

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

**Přírodovědecká fakulta**

**Katedra biochemie**



Studium etiologie nádorů močových cest  
provázející Balkánskou endemickou  
nefropatii

**Bakalářská práce**  
**studijního programu Klinická a toxikologická analýza**

Kristýna Charvátová

Školitel: Prof. RNDr. Marie Stiborová, DrSc.



## Prohlášení

Já, **Kristýna Charvátová**, studentka 3. ročníku Přírodovědecké fakulty, Praha 2, Albertov 6, 128 43 – součástí Univerzity Karlovy v Praze se sídlem v Praze 1, Ovocný trh 3-5, 116 36 (IČO: 00216208) jsem v rámci plnění svých studijních povinností vypracovala v akademickém roce 2008/2009 bakalářskou práci s názvem „**Studium etiologie nádorů močových cest provázející Balkánskou endemickou nefropatii**“, která má povahu školního díla ve smyslu § 60 z.č. 121/2000 Sb. ve znění pozdějších předpisů. Při vypracování bakalářské práce jsem využívala vybavení vysoké školy, její knihovní fondy a sbírky. Při vypracování bakalářské práce mi byla nápomocna **Prof. RNDr. Marie Stiborová, DrSc.** jako školitel. Až na výše uvedené jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně s použitím literatury, která je v bakalářské práci citována.

S přihlédnutím k výše uvedeným skutečnostem a podmínkám, za nichž školní dílo vzniklo, uděluji tímto Univerzitě Karlově v Praze se sídlem v Praze 1, Ovocný trh 3-5, 116 36 (IČO: 00216208) a její součásti Přírodovědecké fakultě Praha 2, Albertov 6, 128 43 svolení k užití výše specifikovaného školního díla, a to zejména pro vnitřní potřeby vysoké školy a její reprezentaci.

Dále se zavazuji výše specifikované školní dílo sama užít a jinému poskytnout licenci pouze s předchozím písemným souhlasem Univerzity Karlovy v Praze se sídlem v Praze 1, Ovocný trh 3-5, 116 36 (IČO: 00216208) a její součásti Přírodovědecké fakulty, Praha 2, Albertov 6, 128 43. Vysoká škola a její zmíněná součást tento souhlas udělí, pokud užití tohoto školního díla jeho autorem a poskytnutí licence jinému není v rozporu s jejími oprávněnými zájmy. Jsem srozuměna s tím, že vysoká škola a její součást jsou oprávněny požadovat, abych jim jako autor školního díla z výtěžku mnou dosaženého v souvislosti s užitím tohoto díla či poskytnutí licence jinému přiměřeně přispěla na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše. Přitom se přihlédne k výši výtěžku dosaženého vysokou školou a její součástí z užití školního díla dle předchozího odstavce.

Jsem si vědoma své odpovědnosti za škodu způsobenou vysoké škole a její součástí porušením povinností, které vyplývají z obecně závazných právních předpisů a tohoto prohlášení, a zavazuji se případnou takto způsobenou škodu vysoké škole a její součástí uhradit.

Toto prohlášení činím na základě své pravé vůle, svobodně, vážně, srozumitelně, určitě, nikoliv v tísní a pod nátlakem. Na důkaz toho připojuji svůj vlastnoruční podpis.

V Praze dne ..... 20. 8. 2009 .....

.....  
Charvatová Kristýna

podpis

Děkuji své vedoucí bakalářské práce Prof. RNDr. Marii Stiborové, DrSc. za odborné vedení, cenné rady a připomínky. Zvláště pak za trpělivost a ochotu kdykoliv poradit.

Dále bych chtěla poděkovat všem členům kateder biochemie a analytické chemie za vše, co mě naučili a za poskytnutí cenných rad. A samozřejmě musím poděkovat členům katedry biochemie za vstřícné prostředí a možnost pracovat na bakalářské práci v jejich společnosti.

# Obsah

<b>1. Úvod</b>	<b>9</b>
1. 1. Toxicita chemických sloučenin.....	10
1. 2. Účinky toxických látek na lidský organismus.....	12
1. 3. Karcinogenita chemických sloučenin.....	14
1. 4. Mechanismus karcinogeneze.....	15
1. 5. Toxicita rostlinných látek.....	19
1. 5. 1. Klasifikace rostlinných jedů.....	19
1. 5. 1. 1. Rostlinné alkaloidy.....	19
1. 5. 1. 2. Rostlinné glykosidy.....	20
1. 5. 1. 3. Rostlinné silice.....	22
1. 5. 1. 4. Rostlinné toxické aminokyseliny.....	22
1. 5. 1. 5. Rostlinné kyseliny.....	22
1. 5. 1. 6. Terpeny.....	23
1. 6. Aristolochové kyseliny.....	24
1. 6. 1. Rostlinné jedy z rodu Aristolochia a jejich účinky na lidský organismus.....	24
1. 6. 2. Zařazení rostlin rodu Aristolochia do biologického systému....	24
1. 6. 3. Klasifikace čeledi Aristolochaceae.....	25
1. 6. 4. Aristolochové kyseliny a jejich chemická klasifikace.....	25
1. 6. 5. Karcinogenita a nefrotoxicita Aristolochových kyselin.....	26
1. 6. 6. Metabolismus aristolochových kyselin.....	27
1. 6. 6. 1. Metabolická aktivace aristolochových kyselin.....	29
1. 6. 6. 2. Detoxikační metabolismus aristolochových kyselin....	33
1. 6. 6. 3. Enzymy účastníci se metabolismu aristolochových kyselin.....	33
1. 6. 6. 3. 1. NAD(P)H:chinonoxidoreduktáza.....	33
1. 6. 6. 3. 2. Cytochrom P450.....	33
1. 7. Nefropatie jako ledvinné onemocnění.....	36
1. 7. 1. Balkánská endemická nefropatie - BEN.....	37
1. 7. 2. Nefropatie vyvolaná aristolochovými kyselinami - AAN.....	40
<b>2. Cíl bakalářské práce.....</b>	<b>44</b>

<b>3. Materiál a metody.....</b>	<b>45</b>
<b>3. 1. Použitý materiál a chemikálie.....</b>	<b>45</b>
<b>3. 2. Přístroje.....</b>	<b>45</b>
<b>3. 3. Metody.....</b>	<b>46</b>
<b>3. 3. 1. Popis metody HPLC.....</b>	<b>46</b>
<b>3. 3. 1. 1. Postup separace AAI a jejího metabolitu pomocí HPLC.....</b>	<b>48</b>
<b>3. 3. 2. Příprava standardů aristolochové kyseliny I pro HPLC.....</b>	<b>48</b>
<b>3. 3. 3. Oxidace aristolochové kyseliny I cytochromy P450 jaterních mikrosomů potkana premedikovaného <math>\beta</math>-naftoflavonem, Sudanem I, fenobarbitalem a potkana bez premedikace.....</b>	<b>49</b>
<b>4. Výsledky.....</b>	<b>51</b>
<b>5. Diskuze.....</b>	<b>54</b>
<b>6. Závěr.....</b>	<b>55</b>
<b>Seznam použité literatury.....</b>	<b>56</b>

## *Seznam použitých zkratek*

A	adenin
AA	aristolochová kyselina
AAs	aristolochové kyseliny
AAI	aristolochová kyselina I
AAIa	metabolit aristolochové kyseliny AAI
AAII	aristolochová kyselina II
AAN	Nefropatie způsobená aristolochovými kyselinami
BEN	Balkánská endemická nefropatie
$\beta$ -NF	$\beta$ -naftoflavon
CHN	Nefropatie vyvolaná čínskými bylinami
COX	cyklooxygenáza
CPR	NADPH:CYP reduktáza
CYP	cytochrom P450
CYPs	cytochromy P450
dA-AA I	7-(deoxyadenosin-N <sup>6</sup> -yl)aristolaktam I
dG-AA I	7-(deoxyguanosin-N <sup>2</sup> -yl)aristolaktam I
DNA	deoxyribonukleová kyselina
G	guanosin
LD <sub>100</sub>	maximální letální dávka
LD <sub>50</sub>	střední letální dávka
MS	mikrosomy
NQO1	NAD(P)H:chinonoxidoreduktáza
NADP <sup>+</sup>	nikotinamidadeninukleotidfosfát – oxidovaná forma
NADPH	nikotinamidadeninukleotidfosfát – redukováná forma
NADPH-GS	NADPH generující systém
PB	fenobarbital
SULT	sulfotransferáza
T	thymin
TD <sub>50</sub>	střední toxická dávka
TEAA	triethylaminacetátu
WHO	World Health Organization

### ***Předmětová hesla***

biochemie, toxikologie

### ***Klíčová hesla***

aristolochové kyseliny, nefropatie, HPLC, rostlinné jedy, karcinogenita, nefrotoxicita, Balkánská endemická nefropatie, nefropatie způsobená aristolochovými kyselinami, metabolismus



## 1. Úvod

V naší populaci jsou nejčastější příčinou smrti kardiovaskulární choroby. Druhý největší počet úmrtí mají na svědomí onemocnění nádorová.

Nádorová onemocnění jsou v mnohém odlišná, ale najdeme zde minimálně jeden společný rys. Vždy dojde ke změně v genetické informaci v DNA buněčného jádra. Změněná buňka se postupně začne vymaňovat z regulačních mechanismů celého organismu a „žije vlastním životem“, nekontrolovatelně se množí a šíří svou genetickou informaci do okolí.

Nádory rozlišujeme benigní a maligní. Benigní nádory jsou pro člověka méně nebezpečné, pokud jsou odhaleny včas. U maligních nádorů dochází k nekontrolovanému dělení bez možnosti odhadnout jejich další vývoj. V případě maligních nádorů dochází často též k jejich metastázování. Metastázi označujeme uvolnění některých nádorových buněk a jejich průnik do krevního řečiště nebo do lymfatického systému, jímž jsou dále šířeny po celém organismu.

V předkládané bakalářské práci jsem se zabývala shromážděním informací o nádorových onemocněních ledvin provázejících chorobu označovanou jako Balkánská endemická nefropatie (BEN). Toto onemocnění postihuje především obyvatele oblastí kolem řeky Dunaje na Balkánském poloostrově. Nefropatie způsobená aristolochovými kyselinami (AAN), dříve nazývaná též Nefropatie vyvolaná čínskými bylinami (CHN) je svými příznaky a podobným průběhem velice blízká Balkánské endemické nefropatii, avšak její výskyt v populaci je značně rozdílný. AAN postihla řadu žen absolvujících speciální léčivý program, který jim měl dopomoci k redukci jejich tělesné hmotnosti (Brusel, Belgie). U obou těchto nefropatií jsou jejich předpokládaným původcem aristolochové kyseliny, přičemž u AAN již byl tento předpoklad definitivně potvrzen. V případě BEN se na prokázání tohoto předpokladu dále pracuje.

## 1. 1. Toxicita chemických sloučenin

Toxikologie je, jak název napovídá, nauka o jedech. Pojem "jed" je však pojem velmi široký. Jedem je každá sloučenina, která vyvolává poruchu biologických rovnováh, charakteristických pro zdravý organismu. Pro takový děj je navíc rozhodující především dávka, která do organismu vstupuje.<sup>11</sup> Tuto skutečnost zdůrazňoval již Paracelsus (1493-1541):

„Dosis sola facit ut venenum non sit.“

(Je to dávka, která určuje, zda nejde o jed.)<sup>7</sup>

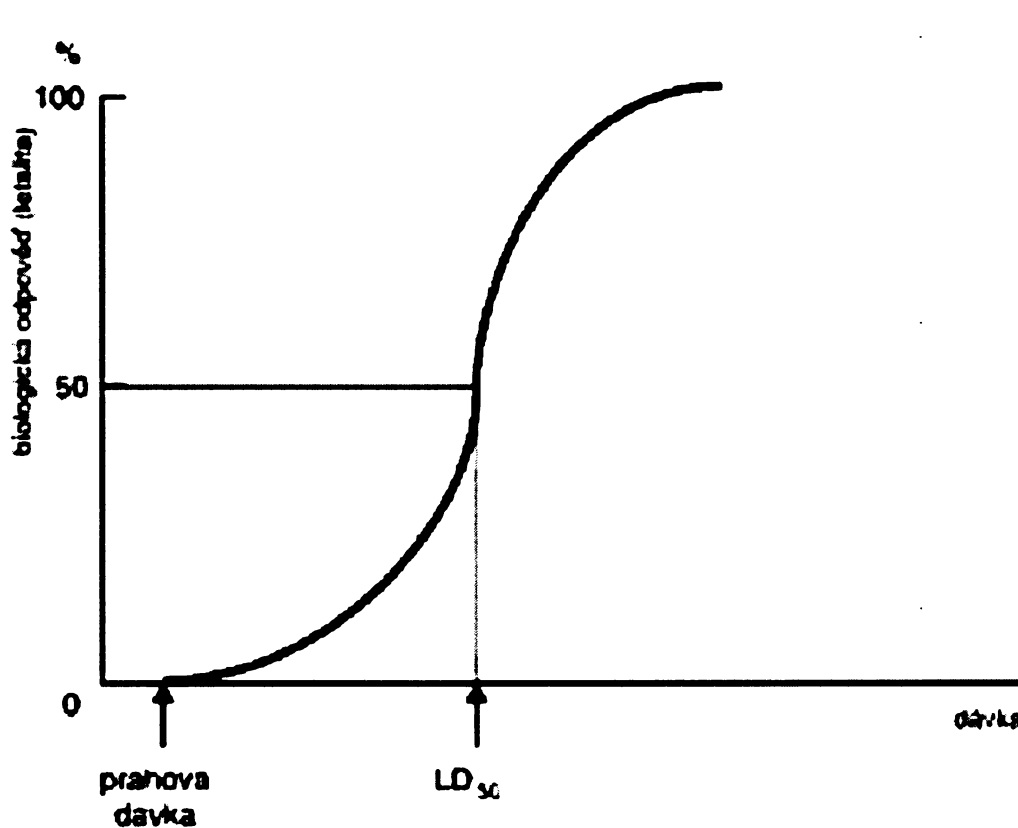
Jak praví Velký lékařský slovník z roku 2004 „slovo toxický znamená též jedovatý, mající škodlivé účinky na živý organismus. Příčina toxického účinku je různá. Jedy mohou zasahovat do látkové výměny buněk, blokovat využití kyslíku buňkami (kyanidy), blokovat nervový přenos (atropin, botulotoxin, kurare), poškozovat některý orgán.“<sup>8</sup>

Toxicita neboli jedovatost (z řeckého - poisonousness) je míra vlivu jakým působí jedovaté látky na živé organismy. Jak již bylo uvedeno, vědecký obor zabývající se těmito vlivy, jejich příčinami a důsledky je označován jako toxikologie.<sup>9,11</sup>

Toxicitu lze zkoumat z hlediska vlivu na celé organismy, jako je živočich, rostlina, bakterie, nebo pouze na stav jejich specifických částí jako jsou orgány těla např. játra či plíce. Můžeme zkoumat také působení toxických látek na skupiny živých organismů či celá společenství. Rozhodující je přitom toxický vliv sledovaného agens na člověka. Tato agens mohou organismus ovlivnit okamžitě nebo mohou působit velmi pomalu a zákeřně likvidovat živé buňky, až konečně, mnohdy po letech pomalého postupu, dojde k usmrcení celého organismu. Většina obecně známých toxických látek rostlinného původu patří do skupiny rychle působících jedů. Je si třeba však uvědomit, že i u některých rostlinných produktů se toxický efekt projeví až po delší době působení.<sup>10,11,13,14</sup>

Toxicitu vyjadřujeme kvantitativně, nejčastěji velikostí dávky potřebné k dosažení určitého účinku. Toxicita je jen výjimečně lineárně úměrná dávce. Tato závislost je mnohem častěji exponenciální nebo může mít křivka závislosti sigmoidální tvar (*graf*

