

UNIVERSITA KARLOVA V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Studijní program: Biochemie



RNDr. František Bárta

FUNKCE BIOTRANSFORMAČNÍCH ENZYMŮ VE VÝVOJI
NEFROPATHIÍ VYVOLANÝCH ARISTOLOCHOVOU
KYSELINOU

FUNCTION OF BIOTRANSFORMATION ENZYMES IN
DEVELOPMENT OF NEPHROPATHIES CAUSED BY
ARISTOLOCHIC ACID

Disertační práce

Školitelka: prof. RNDr. Marie Stiborová, DrSc.

Praha, 2016

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce, ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne

.....

RNDr. František Bárta

Prohlášení spoluautorů:

Prohlašuji, že RNDr. František Bárta rozhodujícím způsobem (30-90 %) přispěl ke vzniku všech 7 publikací, které jsou přílohami předkládané disertační práce. Sám provedl většinu experimentů a významně se podílel na jejich plánování, interpretaci výsledků a na sepsání publikací.

V Praze dne

.....

prof. RNDr. Marie Stiborová, DrSc.

Na tomto místě bych rád poděkoval své školitelce paní prof. RNDr. Marii Stiborové, DrSc., která byla ochotná ujmout se vedení předkládané disertační práce a která mi byla po celou dobu studia oporou, zdrojem cenných rad a inspirace. Dále děkuji všem svým spolupracovníkům v naší laboratoři za pomoc s provedenými analysami, zejména pak panu doc. RNDr. Václavu Martínkovi, Ph.D. za provedení molekulárního modelování *in silico*. V neposlední řadě, děkuji všem kolegyním a kolegům z katedry biochemie PŘF UK v Praze za vytvoření velice příjemné atmosféry.

Práce byla podporovaná Grantovou agenturou České republiky (P303/09/0472, P303/12/G163 a 14-18344S) a Universitou Karlovou v Praze (UNCE 204025/2012 a GAUK 570513).

ABSTRAKT

Rostlinné alkaloidy aristolochové kyseliny (AA) jsou prokazatelné lidské karcinogeny, které vyvolávají dvě závažná onemocnění ledvin: nefropatii vyvolanou aristolochovou kyselinou (*Aristolochic Acid Nephropathy, AAN*) a Balkánskou endemickou nefropatii (*Balkan Endemic Nephropathy, BEN*). Charakteristickým znakem obou onemocnění je vývoj urotheliálních nádorů (*Upper Urothelial Carcinoma, UUC*). Ačkoliv jsou obě nefropatie vyvolané stejnou látkou, AA, není jejich klinická manifestace zcela totožná. Rozdíly mohou být vysvětleny jak vystavením různým dávkám AA, tak interindividuálními rozdíly v expresních hladinách a aktivitách enzymů, které AA v organismu metabolisují. Detailní znalost těchto enzymů může přispět k objasnění rozdílů v průběhu AAN a BEN a ke snížení rizika spojeného s AA. V předkládané disertační práci byly studovány enzymy, které participují jak na oxidační detoxikaci AAI, hlavní složky přírodní směsi AA, tak na redukční aktivaci, která resultuje v tvorbu aduktů AAI s DNA. V modelu laboratorního potkana byla za využití specifického inhibitoru NAD(P)H:chinonoxidoreduktasy 1(NQO1), dikumarolu, studována její úloha v redukční aktivaci AAI *in vivo*. Oxidační detoxikace AAI, která vede k tvorbě demetylovaného derivátu, AAIA (8-hydroxyaristolochové kyseliny), byla studována za využití indukce cytochromů P450 (CYP) 1A1 a 1A2, enzymů, které tuto reakci nejučinněji katalysují. Nicméně, CYP1A1/2 mohou rovněž redukčně aktivovat AAI za tvorby aduktů *in vivo* a *ex vivo*. Proto bylo cílem předkládané disertační práce určit, která z obou metabolických drah v organismu převládá. V rámci studie byla rovněž zkoumána aetiologie BEN/UUC, konkrétně vliv dalších suspektních environmentálních faktorů na vývoj tohoto závažného ledvinného onemocnění. V modelovém organismu laboratorního potkana byl studován vliv ochratoxinu A (OTA) na metabolismus AA s cílem zodpovědět otázku, zda může tento nefrotoxický mykotoxin ovlivňovat BEN/UUC vyvolaných působením AA. V našich studiích byl rovněž zkoumán vliv ostatních hypotetických faktorů (iontů toxických kovů a organických látek uvolňovaných z lignitového podloží oblastí s výskytem BEN) na oxidační detoxikaci AAI na AAIA, potažmo na vývoj BEN/UUC. Výsledky získané v disertační práci demonstrují zásadní úlohu NQO1 v bioaktivaci AAI nejen *in vitro*, ale rovněž v podmínkách *in vivo* a majoritní úlohu CYP1A1/2 v oxidační detoxikaci AAI *in vivo*. Výsledky získané ze studie zkoumající aetologii BEN/UUC poprvé ukazují schopnost OTA potenciálně ovlivňovat metabolismus AA, a tím i vývoj BEN/UUC.

ABSTRACT

Plant alkaloid aristolochic acid (AA) is a proven human carcinogen which causes two serious diseases: Aristolochic Acid Nephropathy (AAN) and Balkan Endemic Nephropathy (BEN). One of the characteristic features of both AAN and BEN is their close association with the development of upper urothelial carcinoma (UUC) in the renal tissue of patients. Although both nephropathies are mediated by the same compound (i.e. AA), their development differs slightly. The differences might be explained by a different exposure schedule of patients or interindividual differences in expression levels and activities of the enzymes metabolising AA in organisms. Detailed knowledge of these enzymes can contribute to the elucidation of the interindividual susceptibility to AA. In this thesis, enzymes participating in both oxidative detoxification of AAI, a major component of natural mixture of AA, and its reductive activation leading to the formation of AA-DNA adducts were studied. In a rat experimental model (*Rattus norvegicus*), NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) and its role in reductive bio-activation of AAI *in vivo* were examined utilising a specific inhibitor of this enzyme, dicoumarol. Oxidative detoxification of AAI resulting in formation of a demethylated derivative AAIa (8-hydroxyaristolochic acid) was studied using induction of cytochromes P450 (CYP) 1A1 and 1A2, the enzymes catalysing the formation of AAIa most efficiently. Nevertheless, CYP1A1/2 can also reductively activate AAI forming AAI-DNA adducts *in vivo* and *ex vivo*. Therefore, one of the aims of the thesis was to evaluate which AAI biotransformation pathway prevails *in vivo*. In this study, we aimed to clarify the aetiology of BEN/UUC, particularly the effect of other suspect environmental factors on development of this life-threatening renal disease. In the rat experimental model, we investigated the influence of ochratoxin A (OTA) on AA metabolism to elucidate whether this nephrotoxic mycotoxin is capable of affecting the AA-mediated BEN/UUC development. We also studied the effect of other factors which are hypothesised to participate in BEN/UUC development (i.e. ions of heavy metals and metalloids, and organic compounds being present in lignite deposits located in BEN regions), namely on oxidative detoxification of AAI to AAIa. The results found in the thesis demonstrate the crucial role of NQO1 in AAI bio-activation not only *in vitro* but also *in vivo*, and the major role of CYP1A1/2 in oxidative detoxification of AAI *in vivo*. In the study investigating the aetiology of BEN/UUC, the results show for the first time that OTA can be capable of influencing AA metabolism thereby potentiating the development of BEN/UUC.

(In Czech)

OBSAH

ABSTRAKT	- 5 -
ABSTRACT.....	- 6 -
OBSAH.....	- 7 -
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	- 9 -
1. ÚVOD.....	- 11 -
1.1 CHEMICKÁ KARCINOGENESE	- 11 -
1.1.1 Procesy vedoucí k vývoji nádorových onemocnění.....	- 12 -
1.1.2 Teorie chemické karcinogenese	- 15 -
1.2 ROSTLINY OBSAHUJÍCÍ ARISTOLOCHOVÉ KYSELINY.....	- 18 -
1.2.1 Látky obsažené v rostlinné čeledi <i>Aristolochiaceae</i>	- 21 -
1.2.2 Význam čeledi <i>Aristolochiaceae</i> v lékařství a léčitelství.....	- 25 -
1.3 ARISTOLOCHOVÉ KYSELINY.....	- 29 -
1.3.1 Chemické a biologické vlastnosti aristolochových kyselin.....	- 29 -
1.3.1 Biosynthesa aristolochových kyselin v rostlinách	- 31 -
1.3.3 Pathologie vyvolané aristolochovými kyselinami.....	- 33 -
1.3.3.1 Nefropathie vyvolaná aristolochovou kyselinou.....	- 34 -
1.3.3.2 Balkánská endemická nefropathie.....	- 37 -
1.3.3.3 Urotheliální nádory vyvolané aristolochovou kyselinou.....	- 43 -
1.3.4 Metabolismus aristolochových kyselin	- 45 -
1.3.4.1 Detoxikace aristolochových kyselin v organismu.....	- 46 -
1.3.4.2 Metabolická aktivace aristolochových kyselin v organismu.....	- 49 -
1.3.4.3 Enzymy oxidačně detoxikující aristolochovou kyselinu I	- 53 -
1.3.4.4 Enzymy redukčně aktivující aristolochové kyseliny.....	- 57 -
2. CÍL DISERTAČNÍ PRÁCE	- 60 -
3. MATERIÁL A METODY.....	- 61 -
3.1 POUŽITÝ MATERIÁL A CHEMIKÁLIE	- 61 -
3.2 METODY	- 61 -
3.2.1 Studie <i>in vivo</i> : premedikace laboratorního potkana	- 61 -
3.2.2 Oxidace AAI nebo AA na AAIA potkaními mikrosomy <i>in vitro</i>	- 62 -
3.2.3 Stanovení aktivit enzymů biotransformujících AA v potkaním organismu.....	- 63 -
3.2.4 Stanovení proteinové exprese NQO1 a CYP1A1/2 v potkaním organismu	- 64 -
3.2.5 Analýza tvorby aduktů AAI, AA a OTA s DNA	- 64 -
3.2.6 Studie <i>in silico</i> : molekulární modelování interakcí AAI s lidskými cytochromy P540 1A1, 1A2, 2C9 a 3A4.....	- 64 -

