 °C po dobu 5 minut. Reakce byla startována přidavkem NADPH (koncentrace ve směsi 1 mM). Inkubace probíhala při 37 °C po dobu 30 min. Poté byla reakce zastavena přidavkem 1 ml ethylacetátu. Metabolity byly dvakrát extrahovány ethylacetátem, promíchány 30 s a centrifugovány po dobu 5 min (4000 RPM). Tento extrakt byl odpařen do sucha (odparka *Speed Vac*).

Odparek byl rozpuštěn v 30  $\mu$ l methanolu a aplikován na kolonu HPLC. Byla použita kolona C18 (*Macharey-Nagel*, SRN). Při stanovení bylo využito isokratického uspořádání, přičemž mobilní fáze se skládala z 0,1 M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (pH = 8,5) a methanolu (poměr 1:9). Jedna eluce probíhala 12 minut s průtokem 0,7 ml/min.

### 3.3.4 Stanovení aktivity NADPH:cytochrom P450 reductasy (POR) v potkaních jaterních a ledvinných mikrosomech

Při stanovení enzymové aktivity POR využíváme přeměny oxidované formy cytochromu *c* na redukovanou formu cytochromu *c*. Tohoto děje se účastní právě POR. Společně s tím dochází k přeměně NADPH na  $\text{NADP}^+$ . Připravené inkubační směsi o celkovém objemu 1 ml měly následující složení:

1. 0,3 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  pufr s 1 mM EDTA (disodná sůl) (pH = 7,5)
2. 20 mg/ml cytochrom *c* (0,5 mg/ml v inkubační směsi)
3. 0,1 mM NADPH

Nejprve bylo pipetováno 955  $\mu$ l TRIS/HCl pufru, 25  $\mu$ l 20 mg/ml cytochromu c a 10  $\mu$ l 0,1 mM NADPH. K měření absorbance bylo použito 980  $\mu$ l této směsi. Nejprve byl měřen „blank“. Poté bylo vždy do kyvety s připravenou směsí přidáno 10  $\mu$ l mikrosomů, směs byla lehce promíchána a absorbance byla měřena při vlnové délce 550 nm.

### 3.3.5 *Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE) potkaních jaterních a ledvinných mikrosomů izolovaných z tkání potkanů premedikovaných AAI, AAIi a směsí AAI s AAIi*

Před samotným průběhem elektroforézy byla skla k tomu použitá očištěna, odmaštěna ethanolem a založena do elektroforetické aparatury.

Elektroforetické gely byly připraveny pomocí komerční sady BIO-Rad. Pro elektroforézu byl připravován 10% gel. Složení chemikálií pro přípravu gelů bylo následující:

Po polymeraci obou gelů (cca 40 min) byla skla vložena do elektroforetické vany, vyjmut hřeben pro tvorbu jamek a gely byly převrstveny elektrodoým pufrém (0,025 M TRIS/HCl; 0,192 M glycin; 0,1 % dodecyl síran sodný (SDS) (w/v); pH 8,3).

Vzorky pro elektroforézu byly ředěny vodou tak, aby koncentrace v jedné jamce byla 60  $\mu$ g proteinu. Vzorky byly smíchány se vzorkovým pufrém v poměru 3:1, následně byly cca 5 min povařeny a naneseny Hamiltonovou stříkačkou do jamek.

Po nanesení vzorků byla elektroforetická vana doplněna na optimální objem elektrodoým pufrém. Elektroforéza probíhala ve vertikálním uspořádání při 200 V, 400 mA po dobu cca 60 min. Po ukončení elektroforézy byl celý gel vyjmut, odstraněn zaostřovací gel a separační gel přenesen do barvicí lázně (25% Coomassie Brilliant Blue R-250 (w/v); 46% ethanol (v/v); 9,2% kyselina octová (v/v)) na 60 minut. Pro odstranění nadbytečné barvy byl gel přesunut to odbarvovací lázně (25% ethanol (v/v); 10% kyselina octová (v/v)) přes noc.

### 3.3.6 *Analýsa mikrosomálních proteinů (enzymů) pomocí metody „Western blot“*

K přenosu proteinů z elektroforetického gelu na membránu (PVDF, nitrocelulósová) bylo použito metody „Western blot“. Tato metoda je založena na schopnosti těchto membrán sorbovat proteiny.

Gel byl po skončení elektroforézy přenesen do „transferového“ pufru (0,025 M TRIS; 0,192 M glycin; pH 8,3). Na přenos proteinů byla použita membrána PVDF, která byla nejprve „smočena“ v methanolu, potom přibližně minutu v destilované vodě a dále asi 5 minut v „transferovém“ pufru. Pro elektropřenos byly použity plošné elektrody, do kterých

se skládal tzv. „sandwich“. Ten byl složen ze tří kusů chromatografického papíru Whatman 3 (rozměry 7,5×8 cm), které byly „smočeny“ v „transferovém“ pufru, PVDF membránou, gelem a dalšími třemi kusy chromatografického papíru. Takto připravený „sandwich“ byl pomocí plastového válečku zbaven bublin a byl zalit malým množstvím „transferového“ pufru. Celá aparatura byla uzavřena vrchní plošnou elektrodou a vložena do přístroje.

Po skončení přenosu byla membrána použita pro imunochemickou detekci CYP.