1.1.). Kvantitativní vyjádření toxicity tedy není jednoduché. Nejčastěji se k jejímu vyjádření užívá statisticky zjištěných parametrů: **Minimální smrtelná dávka** (dosis letalis minima) což je nejmenší dávka, která usmrtí jednoho zástupce experimentálního souboru. **Maximální smrtelná dávka** (dosis letalis maxima, LD<sub>100</sub>) je pak nejmenší dávkou, při které zahyne 100% pokusných jedinců. Avšak obě tato vyjádření nejsou dostatečně informativní, neboť neudávají pouze vlastnost jedu, ale též menší či větší odolnost některého z jedinců experimentálního souboru. Proto se zavádí **střední smrtelná dávka** (dosis letalis media, LD<sub>50</sub>), při které je usmrcena polovina pokusných zvířat. Při dostatečně velkém souboru tento parametr není ovlivňován individuální citlivostí zvířat. Při aplikaci na jiný živočišný druh, zvláště na člověka, je však třeba opatrnosti, neboť mezidruhové rozdíly v reakci na toxin jsou značné. Např. LD<sub>50</sub> atropinu pro člověka je 1,5 mg/kg, avšak pro králíka, který je schopen tento alkaloid štěpit, je LD<sub>50</sub> 1500 mg/kg. Méně spolehlivým ukazatelem toxicity je **střední toxická dávka** (dosis toxica media, TD<sub>50</sub>), která způsobí u poloviny zvířat v souboru určité toxické příznaky.<sup>11,12,14</sup>



Graf 1.1. - Typická závislost biologické odpovědi (toxicity) na dávce toxické látky (převzato z<sup>12)</sup>)

## 1. 2. Účinky toxických látek na lidský organismus

Reakce organismu na jed bývá různá. Závisí na citlivosti jedince k danému typu látky. Pokud je člověk oslaben chronickou chorobou či nemá dostatečně fungující játra nebo ledviny jsou účinky otravy patrné mnohem dříve než u zdravého jedince. Také je nutno konstatovat, že otravy dětské populace nastávají při podání mnohem nižší dávky toxinu, i přesto, že požití takovéto dávky je pro dospělého člověka buď netoxická či spojena jen s lehkými zdravotními obtížemi. Ve stáří organismus často reaguje podobně jako v dětství. Určitým typem přímé reakce oslabeného organismu na toxin je i alergie. Alergická reakce se projevuje různým způsobem (dermatitida, kopřivka, astmatický záchvat, prudký zánět sliznic apod.) a v krajním případě může vést k šoku i smrti organismu.<sup>11,20</sup>

V případě rostlinných jedů může být rozdílná reakce způsobena také rozdílným obsahem jedů ve stejné hmotnostní jednotce různých částí téže rostliny. Některé části rostliny mohou být výrazně toxičtější než jiné. Obsah jedu závisí na vegetačním období, na klimatických a půdních podmínkách a dokonce jsou známy i případy, kdy některé populace daného druhu produkují jedy a jiné nikoliv.<sup>2,3,15</sup>

Častým projevem intoxikací *trávicího traktu* je zvracení (vomitus), který je vyvoláván celou řadou rostlinných jedů (může však být vyvolán i psychicky, neboť jde o reflexní reakci). Jde o primární snahu organismu zbavit se toxinu. Toxické látky působící na *nervový systém* mohou vyvolávat efekty, které se projevují v rychlosti, koordinaci a kontrakci svaloviny. Některé toxiny mohou způsobit až celkovou (popřípadě částečnou) paralýzu organismu (či některé jeho části). Dalším tělním systémem, který může toxin ovlivnit je *dýchací soustava*. Toxiny působí buď přímo na danou část dýchací soustavy, či přes sliznice pronikají až k nervovému systému. Proto při otravách může docházet k útlumu nervového centra v mozku, které má na starosti dýchání jedince. Některé toxické látky mohou vyvolat poruchu srážení, jiné naopak mohou shlukovat erytrocyty a další mohou narušit jejich buněčné membrány. Všechny tyto poruchy jsou fatální pro organismus, neboť dojde k narušení důležitých funkcí *cévního systému* a to zvláště funkci transportní (transport kyslíku, živin, hormonů...). Mnoho toxických látek

přicházejících krevním oběhem z trávicího systému poškozuje játra. Poškození jater může být akutní až okamžitě smrtelné nebo pozvolné s progresivním průběhem. Játra jsou rovněž orgánem, kde jsou toxické látky metabolizovány. Látky, které jsou játry detoxikovány, postupují dále do ledvin, kde mohou způsobit jejich vážné poškození, vedoucí až k jejich zánětu a ztrátě funkce.<sup>21,22,23</sup>

Zvláštním projevem toxicity některých přírodních látek je jejich zásah do genetického aparátu buňky. Změna struktury DNA nebo zásah do mechanismu exprese genetické informace vyvolá mutace, poruší regulaci buněčného dělení (*kapitola 1.3.*) a pokud je zasaženo toxickou látkou embryo, pak mohou vzniknout anomálie v jeho vývoji (teratogenní účinky).<sup>21</sup>

### ***1. 3. Karcinogenita chemických sloučenin***

Karcinogen neboli kancerogen je látka vyvolávající rakovinu, zhoubné bujení. Ke karcinogenům patří různé chemické sloučeniny. Z anorganických sloučenin např. některé sloučeniny arsenu a chromu, azbest, z organických aromatické uhlovodíky (benzopyren), aromatické aminy, nitrosaminy a azosloučeniny, dále pak některé polyuretany, epoxidy, ethyleniminy, vinylchlorid a další. Karcinogeny mohou být jak látky nacházející se v přírodě, tak zejména uměle vyrobené. Karcinogenita chemických látek je předmětem soustavného výzkumu. K přirozeným karcinogenům patří některé produkty mikroorganismů, plísní (zejména aflatoxiny) či rostlin. Zdrojem karcinogenů ohrožujících lidskou populaci v běžném životě je zejména kouření, potrava (např. aristolochové kyseliny), spalování fosilních paliv atd. Karcinogeny jsou ovšem i některé léky (zejména cytostatika). Mechanismus účinku karcinogenů spočívá v poškození DNA. Některé látky se stávají karcinogenními až po jejich metabolické aktivaci v organismu.“<sup>8</sup>

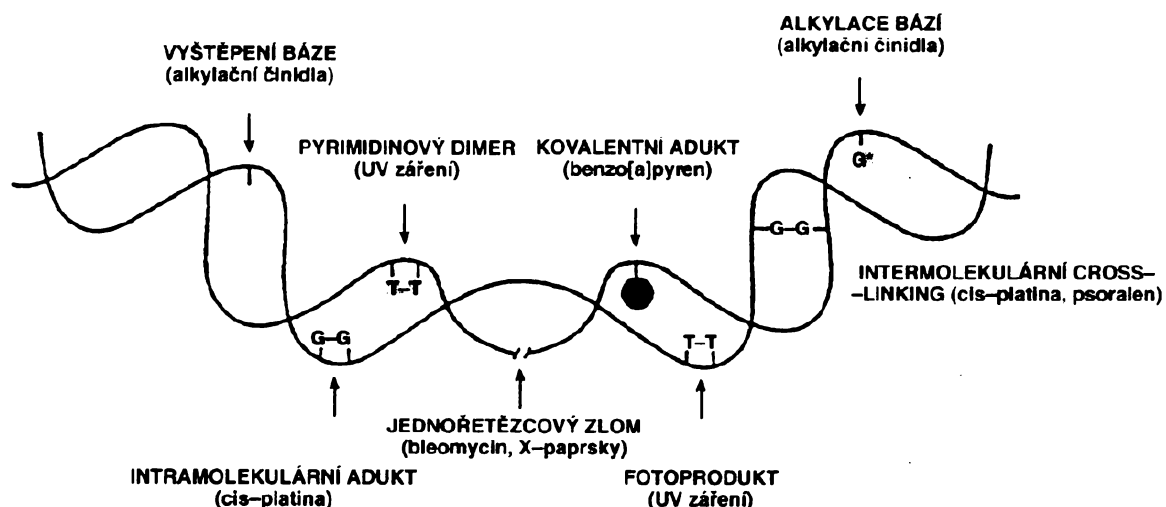
Zhoubné bujení bývá definováno jako „místně neregulovaný tkáňový růst autonomní povahy“<sup>8</sup>. Klíčovými slovy této definice jsou růst a autonomní. Slovo růst je třeba zdůraznit z důvodu, že jde o fyziologický růst, který není nijak omezen a mohl by teoreticky pokračovat donekonečna. Slovo autonomní je třeba zdůraznit proto, že buňky postižené zhoubným bujením se naprosto vymkly regulačním mechanismům celého organismu. Zhoubný růst má charakter procesuální, což můžeme chápat, tak že probíhá v čase. Zpočátku jej nalezneme v tkáni lokálně (může postihnout třeba jen jednu jedinou buňku) a s postupem času se rozšiřuje do okolí, až může postihnout celý organismus. Nejčastěji se šíří ve formě metastáz. U maligně transformovaných buněk můžeme pozorovat jejich abnormální vlastnosti jejich životního cyklu a dále dochází k přenosu těchto abnormálních vlastností i na buňky dceřinné.<sup>27</sup>

Karcinogenitu studovanou z chemického hlediska můžeme jako vědní odvětví datovat přibližně od roku 1775,<sup>11,27,28</sup> kdy Percivall Pott popsal zvýšený výskyt maligních nádorů u kominíků a usuzoval, že k těmto nádorům mohlo dojít z důvodu zvýšené expozice kominíků zplodinám z komínů, které čistili.

Studium nádorového bujení způsobeného chemickými sloučeninami brzdila po dlouhá léta jejich neobyčejná pestrost. Zahrnují totiž širokou škálu chemických sloučenin počínaje aflatoxiny, které vznikají činností hub a plísní, přes polycyklické aromatické uhlovodíky, které byly izolovány z černouhelného dehtu a konče produkty moderního chemického průmyslu.<sup>27</sup> Závěrem tohoto studia byla hypotéza, že chemické karcinogeny jsou sloučeniny, které po vpravení do hostitelského organismu vyvolávají zhoubný růst přímo (to znamená bez změny své molekuly) anebo nepřímo (to znamená poté, co byly v organismu aktivovány a převedeny z tzv. prokarcergenů na funkční karcinogeny). Avšak bez ohledu na svou strukturu a způsob účinku jde o sloučeniny, jejichž společnou vlastností je, že buď samy či po aktivaci vykazují elektrofilní vlastnosti. Tyto sloučeniny pak interagují *in vivo* i *in vitro* s nukleofilními skupinami molekul DNA, RNA a bílkovin. Vzniklé komplexy mění metabolické funkce buňky. Podle okolností, takto postižená buňka buď zanikne, nebo se zcela zotaví tím, že dovede vzniklý defekt opravit, nebo se přemění v buňku mutovanou a posléze se změní (transformuje) v buňku nádorovou.<sup>27</sup>

#### **1. 4. Mechanismus karcinogeneze**

Podstatou bezchybného ontogenetického vývoje a diferenciaci buněk každého mnohobuněčného organismu je regulace transkripce (přepisu DNA do RNA), posttranskripčních úprav, translace (produkce proteinů dle informace obsažené v DNA) a posttranslačních úprav. Geny kódující proteiny, které se zapojují do této regulace (růstové faktory, receptory, proteinkinasy, transkripční faktory), se nazývají protoonkogeny. Produkty protoonkogenů označujeme jako protoonkoproteiny. Na regulaci buněčného cyklu se podílí také tumorové supresorové geny, jejichž produkty působí jako přirozená „brzda“ proliferace somatických buněk.<sup>56</sup> K maligní transformaci buňky dochází v důsledku mutace především v protoonkogenech a tumorových supresorových genech. Kromě přirozeně vznikajících chyb při replikaci může tedy být DNA poškozena také působením vnějších faktorů, jako jsou chemické karcinogeny či fyzikální faktory (např. záření) (Obr. 1.4.1.<sup>57</sup>).



Obr. 1.4.1. - Příklady některých typů poškození DNA v důsledku její interakce s vnějšími faktory. Poškození DNA může být genotoxické (kovalentní vazba karcinogenu na DNA – kovalentní adukty, přičemž většina z nich musí být metabolicky aktivována), dále pak epigenetické (nekovalentní modifikace DNA, např. působením interkalačních činidel) či některé změny struktury molekuly DNA (single strand break - jednořetězové zlomy, double strand break – dvouřetězové zlomy)<sup>58</sup> (převzato z<sup>57</sup>)

Mezi hlavní faktory zvětšující pravděpodobnost vzniku nádorů patří *faktory fyzikální* (radioaktivní, kosmické, UV a Rentgenovo záření; některé druhy velmi jemných pevných částic - např. sloučenin berylia), *biologické* (genetické předpoklady a některé viry) a také faktory *chemické*.<sup>27,56,58</sup>

Chemické karcinogeny (ať syntetické či přírodního původu) hrají v etiologii nádorových onemocnění významnou úlohu. Do lidského organismu se mohou dostat z vnějšího prostředí (třeba z pracovního nebo životního prostředí, jako součásti potravy nebo jako léčiva).<sup>56</sup>

Podle mechanismu působení můžeme karcinogeny rozdělit do tří skupin. První skupinu reprezentují *genotoxické karcinogeny*, které tvoří kovalentní adukty s DNA. Karcinogeny druhé skupiny způsobují změny struktury molekul DNA, jako jsou jedno- a dvouřetězové zlomy, změny struktury DNA, které jsou vyvolány bifunkčními činidly způsobujícími tzv. „*cross-linking*“ (propojení molekul), a to „DNA-DNA cross-linking“ (intra-intermolekulární) nebo „DNA-protein cross-linking“. Třetí skupinou jsou *epige-*



*netické karcinogeny*, které modifikují molekuly DNA nekovalentními interakcemi. Jedná se např. o interkalátory, které se vmezeřují do dvoušroubovicové struktury DNA<sup>56,58</sup> (*obr. 1.4.1.*)<sup>57</sup>.

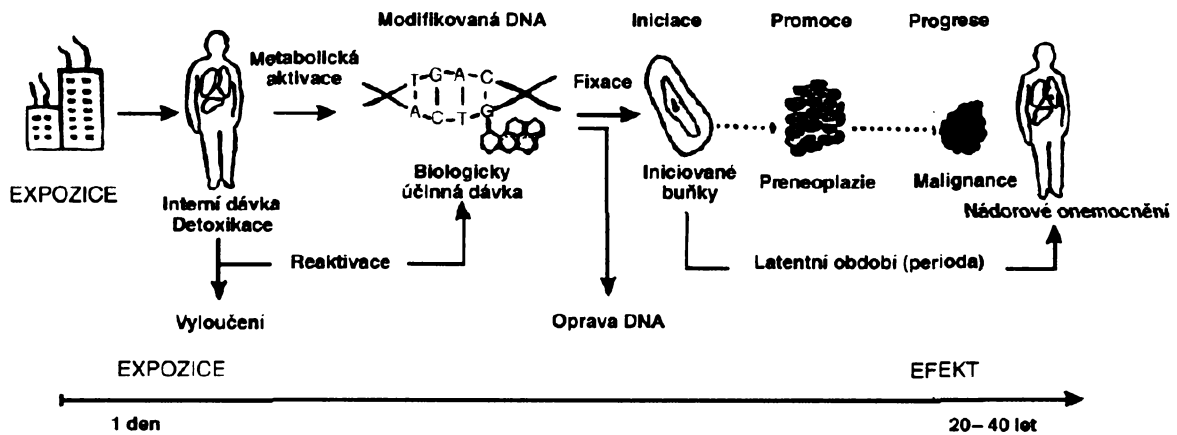
Z 90 % je působení chemických karcinogenů vázáno na tvorbu kovalentních aduktů (kovalentní vazbu karcinogenů nebo jejich metabolitů na báze nebo deoxyribosu DNA).<sup>27,56,58</sup>

Přestože je většina modifikací z DNA eliminována opravnými mechanismy, některé adukty často způsobují permanentní mutace v důležitých genech kontrolujících růst. Důsledkem tohoto je aberantní buněčný vývoj a karcinogenní procesy. Za klíčové pro iniciaci karcinogeneze jsou považovány mutace způsobené karcinogeny v onkogenech a tumorových supresorových genech (antionkogenech).<sup>58</sup>