4. VÝSLEDKY A DISKUSE	- 65 -
4.1 STUDIUM MOLEKULÁRNÍHO MECHANISMU VÝVOJE NEFROPATHIE VYVOLANÉ AA	- 65 -
4.1.1 Studium redukční bioaktivace AAI.....	- 66 -
4.1.1.1 Tvorba aduktů AAI s DNA <i>in vivo</i>	- 66 -
4.1.1.2 Tvorba aduktů AAI s DNA <i>ex vivo</i>	- 67 -
4.1.1.3 NQO1 diktuje bioaktivaci AAI <i>in vivo</i>	- 70 -
4.1.1.4 Úloha cytochromů P450 1A1 a 1A2 v bioaktivaci AAI	- 75 -
4.1.2 Studium oxidační detoxikace AAI.....	- 80 -
4.1.2.1 Mechanismus <i>O</i> -demethylace AAI.....	- 80 -
4.1.2.2 Příspěvky jednotlivých lidských a potkaních cytochromů P450 k oxidační detoxikaci AAI	- 83 -
4.1.2.3 Úloha cytochromů P450 1A1/2 v oxidační detoxikaci AAI	- 86 -
4.1.2.4 Indukce cytochromů P450 1A1/2 snižuje tvorbu aduktů AAI s DNA.....	- 90 -
4.2 STUDIUM AETOLOGIE BALKÁNSKÉ ENDEMICKÉ NEFROPATHIE	- 93 -
4.2.1 Úloha ochratoxinu A ve vývoji Balkánské endemické nefropathie.....	- 93 -
4.2.1.1 Tvorba aduktů aristolochové kyseliny a ochratoxinu A s DNA <i>in vivo</i>	- 94 -
4.2.1.2 Ochratoxin A a aristolochová kyselina indukují NQO1 v játrech a ledvině.....	- 95 -
4.2.1.3 Ochratoxin A snižuje aktivitu enzymů detoxikujících AA	- 97 -
4.2.1.4 Vliv ochratoxinu A a aristolochové kyseliny na detoxikaci AA a AAI.....	- 100 -
4.2.2 Studium dalších hypotetických faktorů ovlivňujících vývoj Balkánské endemické nefropathie	- 103 -
4.2.2.1 Vliv vybraných iontů těžkých kovů a polokovů na detoxikaci AAI <i>in vitro</i>	- 104 -
4.2.2.2 Vliv vybraných ftalátů na detoxikaci AAI <i>in vitro</i>	- 105 -
4.2.2.3 Vliv ochratoxinu A a kombinovaný efekt studovaných polutantů na detoxikaci AAI <i>in vitro</i>	- 105 -
4.2.2.4 Ochratoxin A, butylbenzylftalát a ionty kadmia a selenu inhibují aktivity enzymů oxidačně detoxikujících AAI	- 107 -
5. ZÁVĚR	- 109 -
Seznam použité literatury	- 110 -
Seznam příloh	- 134 -

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

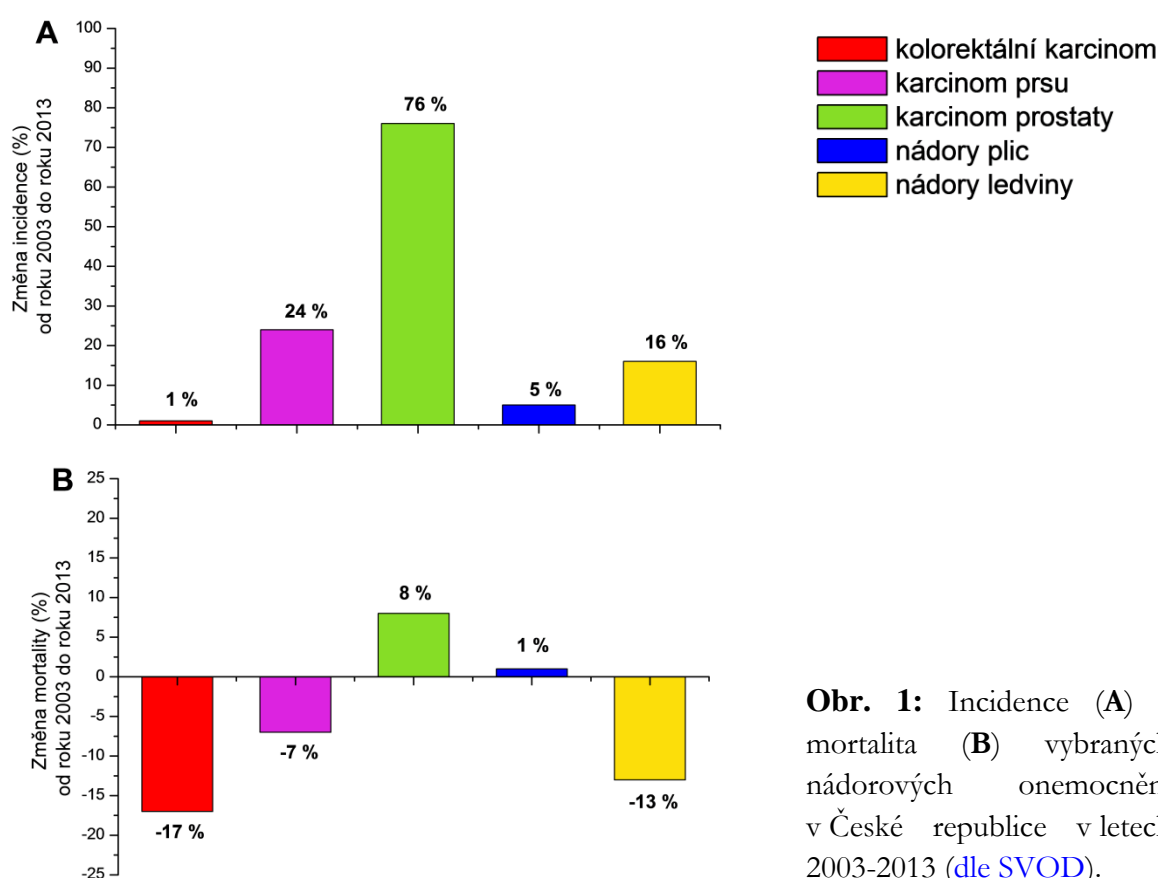
AA	aristolochové kyseliny
AAI	aristolochová kyselina I
AAIa	aristolochová kyselina Ia (8-hydroxyaristolochová kyselina)
AAII	aristolochová kyselina II
AAN	nefropathie vyvolaná aristolochovou kyselinou (<i>Aristolochic Acid Nephropathy</i>)
BBP	butylbenzylftalát
BEN	Balkánská endemická nefropathie (<i>Balkan Endemic Nephropathy</i>)
COX-1	prostaglandin H synthasa 1 (cyklooxygenasa 1)
CYP	cytochrom P450
dA-AAI	7-(deoxyadenosin- N^6 -yl)aristolaktam I
dA-AAII	7-(deoxyadenosin- N^6 -yl)aristolaktam II
DBP	dibutylftalát
DC	dikumarol
DEHP	bis(2-ethylhexyl)ftalát
dG-AAI	7-(deoxyguanosin- N^2 -yl)aristolaktam I
EROD	aktivita <i>O</i> -deethylovat 7-ethoxyresorufin
ESRD	konečné ledvinné selhání (<i>End-Stage Renal Disease</i>)
F	faktor představující násobek
<i>H-ras</i>	onkogen
<i>i.p.</i>	intraperitoneální podání
IARC	Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny (<i>International Agency for Research on Cancer</i>)
IC ₅₀	koncentrace způsobující 50% inhibici
MFO systém	systém oxidas (oxygenas) se smíšenou funkcí (<i>mixed function oxidase system</i>)
MROD	aktivita <i>O</i> -demethylovat 7-methoxyresorufin
NADP ⁺	nikotinamidadenindinukleotidfosfát (oxidovaná forma)
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát (redukována forma)
NADPH-GS	NADPH-generující systém

NAT	<i>N,O</i> -acetyltransferasa
ND	nedetekováno (<i>not detectable</i>)
NE	žádný efekt (<i>no effect</i>)
NQO1	NAD(P)H:chinonoxidoreduktasa 1 (DT-diaforasa)
NQO2	NAD(P)H:chinonoxidoreduktasa 2
OAT	přenašeč organických aniontů (<i>Organic Anion Transporter</i>)
OTA	ochratoxin A
<i>p</i>	hladina významnosti
<i>p53</i>	tumorový supresorový gen
PAU	polycyklické aromatické uhlovodíky
POR	NADH:cytochrom P450 oxidoreduktasa
<i>r</i>	korelační koeficient
RAL	relativní značení aduktů (<i>Relative Adduct Labelling</i>)
ROS	reaktivní formy kyslíku (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
RP-HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie s reversní fází
RPM	počet otáček za minutu
Sud I	Sudan I
SULT	sulfotransferasa
TP21	lidský tumorový supresor kódovaný genem <i>p21</i>
TP53	lidský tumorový supresor kódovaný genem <i>p53</i>
UGT	UDP-glukuronosyltransferasa
UUC	urotheliální karcinom (<i>Upper Urothelial Carcinoma</i>)

1. ÚVOD

1.1 CHEMICKÁ KARCINOGENESE

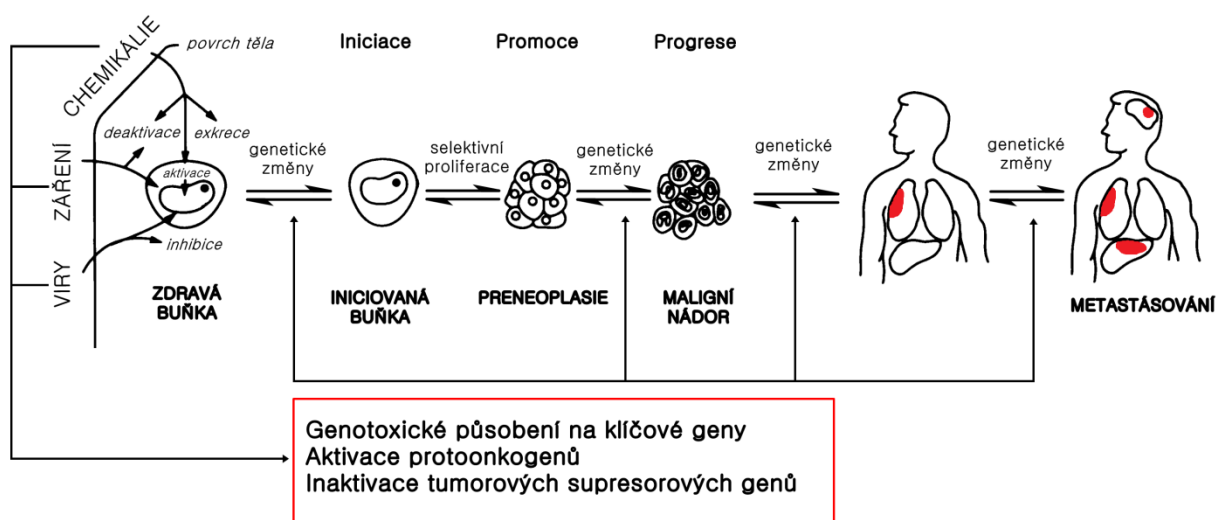
Úvodem své disertační práce bych rád ve zkratce uvedl základní informace, které jsou dosud známy o fenomenu nádorových onemocnění, přičemž důraz bude kladen na tzv. *chemickou karcinogenesi*. Problematika studia karcinogenese a karcinogenů je velice komplexní, nicméně velmi důležitá, a to zejména z hlediska incidence a úmrtnosti pacientů trpících tímto druhem onemocnění. V letech 2003 – 2013 patřily v České republice mezi nádory s největší incidencí a mortalitou kolorektální karcinom, karcinom prsu a prostaty a nádory plic a ledviny (GLOBOCAN, 2012). Ačkoliv úmrtnost v tomto období mírně klesala, výskyt těchto onemocnění výrazně rostl (**Obr. 1**) (SVOD). Tento trend je naneštěstí celosvětový, kdy v lepším případě meziročně počet nově diagnostikovaných případů neroste, nicméně ani neklesá (Pelengaris & Khan, 2013a). Z tohoto hlediska se porozumění a pochopení dějů vedoucích k maligní transformaci zdá být esenciální pro léčbu, popř. prevenci těchto onemocnění.