### 3.3.7 *Imunochemická detekce cytochromů P450*

Po ukončení metody „Western blot“ byla PVDF membrána 1 hodinu blokována v blokovacím roztoku (5% odtučněné, sušené mléko v PBS (1,8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,134 M NaCl, pH 7,2, 0,3% (v/v) TRITON X-100)).

Při použití komerční primární králičí protilátky proti potkaním CYP1A1 (anti-CYP1A1) a proti potkaní CYP1A2 (anti-CYP1A2) byla inkubace s protilátkou provedena přes noc při 6 °C za stálého míchání. Následující den byla membrána umístěna do jamky přístroje SNAP i.d. (Millipore, USA) detekujícího proteiny a primární protilátky byly smyty pufrům PBS obsahující Triton X-100 (3 × 10-30 ml). Poté byla na membránu nanesena sekundární protilátka s navázanou alkalickou fosfatase a inkubace proběhla po dobu 10 minut. Dále byla membrána propláchnuta pufrům PBS Triton X-100, aby byla odstraněna nenavázaná sekundární protilátka. Detekce proteinů byla provedena roztoky pro detekci proteinů, 5-bromo-4-chloro-3-inydolyl fosfátem a nitroblue-tetrazolium (BCIP/NBT), které byl rozpuštěny v 5 ml pufru alkalické fosfatasy.

## 4. Výsledky a diskuze

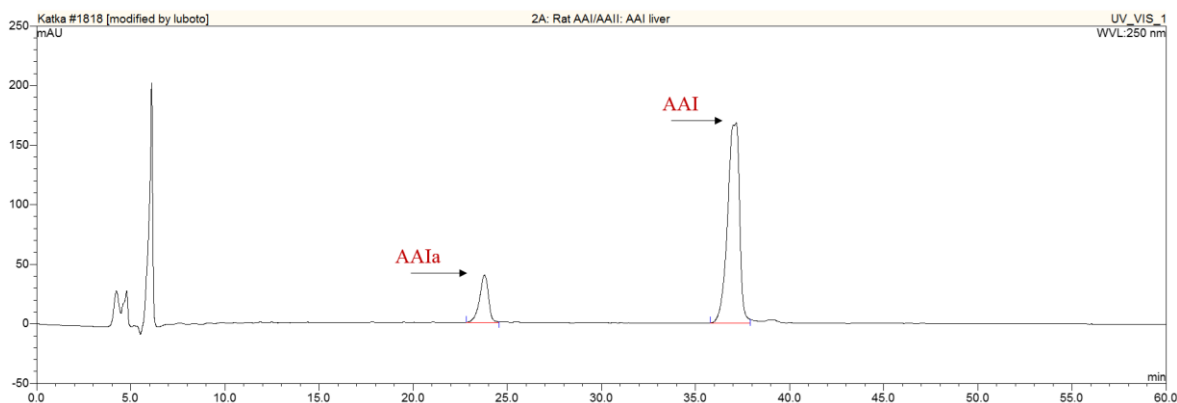
### 4.1 Oxidace AAI jaterními a ledvinnými mikrosomy potkanů premedikovaných AAI, AAI a směsí AAI s AAI

Experimenty této části bakalářské práce byly prováděny společně s Michaleou Balogovou. Některé ze získaných výsledků mohou být tedy presentovány i v její bakalářské práci.

Oxidace AAI cytochromy P450 v potkaních jaterních mikrosomech vede ke vzniku metabolického produktu, 8-hydroxyaristolochové kyseliny I (aristolochové kyseliny Ia, AAIA), která vzniká oxidační demethylací AAI<sup>40</sup>. AAIA je detoxikačním metabolitem AAI. V dřívějších studiích bylo zjištěno, že této reakce se účastní hlavně cytochromy P450 1A1/2 a zástupci cytochromů P450 podrodiny 2C<sup>13,40</sup>.

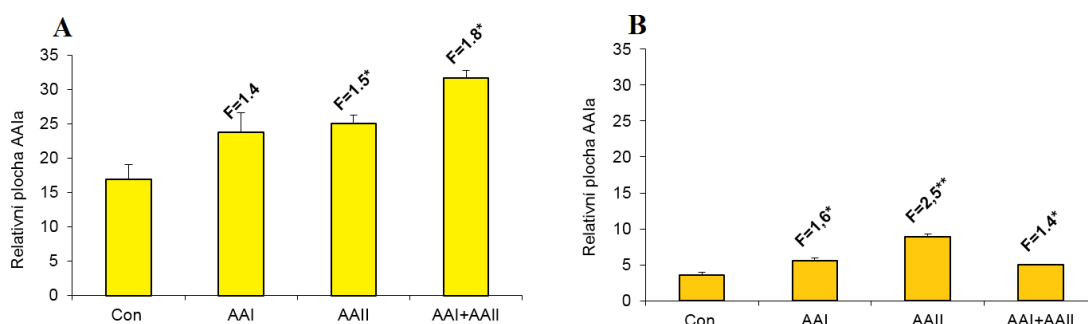
Schopnost oxidovat AAI na metabolický produkt AAIA byla měřena v jaterních a ledvinných mikrosomech izolovaných z testovaných skupin laboratorních potkanů premedikovaných AAI, AAI a AAI s AAI. Mikrosomy byly inkubovány s AAI v přítomnosti NADPH-generujícího systému. Pro extrakci metabolitu bylo použito organického rozpouštědla ethylacetátu. Organická fáze byla oddělena centrifugací. Ke zbylé vodné fázi byl opakovaně přidán stejný objem ethylacetátu a extrakce byla opakována, aby se díky tomu dosáhlo dokonalejší extrakce AAI a jeho metabolitu. Extrakty byly slity, odpařeny a dále uchovány při teplotě -20 °C. Před analysou byly extrakty rozpuštěny v methanolu a takto připravené vzorky byly analysovány metodou RP-HPLC.