Většina karcinogenů tvořících adukty s DNA vyžaduje metabolickou aktivaci. Nejdůležitější enzymy, které je aktivují, jsou monooxygenasy (oxidasy) se smíšenou funkcí lokalizované v endoplasmatickém retikulu a obsahující hemové enzymy, cytochromy P450 (CYP). V některých orgánech (tkáních) chudých na cytochromy P450 pak tuto funkci plní samostatně působící hemové enzymy peroxidasy (nespecifické i specifické - např. myeloperoxidasa, laktoperoxidasa, prostaglandin H synthasa).<sup>56,58,59</sup> V aktivaci jiných karcinogenů hrají úlohu i některé reduktázy (např. NADPH:CYP reduktáza, NAD(P)H:chinonoxidoreduktáza).<sup>56</sup>

Karcinogenezi můžeme rozdělit do tří fází: iniciace, promoce a progrese (*obr. 1.4.2.*)<sup>57</sup>. V *iniciační fázi* dochází ke změně genetické informace normální buňky, která vede k vzniku modifikované DNA. Daná mutace buď může zůstat bez funkčních důsledků na organismus po celá léta, nebo může být opravena mechanismy imunitního systému. Pokud nedojde k opravení porušené buňky imunitním systémem, může v dalších stádiích dojít k vývoji nádoru. *Promoční fáze* může trvat i několik let až desetiletí. Proces proliferace buňky se ještě zvětšuje za pomoci promotorů. Většina promotorů má pouze epigenetické vlastnosti a jejich účinek se proto může projevit teprve po působení genotoxických iniciátorů. Většina promotorů je tkáňově specifická. Při jejich metabo-

lismu často dochází ke vzniku aktivních forem kyslíku, které často vyvolávají oxida-  
 tivní změny v DNA. Posledním stadiem karcinogeneze je *progresní fáze*, při které  
 dochází působením látek s genotoxickým účinkem (progresorů) k přeměně částečně  
 kontrolovatelného růstu nádoru v růst nekontrolovatelný. Dochází ke vzniku maligního  
 nádoru a některé jeho buňky se mohou dostat do krevního řečiště a rozšířit se na jiná  
 místa organismu a vytvářet dceřinné nádory. Tak vznikají metastázy.<sup>56,58</sup>



Obr. 1.4.2. – Schéma víceetapové karcinogeneze. (převzato z<sup>57)</sup>)

## ***1. 5. Toxicita rostlinných látek***

Toxicita rostlin je vždy dána látkami v rostlině obsaženými. Mohou to být některé kovy, které se do rostliny dostávají spolu s vodou kořenovým systémem. Dále mohou být toxické některé sekundární rostlinné metabolity, které jsou přirozenou součástí rostliny.<sup>9</sup> Toxiny bývají charakteristické pro daný rostlinný druh, avšak někdy nacházíme stejný rostlinný jed u všech druhů stejného rodu. V některých rostlinách nalezneme pouze jeden jed, v jiných nalezneme i větší počet toxických látek. Např. u čeledi pryskyřníkovité nalezneme protoanemonin, který je jedinou jedovatou látkou, kterou nacházíme v jejich extraktu. Naproti tomu v opiu získaném extrakcí z nezralých makovic se nachází hned několik alkaloidů. Dále také můžeme nalézt v rostlinném extraktu látky, které jsou bez účinku a které při dalším zpracování jen znečistí účinné látky. Mnohé účinné látky ztrácí svoji účinnost sušením, a proto je potřeba toxicitu dané rostliny zjišťovat z čerstvé byliny.<sup>11,13,14</sup>

### ***1. 5. 1. Klasifikace rostlinných jedů***

Rostlinné jedy jsou často ve vodě rozpustné sloučeniny. Pokud rostlinný jed není rozpustný ve vodě, je vždy rozpustný v určitých alkoholech, chloroformu, etheru či ve směsi chloroformu s etherem. Jejich přítomnost můžeme dokázat v různých orgánech rostlin - v natích, cibulích, listech nebo semenech.<sup>2,3,14</sup>

Nejčastějšími účinnými látkami v jedovatých rostlinách jsou zejména alkaloidy, glykosidy, silice, terpeny, rostlinné kyseliny a toxické aminokyseliny. Tyto toxické látky zasahují řadu životně nezbytných systémů daného organismu jako např. nervový systém, dýchací systém, oběhový systém, trávicí trakt či ledviny.<sup>10,11,15</sup>

#### ***1. 5. 1. 1. Rostlinné alkaloidy***

Alkaloidy jsou přírodní dusíkaté látky rozdílných struktur a vlastností. V rostlinné říši jsou alkaloidy hojně rozšířeny a mají velice silné fyziologické účinky.<sup>15</sup> Tato heterogenní skupina zahrnuje více než 6000 sloučenin, které se nejčastěji vyskytují jako

směsi látek příbuzné struktury v různých částech vyšších rostlin jako např. v semenech, listech, kořenech či kůře.<sup>15,16</sup> Mezi významnými alkaloidy rostlinného původu můžeme jmenovat např. nikotin (obsažený v rodu *Nicotina*)<sup>4</sup>, kokain (obsažený v rostlině *Erythroxylum coca*), koniin (obsažený v některých rostlinách čeledi miříkovitých – *Apiaceae*), papaverin či morfin (oba extrahovatelní z máku setého - *Papaver somniferum*)<sup>4,15</sup>.

Alkaloidy lze třídit na pravé alkaloidy, pseudoalkaloidy a protoalkaloidy. *Pravými alkaloidy* jsou často heterocyklické dusíkaté báze odvozené od aminokyselin. *Pseudoalkaloidy* jsou také heterocyklické dusíkaté báze, avšak jejich prekurzory nejsou aminokyseliny. Pseudoalkaloidy jsou obvykle méně toxické než pravé alkaloidy a jako jejich zástupce můžeme jmenovat např. solanin vyskytující se v bramborech. Strukturně jsou odvozeny od purinu nebo jsou to steroidní sloučeniny. *Protoalkaloidy* jsou bazické aminy odvozené od aminokyselin, avšak dusík není součástí aromatického (heterocyklického) systému (např. kapsaicin v pálivých paprikách).<sup>18</sup>

### **1. 5. 1. 2. Rostlinné glykosidy**

Glykosidy jsou látky, jejichž molekula je tvořena cukernou (monosacharid) a necukernou složkou (tzv. aglykon). Můžeme je rozdělit do několika základních skupin: kyanogenní glykosidy, glukované glykosidy, antrachinonové glykosidy, kardoaktivní glykosidy, furanokumariny a saponiny.<sup>15</sup>

U kyanogenních glykosidů toxicitu způsobuje uvolňovaná kyselina kyanovodíková. Mezi významné zástupce patří např. amygdalin obsažený v mandlích.<sup>15</sup>

*Thioglykosidy*, které v aglykonu obsahují síru, se nejčastěji vyskytují u rostlin čeledi brukvovitých, např. sinigrin. Glukosinoláty obecně pro organismus toxické nejsou, avšak jejich rozkladem vznikají látky se strumigenním účinkem - inhibují syntézu hormonů štítné žlázy a přenos jodu ve štítné žláze, čímž dochází k jejímu zvětšení až následné poruše.<sup>15,19</sup>

*Antrachinonové glykosidy* se běžně používají jako projímavé drogy. Struktura těchto glykosidů se odvozuje od aromatického uhlovodíku antracenu. Drogy obsahují antrachinon, ale též jeho redukované deriváty - antrahydrochinon, oxantron, antron a antranol. Obsah antrachinonových látek se mění v průběhu života rostliny i během skladování. V přírodě bylo nalezeno několik set derivátů, které se vyskytují zejména v různých druzích plísní, jako jsou štětičkovec (*Penicillium*) či kropidlák (*Aspergillus*). Nalezneme je též v mnohých čeledích krytosemenných rostlin, jako jsou liliovité, řešetlákové, rdesnovité či bobovité. Nejvýznamnější rostlinou, obsahující antrachinonové glykosidy, je zřejmě aloe (*Aloe ferox*).<sup>4,15,19</sup>

*Kardioaktivní glykosidy neboli kardioglykosidy* svůj název získaly kvůli farmakologickému účinku na srdeční sval. Jejich aglykon se vyznačuje obsahem nějakého steroidu. Kardioglykosidy se vyskytují v určitých čeledích vyšších rostlin - např. pryskyřníkovité (*Ranunculaceae*), liliovité (*Liliaceae*), krtičníkovité (*Scrophulariaceae*). Významnými kardioglykosiny obsaženými v oleandru (rod *Nerium*) jsou oleandrin a neriin. Tyto látky se mohou vyskytovat i u živočichů - zejména u ropuch (*Bufo*) a u některých druhů hmyzu.<sup>4,15,19</sup>

*Furanokumariny* jsou přírodní obranné látky, jejichž výskyt byl zaznamenán zejména v čeledích routovitých a miříkovitých. Jejich toxikologický význam spočívá ve fotosenzibilizujících vlastnostech. Příkladem těchto látek je psoralen a bergapten obsažený v celeru (rod *Apium*).<sup>15</sup>

Poslední skupinou glykosidů jsou *saponiny*, které se vyskytují v mnoha druzích rostlin a jsou často jedovaté pro řadu organismů. Jejich směs s vodou vytváří pěnu podobnou mýdlové a velmi významná je jejich vlastnost způsobovat hemolýzu, tj. uvolňovat hemoglobin z erytrocytů. Saponiny jako toxické látky jsou popisovány u jírovce, bramboříku, koukolu a břečťanu, který obsahuje hederasaponin C.<sup>15,19</sup>

### **1. 5. 1. 3. Rostlinné silice**

Silice jsou sloučeniny palčivé chuti, příjemné vůně. Jsou silně reaktivní a již při normální teplotě se vypařují. Ve vodě jsou většinou nerozpustné, ale snadno se rozpouští v alkoholu. Otrava silicemi se projevuje především zvýšenou srážlivostí krve a respiračními poruchami.<sup>15</sup>

### **1. 5. 1. 4. Rostlinné toxické aminokyseliny**

V přírodě se vyskytuje kolem tří stovek neproteinových aminokyselin, přičemž mnoho z nich je pro lidský či zvířecí organismus toxických. Vysoká produkce těchto aminokyselin je v hrachoru (kyseliny  $\alpha$ - $\chi$ -diaminomásečná a  $\alpha$ -amino- $\beta$ -oxalylaminopropionová) a v bobovitých rostlinách (kanavanin,  $\beta$ -kyanoalanin, 3,4-dihydroxyfenylalanin). Některé proteiny a peptidy uvolňují toxické aminokyseliny enzymovou hydrolyzou v trávicím traktu, jako je tomu např. u ricinu (ze semen skořce) či fasinu (z čeledi bobovitých). Přímý antagonismus ovlivňuje průchod aminokyselin přes buněčné membrány, aktivaci a inkorporaci aminokyselin do molekul proteinů.<sup>11,19</sup>

Mnoho aminokyselin váže v organismu zaměnit selen za síru. Intoxikace poté vzniká kumulací selenu v organismu.<sup>14</sup>

### **1. 5. 1. 5. Rostlinné kyseliny**

Mnoho rostlinných kyselin lidstvo hojně využívá již od pradávna. Jsou to především kyseliny získané z řady plodů kulturních rostlin (kyselina malonová, vinná, citrónová, askorbová), které jsou důležitou součástí potravinářské výroby. Avšak některé rostlinné kyseliny mohou vyvolávat intoxikaci, která však nemusí souviset s jejich kyselou povahou. V lidském organismu jde především o kyselinu oxalovou (šťavelovou) a její ve vodě rozpustné soli, jako je oxalát sodný, draselný a amonný.<sup>15,23</sup>

### **1. 5. 1. 6. Terpeny**

Terpeny je možné formálně chápat jako oligomery uhlovodíku isoprenu (2-methyl-1.3-butadien) sestavované právě z jeho jednotek (C5). Odtud je odvozen jejich název - isoprenoidy. Podle počtu těchto základních jednotek je dělíme na monoterpeny (C10, 2 isoprenové jednotky), seskviterpeny (C15, 3 isoprenové jednotky), diterpeny (C20, 4 isoprenové jednotky), sesterpeny (C25), triterpeny (C30), a tetraterpeny (C40). Terpeny tvoří základ esenciálních (éterických) olejů, které jsou získávány z rozmanitých rostlinných materiálů a jsou ceněny jako zdroje aromatických látek. Desetiuhlíkatý řetězec či skelet monoterpenu umožňuje nepřeborné strukturní kombinace, a tím i variabilitu ve vlastnostech těchto látek včetně jejich vůní. Mezi významné terpeny patří např. limonen, geraniol, mentol, kafr, citrusový olej (monoterpeny) či vitamin A (retinol), taxol, ginkgolide (diterpeny).<sup>15</sup> Některé z těchto látek jsou živočichům či rostlinám užitečné, avšak jejich nadměrná koncentrace může způsobovat rozličné obtíže z počátku se projevující malátností a křečovými stavy, a u některých jedinců končí až smrtí.

## **1. 6. Aristolochové kyseliny**

### **1. 6. 1. Rostlinné jedy z rodu *Aristolochia* a jejich účinky na lidský organismus**

Rostlinné jedy nacházející se v rodu *Aristolochia* byly odedávna používány v přírodní medicíně.<sup>41</sup> Např. podražec křovistní byl častý v léčích pro podporu menstruace, kde byl přítomen spolu s jablečníkem obecným, konitru dem lékařským, libečkem lékařským, měsíčkem lékařským, omanem pravým, pelyňkem černobýlem, routou vonnou, rozmarýnou lékařskou, řebříčkem obecným, sporýšem lékařským či třezalkou tečkovanou. Odvar z těchto bylin pomáhal proti nepříjemným křečím, ale též pomáhal ženám v přechodu překonávat jeho nepříjemné projevy. Dále byly tyto látky v lidovém léčitelství používány jako emetikum (látka vyvolávající zvracení), diuretikum, při léčbě onemocnění jater, žloutence nebo proti vodnatosti. Připravovaly se z nich „tinkтуры“ a masti pro léčbu bércových vředů, proti křečím v nohou, revmatismu, srdečnímu infarktu, zánětu plic či různým jiným zánětům. Těhotným ženám byl často podražec podáván jako prevence před krvácením do pánve, avšak pouze krátkodobě a v malých dávkách, neboť vyšší dávky zvyšovaly nebezpečí potratu.<sup>25,26</sup>

### **1. 6. 2. Zařazení rostlin rodu *Aristolochia* do biologického systému<sup>2,4</sup>**

Říše:	<i>Plantae</i>	Rostliny
Podříše:	<i>Cormobionta</i>	Vyšší rostliny
Oddělení:	<i>Magnoliophyta</i>	Krytosemenné rostliny
Třída:	<i>Magnoliopsida</i>	„Bazální“ dvouděložné rostliny
Řád:	<i>Piperales</i>	Pepřovníkovité
Čeleď:	<i>Aristolochaceae</i>	Podražcovité



### 1. 6. 3. Klasifikace čeledi *Aristolochaceae*



Do čeledi *Aristolochiaceae* se řadí asi 10 rodů rozlišené do 400 druhů. V České republice najdeme rody podražec a kopytník. Různé zástupce rodu *Aristolochia* nalezneme po celém světě. Velmi častý je v Evropě, v Malé Asii a v Asii. V Evropě jej nacházíme i na severu Anglie a jihu Švédska, kde ale není původní. Objevuje se v polohách od nížin do horského stupně.<sup>2,3,4</sup>

Obr. 1.6.1 *Aristolochia clematis* – podražec křovistní

V čeledi nalezneme popínavé byliny nebo keře (v tropech i liány). Rostliny mají jednoduché řapíkaté listy bez palistů, které ze stonku vyrůstají střídavě. Jejich žilnatina je dlanitě zpeřená. Oboupohlavní květy jsou souměrné, tvořené kalichem a korunou nebo okvětim rozmanitých tvarů. Tyčinek je buď šest (rozmístěné ve dvou kruzích po třech) nebo mnoho (někdy srůstají s pestíkem). Semeník je spodní, srostlý ze čtyř až šesti plodolistů. Plody jsou nažky nebo tobolky.<sup>3,4,5</sup>

Aristolochové kyseliny dříve používané k farmakologickým účelům se nejčastěji extrahovaly z druhů *Aristolochia clematis* (obr. 1.6.1), *Aristolochia fanli* a *Aristolochia manshuriensis*.<sup>4,5</sup>

### 1. 6. 4. Aristolochové kyseliny a jejich chemická klasifikace

V extraktech rostlin rodu *Aristolochia* (obr. 1.6.1) bylo nalezeno pět derivátů aristolochových kyselin, které jsou označovány jako směs přírodních aristolochových kyselin. Nejvíce jsou zde zastoupeny dvě sloučeniny - aristolochová kyselina I (AAI) - cca 65% a aristolochová kyselina II (AAII) - cca 35%.<sup>1</sup> (obr. 1.6.2).