Obr. 1: Incidence (A) a mortalita (B) vybraných nádorových onemocnění v České republice v letech 2003-2013 (dle SVOD).

1.1.1 Procesy vedoucí k vývoji nádorových onemocnění

Vznik nádorové buňky je výsledkem komplexních dějů v organismu, pro něž se v současné době používá model tzv. multifázové karcinogeneze (**Obr. 2**) (Harris, 1991; Abel *et al.*, 2009; Abel & DiGiovanni, 2011). Jednotlivé stupně tohoto modelu byly objasněny za použití experimentálních zvířat, zejména pak na kožních nádorech indukovaných v organismu myši. Původní práce se datují do doby před více než 70 lety (Abel & DiGiovanni, 2011) a tyto studie dokládají, že pro vývoj myších kožních nádorů jsou zásadní tři fáze: *iniciace*, *promoce* a *progrese*. Navíc, koncept modelu multifázové karcinogeneze platí nejen v případě výše zmíněného zvířecího modelu, ale je též v souladu s vývojem tumorů v lidském organismu, ačkoliv ten je komplexnější (Abel & DiGiovanni, 2011). Koncept multifázové karcinogeneze byl a stále je vynikajícím modelem, který velmi přispěl k objasnění procesu karcinogeneze, ba hrál významnou úlohu v identifikaci chemopreventivních látek a jejich mechanistického působení (Abel & DiGiovanni, 2011).



Obr. 2: Multifázový proces karcinogeneze (upraveno dle Harris, 1991).

Vznik iniciované buňky je vyvolán působením exogenního, popř. endogenního karcinogenu, který mutageně působí na klíčové geny v DNA. Takto vzniknuvší iniciované buňky ovlivňují své mikroprostředí tak, že je zajištěn růst takových buněk oproti buňkám normálním. Takové působení následně vede iniciované buňky do tzv. *promoční fáze*. Při této fázi dochází k nadměrnému a nekontrolovanému dělení buněk, resp. k enormní selektivní tvorbě klonů těchto buněk (Kemp, 2005; Abel *et al.*, 2009). Promoce je charakterisována jak nekontrolovanou proliferací, tak remodelací tkání

a zánětem, jinými slovy vzniká tzv. *preneoplasie* (benigní nádor) (Boutwell, 1976; Abel *et al.*, 2009; Rundhaug & Fischer, 2010). Nicméně, v procesu progresu může preneoplasie podstoupit maligní transformaci, která je navíc ulehčena genovou nestabilitou a narušenou genovou expresí. Výsledkem progresní fáze je pak dobře definovaný zhoubný (maligní) nádor, který agresivně napadá ostatní tkáně a může též metastasovat do lymfatických uzlin a ostatních tkání (Woodworth *et al.*, 2004; Abel *et al.*, 2009; Abel & DiGiovanni, 2011).

Jak bylo výše zmíněno, iniciační fáze je vyvolána mutagenním působením karcinogenu na klíčové geny v DNA. Takovými geny jsou zejména protoonkogeny a tumorové supresorové geny. Obě skupiny těchto genů hrají kruciální roli v regulaci buněčného cyklu, resp. v buněčné proliferaci.

Teorie působení protoonkogenů byla podrobně rozpracována v pracích Temina a Baltimore (Temin, 1976; Baltimore, 1976) věnujících se problematice Rousova sarkomu. Ve zkratce, v organismech lze najít homologa virových, resp. retrovirových onkogenů, která označujeme jako protoonkogeny. Mutací buněčných protoonkogenů vznikají onkogeny, jejichž proteinové produkty, *onkoproteiny*, působí proti své přirozené funkci v buňce, a jejich následná exprese indukuje nekontrolovanou buněčnou proliferaci. Aktivace buněčných protoonkogenů může být, vedle chemických faktorů, vyvolána též působením onkovirů, resp. retroonkovirů, které jsou schopny zavést do hostitelské DNA svou vlastní genetickou informaci (Varmus, 1985; Liao, 2006; McLaughlin-Drubin, 2008). Navíc, k manifestaci maligní transformace vyvolané onkogeny stačí mutace pouze v jedné alele protoonkogenu (Pelengaris & Khan, 2013b).

Onkogeny se klasifikují do sedmi základních tříd, ve kterých lze najít vedle různých buněčných tyrosin-kinasových receptorů, cytosolárních proteinkinás threoninového a serinového typu a jaderných transkripčních faktorů též proteiny s GTPasovou aktivitou (např. rodina Ras) (Ruddon, 2007). Právě onkogeny rodiny Ras patří spolu s tumorovým supresorovým genem *p53* (viz dále) k nejčastěji mutovaným genům nalezeným v mnoha nádorech různého původu (Abedin *et al.*, 2011).

Tumorové supresorové geny, jak název napovídá, regulují buněčný cyklus tím, že eliminují poškozené buňky nebo buňky, které nadměrně proliferují navzdory buněčné signalisaci (Roussel, 2013). Produkty těchto genů, kterými jsou především inhibitory cyklin-dependentních kinás, hrají tedy klíčovou úlohu v prevenci tvorby nádorů v organismu. Pionýrskými pracemi v této oblasti byly studie Alfreda Knudsona, který se zabýval vzácnými dětskými očními nádory, retinoblastomy (Knudson, 1985; Knudson,

2001). Navíc, před 45 lety Knudson formuloval svou hypotézu tzv. *dvojího zásahu*. Podle této hypotézy je pro vývoj onemocnění nutná mutace obou alel (na rozdíl od onkogenů, kde je dostačující mutace pouze jedné alely). Mutací, resp. inaktivací obou alel genu dochází ke ztrátě inhibičního potenciálu těchto genů, které *ergo* pozbývají svou fyziologickou funkci a umožňují tvorbu a proliferaci *iniciovaných buněk* (Knudson, 1971; Knudson, 1985). Do dnešního dne bylo identifikováno 1 217 tumorových supresorových genů, z toho o 1 018 je známo, že kódují proteiny (TSGene). Za všechny bych zmínil nejčastěji mutovaný tumorový supresorový gen v nádorových tkáních, a to gen *p53*. Ačkoliv gen *p53* nekóduje inhibitor cyklin-dependentních kinas a není tedy tumorovým supresorem v přesném slova smyslu, protein TP53 velice úzce spolupracuje s těmito proteiny (např. TP21) a podílí se klíčovým způsobem na regulaci buněčného cyklu (Abedin *et al.*, 2011; Roussel, 2013). Lidský protein TP53, který je lokalizován v buněčném jádře, zásadně zasahuje rovněž do procesu programované buněčné smrti (apoptosy) a angiogeneze (Hanahan, 2000; Schmid *et al.*, 2006; Braicu *et al.*, 2015).

Vývoj nádorových onemocnění může být vedle životního stylu a přítomnosti, resp. nepřítomnosti genetických predisposic, vyvolán třemi základními faktory: fyzikálními, biologickými a chemickými. Fyzikální příčiny tumorigeneze zahrnují zejména různé druhy záření – ionisující, Röntgenovo, ultrafialové záření ad. (IARC, 2001, 2012a; Kotova *et al.* 2005). Takové záření může vyvolat zásadní změny ve struktuře DNA, tj. jednořetězové a dvouřetězové zlomy, které mohou resultovat v tvorbu genetických delecí a přeskupení (Schulte-Frohlide, 1987; Rak *et al.*, 2015).

Do biologické teorie karcinogeneze spadá především působení onkovirů, resp. retroonkovirů, které jsou schopny aktivovat buněčné protoonkogeny. Jak je popsáno výše, takový zásah do jejich přirozené funkce může vyústit tvorbou iniciované buňky a následným vývojem nádoru (Varmus, 1985; Liao, 2006; McLaughlin-Drubin, 2008). Třetí významnou skupinou faktorů vyvolávajících vývoj nádorových onemocnění jsou faktory chemické, resp. chemické karcinogeny. O této důležité problematice detailně pojednává následující kapitola.















1.1.2 Teorie chemické karcinogenese

První práce, které popisovaly spojitost mezi nádorovými onemocněními a vystavením určitému druhu chemických látek, se datují již do druhé poloviny 18. století. V roce 1781 publikoval londýnský lékař John Hill pojednání o „nepřiměřeném užívání šňupacího tabáku“, ve kterém poukazoval na souvislosti užívání tabáku a tvorby rakovinných lesí v nosní sliznici (Hill, 1761). O 14 let později, v roce 1775, fyziolog sir Percivall Pott zaznamenal vysoký výskyt skrotálního karcinomu u londýnských kominíků a vyslovil hypotézu, že toto onemocnění je vyvoláno působením sazí (Pott, 1775). V průběhu necelých dvou století, bylo nad vši pochybnost prokázáno, že aplikace černouhelného dehtu na kůži experimentálních zvířat vede k vývoji nádorů (Yamagawa & Ichikawa, 1915), a nakonec Cookem a jeho spolupracovníky byla identifikována látka za toto karcinogenní působení odpovědná, a to benzo[*a*]pyren (Cook *et al.*, 1933). Od průkopnických prací Hillových a Pottových, které sice ve své době neměly příliš velký dopad, se začala shromažďovat data podobného charakteru, tj. data o výskytu vývoje různých nádorových onemocnění po vystavení chemikáliím. Postupem času bylo identifikováno nepřeberné množství takových látek, které jsou schopny vyvolat v organismu maligní transformaci. Jednou z prvních takových prací byla např. zpráva německého lékaře Ludwiga Rhena, ve které popisoval velmi vysokou incidenci nádorů močového měchýře u pracovníků v barvářském průmyslu (Rehn, 1895). Později byly objeveny látky, který toto onemocnění způsobovaly, a to 2-aminonaftalen, 4-aminobifenyl a benzidin (Harvey, 2011). Vedle polycyklických aromatických uhlovodíků (PAU) a aromatických aminů a amidů se do této kategorie řadí z organických látek rovněž *N*-nitrosaminy, nitrosloučeniny, azobarviva ad.