Tvorba AAIA z AAI byla sledována pomocí metody HPLC (**obr. 11**). Při experimentu byla použita AAI a potkaní jaterní mikrosomy izolované ze zvířat premedikovaných AAI, AAI a směsí AAI s AAI. Detekce AAI a jejich metabolitů byla měřena při vlnové délce 250 nm. AAI byla eluována v retenčním čase 37,2 min. a metabolit AAIA v retenčním čase 23,8 min.



**Obr. 11:** HPLC produktů oxidace AAI na AAIA jaterními mikrosomy izolovanými z laboratorního potkana premedikovaného AAI. 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 30 µl vzorku, detekce při 250 nm.

Detoxikace AAI byla tedy měřena jako schopnost jaterních a ledvinných mikrosomů oxidovat AAI *in vitro*. Oxidace AAI byla analyzována se všemi typy izolovaných jaterních a ledvinných mikrosomů zvířat premedikovaných AAI, AAII a směsí AAI s AAII. Na **Obr. 12** je uvedeno množství AAIA vzniklého mikrosomálními enzymy, které ilustruje, že oxidace AAI závisí na použití jednotlivých premedikovaných skupin zvířat. Nejvyšší tvorbu AAIA vykazovaly mikrosomy potkanů premedikovaných směsí AAI a AAII (**obr. 12A**).



**Obr. 12:** Tvorba AAIA z AAI za katalysy jaterními (**A**) a ledvinnými (**B**) mikrosomy, izolovanými z potkanů premedikovaných AAI, AAII a směsí AAI s AAII. Hodnoty jsou průměrem ze tří stanovení \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  (Studentův t-test). F, faktor představující násobek zvýšení množství AAIA oproti kontrole.

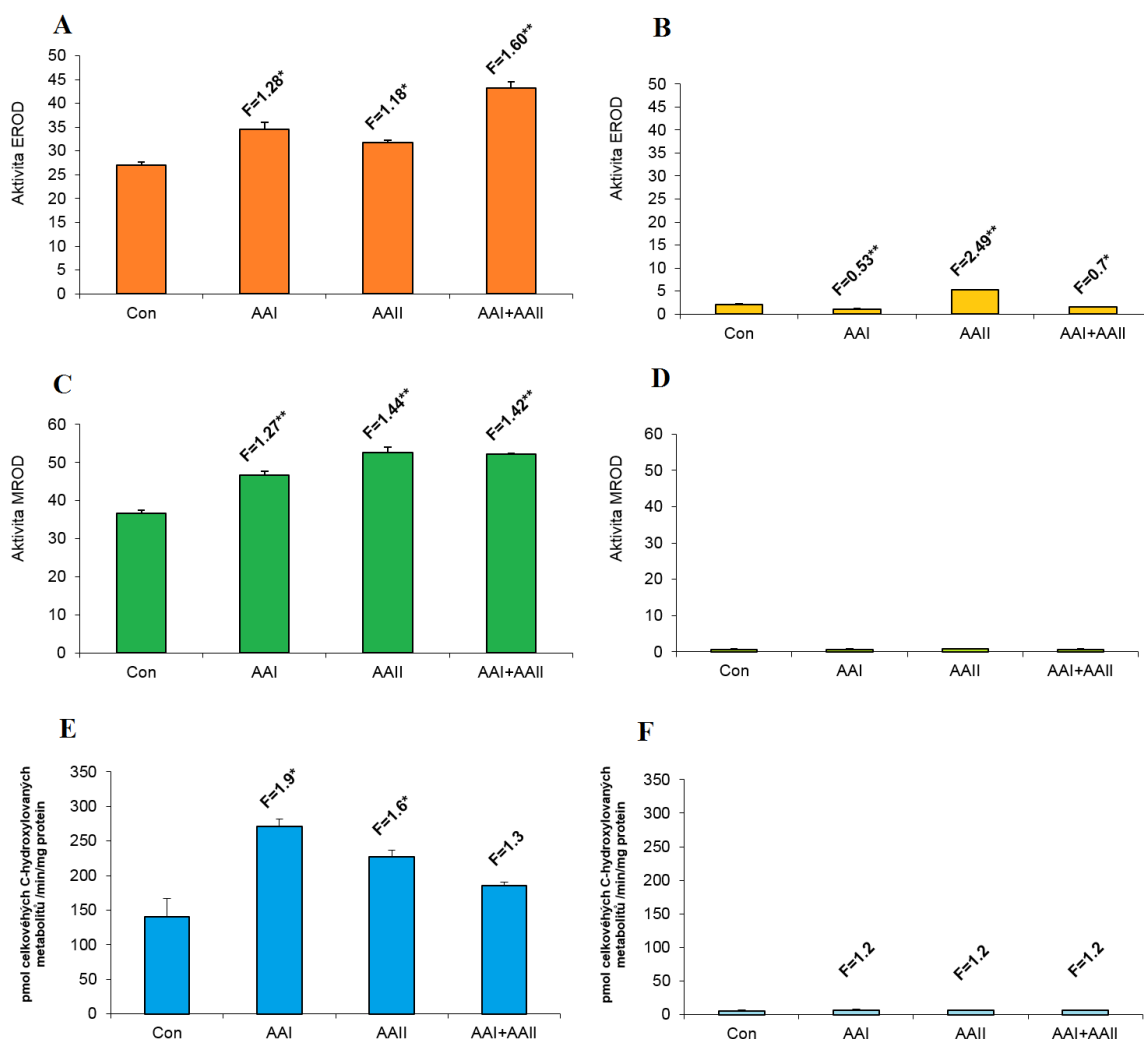
## 4.2 Vliv premedikace potkanů AAI, AAI a směsi AAI s AAI na aktivity enzymů systému oxidace se smíšenou funkcí (MFO systém)