Systematicky jsou tyto kyseliny označovány jako 8-methoxy-6-nitronafto[2,1-g][1,3] benzodioxole-5-karboxylová kyselina (AAI)<sup>6</sup> a 6-nitronafto[2,1-g][1,3]benzodi-

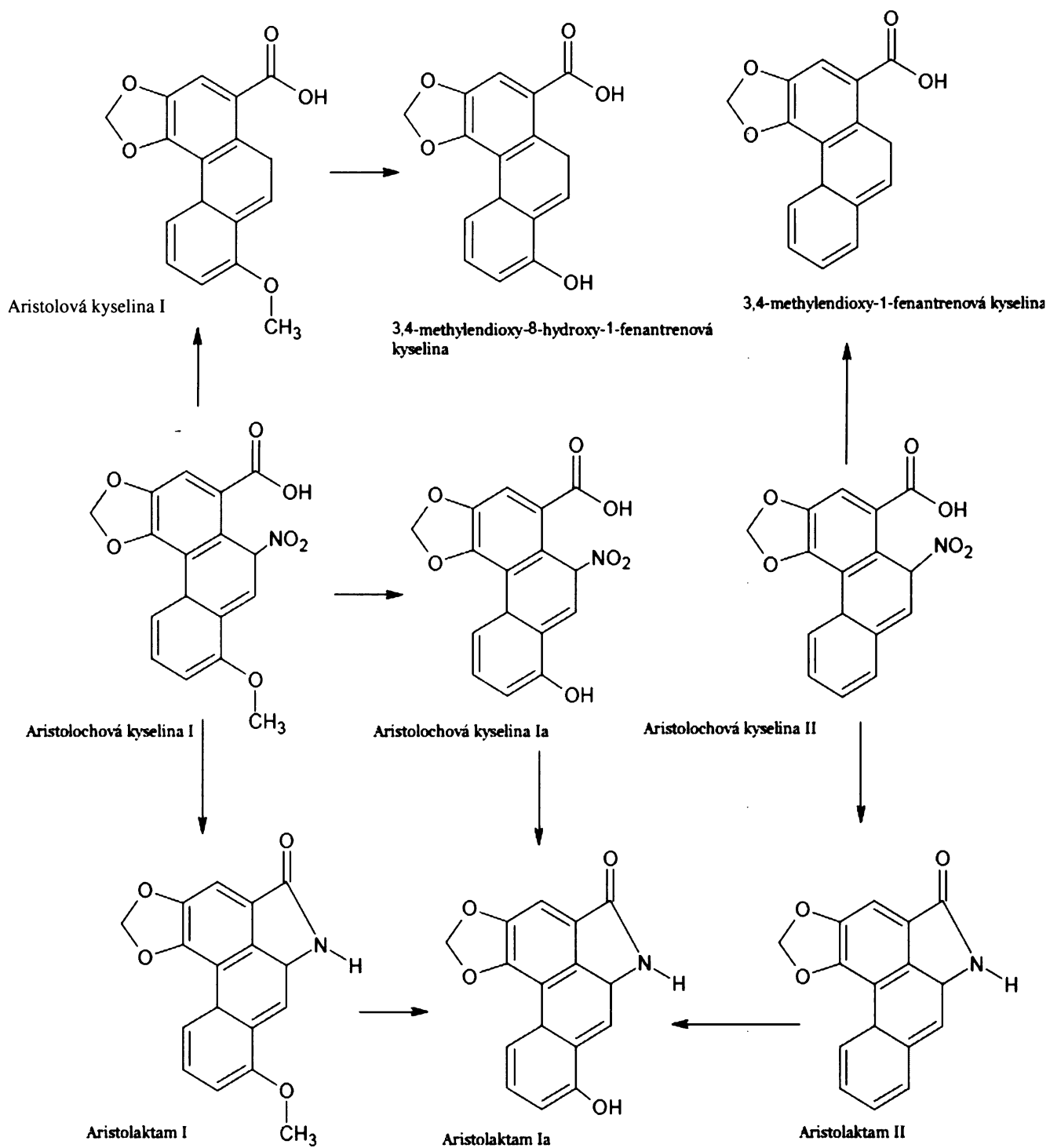


hlavně na exocyklické aminoskupiny purinových nukleotidů. Takto vznikají adukty s deoxyadenosinem (dA-AA I) a deoxyguanosinem (dG-AA I).<sup>37</sup> Převládajícím aduktem tvořeným aristolochovými kyselinami na DNA in vivo je dA-AA I, jehož dlouhá doba perzistence je zásadní pro iniciaci karcinogeneze jimi vyvolané. Tento adukt byl u pacientů nalezen jako perzistentní léze, vedoucí k mutaci A-T.<sup>38,39</sup> Tato mutace byla nalezena v tumorech v kodonu 61 onkogenu H-ras u potkanů a tumorovém supresoru p53 u člověka po vystavení působení AAI.

### ***1. 6. 6. Metabolismus aristolochových kyselin***

Metabolismus aristolochových kyselin byl studován v mnoha různých živočišných druzích a studie zahrnovaly jedince obou pohlaví daného druhu. Metabolismus AA byl studován ze dvou různých hledisek. Z hlediska aktivační cesty jejich metabolismu a cesty detoxikační.

Základní metabolická cesta aristolochových kyselin je nitroredukce. Vznikajícími metabolickými produkty jsou aristolaktamy I a II, které je možno nalézt v moči i výkalech pokusných zvířat jak v konjugované tak nekonjugované formě (*obr 1.6.3*).



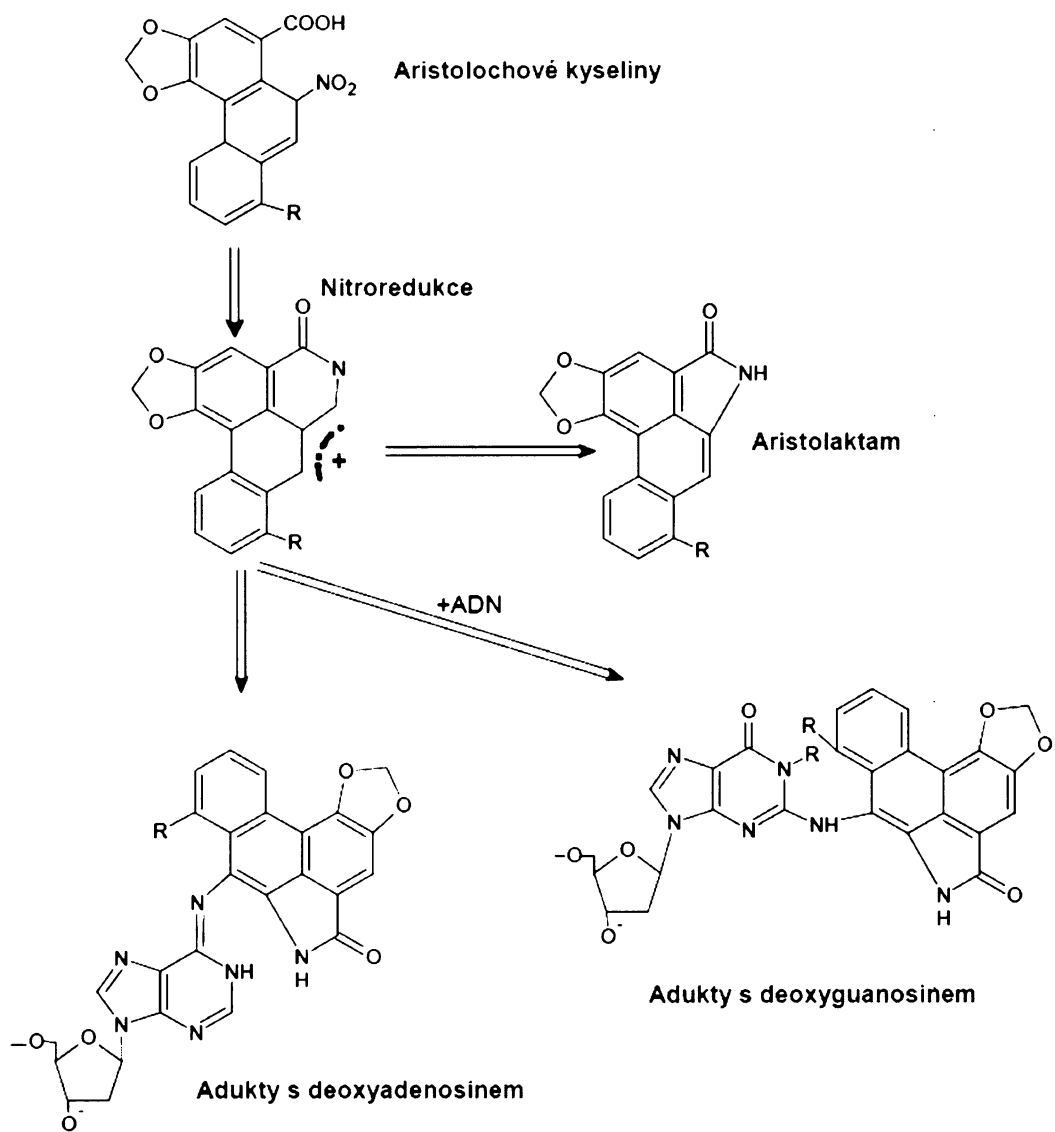
Obr. 1.6.3. – Metabolismus aristolochových kyselin I a II (převzato z<sup>29</sup> a upraveno)

### 1. 6. 6. 1. *Metabolická aktivace aristolochových kyselin*

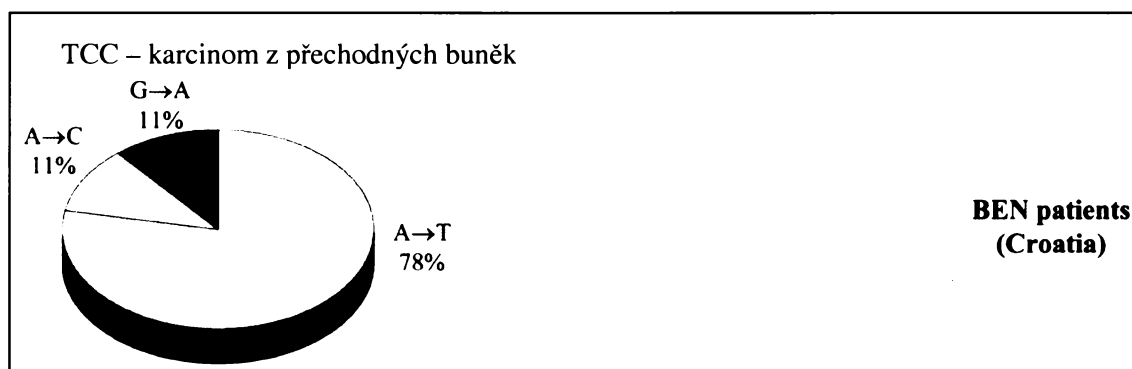
Jak již bylo uvedeno výše (*kapitola 1.6.5., 1.6.6.*), aktivace aristolochových kyselin na „ultimální“ (okamžité) toxikanty (karcenogeny) probíhá redukční cestou za vzniku aristolaktamu I a aristolaktamu II. Během redukce obou kyselin (AAI i AAI) dochází ke vzniku reaktivního cyklického acylnitreniového iontu, který se váže na DNA a vytváří dva majoritní adukty. Tento výsledek byl pozorován jak v experimentech *in vitro*, tak *in vivo*. Jedná se o adukty s deoxyadenosinem a deoxyguanosinem, jmenovitě [7-(deoxyadenosin-N<sup>6</sup>-yl)aristolaktam (dA-AA) a 7-(deoxyguanosin-N<sup>2</sup>-yl)aristolaktam (dG-AA)] (*obr. 1.6.4.*). Efektivnější tvorba aduktů je produkována aristolochovou kyselinou I.<sup>35,61</sup> K detekci a identifikaci aduktů tvořených aristolochovými kyselinami bývá využita vysoce senzitivní Randerathova metoda (<sup>32</sup>P-postlabelling), jejímž prostřednictvím byl odhalen i vztah mezi perzistencí aduktů a karcinogenním účinkem aristolochových kyselin.<sup>61</sup>

Na rozdíl od doby přetrvání aduktu 7-(deoxyguanosin-N<sup>2</sup>-yl)-aristolaktamu I v DNA různých orgánů laboratorních zvířat (laboratorních potkanů), (*obr. 1.6.4.*), která nebyla delší než dva týdny, perzistence aduktů s deoxyadenosinem (dA-AAI) byla dlouhodobá.<sup>35,61</sup> Tato skutečnost signalizuje, že dlouhodobá perzistence deoxyadenosinového aduktu může být kritickým prekarcinogenním stavem, lézí v DNA, která je zodpovědná za iniciaci karcinogeneze vyvolané aristolochovými kyselinami.

Adukt dA-AAI byl nalezen též jako perzistentní léze způsobující mutaci tumor supresorového genu p53 [mutace AAG → TAG v kodonu 139 (Lys → Stop) v exonu 5] v lidském organismu u pacientů trpících Nefropatií způsobenou aristolochovými kyselinami<sup>62</sup> a Balkánskou endemickou nefropatií.<sup>35,61</sup> (*dále též kapitoly 1.7.1 a 1.7.2, obr.1.6.5.*)

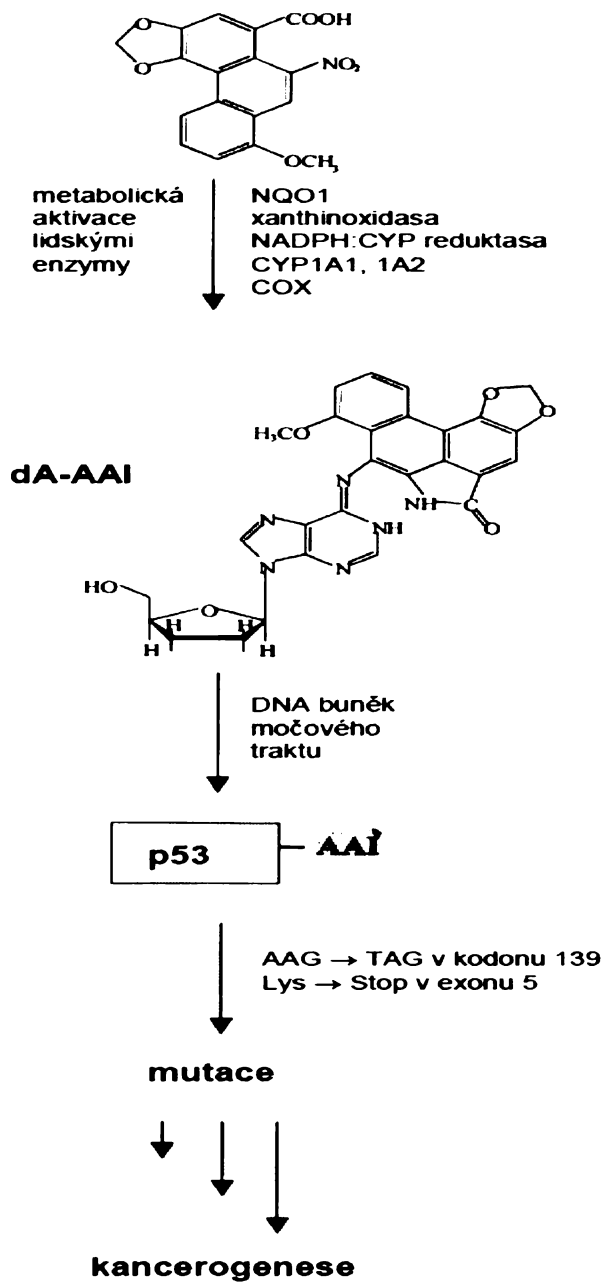


Obr. 1.6.4. – Metabolická aktivace a tvorba DNA aduktů z aristolochových kyselin. (převzato a upraveno z<sup>60</sup>)



Obr 1.6.5. Grafické znázornění počtu transverzí AT-TA v DNA pacientů trpících BEN (převzato a upraveno z<sup>34</sup>)

Metabolická aktivace AAI je katalyzována cytochromy P450 podrodiny 1A, NAD(P)H-chinonreduktázou, NADPH cytochrom P450 reduktázou a některými peroxidázami (např. cyklooxygenázou – COX) (Obr.1.6.6.).