Ačkoliv první teorie předpokládaly, že chemické karcinogeny působí v buňce přímo, byly tyto předpoklady záhy opuštěny a nahrazeny hypotézou, že tyto látky ke svému genotoxickému působení potřebují nejdříve metabolickou aktivaci katalysovanou enzymy. Na tomto poli v 60. letech 20. století publikovali skvělé práce manželé Millerovy. Ve svých studiích formulovali hypotézu (která se ukázala být velmi správnou), že chemické karcinogeny podstupují aktivaci katalysovanou enzymy za vzniku „proximálního“ karcinogenu (*proximate carcinogen*), který je enzymově transformován na tzv. „okamžitý“ karcinogen (*ultimate carcinogen*), a právě tento „okamžitý“ karcinogen je svou povahou *elektrofilní agens*, které může tvořit adukty s proteiny, RNA a/nebo DNA (Miller *et al.*, 1966a; Miller & Miller, 1966b, 1981). Brooks a Lawley ve svých pracích

dokázali, že afinita karcinogenních aktivních metabolitů polycyklických aromatických uhlovodíků k DNA je podstatně vyšší než k RNA nebo k proteinům (Brookes & Lawley, 1964). Toto zjištění potvrdilo hypotézy manželů Millerových, podle nichž je prvním krokem chemické karcinogenese genotoxické působení ultimativního karcinogenu na DNA (Miller & Miller, 1981). V současnosti jsou identifikovány aktivní metabolity většiny známých chemických karcinogenů (**Tab. 1**).

Tabulka. 1: Přehled aktivních metabolitů vybraných chemických karcinogenů (převzato z Harvey, 2011).

<i>Chemický karcinogen</i>	<i>Aktivní metabolit</i>	<i>Reaktivní species</i>
PAU	 diol epoxid	 karbeniový ion
	 chinon	 ROS
Arylaminy Arylamidy Nitroareny	 <i>N</i> -hydroxyester	 nitreniový ion
<i>N</i> -nitrosaminy	 α -hydroxyderivát	 diazoniový /karbeniový ion aldehyd
Aflatoxin	 epoxid	 karbeniový ion
Safrol	 sulfatovaný OH-derivát	 karbeniový ion
Alkylační činidlo	 přímý účinek	 karbeniový ion

Problematika chemických karcinogenů ovšem není otázkou pouze organických látek produkovaných chemickým průmyslem. Jsou známy rovněž anorganické chemické karcinogeny, mezi něž jsou zařazeny sloučeniny arsenu, niklu, chromu, beryllia a kadmia, dále asbest a jiná minerální vlákna. Tyto látky často najdeme v seznamech risikových látek na vybraných pracovištích (IARC, 2012b). Podobně jako organické látky, podstupují i soli výše zmíněných kovů metabolickou enzymově katalysovanou přeměnu. Ačkoliv dosud není zcela určen přesný mechanismus jejich genotoxického působení, předpokládá se, že ve většině případů metabolická biotransformace resultuje v tvorbu kyslíkových radikálů (*Reactive Oxygen Species*, ROS), které vyvolávají oxidační poškození DNA (Sugiyama, 1994a, 1994b; Quievryn *et al.*, 2003; Valko *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2007; Pu *et al.*, 2007).

Další významnou skupinou chemických karcinogenů jsou látky přírodního původu. Ačkoliv současné trendy životního stylu hlásají návrat k přírodním látkám, ne vždy *přírodní* znamená *bezpečný*. Mezi tyto látky řadíme metabolity produkované plísněmi

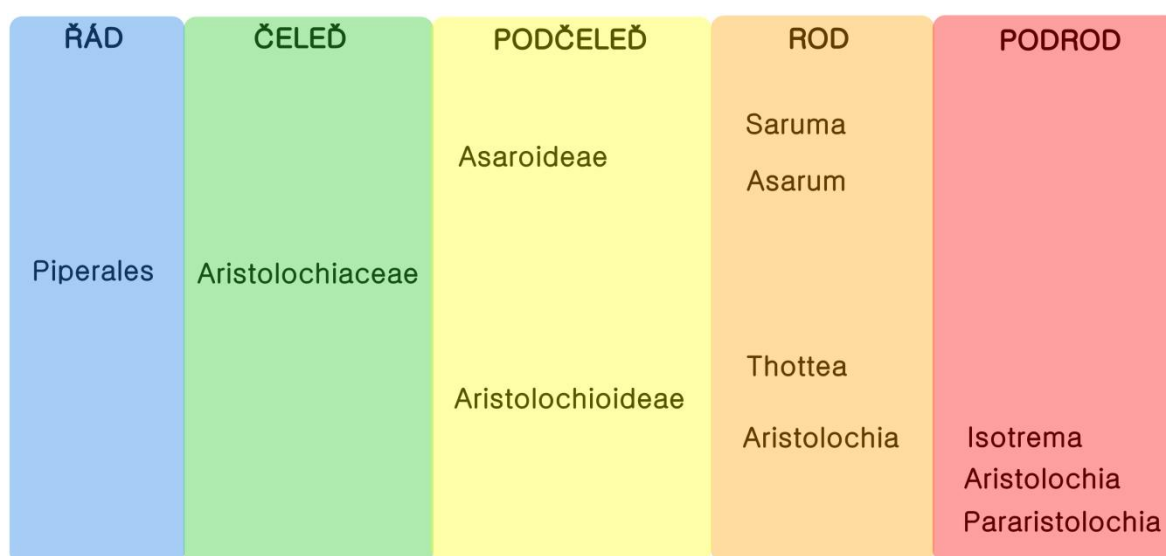
(např. aflatoxiny), rostlinné alkaloidy a další. Zajímavou skupinou jsou právě rostlinné metabolity. Můžeme zde nalézt např. deriváty allylbenzenu safrol, estragol, methyleugenol či myristicin. Safrol je silice obsažená v kořenové kůře Kašti bělavé (*Sassafras albidum*) (IARC, 1976; Jahodář, 2011). Za rozluštěním metabolické aktivace safrolu opět nalezneme manžele Millerovy se svými spolupracovníky. Ti zjistili, že bioaktivace safrolu je zprostředkována enzymy jak první, tak druhé fáze biotransformace, která resultuje v tvorbu allylkarbeniového iontu, který může reagovat s DNA za vzniku aduktů s deoxyguanosinem (Borchert *et al.*, 1973). Safrol je Mezinárodní agenturou pro výzkum rakoviny klasifikován do skupiny 2B, tzn. pravděpodobně karcinogenní pro člověka. Nicméně, je prokázáno, že safrol vyvolává tvorbu plicních a jaterních nádorů u hlodavců a zařazení tohoto karcinogenu do vyšší třídy brání pouze nedostatek epidemiologických dat (IARC, 1976). Estragol je známá silice obsažená v Pelyňku kozalci (*Artemisia dracunculus*) a Bazalce vonné (*Ocimum basilicum*) (Harvey, 2011; Jahodář, 2011), myristicin nalezneme v Muškátovníku vonném (*Myristica fragrans*) a v Petrželi obecné (*Petroselinum crispum*) (Jahodář, 2011; Harvey, 2011). Je tedy zřejmé, že z hlediska karcinogenního nebezpečí musíme být pozorní i vůči přírodním látkám. Velmi nebezpečným prokázaným lidským karcinogenem je rostlinný alkaloid aristolochová kyselina, která kromě karcinogenních vlastností je rovněž silným nefrotoxinem (Mengs, 1982; Nortier *et al.*, 2000; Cosyns, 2003; IARC, 2012c). Ve vysokém množství je tento alkaloid obsažen v rostlinách rodu *Aristolochia*, jejichž zástupce můžeme najít též v České republice. Podrobně o tomto nebezpečném alkaloidu pojednávají **kapitoly 1.2** (str. 18) a **1.3** (str. 29).

V organismu podstupují chemické karcinogeny v rámci biotransformace enzymovou přeměnu, jejíž primární výsledek je detoxikace xenobiotika z organismu. Nicméně, tento proces může rovněž vést k bioaktivaci těchto látek a ty pak mohou genotoxicky poškozovat DNA. Záleží tedy též na rovnováze mezi detoxikací a aktivací karcinogenu. Studium těchto enzymů se z tohoto pohledu zdá být zásadní, leč vysoký stupeň polymorfismu, který je s nimi spojen, toto studium značně komplikuje.

1.2 ROSTLINY OBSAHUJÍCÍ ARISTOLOCHOVÉ KYSELINY

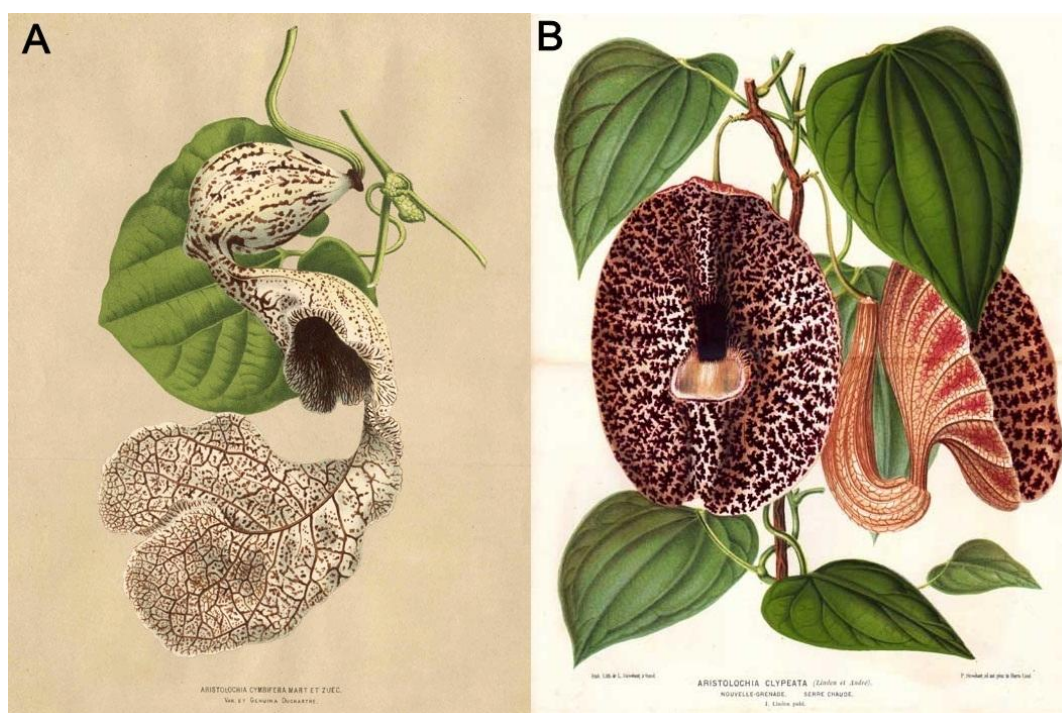
Jak bylo zmíněno v předchozí kapitole, nebezpečné látky vykazující karcinogenní účinky se nerekutují pouze z řad průmyslových chemikálií, ale rovněž je nacházíme v látkách přírodního původu, a to zejména rostlinného. Takovými pozoruhodnými látkami jsou přírodní nitroaromatické sloučeniny, známé jako aristolochové kyseliny (AA). Tyto látky se nalézají výhradně v rostlinách čeledi podražcovitých, podle kterých také získaly své latinské označení (*Aristolochiaceae*). V této kapitole tedy bude stručně pojednáno o skupině rostlin z čeledi podražcovitých tak, aby problematika AA byla diskutována uceleně a byly zohledněny všechny úhly pohledu na tyto nebezpečné alkaloidy.