### 4.2.1 Vliv premedikace potkanů AAI, AAI a směsi AAI s AAI na enzymovou aktivitu cytochromů P450 1A1 a 1A2

Jak již bylo zjištěno v dřívějších studiích, v metabolismu AAI hrají velmi důležitou roli CYP1A1 a 1A2, neboť mohou AAI oxidačně detoxikovat, ale i redukčně aktivovat<sup>48</sup>. CYP1A1 laboratorního potkana se jeví být v tomto směru účinnější než CYP1A2<sup>13</sup>. Avšak v lidských játrech se CYP1A1 projevuje jako méně efektivní než CYP1A2<sup>13,21,40</sup>. V bakalářské práci byly analysovány aktivity těchto enzymů ve všech testovaných mikrosomálních vzorcích jater a ledvin potkanů premedikovaných AAI, AAI a směsí AAI s AAI. Tedy těch mikrosomů, které vykazovaly schopnost *O*-demethylovat AAI. Enzymová aktivita CYP1A1 a 1A2 byla stanovena pomocí markerových reakcí, tedy *O*-deethylací ethoxyresorufinu (EROD) (CYP1A1/2) a *O*-demethylací methoxyresorufinu (MROD) (CYP1A2).

Další markerovou reakcí, díky které byla určena aktivita CYP1A1, byla oxidace Sudanu I (1-fenylazo-2-hydroxynaftol). Sudan I je totiž markerovým substrátem potkaního CYP1A1<sup>55</sup>.

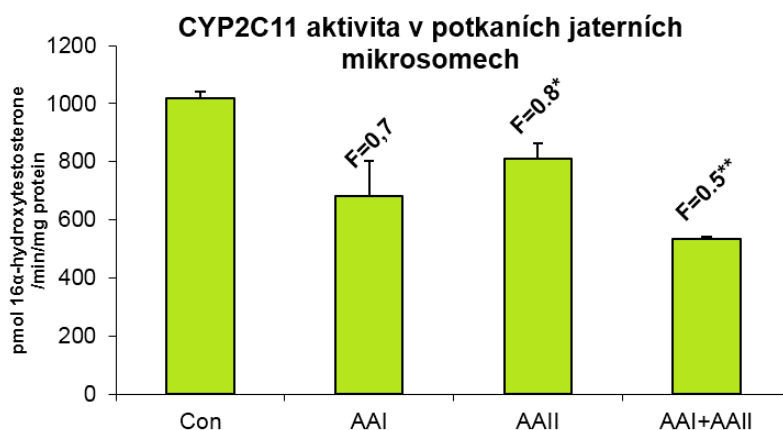
Na obrázku **13A, B** jsou uvedeny aktivity EROD ve sledovaných mikrosomech. Z obrázku je patrné, že CYP1A1/2 je mnohem aktivnější v játrech než v ledvině. Nejvyšší aktivitu EROD, oproti nepremedikovaným potkanům (kontrola), vykazují jaterní mikrosomy potkanů premedikovaných směsí AAI s AAI. Naopak v ledvině vykazuje nejvyšší aktivitu EROD mikrosomy skupiny zvířat premedikovaných AAI. Analogické výsledky byly zjištěny z analýzy MROD, přičemž v ledvinách je aktivita CYP1A2 velmi malá. V jaterních mikrosomech byla nejvyšší aktivita MROD pozorována v mikrosomech izolovaných ze zvířat premedikovaných AAI (**Obr.13 C,D**). Obrázek **13 E,F** ukazuje aktivitu jaterních a ledvinných mikrosomů oxidovat Sudan I. Jak bylo výše uvedeno, tato reakce je katalyzována hlavně prostřednictvím CYP1A1. Z obrázku **13** je patrné, že premedikace potkanů pomocí AAI, AAI a směsí AAI s AAI zvyšuje aktivitu jaterního CYP1A1, nejvíce v játrech potkanů premedikovaných AAI.



**Obr. 13:** Enzymová aktivita *CYP1A1/2* a *CYP1A1* v mikrosomech jater (**A,C,E**) a ledvin (**B,D,F**) potkanů vystavených působení AAI, AAI a směsi AAI s AAI. Aktivita *CYP1A1/2* byla stanovena jako EROD (vyjádřena v pmol resorufinu/min/mg proteinu (**A,B**)); enzymová aktivita *CYP1A2* v játrech (**C**) a ledvině (**D**) byla stanovena jako MROD (vyjádřena v pmol resorufinu/min/mg proteinu; enzymová aktivita *CYP1A1* v játrech (**E**) a ledvině (**F**) byla stanovena jako schopnost mikrosomů oxidovat Sudan I (vyjádřena v pmol C-hydroxylovaných metabolitů/min./mg proteinu. Hodnoty jsou průměrem ze tří stanovení; \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  (Studentův t-test). F, faktor představující násobek navýšení oproti kontrole.