Obr. 1.6.6. Iniciace nádorových procesů vyvolaných aristolochovou kyselinou I v lidském organismu: Pomocí NQO1, COX, CYP a NAD(P)H:chinonoxidoreduktázy dochází k aktivaci AAI na dA-AAI, který je prekarcinogéní lézí v DNA. NQO1=NAD(P)H:chinonoxidoreduktáza; CYP=cytochrom P450; COX=cyklooxygenasa (prostaglandin H synthasa)<sup>35</sup>



### **1. 6. 6. 2. Detoxikační metabolismus aristolochových kyselin**

Při detoxikaci, která probíhá převážně v játrech, dochází nejen k vyloučení toxinu z organismu, ale může dojít i k aktivaci některých toxinů.

Produktem detoxikačního metabolismu AAI je především metabolit AAIA, který vzniká demethylací AAI (obr. 1.6.3.). Tento chemický proces je katalyzován oxidací cytochromy P450 (CYP).<sup>62</sup>

Metabolické studie dále prokázaly, že hlavními redukčními metabolity aristolochových kyselin jsou aristolaktam I a aristolaktam II (obr. 1.6.3. a 1.6.3.).

### **1. 6. 6. 3. Enzymy účastníci se metabolismu aristolochových kyselin**

#### **1. 6. 6. 3. 1. NAD(P)H:chinonoxidoreduktáza**

**NAD(P)H:chinonoxidoreduktáza** (DT-diaforasa, **NQO1**), patří mezi oxidoreduktázy katalyzuje redukci řady substrátů. Detoxikuje reaktivní chinony a chinoniminy na méně toxické hydrochinony, které mají antioxidační účinek.

V předchozích studiích bylo zjištěno, že aktivita tohoto enzymu bývá zvýšena v nádorových buňkách.<sup>64</sup> NAD(P)H:chinonoxidoreduktáza je také účinnější za anaerobních podmínek, které jsou typické pro maligně transformované buňky.<sup>65</sup>

#### **1. 6. 6. 3. 2. Cytochrom P450**

Pojmem cytochrom **P450 (CYP)** je označena velká skupina („super“ rodina) enzymů obsahujících ve své molekule hem.<sup>66</sup> Jméno je odvozeno od charakteristické vlastnosti enzymů této skupiny, kterou je VIS absorpční maximum při 450 nm, pokud jsou v re-dukovaném stavu v komplexu s oxidem uhelnatým. Fylogeneticky se jedná o velmi starý systém, který je konkrétními enzymy zastoupen u všech žijících organismů. Kromě oxidace a redukce širokého spektra exogenních látek se také podílejí na

biosyntéze a metabolismu endogenních sloučenin jako jsou cholesterol, steroidní hormony, žlučové kyseliny. Účastní se i oxidačního metabolismu mastných kyselin a dalších látek.<sup>67</sup>

Tyto enzymy jsou zodpovědné za reakce I. fáze biotransformace cizorodých chemických látek, které mohou vést k detoxikaci či aktivaci daných látek. Tato fáze bývá někdy nazývána též derivatizační.<sup>68,69</sup> Při první fázi biotransformace dochází ke vnášení polární skupiny či skupin do skeletu lipofilní chemikálie. Může též dojít k demaskování již přítomných funkčních skupin v molekule. Reakce patřící k první fázi biotransformace jsou většinou oxidační (hydroxylace, dealkylace, deaminace), některé ovšem také probíhají redukčním mechanismem (např. nitroredukce, azoredukce). Reakcí se tyto enzymy účastní spolu s jeho reduktázou (NADPH:CYP reduktáza).<sup>68,69</sup>

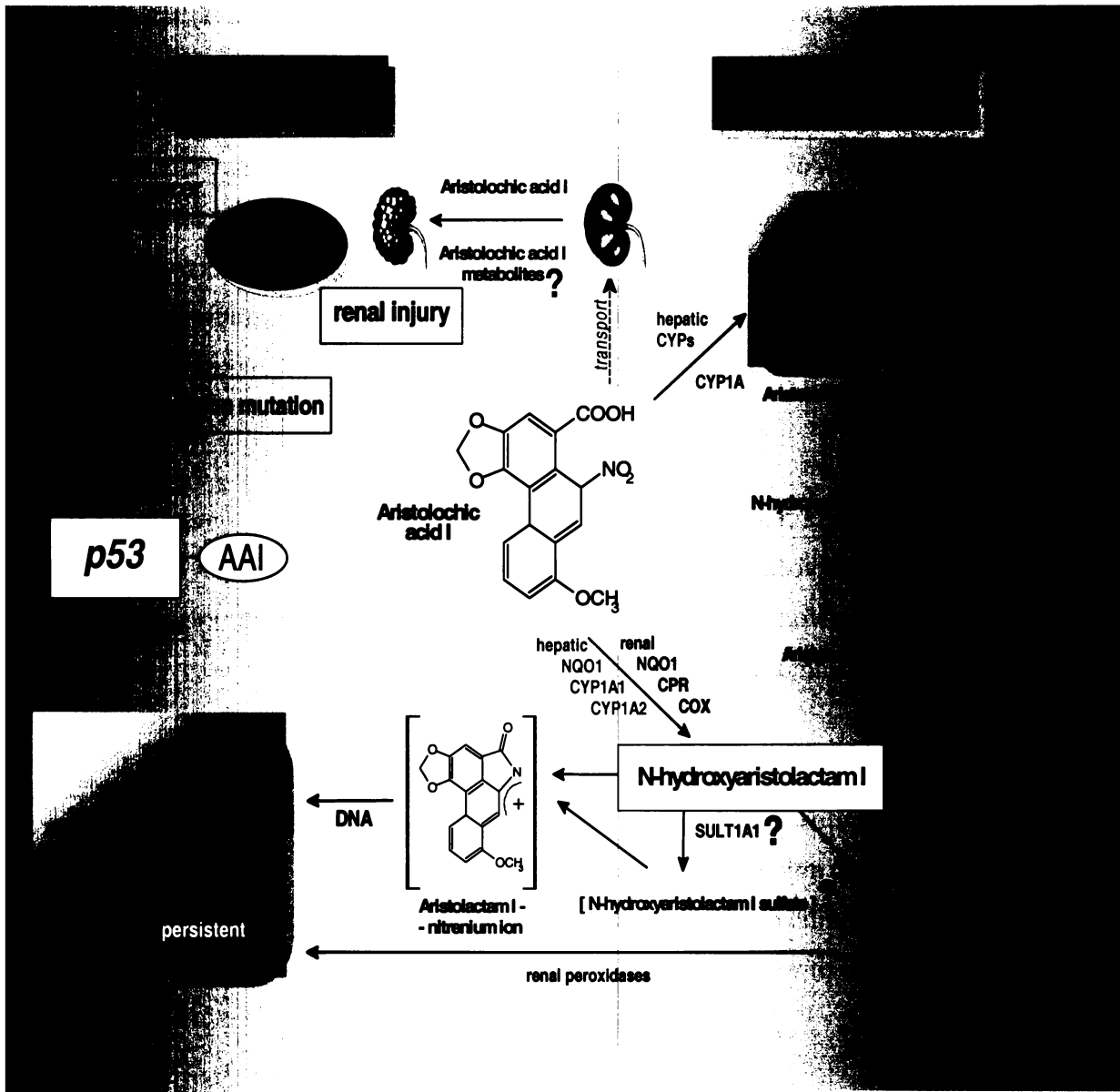
V lidském těle jsou cytochromy P450 přítomny především v játrech, avšak významné jsou jejich hladiny též v plicích, ledvinách, tenkém střevě, kůži, mozku nebo nadledvinkách. V rámci buňky jsou lokalizovány v membráně hladkého endoplazmatického retikula, a nebo méně častěji v membráně mitochondrií.<sup>67</sup>

Cytochrom P450 se dělí na rodiny (40% shoda sekvencí), podrodiny (55% shoda sekvencí) a na konkrétní enzymy. Označení konkrétního enzymu z rodiny P450 se tedy skládá ze zkratky CYP, následované arabskou číslicí označující rodinu, velkým písmenem pro podrodinu a další arabskou číslicí pro označení konkrétního enzymu, např. CYP3A4.<sup>58</sup>

V lidském genomu se doposud podařilo identifikovat 57 genů pro různé izoformy CYP, které lze zařadit do 18 rodin a 43 podrodin.<sup>70</sup>

V případě AAI existují důkazy, že cytochromy P450 podrodiny 1A mohou v jejich metabolismu hrát významnou úlohu. A to jak v jejich detoxikaci, tak i aktivaci.<sup>1,30</sup>

Obrázek 1.6.3. shrnuje metabolismus AAI, včetně enzymů, které na tomto metabolismu participují.



Obr. 1.6.3. - Metabolické cesty AAI (převzato z<sup>63</sup>)

## 1. 7. Nefropatie jako ledvinné onemocnění

Jak je definováno ve Velkém lékařském slovníku z roku 2004, „*nefropatie je obecné označení pro nezánětlivé onemocnění ledvin. Mezi nejdůležitější patří např. Balkánská nefropatie (kapitola 1.7.1.), diabetická nefropatie (jedna z chronických komplikací při diabetes mellitus), epidemická nefropatie (způsobená viry rodu Hantavirus), hypokalemická nefropatie (k poškození ledvin dochází v souvislosti s nízkou koncentrací draslíku v krvi), IgA nefropatie neboli Bergerova nemoc, myelomová nefropatie (vzniká při myelomu), odlišková nefropatie (komplikace myelomu s ireverzibilním poškozením ledvinných funkcí) či refluxní nefropatie (vzniká při vesikoureterálním refluxu moči z močového měchýře do močovodů a ledvin).*“<sup>8</sup>

Nefropatie mohou být způsobeny mnohými podněty, např. krystalovou artropatií (dna), infekcí v okolních orgánech, chronickým poškozením močových cest, metabolickými poruchami (např. amyloidóza – vylučování patologické bílkoviny v korových částech ledvin) nebo toxickými chemickými látkami, které jsou přítomny jak v potravě, tak i v okolním prostředí.

V Africe se např. poškození ledvin vzniklé v souvislosti s užitím herbální medicíny podílí až na 35 % všech případů akutního selhání ledvin. Velmi často se kamenem úrazu stává vysoký obsah draslíku či těžkých kovů, které se do rostlin dostávají z vnějšího prostředí. Také může dojít k interakci s látkami obsaženými v trvale užívaných lécích.

Poškození močových cest rostlinnými toxiny můžeme posuzovat ve dvou rovinách. Buď může dojít po požití rostlinné látky k poškození plně funkčního orgánu, neboť v tubulárních částech močových cest dojde k záchytu toxinů, nebo k vychytávání škodlivin v dřeni ledvin.<sup>31</sup>

Existuje mnoho nefropatií, avšak v předkládané bakalářské práci se budu zabývat hlavně Balkánskou endemickou nefropatií (BEN z angl. Balkan Endemic Nephropathy) a nefropatií způsobenou aristolochovými kyselinami (AAN z angl. Aristolochic

Acid Nephropathy) dříve označovanou jako nefropatie vyvolaná čínskými bylinami (CHN z angl. Chinese Herbs Nephropathy).

### **1. 7. 1. Balkánská endemická nefropatie - BEN**

Velký lékařský slovník z roku 2004 uvádí, že „*Balkánská nefropatie je chronické onemocnění ledvin typu tubulointersticiální nefritidy vznikající v některých oblastech Balkánu, zejména v okolí dunajské nížiny, popřípadě až v Řecku. Předpokládá se toxické působení některých endemických látek např. ochratoxinu A. Jinou předpokládanou příčinou je infekce viry Coxsackie. Nemoc se projevuje též heaturií a anemií, nevyskytují se edemy ani hypertenze. V oblasti papil bývá atrofie tubulů a intersticiální skleróza, relativně častěji se nacházejí tumory vývodných cest močových.*“<sup>8</sup>

Ledviny jsou při této nemoci velmi malé, neboť atrofují. V mnohých případech se jejich velikost může pohybovat mezi 2 a 3 cm a jejich hmotnost kolem 50 g.<sup>32</sup>

Tato choroba byla poprvé popsána v roce 1956. Deset let před tímto datem si začal místní lékař Dr. Tatchev v severozápadním Bulharsku všimnout značného rozšíření onemocnění ledvin v oblasti zvané Vratza. Tatchev proto v průběhu let 1950 až 1954 zaznamenával podrobné anamnézy těchto pacientů a byl tak prvním, který si všiml nápadného výskytu tohoto onemocnění v určitých lokalitách, např. v celých vesnicích, určitých rodinách či dokonce i jednotlivých domácnostech. Toto onemocnění pojmenoval podle místa výskytu jako Vratskou endemickou nefritidu (Endemic Vratza nephritis). V roce 1956 bylo toto onemocnění oficiálně uznáno jako nové ledvinné onemocnění. Avšak rok po prvním publikování popisu průběhu nemoci se objevil nový případ, a to v sousední zemi - Jugoslávii. Nemoc vykazovala identický klinický a epidemiologický fenotyp jako Vratská endemická nefritida, ale pacienti nepocházeli z oblasti Vratza a ani do ní nikdy nezavítali. A v roce 1961 byl popsán první případ obdobné nemoci v jiné zemi - Rumunsku.<sup>32</sup>

Z těchto důvodů se v roce 1965 na společném setkání odborníci z WHO dohodli, a následně dva roky nato odborníci z CIBA Foundation tuto dohodu potvrdili a defini-

tivně registrovali tuto nemoc pod názvem Balkánská endemická nefropatie (Balkan Endemic Nephropathy, BEN).<sup>32</sup>

Geografické vymezení oblasti výskytu Balkánské endemické nefropatie je znázorněno na obrázku 1.7.1.<sup>33</sup>



Obr 1.7.1.: Oblast výskytu BEN: místa výskytu vyznačena modrou barvou (převzato z<sup>33</sup>)

Nemoc postihuje obyvatelstvo žijící v oblasti téměř 20 000 km<sup>2</sup> podél řeky Dunaje, a to jak v bezprostřední blízkosti řeky tak v okolních horách.<sup>36</sup>

Lze říci, že od oficiálního popisu této nemoci v padesátých letech dvacátého století se region výskytu BEN téměř nezměnil. Mnohé vesnice, které byly touto nemocí postiženy, jsou jí postiženy i nadále, zatímco mnohé nově vystavěné vesnice i města nacházející se často v blízkosti postižených vesnic už postiženy být nemusí.<sup>34</sup>

V současnosti je registrováno více než 25000 pacientů, kteří trpí BEN. Bereme-li však v potaz i případy ranných příznaků nemoci, je nutné uvažovat o více než 100 000 postižených osob!<sup>34</sup> Jedním z problémů odhalení, zda pacient trpí BEN, je mimo jiné i dlouhá doba plného propuknutí této nemoci.<sup>32</sup>

Průběh choroby je nápadně podobný „Nefropatii vyvolané aristolochovými kyselinami“.<sup>43</sup>

Příčina Balkánské endemické nefropatie není doposud vysvětlena. Za původce BEN bylo považováno mnoho faktorů, které jsou specificky svázané s danou lokalitou. Jedna z hypotéz počítá též s aristolochovými kyselinami jako původci této choroby. Rostlinné extrakty čeledi *Aristolochaceae* byly odjakživa používány obyvateli těchto oblastí v lidovém léčitelství, které rostou volně v obilninách pěstovaných v těchto oblastech. Jejich zbytky byly nalezeny i v sýpkách.<sup>35,36</sup> Je tedy velice pravděpodobné, že místní obyvatelé dlouhodobě používali mouku z obilovin kontaminovaných semeny těchto rostlin. Zcela nedávno byla tato hypotéza silně podpořena nálezem aduktu aristolochových kyselin v DNA vzorků ledvin u pacientů s BEN z Chorvatska a Srbska.<sup>34</sup>