Rostliny obsahující AA patří mezi krytosemenné rostliny (*Magnoliophyta*), které se botanicky klasifikují do řádu pepřotvarých (*Piperales*) a čeledi podražcovitých (*Aristolochiaceae*). Jedná se o druhově velice početnou čeleď, neboť se odhaduje, že čítá takřka 700 rostlinných druhů (Kelly & Gonzáles, 2003; Wanke *et al.*, 2006; Do *et al.* 2014). Co se týká podrobnější botanické klasifikace, čeleď *Aristolochiaceae* se dělí na dvě podčeledi, *Asaroideae* a *Aristolochioideae* (Wanke *et al.*, 2006). V literatuře pak můžeme nalézt relativně ustálené dělení do čtyř samostatných rodů: podčeleď *Asaroideae* zahrnuje rody *Saruma* a *Asarum*, a podčeleď *Aristolochioideae* rody *Thottea* a *Aristolochia* (Wanke *et al.*, 2006). Na základě fylogenetických studií těchto rostlin byly též postulovány tři základní podrody největší skupiny, *Aristolochia*, a to podrody: *Isotrema*, *Aristolochia* a *Pararistolochia* (Wanke *et al.*, 2006; Do *et al.*, 2014). Výše zmíněné taxonomické zařazení rostlin popisuje **Obr. 3**.



Obr. 3: Taxonomie rostlin čeledi *Aristolochiaceae* (upraveno dle Wanke *et al.*, 2006).

Rostliny čeledi *Aristolochiaceae* se vyskytují zejména v tropických a subtropických oblastech celého světa. U většiny druhů se jedná o popínavé liány, nicméně lze v této čeledi nalézt rovněž byliny a malé keře (Kelly & Gonzáles, 2003; Wanke *et al.*, 2006; Wagner *et al.*, 2012). Nejmenším rodem je rod *Saruma*, který je monotypický, tzn. zahrnuje pouze jeden rostlinný druh (*Saruma henryi*). Ten je navíc endemický v střední Číně (Kelly & Gonzáles, 2003; Wanke *et al.*, 2006). Druhý rod z podčeledi *Asaroidae* je *Asarum*, ve kterém nalezneme přibližně 86 druhů, které se vyskytují v mírném podnebí Severní Ameriky, Evropy a Asie (Wanke *et al.*, 2006; Kelly & Gonzáles, 2003). Podčeleď *Aristolochioideae* zahrnuje dva rody: rod *Thottea* zastupuje ne více než 30 druhů, které najdeme v tropických oblastech Asie, zejména pak malajsijských a indo-malajsijských. Nicméně největším rodem této rostlinné čeledi je rod *Aristolochia*, který čítá přibližně 550 druhů (**Obr. 4**) a který je ve většině případů pantropický (Kelly & Gonzáles, 2003; Wanke *et al.*, 2006; Do *et al.* 2014). Pochopitelně výjimky existují i zde. Mezi zástupce vyskytující se v subtropických oblastech řadíme *Aristolochia clematitis* (Podražec křovištní), který můžeme nalézt dokonce na území České republiky (Danihelka *et al.*, 2012), *Aristolochia rotunda* (Oelschlägel *et al.*, 2015), *Pararistolochia praevenosa*, druh vyskytující se na australských nížinách (Sands & New, 2013) a další.



Obr. 4: Nákres druhu *Aristolochia cymbifera* (A) a *Aristolochia gigantea* (B) (převzato z Morren, 1869; André, 1870).

Jak bylo výše zmíněno, rozděluje se rod *Aristolochia* ještě na tři podrody (**Obr. 3**, str. 18). Podrod *Aristolochia* se vyskytuje v subtropických a tropických oblastech Ameriky, Afriky, Asie a rovněž ve středomořských oblastech (Wanke *et al.*, 2006; Do *et al.*, 2014). Zbývající podrody nalezneme především v tropických oblastech. Podrod *Pararistolochia* se nachází v afrických a australských oblastech a podrod *Isotrema*, který je zastoupen přibližně 70 druhy, nalezneme zejména v Asii (cca 50 druhů) a středoamerických tropických oblastech (Do *et al.*, 2014).

Dříve než přejdeme ke **kapitole 1.2.1** (str. 21), která se bude zabývat alkaloidy obsaženými v rostlinách čeledi *Aristolochiaceae*, podívejme se na ještě pár zajímavých skutečností, které se pojí s touto pozoruhodnou rostlinnou čeledí. Zvláštní je způsob, kterým podražce lákají hmyz, který je opyluje. Hlavní opylovací strategií těchto rostlin je vylučování charakteristického zápachu, který se druh od druhu liší. Některé tropické druhy vylučují zápach podobný rozkládajícímu se masu (*Aristolochia grandiflora*, *Aristolochia gigantea*), kdežto jiné druhy zapáchají jako přezrálé ovoce, rozkládající se houby apod. (Oelschlägel *et al.*, 2015; Burgess *et al.*, 2004). Navíc, tato pachová stopa je u některých druhů již charakterisována. Pach, který vylučuje výše zmíněný druh *Aristolochia gigantea*, byl stanoven jako směs dimetyldisulfidu (zápach hnijícího masa), linaloolu (sladký zápach ovoce) a β -citronellolu (citronový zápach) (Hipólito *et al.*, 2012; Oelschlägel *et al.*, 2015). Poté, co je opylovač pachem přilákan, rostlina jej uzavře, zadrží a po opylování jej opět uvolní z květu ven (Oelschlägel *et al.*, 2015).

Rostliny z čeledi *Aristolochiaceae* slouží rovněž jako primární potrava pro larvy motýlů čeledi Otakárkovitých (*Papilionidae*). Tito potravní specialisté využívají sekundární metabolity čeledi *Aristolochiaceae*, aristolochové kyseliny, k odstrašení predátorů (Klitzke & Brown Jr, 2000; Mebs & Schneider, 2002; Nishida, 2002; Priestap *et al.*, 2012a; Urzúa *et al.*, 2013). U chilského druhu motýla *Battus polydamas archidamas*, který se živí pouze listy *Aristolochia chilensis* (jediného druhu této čeledi v Chile), byly nalezeny AA a jejich deriváty v různých stádiích vývoje motýla: jak v larvě, tak i v dospělém jedinci (imagu). Nedávné studie ukázaly, že tento druh preferuje spíše redukované deriváty AA, aristolaktamy, konkrétně aristolaktam II. Navíc, bylo demonstrováno, že aristolaktam II není z těla vylučován. Zdá se tedy, že deriváty AA jsou v těle larvy oxidačně metabolisovány za vzniku původních, parentálních molekul, tj. příslušných aristolochových kyselin (Urzúa *et al.*, 2013). Vedle těchto zjištění ukázal Klitzke a Brown Jr., že rovněž v larvách druhu *Battus polydamas*, které se živily listy