#### 4.2.2 Vliv premedikace potkanů AAI, AAI a směsi AAI s AAI na enzymovou aktivitu cytochromů P450 2C11

Jak bylo zjištěno v dřívějších studiích, v metabolismu AAI hrají důležitou roli nejen cytochromy P450 1A1/1A2. Mezi další enzymy, participující na oxidaci AAI na AAIa, se řadí cytochromy P450 podrodiny 2C<sup>13,21,40</sup>. CYP2C a 1A jsou tedy zásadní pro detoxikaci AAI v potkaních játrech<sup>40</sup>. Podrodinu cytochromů P450 2C v potkaních játerních mikrosomech tvoří zejména dva majoritní zástupci, a to CYP2C6 a 2C11. CYP2C11 je v potkaních zastoupen z 50 % a CYP2C6 z 20 %<sup>59</sup>. Aktivita CYP2C11 byla stanovena pomocí 16 $\alpha$ -hydroxylace testosteronu jako markerové reakce<sup>13</sup>. Na obrázku 14 jsou uvedeny aktivity CYP2C11 v jednotlivých mikrosomech izolovaných ze zvířat premedikovaných AAI, AAI a směsí AAI s AAI a zvířat nepremedikovaných. Nejvyšší zjištěnou aktivitu CYP2C11 je možné pozorovat v mikrosomech nepremedikovaných potkanů. Expozice potkanů AAI, AAI a směsí AAI s AAI rezultovala ke snížení aktivity játerního CYP2C11 (obr. 14).

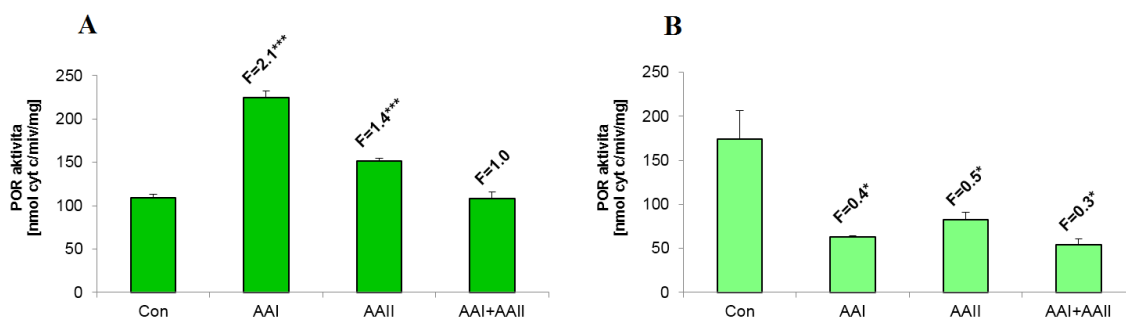


**Obr. 14:** Enzymová aktivita CYP2C11 v játerních mikrosomech izolovaných z potkanů premedikovaných AAI, AAI a směsí AAI s AAI. Aktivita CYP2C11 je uvedena v pmol 16 $\alpha$ -hydroxytestosteronu vztažených na minutu a mg proteinu. Hodnoty jsou průměrem ze tří stanovení; \* $p < 0,05$  a \*\* $p < 0,01$  (Studentův t-test). F, faktor představující násobek změny oproti kontrole.

#### 4.2.3 Vliv premedikace potkanů AAI, AAI a směsi AAI s AAI na enzymovou aktivitu NADPH:cytochromu P450 oxidoreduktasy (POR)

Mezi další enzymy MFO systému patří NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasa. Katalysuje redukci cytochromu P450 dvěma elektrony v průběhu jeho redukčního cyklu<sup>60</sup>. Účastní se však i redukce xenobiotik, mimo jiné také přeměny AAI a AAI. POR je tedy pro AA enzymem aktivačním (zejména v ledvinách), participující na tvorbě aduktů s DNA<sup>61</sup>. Nicméně podíl tohoto enzymu na této přeměně není zásadní<sup>40</sup>.

Všechny testované mikrosomy vykazují aktivitu POR. Z obrázku vyplývá, že v mikrosomech izolovaných z jater a ledvin potkanů premedikovaných AAI, AAI a směsi AAI s AAI, dochází ke snižování enzymové aktivity POR (obr. 15 AB).