Enzymy metabolizující karcinogeny jsou kódovány geny, které mohou existovat ve více „variantních formách“ nebo se u nich může vyskytovat polymorfismus. Z tohoto jevu vyplývají různé aktivity genových produktů. Z výsledků prací Smithe, Stanleyho a Sima vyplývá, že právě genetické variace v genech kódujících biotransformační enzymy jsou důležitým faktorem určujícím riziko rakoviny.<sup>40</sup>

Další hypotézou etiologie BEN je působení ochratoxinu A. Ochratoxin A je mykotoxin, přítomný v některých potravinách, které jsou v těchto oblastech konzumovány. Samozřejmě je nutné brát v úvahu i genetické faktory jako je např. genetický polymorfismus enzymů metabolizujících xenobiotika včetně aristolochových kyselin, popřípadě podmíněné defekty imunitního systému.<sup>35</sup>

### 1. 7. 2. Nefropatie vyvolaná aristolochovými kyselinami - AAN

Nefropatie vyvolaná aristolochovými kyselinami (AAN) dříve označovaná jako Nefropatie vyvolaná čínskými bylinami byla poprvé popsána v Belgii v roce 1993. Počátkem devadesátých let dvacátého století se mnoho žen zapojilo do léčebného programu zaměřeného na redukci jejich tělesné hmotnosti na jedné bruselské klinice, která podobné odtučňovací kúry s dobrými výsledky provozovala již od roku 1975.<sup>46-48</sup> Dieta byla založena na intradermální aplikaci eufyllinu s extraktem z artyčoků a pilulky obsahující fenfluramin, diethylpropan, meprobamát, „Pankreas powder“ (pankreatin), „Laminaria powder“ (extrakt z mořské řasy *Laminaria*), „Cascara powder“ (extrakt z kůry stromu *Rhamnus purshia*), extrakty z chaluh a acetazolamid. Všechny tyto látky byly kombinovány ve dvou typech kapslí a jedné injekce, které byly vzájemně indikovány pacientkám. Injekce byla aplikována jednou týdně intradermálně a tablety byly podávány orálně 3krát denně. Od května 1990 byly některé složky léčebné kúry nahrazeny extraktem z rostlin rodu *Beladonia* a dvěma bylinami dovezenými z Číny. Díky novým bylinám mělo dojít k rapidní změně programu redukce tělesné hmotnosti. Hlavní složkou těchto přípravků měla být rostlina Han Fang Ji (kořen *Stephania tetrandra*) a Hou Po (kůra z rostliny *Magnolia officinalis*).<sup>45,51</sup> Dieta měla spočívat ve využití alkaloidu tetrandrinu z rostliny *Stephania tetrandra*, který byl v čínské tradiční medicíně často užíván a patřil mezi tzv. „domácí léky“. Naneštěstí v tabletách požívaných pacientkami nebyl však tetrandrin nalezen.<sup>49</sup> Došlo zde totiž k záměně rostliny *Stephania tetrandra* za bylinu rodu *Aristolochia*. Záměna byla nejspíš způsobena podobností názvů těchto rostlin v čínštině. Ty se totiž čínsky jmenují Han Fang Ji (*Stephania tetrandra*) a Guang Fang Ji (*Aristolochia sp.*).<sup>42,44</sup>

Redukční kúře se podrobily pouze ženy. Proto z počátku nebyl prokázán žádný mužský pacient postižený touto chorobou. V pozdějších studiích byly zjištěny podobné nefropatie i v jiných zemích jako např. ve Francii, Anglii, Španělsku, USA, Japonsku či Číně.<sup>62</sup> V těchto zemích byla choroba prokázána i u mužských pacientů.<sup>50</sup>

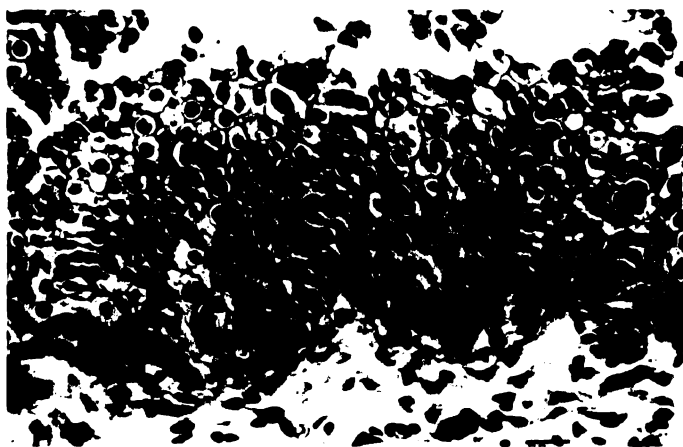
Věk pacientek trpících chorobou v Belgii se pohyboval mezi 23 a 65 lety. 5% z nich postihla nefropatie způsobená aristolochovými kyselinami. U většiny pacientek



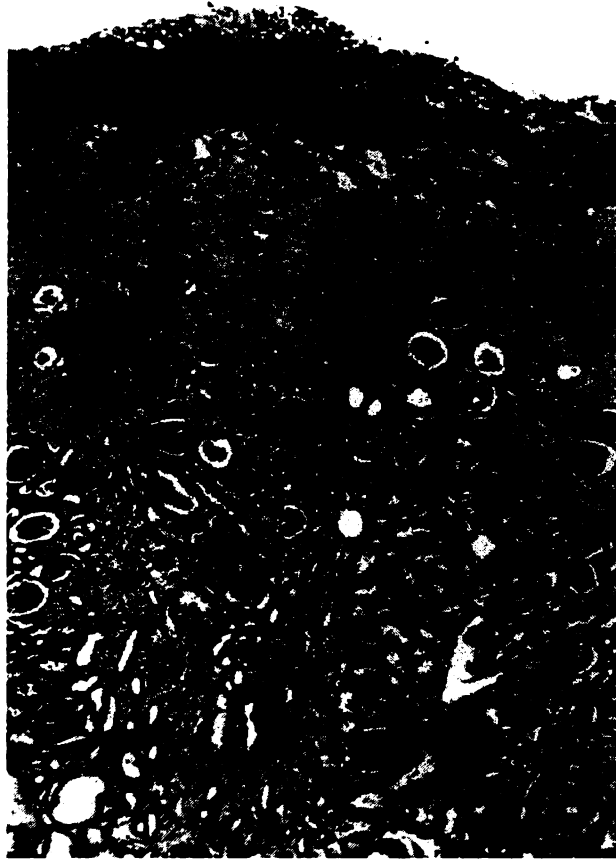
došlo k selhání ledvin léčenou dialýzou, která však často končila transplantací ledvin. Bohužel ani tento zákrok neměl kladný výsledek.<sup>51</sup> U mnohých těchto žen patologický proces stále pokračuje, vznikají nové nádory močových cest<sup>52</sup> a naneštěstí se k nim přidávají i další poškození jako např. poškození srdce. Toto poškození chlopní srdce může být způsobeno kombinací působení AA s různými léky na podporu chorobného nechu-tenství, které některé pacientky užívaly před nástupem do programu na redukci jejich hmotnosti.<sup>53</sup> Na obrázcích 1.7.2. – 1.7.6. jsou uvedeny histologické snímky různých poškození ledvin provázejících AAN.<sup>41,54</sup>



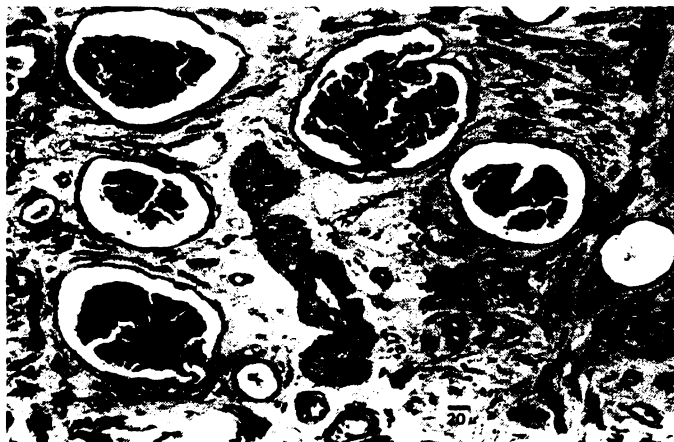
*Obr. 1.7.2. - Rošířená atrofie cortexu (C) zahrnující Bertiniho útvary (B) dolů k ledvinovému uzlíku u pacientky trpící AAN. Lze vidět nepatrný zásah pyramidových buněk (M). (HE,x 4). (převzato z<sup>54</sup>)*



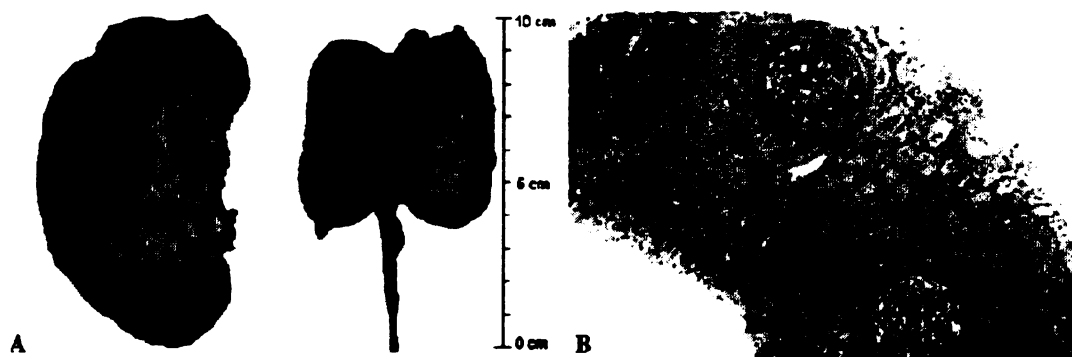
*Obr. 1.7.3. - Mírně atypická hyperplazie ledvinové pánvičky. Řez ledvinnou tkání pacientky trpící AAN (HE, x 560). (převzato z<sup>54</sup>)*



*Obr. 1.7.4. - Extensivní skleróza vnějšího a vnitřního kortexu ledviny. Snímek ledviny pacientky trpící AAN. (HE, x 50). (převzato z <sup>54</sup>)*



*Obr. 1.7.5. – Fibrózní ztlustěniný intimy (cévní výstelky), zejména interlobulárních tepen. Je patrná intersticiální skleróza a tubulární atrofie. Sonografický snímek ledviny pacienta trpícího AAN. (HE x 280). (převzato z <sup>54</sup>)*



Obr. 1.7.6. - (A) Porovnání normálních ledvin (vlevo) a atrofovaných ledvin s degradovaným kortexem způsobené AA (vpravo). Postižené ledviny pocházejí od 47-leté pacientky postižené AAN po dvouletém užívání rostlinných přípravků. (odhad - 374 g kumulovaných AA). (B) Biopsie ledvinné tkáně 49-leté pacientky trpící AAN. Kreatininová clearance byla snížena na 37 ml/min. Normálně by se kreatininová clearance měla pohybovat v rozmezí 8,84 - 15,91 mmol/den.<sup>55</sup> Rok po redukční kůře obsahovaly její ledviny 186 g kumulovaných AA a během dalších 13 měsíců se objevila rozsáhlá intersticiální fibróza, množství zánětlivých buněk, ale neporušený glomerulus. (HE x 100). (převzato z<sup>41</sup>)

Existují však stále otázky, na které je potřeba najít odpověď: Proč se tato choroba projevila asi jen u 5 % pacientek? Je možné, že u některé z nepoškozených pacientek existují procesy, které zabránily vzniku nádorů? Na tyto otázky jistě odpoví neustále probíhající výzkum této choroby

## ***2. Cíl bakalářské práce***

Cílem předkládané bakalářské práce byla především literární rešerše poznatků týkajících se látek působících jak nefrotoxicky tak karcinogeně. V experimentální části pak byl sledován metabolismus aristolochové kyseliny I (AAI), konkrétně její detoxikační metabolická cesta. Při práci byly používány mikrosomy (MS) z jater potkanů premedikovaných induktory různých cytochromů P450 . Za jejich katalýzy byl sledován vznik demethylačního metabolitu aristolochové kyseliny Ia (AAIa).

Bakalářská práce vznikla za podpory grantů GAČR (303/09/0472) a MŠMT ČR (MSM0021620808).

### ***3. Materiál a metody***

#### ***3. 1. Použitý materiál a chemikálie***

Použitý materiál a chemikálie pocházejí z těchto zdrojů:

- **Chemopetrol, Česká republika** - suchý led
- **Lachema Brno, Česká republika** -  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgCl}_2$ , kyselina octová, methanol
- **Linde, Česká republika** - kapalný dusík
- **Merck, Německo** - acetonitril
- **Penta, Česká republika** - ethylacetát
- **Sigma, USA** - glukosa-6-fosfát, glukosa-6-fosfát dehydrogenasa, triethyl-aminacetát (TEAA), NADPH
- **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 izoform CYP i mikrosomy izolované z potkanů kontrolní byly izolovány v laboratoři katedry biochemie PŘF UK

#### ***3. 2. Přístroje***

- **Automatické mikropipety** - Nichipet EX (Japonsko)
- **Centrifuga** - Microcentaur MSE, Sanyo, úhlový rotor (Velká Británie)
- **Inkubátor** - Thermomixer Eppendorf Compaq Eppendorf (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)

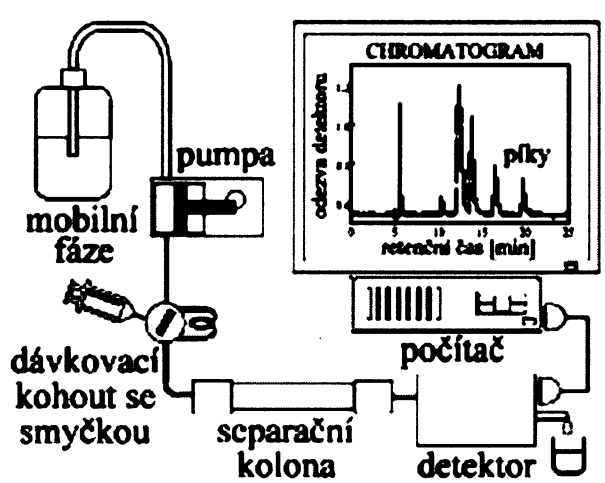
- **Spektrofotometr** - Hewlett Packard E8453 (USA)
- **Systém HPLC** - pumpa: Dionex pump P580; ASI-100 Automated Sample Injector; UV/VIS Detector UVD 170S/340S (USA); Degasys DG-1210 Dionex; termobox pro kolonu: COLUMN OVEN LCO 101; Kolona Macherey-Nagel, Nukleosil 100-5 C18HD, 4x250 mm (Německo); program Chromeleon™ 6.11 build 490
- **Další přístroje** – analytické váhy PESA 40SM-200A (Švýcarsko); termostatová lázeň KL1 (Laboratorní přístroje Praha), Mikroshaker type ML-1

### 3. 3. *Metody*

#### 3. 3. 1. *Popis metody HPLC*

Metoda HPLC je jednou ze základních separačních a současně analytických metod. Tato čtyři písmena jsou zkratkou *High Performance Liquid Chromatography* neboli vysokoúčinná kapalinová chromatografie. Metoda HPLC byla vynalezena v sedmdesátých letech minulého století a během několika let získala značnou popularitu mimo jiné díky své schopnosti separace velmi podobných (strukturně blízkých) složek směsi. Během osmdesátých let minulého století se začala tato metoda kombinovat s jinými dříve již používanými metodami a její vyhodnocování bylo svěřeno počítači. Snadná automatizace a spojení s počítačem poskytlo HPLC další výhodu při použití v laboratoři oproti jiným separačním metodám. Metoda HPLC má široké spektrum využití - můžeme se s ní setkat v běžné laboratorní praxi, kosmetickém průmyslu, potravinářství, výzkumu či environmentální praxi.<sup>71</sup>

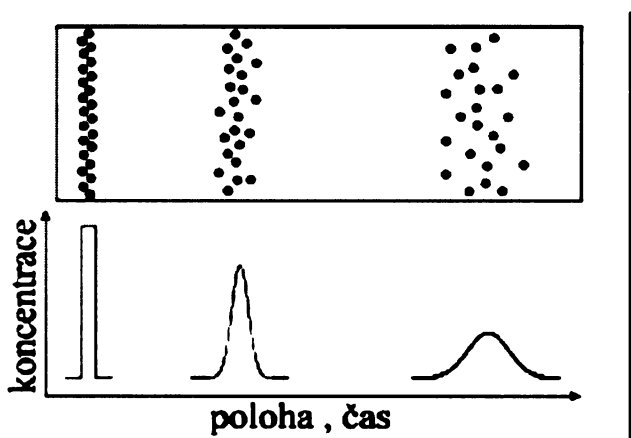
Schematicky můžeme kapalinový chromatogram znázornit tak, jak je ukázáno na obrázku 3.3.1.