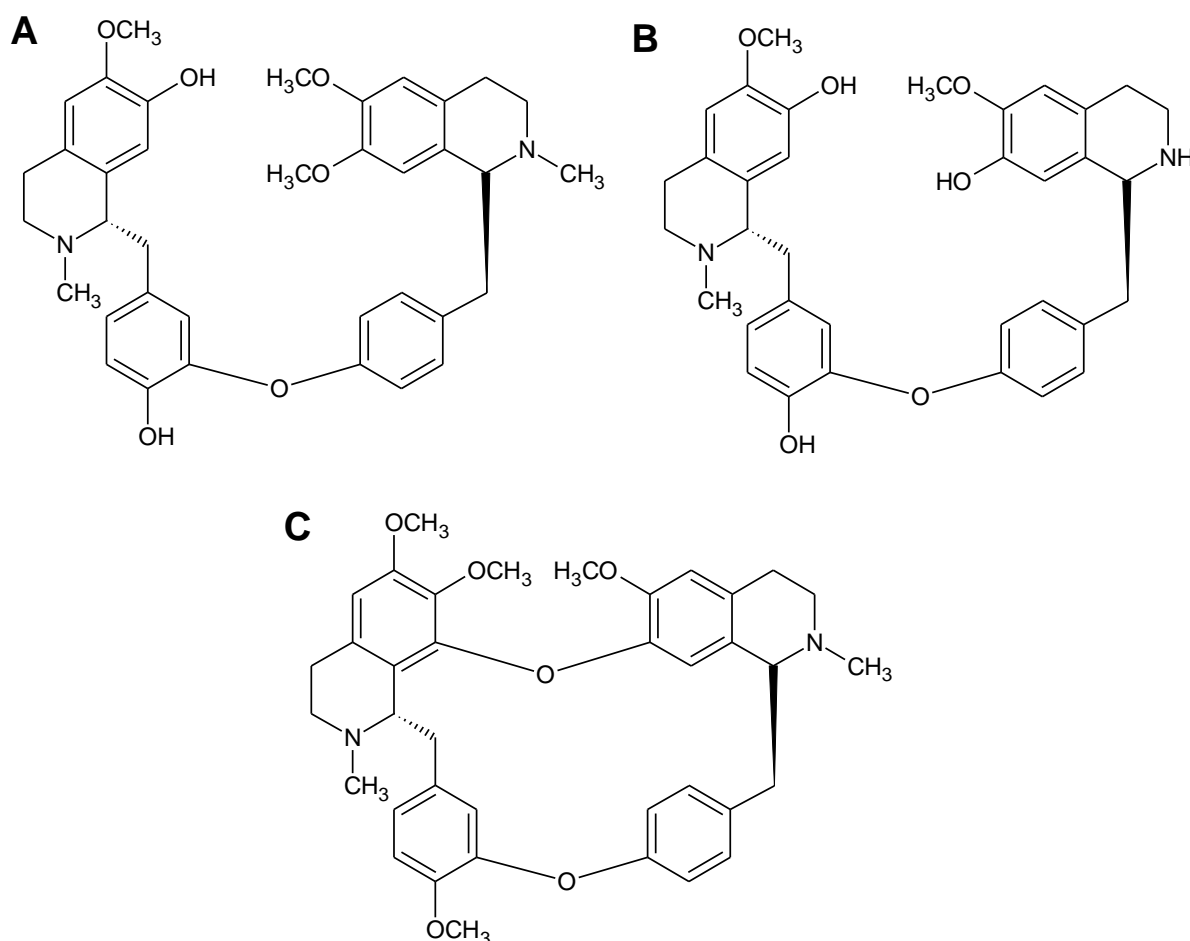
Aristolochia galeata, byly nalezeny AA. Takové zjištění bylo překvapivé, neboť listy tohoto druhu AA neobsahují. Zdá se tedy, že larvy *Battus polydamas* mohou syntetizovat AA *de novo*, k čemuž pravděpodobně jako prekursory využívají benzylisochinolinové alkaloidy, které v listech *Aristolochia galeata* přítomny jsou (Klitzke & Brown Jr, 2000; Priestap *et al.*, 2012a). Stále ovšem zůstává otázkou, zda jsou takové synthesy schopny i jiné druhy motýlů čeledi *Papilionidae*. Nejenže jsou výše zmínění motýli, mj. *Battus belus*, *Battus philenor*, *Zerynthia polyxena*, odolní vůči požití rostlin čeledi *Aristolochiaceae*, ale látky v nich obsažené způsobují, že larvy těchto motýlů jsou nepoživatelné pro jejich přirozené predátory (Klitzke & Brown Jr, 2000; Mebs & Schneider, 2002; Nishida, 2002; Priestap *et al.*, 2012a).

1.2.1 Látky obsažené v rostlinné čeledi *Aristolochiaceae*

Rostliny čeledi *Aristolochiaceae* obsahují velké množství odlišných látek, jejichž distribuce a koncentrace v rostlině je závislá nejen na druhu, ale též na zeměpisné poloze, kde rostou (Huber & Gottlieb, 1993; Holzbach & Lopes, 2010; Santander *et al.*, 2015). Hlavní složky obsažené v těchto rostlinách lze rozdělit na několik skupin: (i) aristolochové kyseliny a jejich deriváty, (ii) alkaloidy bisbenzylisochinolinového typu a jejich deriváty, (iii) lignany furofuranového a butyrolaktonového typu a (iv) další látky (např. allantoin) (Mix *et al.*, 1982; Huber & Gottlieb, 1993; Shi *et al.*, 2004; Francisco *et al.*, 2008; Holzbach & Lopes, 2010; Michl *et al.*, 2014). Vedle těchto alkaloidů bylo nalezeno několik desítek těkavých látek v esenciálních olejích extrahovaných z rostlin čeledi *Aristolochiaceae*, zejména látek terpenického charakteru (mono-, di- a triterpeny) (Francisco *et al.*, 2008; Holzbach & Lopes, 2010; Li *et al.*, 2013)

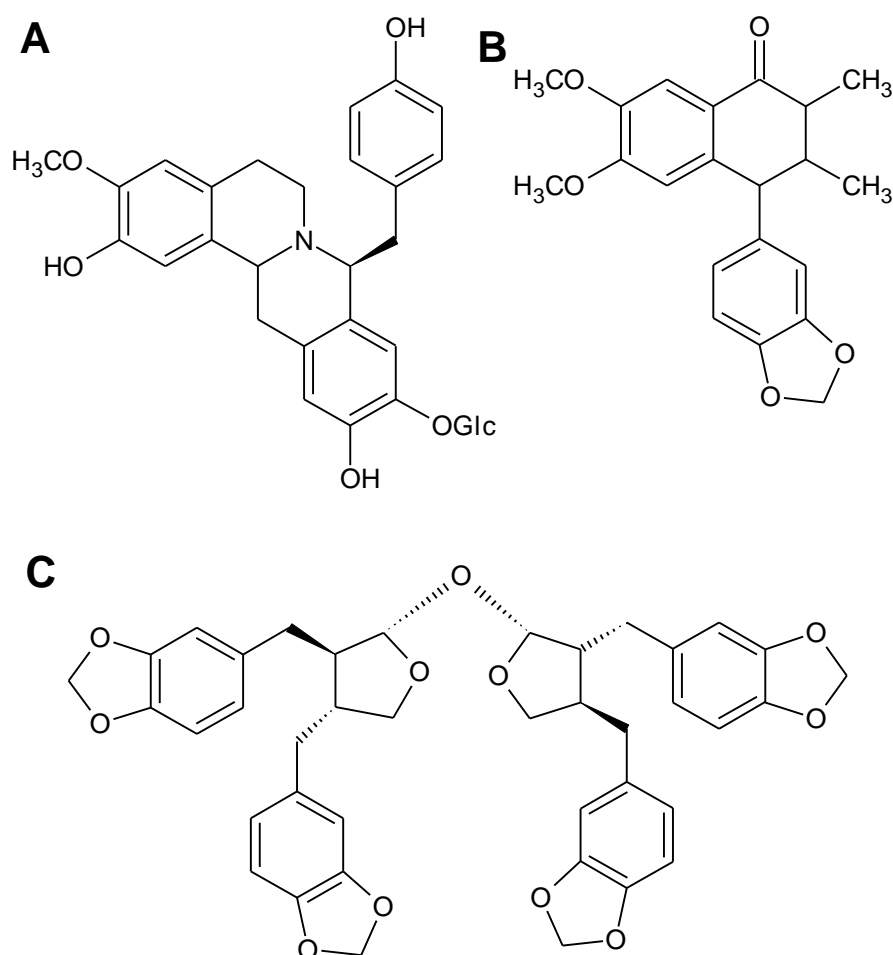
Následujících několik odstavců pojednává o bližší charakteristice výše zmíněných látek. O aristolochových kyselinách a jejich derivátech bude komplexně pojednáno v **kapitole 1.3** (str. 29). Zde bude pouze zmíněno, že tato velice rozmanitá skupina látek je majoritně zastoupena v rostlinách čeledi *Aristolochiaceae* (Mix *et al.*, 1982; Michl *et al.*, 2014) a jejich obsah v rostlině se liší v závislosti na rostlinném kompartmentu i ročním období (Stashenko *et al.*, 2009; Holzbach & Lopes, 2010; Santander *et al.* 2015). Dále byly zmíněny v rostlinách velice hojně zastoupené alkaloidy bisbenzylisochinolinového typu. Mezi sloučeniny, které můžeme nalézt v čeledi *Aristolochiaceae*, řadíme např. temukonin, pedroamin, methylkuspidalin, pampulhamin ad. (**Obr. 5**, str. 22) (Shiff Jr., 1991; Shi *et al.*,

2004). Obecně, bisbenzylisochinolinové alkaloidy vykazují zajímavé biologické účinky, a to zejména antiplasmodiální. Příkladně, temukonin a mnohé další látky podobného charakteru působili relativně selektivně antiplasmodiálním účinkem (Angerhofer *et al.*, 1999), proto takové látky mohou být vhodnými kandidáty na vývoj nových antimalarických léčiv. Určitý problém může představovat cytotoxicita těchto látek vůči savcím buňkám, nicméně cílené chemické derivatisace mohou vést ke snížení této toxicity (Marshall *et al.* 1994; Angerhofer *et al.*, 1999; Desgrouas *et al.*, 2014; Omole *et al.*, 2014). Velmi pozoruhodným je z farmakologického hlediska tetrandrin, rovněž bisbenzylisochinolinový alkaloid rostlinného druhu *Stephania tetrandra* (viz **kap. 1.3.3.1**, str. 34), který blokuje vápníkové kanály v buňkách. Tetrandrin vykazuje účinky, které vedou ke snížení krevního tlaku a vasodilataci, a zdá se, že moduluje též intracelulární koncentrace vápenatých iontů v organismu (Kwan & Achike, 2002).



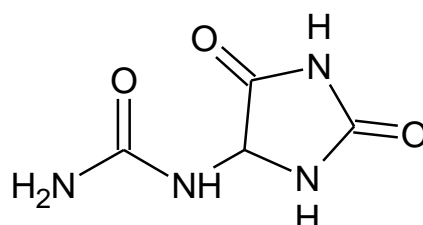
Obr. 5: Struktury vybraných bisbenzylisochinolinů: temukonin (A), pedroamin (B) (*Aristolochiaceae*) a tetrandrin (C) (*Stephania tetrandra*).

Lignany jsou sekundární metabolity široce zastoupené v rostlinné čeledi *Aristolochiaceae* a obecně v cévnatých rostlinách a jejich biologické vlastnosti jsou hodny pozornosti (Fuss, 2003; Apers *et al.*, 2003; Tang *et al.*, 2015). Z chemického hlediska se jedná o polyhydroxylované látky, které jsou strukturně odvozeny od fenyylpropanu. Dle jejich struktury, která je velice rozmanitá, je lze rozdělit do osmi základních skupin (Umezawa, 2003). V čeledi *Aristolochiaceae* jsou zastoupeny zejména lignany furofuranového a dibenzylbutyrolaktonového typu (de Pascoli, *et al.*, 2006; Francisco *et al.*, 2008; Marchesini *et al.*, 2009). Vedle těchto typů lignanů lze u různých druhů *Aristolochia* nalézt další typy např. benzylberbinové alkaloidy (*Aristolochia gigantea*) (Lopes & Humpfer, 1997), neolignany benzofuranového typu, aristotetralon (*Aristolochia chilensis*) (Urzúa *et al.*, 1987) anebo bikubebiny (*Aristolochia lagesiana* a *Aristolochia pubescens*), deriváty dibenzylbutyrolaktonových lignanů (**Obr. 6**), které vykazují protizánětlivé a analgetické účinky (de Pascoli, *et al.*, 2006).