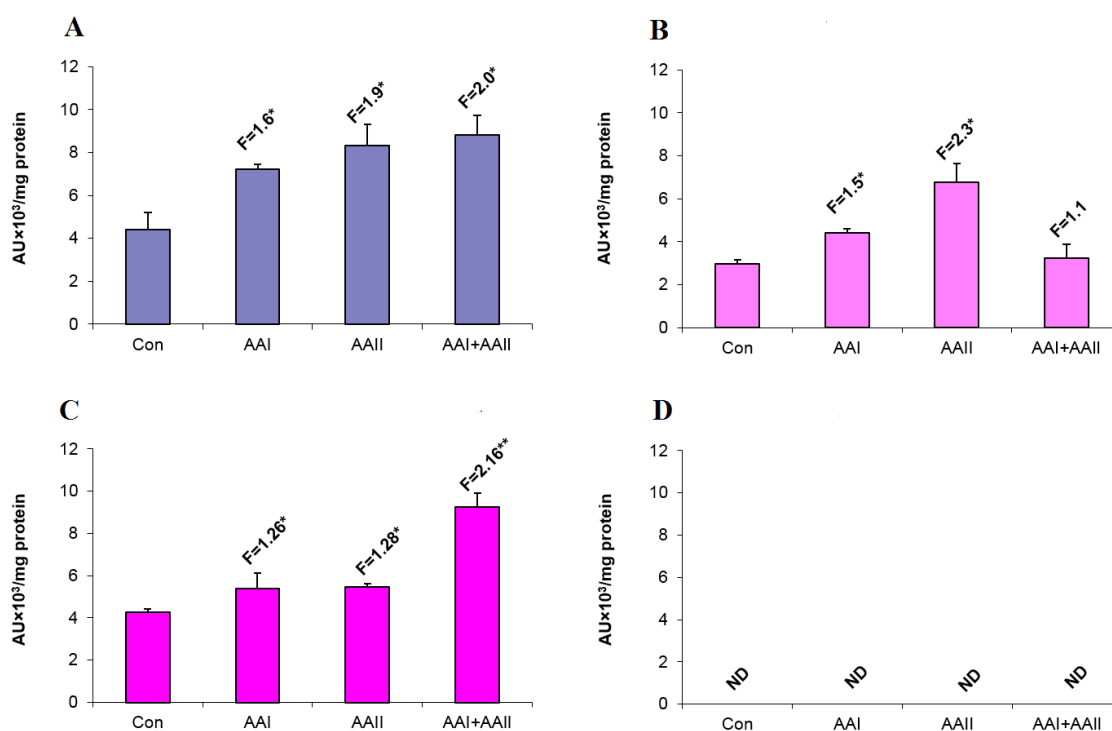
**Obr. 15:** Enzymová aktivita POR v jaterních (A) a ledvinných (B) mikrosomech izolovaných z potkanů premedikovaných AAI, AAI a jejich kombinací. Aktivita POR je uvedena v nmol vztažených na minutu a mg proteinu. Hodnoty jsou průměrem ze tří stanovení; \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  a \*\*\* $p < 0,001$  (Studentův t-test). F, faktor představující násobek zvýšení oproti kontrole.

#### 4.3 Vliv premedikace potkanů AAI, AAI a směsi AAI s AAI na proteinovou expresi cytochromů P450

##### 4.3.1 Vliv premedikace potkanů AAI, AAI a směsi AAI s AAI na proteinovou expresi cytochromů P450 1A1 a 1A2

Míra proteinové exprese byla stanovena pomocí metody „Western blot“ (kapitola 3.3.6. Analýza mikrosomálních proteinů pomocí metody „Western blot“). Jako primární protilátky byly použity králičí anti-CYP1A1 a anti-CYP1A2 proti potkaním CYP1A1 a 1A2. Při použití sekundární protilátky bylo využito navázané alkalické fosfatasy a pro vizualizaci byl použit substrát tohoto enzymu (BCIP/NBT). Za použití imunochemické detekce cytochromu P450 1A1 a 1A2 byly získány následující výsledky.

Obrázek 16 ukazuje exprese proteinů sledovaných enzymů v mikrosomech izolovaných ze zvířat premedikovaných AAI, AAI a směsí AAI s AAI. Proteinová exprese CYP1A1 i CYP1A2 je efektivnější v jaterních mikrosomech ve srovnání s mikrosomy ledvinnými v závislosti na vystavení experimentálních zvířat působení testovaných látek. Expese CYP1A2 v ledvinných mikrosomech zvířat premedikovaných AAI, AAI a směsí AAI s AAI nebyla detekována vůbec. Na obr. 16A je viditelný nárůst proteinové exprese CYP1A1 způsobený vystavením zvířat působení AAI, AAI a směsí AAI s AAI. Analogické výsledky jsou patrné pro CYP1A2 (obr. 16C). Expese sledovaných aktivit CYP1A koreluje s aktivitami těchto enzymů (obr. 13).



**Obr. 16:** Proteinová exprese CYP1A1 a CYP1A2 v jaterních (A,C) a ledvinných (B,D) mikrosomech; hodnoty jsou vyjádřeny jako jednotka AU na mg proteinu. ND, expese proteinu CYP1A2 nebyla detekována. Hodnoty jsou průměrem ze tří stanovení; \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  a \*\*\* $p < 0,001$  (Studentův *t*-test). *F*, faktor představující násobek zvýšení oproti kontrole.

V této bakalářské práci byla sledována i exprese proteinu CYP2C11. Nicméně metodou „Western blot“ nebyly získány reprodukovatelné výsledky.

Chceme-li shrnout získané výsledky, je možné konstatovat, že enzymová aktivita CYP1A1, 1A2, 2C11 a POR sledovaná v mikrosomech jater a ledvin laboratorního potkana premedikovaného AAI, AAII a směsí AAI s AAII ilustruje, že jejich exprese a aktivity závisí na premedikaci zvířat AAI, AAII a jejich směsí. Tato skutečnost se v případě CYP1A1 a 1A2 a zobrazuje ve zvýšení schopnosti oxidovat AAI na metabolit AAIIa v jaterních a ledvinných mikrosomech potkanů premedikovaných AAI, AAII a směsí AAI s AAII (obr. 12).