Obr 3.3.1. - Schéma kapalinového chromatografu (převzato z <sup>72</sup>)

Separace probíhá na separační koloně, která je naplněna stacionární (nepohyblivou) a mobilní (pohyblivou) fází. Analyt je mobilní fází unášen separační kolonou a je zadržován ve stacionární fázi. Podle toho, jakou afinitu má analyt ke stacionární fázi, je na ní zadržován a tím pádem i zpoždován.<sup>71,72</sup>

Zóna analytu se nám v chromatogramu znázorní jako pík (eluční křivka), jehož tvar a velikost je závislá na koncentraci analytu ve vzorku, jak je ukázáno na obrázku 3.3.2.



Obr 3.3.2. - Velikost a šířka píků v závislosti na koncentraci analytu ve vzorku (převzato z <sup>72</sup>)  
V první části obrázku je znázorněn pík při vysoké koncentraci analytu v analyzovaném vzorku. Čím víc se snižuje koncentrace analytu ve vzorku, tím nižší a rozrytější píky se nám na chromatogramu objeví.

Z chromatogramu můžeme vyčíst kvalitativní informace – retenční čas, ze kterého můžeme pomocí metody standardů zjistit, o jakou látku se jedná, ale též

kvantitativní informace, kdy z ploch píků zjistíme množství a koncentraci analytu ve vzorku.<sup>71,72</sup>

Kapalinovou chromatografii můžeme rozdělovat na dva typy – chromatografii s *normálními fázemi*, kde stacionární fáze je polární a mobilní fáze je nepolární. Oproti tomu chromatografie a *reverzními* (obrácenými) fázemi (RP-HPLC) má nepolární stacionární fázi a polární mobilní fázi.<sup>71,72</sup> Tento typ chromatografie byl užít v předkládané bakalářské práci.

### **3. 3. 1. 1. Postup separace AAI a jejího metabolitu pomocí HPLC**

Látky obsažené v inkubačních směsích AAI s enzymovými systémy a standardní vzorky sloučenin byly separovány a stanovovány pomocí metody RP-HPLC na koloně C<sub>18</sub> (Macherey-Nagel, SRN) při teplotě 35 °C. Jako mobilní fáze byla použita směs 100 mM triethylaminacetátu (pH 7,0; pH upraveno kyselinou octovou) a 80 % acetonitril. Po aplikaci vzorku na kolonu bylo složení mobilní fáze 80 % TEAA a 20 % acetonitrilu. Byla nastavena postupná změna gradientu až na konečných 40 % TEAA a 60 % acetonitrilu. Obě mobilní fáze byly připraveny ve skleněných lahvích a před použitím z nich sonikací v ultrazvukové lázni byl odstraněn vzduch. Eluce probíhala gradientově při průtoku mobilní fáze 0,5 ml/min po dobu 55 minut. Jednotlivé složky inkubační směsi byly analyzovány při vlnové délce 250 nm a objem vzorku nanášeného na kolonu činil 20 µl.

### **3. 3. 2. Příprava standardů aristolochové kyseliny I pro HPLC**

K 28 ml methanolu byly přidány 2 ml 2,75 mM AAI. Směs byla důkladně promíchána a dále analyzována dle podmínek popsaných v kapitole 3.3.1.1..



### ***3. 3. 3. Oxidace aristolochové kyseliny I cytochromy P450 jaterních mikrosomů potkana premedikovaného $\beta$ -naftoflavonem, Sudanem I, fenobarbitalem a potkana bez premedikace***

Oxidace AAI byla prováděna inkubací AAI s enzymovým mikrosomálními systémy jater potkana. Inkubační směs byla připravena v „dubletech“ o celkovém objemu 500  $\mu$ l. NADPH zde poskytoval NADPH generující systém (NADPH-GS).

*Složení inkubační směsi:*

- fosfátový pufr 100 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  pH = 7,4
- NADPH-GS - 10 mM  $\text{MgCl}_2$ 
  - 10 mM glukosa-6-fosfát
  - 1mM  $\text{NADP}^+$
  - 1 U/ml glukosa-6-fosfátdehydrogenáza
- AAI - zásobní roztok o koncentraci 2 mg/ml
  - výsledná používaná koncentrace 4  $\mu$ g/ml
- jaterní mikrosomy od potkanů premedikovaných fenobarbitalem,  $\beta$ -naftoflavonem, Sudanem I a mikrosomy od potkanů bez premedikace

*koncentrace zásobních roztoků mikrosomů* - MS PB - 163  $\mu$ M  
- MS  $\beta$ -NF - 32,3  $\mu$ M  
- MS Sudan I - 44,34  $\mu$ M  
- MS Kontrolní - 16,8  $\mu$ M

Z daných mikrosomů byly připraveny roztoky o látkovém množství 0,1, 0,2 a 0,3 nmol cytochromů P450 následujícím způsobem:

Všechny potřebné složky byly do směsi přidány tak, aby odpovídaly výše zmíněným parametrům. Směs byla doplněna fosfátovým pufrům na objem 500  $\mu$ l, zamíchána a inkubována 10 minut za stálého třepání (37 °C a 400 RPM) v otevřených mikrozkušavkách. Přídatkem 1 ml ethylesteru kyseliny octové byla probíhající reakce zastavena. Následovalo jednominutové třepání na třepačce Microshaker typ ML-1, čímž se

produkty extrahovaly do organické fáze. Pro důkladnější oddělení fází byla směs centrifugována po dobu 3 minut při 13 000 RPM (minicentrifuga MicroCentaur MSE, úhlový rotor). Po oddělení organické fáze obsahující produkty reakce byl k vodné fázi přidán opět 1 ml ethylesteru kyseliny octové a byla provedena další extrakce stejným způsobem. Spojené extrakty byly odpařeny a vzorky byly před analýzou uchovány při teplotě -20 °C. Těsně před analýzou byly odparky rozpuštěny ve 30  $\mu$ l methanolu a vzorky byly analyzovány pomocí HPLC (aplikováno 20  $\mu$ l).

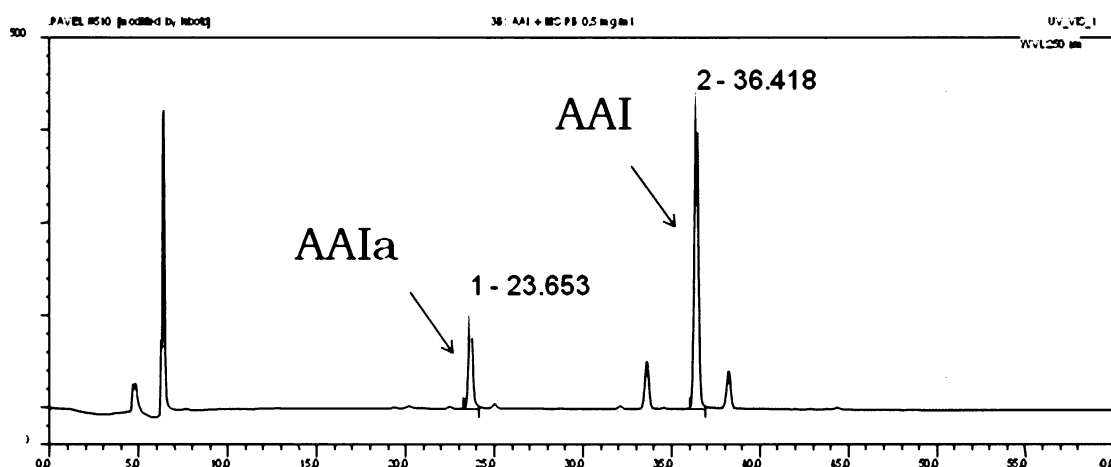
## 4. Výsledky

V literatuře je jako detoxikační cesta aristolochové kyseliny I popsána její oxidace.<sup>29,30</sup> Majoritní metabolit detoxikace, tvořený demethylací methoxy skupiny AAI, byl separován od AAIA pomocí HPLC a detekován při vlnové délce 250 nm.

Optimální podmínky separace AAI od jejího metabolitu pomocí HPLC byly stanoveny již dříve.<sup>73</sup> V předkládané bakalářské práci však byly podmínky separace mírně modifikovány. Popis postupu je uveden v kapitole 3.3.1.1.

V metabolických studiích, a také jako standard, byla používána sodná sůl aristolochové kyseliny I (AAI).

AAI je enzymy přítomnými v jaterních mikrosomech potkanů oxidována na demethylační metabolit AAIA (*graf 4.1.*). AAI je při podmínkách popsaných v kapitole 3.3.1.1. eluována v retenčním čase 36,4 minut a její oxidační metabolit (AAIA) v retenčním čase 23,6 minut (*graf 4.1.*). Ostatní píky v chromatogramech na grafu 4.1. byly detekovány i v kontrolních vzorcích, z čehož vyplývá, že nejsou produkty metabolismu AAI.



*Graf 4.1. – HPLC AAI a jeho metabolitu AAIA tvořeného jaterními mikrosomy potkana premedikovaného fenobarbitalem*

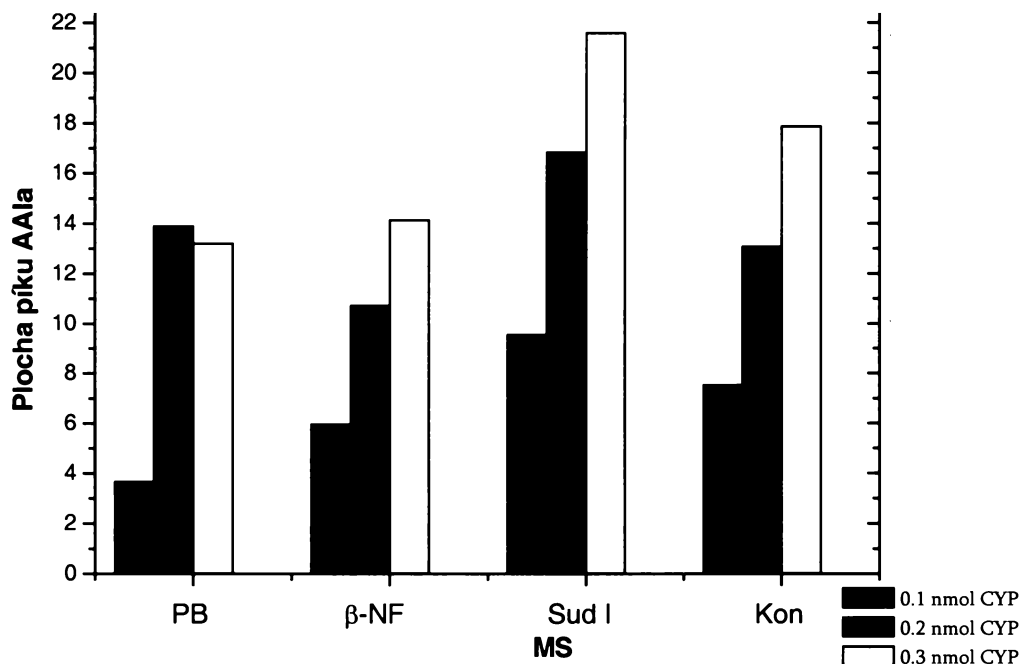
Abychom zjistili, které cytochromy P450 se účastní oxidace AAI na AAIA, byly v experimentech použity jaterní mikrosomy laboratorních potkanů, u nichž byl oboha-  
cen obsah jejich jednotlivých cytochromů P450 pomocí jejich induktorů. Z induktorů  
byly použity Sudan I a  $\beta$ -naftoflavon jako induktory cytochromů P450 1A1/2 a fenobar-  
bital jako induktor cytochromů P450 2B. Účinnost jednotlivých mikrosomů z jater indu-  
kovaných zvířat oxidovat AAI pak byla porovnávána s účinností mikrosomů z jater  
kontrolních nepremedikovaných zvířat.

Inkubační směsi se všemi typy mikrosomů byly připraveny ve třech sériích tak,  
aby následné látkové množství CYP z mikrosomů bylo 0,1, 0,2 a 0,3 nm. Všechny typy  
použitých mikrosomálních frakcí oxidují AAI na AAIA (*graf 4.2. a tabulka 4.1.*).

*Tabulka 4.1. - Srovnání ploch píků AAIA tvořeného při různých koncentracích cytochromu P450  
v jaterních mikrosomech potkanů indukovaných fenobarbitalem,  $\beta$ -naftoflavonem, Sudanem I a  
potkanů kontrolních*

Plocha píku AAIA				
n CYP (nmol)	PB	$\beta$ -NF	Sud I	Kon
0,1	3,67	5,96	9,54	7,53
0,2	13,89	10,71	16,83	13,09
0,3	13,20	14,14	21,60	17,87

Z výsledků experimentu je patrné, že všechny typy mikrosomů jsou schopny  
oxidovat AAI. Množství vzniklého metabolitu však bylo ovlivněno indukci experiment-  
tálních zvířat induktory některých cytochromů P450 a koncentrací cytochromů P450.



*Graf 4.2. - Závislost vzniku AA1a z AAI na mikrosomech z různě premedikovaných potkanů – porovnání tří různých koncentrací cytochromů P450 a jejich vliv na vznik metabolitu AA1a. Potkani, ze kterých byly mikrosomy použity, byly premedikovány fenobarbitalem (PB), Sudanem I (Sud I), β-naftofalvonem (β-NF) a též z potkanů bez premedikace (Kon). Sloupce uvedené v grafu udávají množství vzniklé AA1a. Uvedené hodnoty jsou průměr ze dvou měření. Složení inkubační směsi: 11 μM 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 dehydrogenáza, fosfátový pufr pH=7,4*

Nejúčinněji oxidovali AAI na AA1a jaterní mikrosomy potkanů premedikovaných Sudanem I (*Graf 4.2.*).

Z uvedených výsledků vyplývá, že oxidace AAI je preferenčně katalyzována cytochromy P450 1A1 a 1A2.

## 5. Diskuze

Aby bylo možné studovat vliv xenobiotika na lidský organismus, je třeba detailně znát průběh jeho metabolismu včetně všech enzymů, které se ho zúčastňují. K detoxikaci karcinogenní a nefrotoxické AAI na AAIA dochází její demethylací AAI na AAIA (obr. 1.6.3.). Tento chemický proces je katalyzován oxidací cytochromy P450 (CYP).<sup>74</sup>

Cytochromy P450 patří mezi inducibilní enzymy. Premedikací experimentálních zvířat specifickými induktory těchto enzymů je možné docílit odlišného zastoupení jednotlivých forem tohoto enzymu v mikrosomech. Experimenty sledující oxidaci aristolochové kyseliny I byly prováděny s mikrosomy z jaterní tkáň potkanů premedikovanými známými induktory jednotlivých 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 kontrolní mikrosomy. Kontrolní mikrosomy byly izolovány z nepremedikovaných zvířat. Premedikace potkanů Sudanem I, a tedy nabohacení jaterních buněk cytochromy P450 1A1/2, vedla k výrazné stimulaci tvorby metabolitu aristolochové kyseliny I, AAIA. Podobně jako Sudan I indukuje 1A1/2 i  $\beta$ -naftoflavon. Sudan I je ale silnějším induktorem této podrodiny cytochromů P450 než  $\beta$ -naftoflavon. V případě mikrosomů takto premedikovaných potkanů (Sudanem I) byla pozorována větší efektivita v tvorbě metabolitu aristolochové kyseliny I, AAIA. Tato skutečnost silně napovídá, že cytochromy P450 podrodiny 1A hrají v oxidaci aristolochové kyseliny významnou úlohu. Jaterní mikrosomy potkanů premedikovaných fenobarbitalem (indukce CYP2B) byly oproti kontrolním mikrosomům méně účinné. Cytochromy P450 podrodiny 2B hrají minoritní roli v oxidaci aristolochové kyseliny I, což koresponduje s poznatky popsanými v dřívějších studiích.<sup>1</sup>

## 6. Závěr

Aristolochové kyseliny jsou karcinogenní<sup>61</sup> a mutagenní sloučeniny<sup>29</sup> rostlinného původu. Jsou jednou z diskutovaných příčin onemocnění Balkánské endemické nefropatie (BEN - Balkan endemic nephropathy) a potvrzenou příčinou Nefropatie vyvolané aristolochovými kyselinami (AAN - Aristolochic acid nephropathy), která byla dříve označována jako Nefropatie vyvolaná čínskými bylinami (CHN - Chinese Herb Nephropathy).<sup>29,35,61</sup>

V předkládané bakalářské práci bylo prokázáno, že aristolochová kyselina I je v případě experimentálního modelu potkana oxidována jaterními mikrosomálními systémy obsahujícími cytochromy P450 na aristolochovou kyselinu Ia.