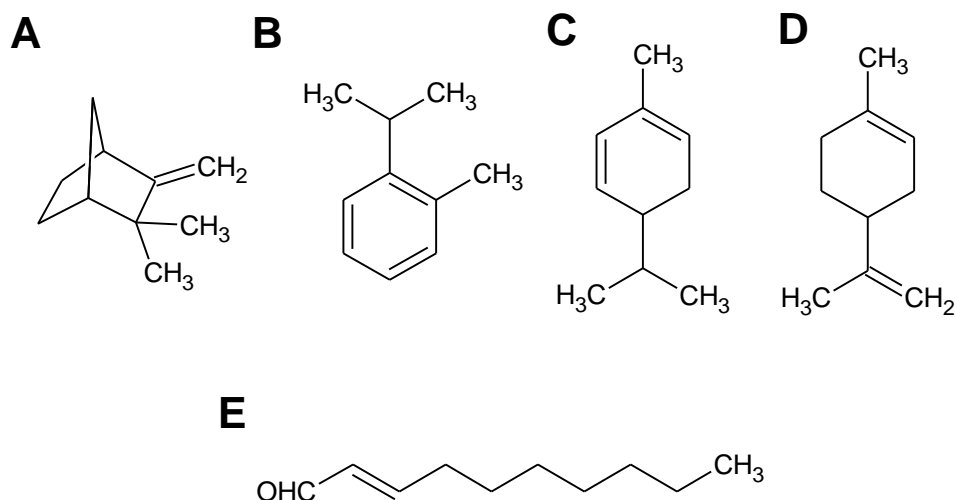
Obr. 6: Struktury vybraných lignanů vyskytujících se v čeledi *Aristolochiaceae*: 8-benzylberbin (A), (-)-aristotetralon (B) a 8,8'-trans-bikubebin (C).

V rostlinách čeledi *Aristolochiaceae* byl nalezen rovněž alkaloid allantoin (**Obr. 7**), který je široce distribuován v biologických systémech. Tato dusíkatá heterosloučenina, produkt metabolismu purinů, byla izolována jak z živočichů, tak rostlin (Francisco *et al.*, 2008; Holzbach & Lopes, 2010). Zajímavé jsou biologické účinky allantoinu. Jedná se o látku, která vykazuje výrazný hojivý účinek (stimuluje tvorbu nové tkáně) a působí též protizánětlivě (Lee *et al.*, 2010; Savić *et al.*, 2015).



Obr. 7: Struktura alkaloidu allantoinu.

Poslední skupina látek, kterou bych rád zmínil, tvoří esenciální oleje získané z rostlinné čeledi *Aristolochiaceae*. Jedná se zejména o sloučeniny terpenického charakteru, kterých byly identifikovány desítky v různých druzích rodu *Aristolochia*. Jedinečná práce, mezi mnohými dalšími, se zdá být studie, v jejímž rámci bylo studováno a charakterisováno chemické složení esenciálních olejů deseti druhů podražců vyskytujících se v Brazílii (Francisco *et al.*, 2008). Mezi studovanými rostlinnými druhy nechyběly obecně známé druhy jako *Aristolochia elegans (littoralis)*, *Aristolochia arcuata*, *Aristolochia gigantea* a další. Francisco se svými spolupracovníky zjistila, že základními složkami esenciálních olejů studovaných rostlinných druhů jsou zejména kamfen, *o*-cymen, limonen a isobornylacetát (Francisco *et al.*, 2008) (**Obr. 8**, str. 25). Některé druhy jsou ve složení esenciálních olejů velice specifické. Esenciální olej druhu *Aristolochia gigantea* obsahuje vedle magnoflorinu a *E*-nerolidolu, především α -felandren (61 %) a β -linalool (17 %) (Francisco *et al.*, 2008; Holzbach & Lopes, 2010). V *Aristolochia gilberti* byl vedle mono-, di- a seskviterpenů nalezen rovněž velmi zajímavý tetracyklický triterpen, (-)-onocera-8,8'-diol, který se zdá mít potenciální lékařské využití (Marchesini *et al.*, 2009). Nicméně, jsou i takové druhy, např. *Aristolochia delavayi*, jejichž majoritní obsah esenciálních olejů představují nasycené a α,β -nenasycené aldehydy. Hlavní složkou výše jmenovaného druhu je *E*-dec-2-enal (52 %) a dále byly identifikovány látky jako docec-2-enal, dodekanal, heptanal aj. (Li *et al.*, 2013). Zajímavou skutečností je, že esenciální oleje jsou prosté nefrotoxických a karcinogenních aristolochových kyselin, protože jejich použití jak v tradiční tak moderní medicíně je nasnadě.



Obr. 8: Struktury vybraných látek přítomných v esenciálních olejích čeledi *Aristolochiaceae*: kamfen (A), *o*-cymen (B), α-felandren (C), limonen (D) a *E*-dec-2-enal (E).

Jak lze vidět z tohoto stručného přehledu alkaloidů a jiných chemických látek obsažených v rostlinné čeledi *Aristolochiaceae*, jedná se o látky velice různorodé a strukturně rozmanité. Navíc, většina z nich vykazuje velice zajímavou biologickou aktivitu, pro niž byly a nadále jsou tyto rostliny využívány v tradiční medicíně po celém světě.

1.2.2 Význam čeledi *Aristolochiaceae* v lékařství a léčitelství

Rostliny čeledi *Aristolochiaceae* byly a nadále jsou velmi široce využívány v tzv. tradiční medicíně v Asii, Evropě, Africe, ba na obou amerických kontinentech (Wu *et al.*, 2005; Heinrich *et al.*, 2009; Akindele *et al.*, 2013; Yamani *et al.*, 2015). Alkaloidy obsažené v této rostlinné čeledi, zejména AA, vykazují velice silné protizánětlivé účinky, díky nimž byly tyto látky zvažovány i k využití ve farmaceutickém průmyslu, ba některé přípravky již existovaly (Möse, 1966, 1974a, 1974b). Nicméně, po odhalení a prokázání silně nefrotoxických a karcinogenních vlastností AA bylo od tohoto záměru upuštěno (Mengs, 1982; Reynolds, 1989; Nortier *et al.*, 2000; Cosyns, 2003; IARC, 2012c). Avšak v lidovém léčitelství si čeleď *Aristolochiaceae* udržela své místo. Používání těchto rostlin v asijské tradiční medicíně je v současnosti již dobře známo a popsáno v mnoha studiích

(Wu *et al.*, 2005, 2015; Heinrich *et al.*, 2009; Bhattacharjee & Bhattacharyya, 2013). Nicméně, novým, teprve nedávno popsáným fenoménem je velmi hojně užití čeledi *Aristolochiaceae* v Jižní a Střední Americe (Heinrich *et al.*, 2009; Marchesini *et al.*, 2009; Zamilpa *et al.*, 2014). Heinrich se svými spolupracovníky popsal ve velice detailní studii několik desítek medicíně využitelných rostlin čeledi *Aristolochiaceae* po celém světě. V Evropě bylo nalezeno pět takových druhů, které se vyskytují v tradičním léčitelství středomořských oblastí Balkánského a Pyrenejského poloostrova. Výše zmíněnými druhy jsou *Aristolochia clematitis*, *Aristolochia rotunda*, *Aristolochia serpentaria*, *Aristolochia pistolochia* a *Aristolochia paucinervis* (Heinrich *et al.*, 2009). Dle výše zmiňované studie bylo zjištěno, že převážné využití podražcovitých v léčitelství je na asijském a americkém kontinentě. Zejména v Asii mají tyto rostliny již od nepaměti své tradiční místo v lidovém léčitelství.

V Číně je velice rozšířené použití druhu *Aristolochia debilis* (*Madouling*), který se používá k tlumení silných bolestí a zánětů, dále proti hadímu uštknutí a při léčbě hypertenze (Wu *et al.*, 2005; Heinrich *et al.*, 2009). Velmi rozšířené je ošetření těmito rostlinami rovněž na indickém subkontinentu. Medicinální produkty připravené z druhu *Aristolochia indica* (*Iswar mul*) našly své využití jako látky ovlivňující menstruační cyklus nebo vyvolávající potrat (Wu *et al.*, 2005, 2015). Nicméně, seriosní studie zabývající se rostlinným druhem *Aristolochia indica* zjistily, že vodný výluh kořene má velmi zajímavou enzymovou aktivitu – kolagenasovou, nukleasovou a rovněž fibrinolytickou. Díky poslední jmenované enzymové aktivitě je takový výluh schopen (na rozdíl od enzymů tělu vlastních) destabilizovat fibrinové a β -amyloidní koagregáty, které mohou vyvolávat závažné cévní onemocnění mozku tzv. cerebrální amyloidní angiopathii (Bhattacharjee & Bhattacharyya, 2015). Stejní autoři studovali také účinky *Aristolochia indica* na jed v Indii velice rozšířené Zmije řetízkové (*Daboia russellii*) a zjistili, že díky enzymové aktivitě látek obsažených v rostlině je vodný výluh kořene schopen neutralizovat jed jednoho z nejjedovatějších hadů světa (Bhattacharjee & Bhattacharyya, 2013). Nicméně, problémem zůstává přítomnost AA ve vodném výluhu. Autoři sice udávají, že ve vysokých dávkách vede tato kúra k poškození jater a ledvin, ale zároveň jedním dechem dodávají, že při nízkých dávkách je vodný roztok netoxický (Bhattacharjee & Bhattacharyya, 2013). Nicméně detailnější studie, která by pečlivě prozkoumala positiva a negativa lékařského použití takového přípravku jako protijedu, dosud chybí. Zajímavým nepřímým lékařským účinkem *Aristolochia indica* je jeho toxicita vůči larvám komára druhu *Anopheles*

stephensi, který je znám jako přenašeč malárie. V současné době probíhá výzkum, který by tyto primární výsledky využil k přípravě insekticidu. Naneštěstí, výše zmíněné insekticidní účinky *Aristolochia indica* jsou vyvolány přítomností AA v této rostlině (Pradeepa *et al.*, 2015). Dalším medicíně velmi využívaným druhem podražce je *Aristolochia bracteata*, který je ceněn pro svou antihelmintickou aktivitu a účinky při gynekologických potížích (Wu *et al.*, 2005; Heinrich *et al.*, 2009).