## 5. Závěr

Cílem předkládané bakalářské práce bylo objasnit vliv aristolochových kyselin na expresi a aktivity enzymů, které participují na jejich metabolismu. Získané výsledky lze shrnout následovně:

- ❖ Oxidace AAI na AAIAa jaterními a ledvinnými mikrosomy byla zvýšena premedikací potkanů AAI, AAII a směsí AAI s AAII.
- ❖ Z enzymů, které na demethylaci AAI na AAIAa participují, byly premedikací potkanů AAI, AAII a směsí AAI s AAII zvýšeny aktivity i proteinové exprese CYP1A1 a 1A2. Naopak aktivity CYP2C11 byla premedikací potkanů snížena.
- ❖ Aktivita NADPH:CYP reduktázy byla premedikací zvířat AAI a AAII zvýšena v játrech a snížena v ledvinách.

Získané výsledky mohou rozšířit poznatky o ovlivnění metabolismu aristolochových kyselin I a II po působení přímo těchto látek v organismech exponovaných těmito toxikantům. Tyto výsledky budou dále využity při dalším studiu funkcí enzymů podílejících se na metabolismu aristolochových kyselin.

## Použitá literatura

- (1) Devi, P. U.: *Health Ad.* 17, 16-24 (2004)
- (2) Stratil, P., Kubáň, V.: *Chem. Listy* 98, 379-384 (2004)
- (3) Stiborová, M., Mikšanová, M.: *Živa* 4, 146 (1999)
- (4) [https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/ps13/genotox/web/pages/01\\_nador.html](https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/ps13/genotox/web/pages/01_nador.html) (přístup 22. 2. 2016)
- (5) Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walther, P.: *Základy buněčné biologie*, Espresso Publishing, Ústí nad Labem (1998)
- (6) Voet, D., Voet, J. G.: *Biochemistry* (3<sup>th</sup> Edition), John Wiley & Sons, Inc. (2004)
- (7) Martínková, M.: *Klinická a analytická biochemie*, přednáška PřF UK, katedra biochemie, Praha (2015)
- (8) Warburg, O.: *Science*, 123, 309-314, (1956)
- (9) Seyfried, T. N., Flores, R. E., Poff, A. M., D'Agostino, D. P.: *Carcinogenesis* 35, 515-527, (2014)
- (10) Wanke, S., González, F., Neinhuis, Ch.: *Int. J. Plant Sci* 167, 1215-1227, (2006)
- (11) [https://cs.wikipedia.org/wiki/Podra%C5%BEec#/media/File:362\\_Aristolochia\\_clematitis.jpg](https://cs.wikipedia.org/wiki/Podra%C5%BEec#/media/File:362_Aristolochia_clematitis.jpg), přístup 31. 3. 2016
- (12) Kumar, V., Prasad A. K., Parmar V. S.: *Nat. Prod. Rep.* 20, 565-583, (2003)
- (13) Dračínská, H., Bárta, F., Levová, K., Hudecová, A., Moserová, M., Schmeiser, H.H., Kopka, K., Frei, E., Arlt, V.M., Stiborova, M.: *Toxicology*, 7-18, 344-346, (2016)
- (14) Jadot, I., Decleves, A.E., Nortier, J., Caron, N.: *Int. J. Mol. Sci* 18, 297 (2017)
- (15) Michl, J., Ingrouile, M. J., Simmonds, M. S. J., Heinrich, M.: *Nat. Prod. Rep.* 31, 676-693, (2014)
- (16) Grollman, A. P.: *Envirom. Mol. Mutagenesis* 54, 1-7, (2013)
- (17) Stiborova, M., Frei, E., Schmeiser, H., H.: *Chem. Listy* 94, 186-189, (2000)
- (18) Arlt, V. M., Stiborova, M., Schmeiser, H. H.: *Mutagenesis* 17, 265-277, (2002)
- (19) Debelle, F. D., Vanherweghem, J. L., Nortier, J. L.: *Kidney Int.* 74, 158-169, (2008)
- (20) Arlt, V. M., Stiborova, M., Brocke, J.: *Carcinogenesis* 28, 2253-2261, (2007)
- (21) Stiborova, M., Arlt, V.M., Schmeiser, H.H.: *Arch Toxicol* 90, 2595-2615, (2016)
- (22) Stefanovic, V., Toncheva, D., Polenakovic, M.: *Clinic. Nephrol* 83, 64-69, (2015)
- (23) Schiller, A., Gunsbeth-Tatomir, P., Pavlovic, O., Ferluga, D., Spasovski, G., Covic, A.: *J. Nephrol.* 21, 673-680, (2005)
- (24) Stiborova, M., Patočka, J., Frei, E., Schmeiser, H.H.: *Chem. Listy* 99, 782-788, (2005)