Na oxidaci aristolochové kyseliny I se významně podílí především cytochromy P450 podrodiny 1A. Tato skutečnost vyplývá z experimentů využívajících nabohacení jednotlivých forem cytochromu P450 jejich induktory. Mikrosomální systém jater z potkanů premedikovaných Sudanem I oxiduje AAI neefektivněji a tvoří metabolit AAIA.

Výsledky získané v bakalářské práci mohou přispět k poznání detoxikačního metabolismu aristolochové kyseliny I a mohou být využity při dalším výzkumu poznání etiologie Balkánské endemické nefropatie.

## *Seznam použité literatury*

- 1 Šistková, J.; Hudeček, J.; Hodek, P.; Frei, E.; Schmeiser, H. H.; Stiborová, M.: Human cytochromes P4501A1 and 1A2 participate in detoxication of carcinogenic aristolochic acid. *Neuroendocrinology Letters*, **29**:5, 733-737 (2008)
- 2 Valečková, V.: ústní sdělení
- 3 Mathioli, P.O.: *Herbář neboli bylinář I*. Olomouc, Dobra & Fontána 1998
- 4 [http://rostliny.prirodou.cz/?rostlina=asarum\\_europaeum](http://rostliny.prirodou.cz/?rostlina=asarum_europaeum) 22.2.2009
- 5 <http://bylinka.bloguje.cz/0701archiv.php> 22.2.2009
- 6 [http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=2236&loc=ec\\_res](http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=2236&loc=ec_res) 5.1.2009
- 7 Gordon, R.: *Podivuhodné dějiny lékařství*. Praha, Melantrich 1995
- 8 Vokurka, M.; Hugo, J.: *Velký lékařský slovník*. 4. aktualizované vydání, Praha, Maxdorf 2004
- 9 <http://www.toxicita.cz/> 26.2.2009
- 10 Balíková, M.: *Analytická toxikologie*. přednáška na 1.LF UK Praha, 2008
- 11 Nesměrák, K.: *Toxikologie*. přednáška na PřF UK, katedra analytické chemie, Praha 2007
- 12 Patočka, J.: *Vojenská toxikologie*. Grada Publishing 2004
- 13 Hrdina, V.; Hrdina, R.; Jahodář, L.: *Přírodní jedy a toxiny*. Praha, Galén 2004
- 14 Prokeš, J.: *Základy toxikologie*. Praha, Galén 2005
- 15 Chodounská, H.: *Přírodní látky I*. přednáška na PřF UK, Praha 2007
- 16 Schulzová, V.; Hajšlová, J.: *Toxické alkaloidy v potravinovém řetězci člověka*. Výzkumný ústav rostlinné výroby 2006
- 17 [http://www.rozhlas.cz/lekari/kolumbie/\\_zprava/466168](http://www.rozhlas.cz/lekari/kolumbie/_zprava/466168) 13.5.2009
- 18 Velíšek J.: *Chemie potravin*. Tábor, OSSIS 2002
- 19 [http://cs.wikibooks.org/wiki/P%C5%99%C3%ADrodn%C3%AD\\_l%C3%A1tky/Chemie\\_p%C5%99%C3%ADrodn%C3%ADch\\_l%C3%A1tek/P%C5%99e](http://cs.wikibooks.org/wiki/P%C5%99%C3%ADrodn%C3%AD_l%C3%A1tky/Chemie_p%C5%99%C3%ADrodn%C3%ADch_l%C3%A1tek/P%C5%99e)



hled\_p%C5%99%C3%ADrodn%C3%ADch\_l%C3%A1tek/Glykosidy  
13.5.2009

- 20 <http://www.vscht.cz/kot/resources/studijni-materialy/tox-001/prezentace.pdf>  
13.5.2009
- 21 Erhart, L.: *Seminář z antropologie*. seminář na Gymnáziu Arabská 14, Praha 2005/2006
- 22 Valečková, V.: *Biologie*. vyučovací předmět na Gymnáziu Arabská 14, Praha 2004/2005
- 23 Pegřím, R.; Valachovič, A.: *Anatomie a fyziologie člověka*. Praha, Státní zdravotnické nakladatelství 1969
- 24 <http://ezinearticles.com/?History-of-Alternative-Medicine&id=275778> 1.5.2009
- 25 French, R.: *Medicine Before Science or The Business of Medicine from the Middle Ages to the Enlightenment*. Cambridge, Cambridge University Press 2003
- 26 Watts, S.: *Diseases and Medicine in World History*. New York, Routledge 2003
- 27 Musil, J.: *Úvod do biochemie chorobných procesů*. Praha, Státní pedagogické nakladatelství 1983
- 28 <http://www.britannica.com/EBchecked/topic/472824/Sir-Percivall-Pott>  
13.5.2009
- 29 Arlt, V.M.; Stiborová, M.; Schmeiser, H.H.: Aristolochic acid as a probable human cancer hazard in herbal remedies: a review. *Mutagenesis* 17:4, 265-277 (2002)
- 30 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.: Detoxication role of hepatic cytochrom P450s in the kidneys toxicity induced by aristolochic acid. *Kidney International*, 73, 1231-1239 (2008)
- 31 Merta, M.: Riziko renálního poškození herbálními látkami. *Postgraduální nefrologie*, 2:5, 75-77 (2004)
- 32 Biamas, G.; Boletis, J.: Balkan Nephropathy: Evolution of Our Knowledge. *American Journal of Kidney Diseases*. 52:3, 606-616 (2008)
- 33 Stefanovic, V.; Cosyns, J.P.: *Balkan nephropathy*. v Davison, A.M.; Cameron, J.S.; Grunfeld, J.P.; Ponticelli, C.: *Oxford Textbook of Clinical Nephrology ed 3*. Oxford, Oxford University, 1095-1102 (2004)

- 34 Arlt, M.V.; Stiborová, M.; von Brocke, J.; Simões, M.L.; Lord, G.M.; Nortier, J.L.; Hollstein, M.; Phillips, D.H.; Schmeiser, H.H.: Aristolochic acid mutagenesis: molecular clues to the aetiology of Balkan endemic nephropathy-associated urothelial cancer. *Carcinogenesis*, **28**:11, 2253–2261 (2007)
- 35 Stiborová, M.; Patočka, J.; Frei, E.; Schmeiser, H.H.: Biochemické a toxikologické aspekty etiologie balkánské endemické nefropatie. *Chemické listy*, **99**, 782-788 (2005)
- 36 Stefanovic, V.; Toncheva, D.; Atanasova, S.; Polenakovic, M.: Etiology of Balkan endemic nephropathy and associated urothelial cancer. *American Journal of Nephrology*, **26**, 1-11 (2006)
- 37 Pfau, W.; Schmeiser, H.H.; Wiessler, M.: P-32 postlabeling analyzis of the DNA adducts formed by aristolochic-acid-I and aristolochic-II. *Carcinogenesis*, **11**:9, 1627-1633 (1990)
- 38 Arlt, M.V.; Wiesler, M.; Schmeiser, H.H.: Using polymerase arrest to detect DNA binding specificity of aristolochic acid in the mouse H-ras gene. *Carcinogenesis*, **21**:2, 235-242 (2000)
- 39 Schmeiser, H.H.; Janssen, J.W.G.; Lyons, J.; Scherf, H.R.; Pfau, W.; Buchmann, A.; Bartram, C.R.; Weissler, M.: Aristolochic acid activates ras genes in rat-tumors at deoxyadenosine residues. *Cancer research*, **50**:17, 5464-5469 (1990)
- 40 Smith, G.; Stanley, L.A.; Sim, E.; Strange, R.C.; Wolf, C.R.: Metabolic polymorfisms and cancer susceptibility. *Cancer surveys*, **25**, 27-65 (1995)
- 41 Nortier, J.L.; Vanherweghem, J.L.: For patients taking herbal therapy—lessons from aristolochic acid nephropathy. *Nephroogyl Dialysis Transplantation* **22**, 1512-1517 (2007)
- 42 van Ypersele de Strihou, C.; Vanherweghem, J.L.: The tragic paradigm of Chinese herbs nephropathy. *Nephroogyl Dialysis Transplantation*, **10**:2, 157-160 (1995)
- 43 Tatu, C.A.; Orem, W.H.; Finkelman, R.B.; Feder, G.L.: The etiology of Balkan endemic nephropathy: Still more questions than answers. *Enviromental Health Perspectives*, **106**:11, 689-700 (1998)
- 44 Nortier, J.L.; Martinez, M.M.; Schmeiser, H.H.; Arlt, V.M.; Bieler, C.A.; Petein, M.; Depierreux, M.F.; De Pauw, L.; Abramowicz, D.; Vereerstraeten, P.; Vanherweghem, J.L.: Urothelial carcinoma associated with the use of a

- Chinese herb (*Aristolochia fangchi*). *New England Journal of Medicine*, **342**:23, 1686-1692 (2000)
- 45 Miller, G.L.; Murray, W.L.: *Herbal medicinals, A Clinician's Guide*. Binghamton NY, Haworth Press 1998
- 46 <http://web.lfp.cuni.cz/journals/imj/1999/3/c114.html> 22.2.2009
- 47 Vanherweghem, J.L.; Depierreux, M.F.; Tielemans, C.; Abramowicz, D.; Dratwa, M.; Jadoul, M.; Richarvd, C.; Vandervelde, D.; Verbeelen, D.; van Haelenfastre, R.; Vanhaelen, M.: Rapidly progressive interstitial renal fibrosis in young-women: association with slimming regimen including Chinese herbs. *Lancet*, **341**:8842, 387-391 (1993)
- 48 Pokhrel, P.K.; Ergil, K.V.: Aristolochic acid: a toxicological review. *Clinical Acupuncture and Oriental Medicine*, **1**:3, 161-166 (2000)
- 49 Vanhaelen, M.; Vanhaelen-Fastre, R.; But, P.; Vanherweghem, J.L.: Identification of aristolochic acid in Chinese herbs. *Lancet*, **343**:8890, 174-174 (1994)
- 50 Stiborová, M.: ústní sdělení
- 51 Martinez, M.C.M.; Nortier, J.; Vereerstraeten, P.; Vanherweghem, J.L.: Progression rate of Chinese herb nephropathy: impact of *Aristolochia fangchi* ingested dose. *Nephrology Dialysis Transplantation*, **17**, 408-412 (2002)
- 52 Nortier, J.L.; Schmeiser, H.H.; Martinez, M.C.M.; Artl, V.M.; Vervaet, C.; Garbar, C.H.; Daelemans, P.; Vanherweghem, J.L.: Invasive urothelial carcinoma after exposure to Chinese herbal medicine containing aristolochic acid may occur without severe renal failure. *Nephrology Dialysis Transplantation*, **18**:2, 426-428 (2003)
- 53 Unger, P.; Nortier, J.L.; Martinez, M.C.M.; Plein, D.; Vandebossche, J.L.; Vereerstracten, P.; Vanherweghem, J.L.: High prevalence of fenfluramine-related aortic regurgitation in women with end-stage renal disease secondary to Chinese herb nephropathy. *Nephrology Dialysis Transplantation*, **18**:5, 906-910 (2003)
- 54 Cosyns, J.P.; Jadoul, M.; Squifflet, J.P.; Deplaen, J.F.; Ferluga, D.; Destrihou, C.V.: Chinese herbs nephropathy: A clue to Balkan endemic nephropathy. *Kidney International*, **45**:6, 1680-1688 (1994)
- 55 Novák, F.: Návodý k praktiku z klinické biochemie pro 3. ročník Klinické a toxikologické analýzy (2008)

- 56 Stiborová, M.: *Studium enzymů biotransformujících xenobiotika jako nástroj k poznání mechanismu působení karcinogenů a konstrukce karcinomatik nové generace* v Sborník příspěvků IX. setkání týdenní školy pro středoškolské učitele přírodovědného zaměření. Praha, 2-24 (2005)
- 57 Stiborová, M.; Mikšanová, M.: Molekulární mechanismus karcinogeneze. *Živa*, **4**, 146 (1999)
- 58 Stiborová, M.: *Biochemie jako teoretický základ biomedicíny*. přednáška na PŘF UK, Praha 2008
- 59 Hrozinka, Š.: *Seminář z biologie pro přírodovědné obory*. vyučovaný předmět na Gymnáziu Arabská 14, Praha 2005/2006
- 60 Vanherweghem, J.L.: Urémie chronique et cancer des voies urinaires secondaires à la prise d'extraits végétaux utilisés en phytothérapie chinoise. *Medicine/Science*, **18**, 1095-1101 (2002)
- 61 Stiborová, M.; Frei, E.; Schmeiser, H.H.: Aristolochové kyseliny a ledvinové onemocnění „Chinese herbs nephropathy“. *Chemické listy*, **94**, 186-189 (2000)
- 62 Chan, W.; Yue, H.; Poon, W.T.; Chan, Y.W.; Smitz, O.J.; Kwong, D.W.J.; Wong, R.N.S.; Cai, Z.: Quantification of aristolochic acid-derived DNA adducts in rat kidney and liver by using liquid chromatography – electrospray ionization mass spectrometry. *Mutation Research*, **646**, 17-24 (2008)
- 63 Stiborová, M.; Frei, E.; Schmeiser, H.H.: Biotransformation enzymes in development of renal injury and urothelial cancer caused by aristolochic acid. *Kidney International*, **73**:11, 1209-11 (2008)
- 64 Stiborová M.: *Doktorská disertační práce*, PŘF UK Praha (2003)
- 65 Patterson, L.H.; McKeown, S.R.; Robson, T.; Gallagher, R.; Raleigh, S.M.; Orr, S.: Antitumour prodrug development using cytochrome P450 (CYP) mediated activation. *Anti-Cancer Drug Design*, **14**:6, 473-486 (1999)
- 66 Hietanen, E.; Laitinen, M.; Hänninen, O.: *Cytochrome P-450, Biochemistry, Biophysics and Environmental Implications*. New York, Elsevier 1982
- 67 Sheweita, S.A.: Drug-metabolizing enzymes: mechanism and functions. *Current Drug Metabolism*, **1**, 107-132 (2000)
- 68 Hudeček, J.: *Biochemie I(kata)*. přednáška na PŘF UK Praha 2007

- 69 Sofrová, D.; Tichá, M.; Barthová, J.; Entlicher, G.; Stiborová, M.; Novák, F.; Hudeček, J.; Hladík, J.; Krajhanzl, A.: Biochemie - základní kurz (skriptum), UK, Praha 1998
- 70 <http://www.lfhk.cuni.cz/farmakol/interakce/P450.htm> 21.4.2009
- 71 Opekar, F.; Jelínek, I.; Rychlovský, P.; Plzák, Z.: Základní analytická chemie (skriptum), Praha, UK-Karolinum, 2002
- 72 Coufal, P.: *Separální metody*. přednáška na PřF UK Praha 2008
- 73 Burda, P.: *Diplomová práce*. 2006, PřF UK Praha
- 74 Stiborová, M.; Frei, E.; Arlt, V.M.; Schmeiser, H.H.: Metabolic activation of carcinogenic aristolochic acid, a risk factor of Balkan endemic nephropathy. *Mutation Research*, **658**, 55-67 (2008)

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

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