- (25) Toncheva, D., Dimitrov, T., Stojanova, S.: *Euro. J. Epidem.* 14, 389-394, (1998)
- (26) Arlt, V.M., Ferluga, D., Stiborová, M., Pfohl-Leszkowicz, A., Vukelic, M., Ceovic, S., Schmeiser, H.H., Cosyns, J.P.: *Int. J. Cancer* 101, 500-502, (2002)
- (27) Randerath, K., Randerath, E.: *Drug Metab. Rev.* 26, 67-85, (1994)
- (28) Grollman, A.P., Jelakovic, B.: *J. Am. Soc. Nephrol.* 18, 2817-2823, (2007)
- (29) Vanherweghem, J-L., Depierreux, M., Tleemans, Ch., Abramowicz, D., Dratwa, M., Verbeelen, D., Vanhaelen-Fastre, R., Vanhaelen, M.: *Lancet* 341, 387-391, (1993)
- (30) Nortier, J.L., Muniz Martinez, 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, 1668-1682, (2000)
- (31) Vanherweghem, J-L.: *Lancet* 350, 1858, (1997)
- (32) Nortier, J-L., Vanherweghem, J-L.: *Toxicology*, 181-182, (2002)
- (33) Vanhaelen, M., Vanhaelen-Fastre, R., But, P., Vanherweghem, J-L.: *Lancet* 343, 174, (1994)
- (34) De Broe, M.E.: *Kidney Int.* 81, 513-515, (2012)
- (35) Bieler, C.A., Stiborova, M., Wiessler, M., Cosyns, J-P., Wan Ypersel de Strihov, C., Schmeiser, H.H.: *Carcinogenesis* 18, 1063-1067, (1997)
- (36) Schmeiser, H.H., Frei, E., Wiessler, M., Stiborova, M.: *Carcinogenesis* 18, 1055-1062, (1997)
- (37) Arlt, V.M., Wiessler, M., Schmeiser, H.H.: *Carcinogenesis* 21, 235-242, (2000)
- (38) Cosyns, J-P.: *Drug Safety* 26, 33-48, (2003)
- (39) Schmeiser, H.H., Jansen, J.W.G., Kyons, J., Scherf, H.R., Pfau, W., Buchmann, A., Bartram, C.R., Wiessler, M.: *Cancer Res.* 50, 5464-5469, (1990)
- (40) Stiborova, M., Frei, E., Arlt, V.M., Schmeiser, H.H.: *Mutat. Res.* 658, 55-67, (2008)
- (41) Knejzlík, Z., Káš, J., Ruml, T.: *Chem. Listy* 94, 913-918, (2000)
- (42) Chromá, L., Macková M., Macek, T., Martínek, V., Stiborová, M.: *Chem. Listy* 95, 212-222, (2001)
- (43) Stiborová, M.: *Biochemie II*, přednáška PŘF UK, katedra biochemie, Praha, (2015)
- (44) Krumbiegel, G., Hallensleben, J., Mennicke, W.H., Rittmann, N.: *Xenobiotica* 17, 981-991, (1987) dle Arlt, V. M., Stiborová, M., Schmeiser, H. H.: *Mutagenesis* 17, 265-277, (2002)
- (45) Chan, W., Cu, L., Xu, G., Cai, Z.: *Rapid Commun Mass Spectrom.* 20, 171-177, (2006)
- (46) Maier, P., Schawalder, H., Weibel, B.: *Environ. Mol. Mutagen.* 10, 275-281, (1987) dle Stiborová, M., Frei, E., Arlt, V.M., Schmeise, H.H.: *Mutat. Res.* 658, 55-67, (2008)

- (47) Chan, W., Luo, H-B., Zheng, Y., Cheng, Y-K., Cai, Z.: *Drug Metab. Dispos.* 35, 866-874, (2007)
- (48) Stiborová, M., Frei, E., Arlt, V.M., Schmeiser, H.H.: *Biomed. Pap.* 153, 5-12, (2009)
- (49) Stiborová, M., Mares, J., Levová, K., Pavlickova, J., Barta, F., Hodek, P., Frei, E., Schmeiser, H.H.: *Neuroendocrinol Lett*, 32, 101-110, (2011)
- (50) Stiborová, M., Frei, E., Hodek, P., Wiessler, M., Schmeiser, H.H.: *Int. J. Cancer* 113, 189-197, (2005)
- (51) Stiborová, M., Frei, E., Sopko, B., Sopková, K., Marková, V., Laňková, M., Kumštýřová, F., Wiessler, M., Schmeiser, H.H.: *Carcinogenesis* 24, 1695-1703, (2003)
- (52) Stiborová, M., Levová, K., Bárta, F., Shi, Z., Frei, E., Schmeiser, H.H., Nebert, D.W., Phillips, D.H., Arlt, V.M.: *Tox. Sci.* 125, 345-358, (2012)
- (53) Stiborová, M., Frei, E., Schmeiser, H.H.: *Kidney Int.* 73, 1209-1211, (2008)
- (54) Štítková, J., Hudeček, J., Hodek, P., Frei, E., Schmeiser, H.H., Stiborová, M.: *Neuroendocrinol. Lett.* 29, 731-733, (2008)
- (55) Stiborová, M.: *Cancer Res.*, 62 5678-5684, (2002)
- (56) Stiborová, M.: *Cancer Lett.* 220, 145-154, (2005)
- (57) Ernster, L.: *Methods Enzymol.* 10, 309-317, (1967)
- (58) Mrízová, I.: Diplomová práce, Přírodovědecká fakulta, katedra biochemie, (2012)
- (59) Bárta, F.: Disertační práce, Přírodovědecká fakulta, katedra biochemie, (2016)
- (60) Andersen, T.B., Hansen, N.B., Laursen, T., Weitzel, C., Simonsen, H.T.: *Mol. Phylogen. Evo*, 98, 21-28, (2016)
- (61) Stiborova, M., Sopko, B., Hodek, P., Frei, E., Schmeiser, H.H., Hudeček, J.: *Cancer Lett.* 229, 193-204, (2005)