Jižní a Střední Amerika byly dlouho dobu mimo ohnisko zájmu vědců studujících problematiku AA. V současné době se, nicméně, jejich pozornost na tuto část světa pomalu obrací. Podobně jako v jiných oblastech i zde byly a jsou rostliny čeledi *Aristolochiaceae* využívány v tradiční medicíně (Heinrich *et al.* 2009; Marchesini *et al.*, 2009). Na brazilském trhu je velmi rozšířený druh *Aristolochia gilberti*, který se užívá jako látka navozující potrat, usnadňující vykašlávání, dále pak proti hadímu jedu či při zaživacích potížích. Naneštěstí, i sem dorazil fenomen využití *Aristolochiaceae* jako podpurné látky při redukční kúře (Marchesini *et al.*, 2009). Na druhé straně byly popsány zdravotně prospěšné účinky lignanů přítomných v *Aristolochia gilberti* (de Pascoli *et al.*, 2006). Dalšími druhy známými z jihoamerického a středoamerického léčitelství jsou *Aristolochia argentina* (*Charrua*), který se využívá při gynekologických potížích a arthritidě, a *Aristolochia chilensis* (*Oreja de zorro, liščí ucho*), který našel své využití při poporodní péči (Wu *et al.*, 2005; Heinrich *et al.*, 2009). Ve Střední Americe, v Mexiku, je velmi oblíbeným lidovým prostředkem proti bodnutí štírem a hadím uškntutím *Aristolochia elegans* (*Guaco*). Aktivita hexanového extraktu kořene *Aristolochia elegans* proti jedu Štíra jasného (*Centruroides limpidus*) byla popsána ve studii z roku 2005 (Jiménez-Ferrer *et al.*, 2005), nicméně o deset let později byly charakterisovány látky za tuto aktivitu odpovědné, a to neolignany eupomatenoid-7 a likarin A. Navíc, v hexanovém extraktu kořene *Aristolochia elegans* nebyly nalezeny stopy AA (Zamilpa *et al.*, 2014).

Rovněž v Africe je užití rostlin čeledi *Aristolochiaceae* v lidovém léčitelství velice rozšířené. Jedním z takových druhů je *Aristolochia ringens* (*Ako-igun*), který je, ač původem z Jižní Ameriky, hojně rostoucí v Nigerii, Sierra Leone, Ghaně a Kongu. V Nigerii je popsáno rozmanité použití kořene, listu ba celé rostliny proti kožním onemocněním (drakunkulosa), tyfu, bolestem a astmatu (Akindele *et al.*, 2015). Další účinky připisované *Aristolochia ringens* jsou protizánětlivé a antidiabetické (Ruth *et al.*, 2014;). Nedávná studie navíc prokázala protinádorovou aktivitu extraktu kořene tohoto rostlinného druhu *in vitro* a *in vivo* (Akindele *et al.*, 2015). Nicméně, již dříve byla

dokázána přítomnost nebezpečných AA v listu, stonku a květu *Aristolochia ringens* (Stashenko *et al.*, 2009). Jiným takovým užívaným druhem je *Aristolochia albida*, který nachází uplatnění při léčbě kožních onemocnění, hadího uštknutí a při problémech gastrointestinálního traktu (Wu *et al.*, 2005; Heinrich *et al.*, 2009).

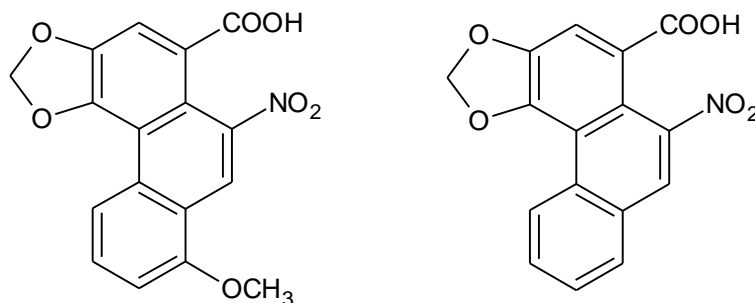
Na evropském kontinentu jsou podražce používány podobně hojně jako v jiných částech světa. Velmi rozšířené je použití Podražce křovištního (*Aristolochia clematitis*), který je rozšířen na Balkánském poloostrově (Heinrich *et al.*, 2009), ale můžeme jej nalézt rovněž v České republice (Daníhelka *et al.*, 2012). Užití *Aristolochia clematitis* je podobně jako u ostatních zástupců této rostlinné čeledi, velice rozmanité: je užíván k hojení ran, k léčbě gynekologických potíží (indukce menstruačního cyklu, stimulace porodu, abortivum, prevence infekcí po porodu), dále nachází uplatnění při tlumení zánětů, bolestí kloubů a léčbě artritidy, revmatických onemocnění a kožních infekcí (Leporatti & Ivancheva, 2003; Jarić *et al.*, 2007; Heinrich *et al.*, 2009). Podražec křovištní společně s Kopytníkem evropským (*Asarum europaeum*) můžeme nalézt rovněž v Německém homeopatickém lékopisu (Homöopathisches Arzneibuch). Obě rostliny ve formě tinktur jsou doporučované tímto lékopisem k léčbě infekcí horních a dolních cest dýchacích, trávicího traktu a močových cest (*Aristolochia clematitis*) a k léčbě onemocnění centrální nervové soustavy, dolních cest dýchacích a trávicího traktu (*Asarum europaeum*). U obou výše zmíněných tinktur byla v nedávné studii zkoumána cytotoxicita, tj. dopad na buněčný cyklus, a genotoxicita, tj. tvorba aduktů s DNA, v lidské nádorové linii jaterních buněk (HepG2). Výsledky hovoří jasně, AA přítomné v obou rostlinných druzích vedly k tvorbě aduktů s DNA a k přerušení syntézy DNA v S-fázi buněčného cyklu. Dále byla pozorována přítomnost chromosomálních aberací a zlomů v DNA a zvýšená proteinová exprese tumorových supresorů TP53 a TP21. Nicméně, zdá se, že tento efekt na výše zmíněnou buněčnou linii je dán nejen AA, ale též dalšími látkami přítomnými ve studovaných rostlinných druzích, např. α -asaronem (Nitzsche *et al.*, 2013). Není bez zajímavosti, že *Aristolochia clematitis* je užívána nejen v humánní lidové medicíně, ale rovněž ve veterinární lidové medicíně. Tento druh, konkrétně list, je velmi často užíván v určitých oblastech Rumunska při léčbě poranění kůže a při hojení ran domácích zvířat, a to pouze externě vzhledem k toxicitě *Aristolochia clematitis* (Bartha *et al.*, 2015).

1.3 ARISTOLOCHOVÉ KYSELINY

Následující kapitola pojednává o chemických a biologických vlastnostech AA, rostlinných alkaloidů přítomných majoritně v botanickém čeledi *Aristolochiaceae*. Velký důraz je kladen zejména na patologie vyvolané AA a na metabolismus tohoto toxinu v organismech. AA totiž vykazují nejen silné nefrotoxické vlastnosti (Mengs, 1988), ale rovněž se jedná o prokazatelné karcinogeny pro člověka (Nortier *et al.*, 2000; Cosyns, 2003; IARC, 2012c). Proto je v druhé části této kapitoly uveden detailní přehled dosud známých informací o metabolismu tohoto nebezpečného rostlinného alkaloidu jak v lidském, tak zvířecím organismu.

1.3.1 Chemické a biologické vlastnosti aristolochových kyselin

Jak bylo zmíněno v **kapitole 1.2.1** (str. 21), rostliny z čeledi *Aristolochiaceae* obsahují AA. Jejich množství v rostlinách se ovšem může velmi lišit (Stashenko *et al.*, 2009): nalézt můžeme rostliny, které AA takřka neobsahují, nicméně převažují takové druhy, ve kterých jsou AA hojně zastoupeny (Kumar *et al.*, 2003). Jedná se o velice početnou skupinu látek, která je tvořena několika desítkami derivátů nitrofenanthrenových karboxylových kyselin. V rostlinách převažují zejména dva deriváty, *aristolochová kyselina I (AAI)* – 8-methoxy-6-nitro-fenanthro-(3,4-*d*)-1,3-dioxolo-5-karboxylová kyselina – a *aristolochová kyselina II (AAII)* – 6-nitro-fenanthro-(3,4-*d*)-1,3-dioxolo-5-karboxylová kyselina (**Obr. 9**) (Mix *et al.*, 1982; Kumar *et al.*, 2003). Zajímavou skutečností je, že se jedná o jedny z mála přírodních sloučenin obsahujících nitroskupinu, jejíž přítomnost je známa spíše v environmentálních kontaminantech z antropogenní činnosti. Nicméně, několik výjimek existuje vedle AA to je např. chloramfenikol, stephanosporin či nitroaknadinin (Winkler & Hertweck, 2007).



Aristolochová kyselina I

Aristolochová kyselina II

Obr. 9: Struktura aristolochové kyseliny I a II.

Výše zmíněná přítomnost nitroskupiny v molekule AA je zásadní z hlediska metabolismu tohoto alkaloidu v organismu. Díky této funkční skupině jsou AA schopny tvořit další deriváty – laktamy. Tyto tzv. aristolaktamy představují základní biotransformační metabolity jak detoxikačních, tak aktivačních reakcí aristolochových kyselin (Arlt *et al.*, 2002a). Jejich tvorba však není spojena pouze s enzymy biotransformujícími xenobiotika, neboť aristolaktamy společně s dalšími deriváty jsou přirozeně přítomny rovněž v samotných rostlinách čeledi *Aristolochiaceae* (Kumar *et al.*, 2003; Michl *et al.*, 2014).

Aristolochové kyseliny vykazují výrazné protizánětlivé účinky, pro něž rostliny obsahující AA byly a nadále jsou využívány v tradičním léčitelství (viz **kap. 1.2.2**, str. 25). Tyto účinky neunikly ani pozornosti vědců a lékařů, proto byly jak tyto rostliny, tak i samotné AA detailně studovány s cílem zařadit tyto látky do medicínské praxe (Jackson *et al.*, 1964; Möse, 1966, 1974a, 1974b). Nicméně, zanedlouho byly objeveny a prokázány toxické účinky AA. Tento směr výzkumu byl tedy opuštěn a již existující léčebné preparáty byly vyloučeny z trhu a používání (Jackson *et al.*, 1964; Reynolds, 1989). Nutno připustit, že výše zmíněné toxické účinky AA stojí za pozornost. V první řadě se jedná o velice silný nefrotoxin, který je schopen poškozovat ledvinnou tkáň (Jackson *et al.*, 1964; Mengs, 1988; Tang *et al.*, 2014), dále AA vykazují rovněž cytotoxický efekt, který je charakterisován přerušением buněčného cyklu a indukcí apoptosy (Nitzsche *et al.*, 2013; Michl *et al.*, 2014; Romanov *et al.*, 2015; Kwak & Lee, 2016). Nedávná studie nově popsala účinky AA na červené krvinky. Vystavení krevních buněk AA po 48 hodin vedlo ke zvýšení buněčné koncentrace vápenatých iontů a stimulaci tvorby ceramidů, které rezultovaly v tzv. eryptosu, „sebevraženou smrt erythrocytů“ (Malik *et al.*, 2014).

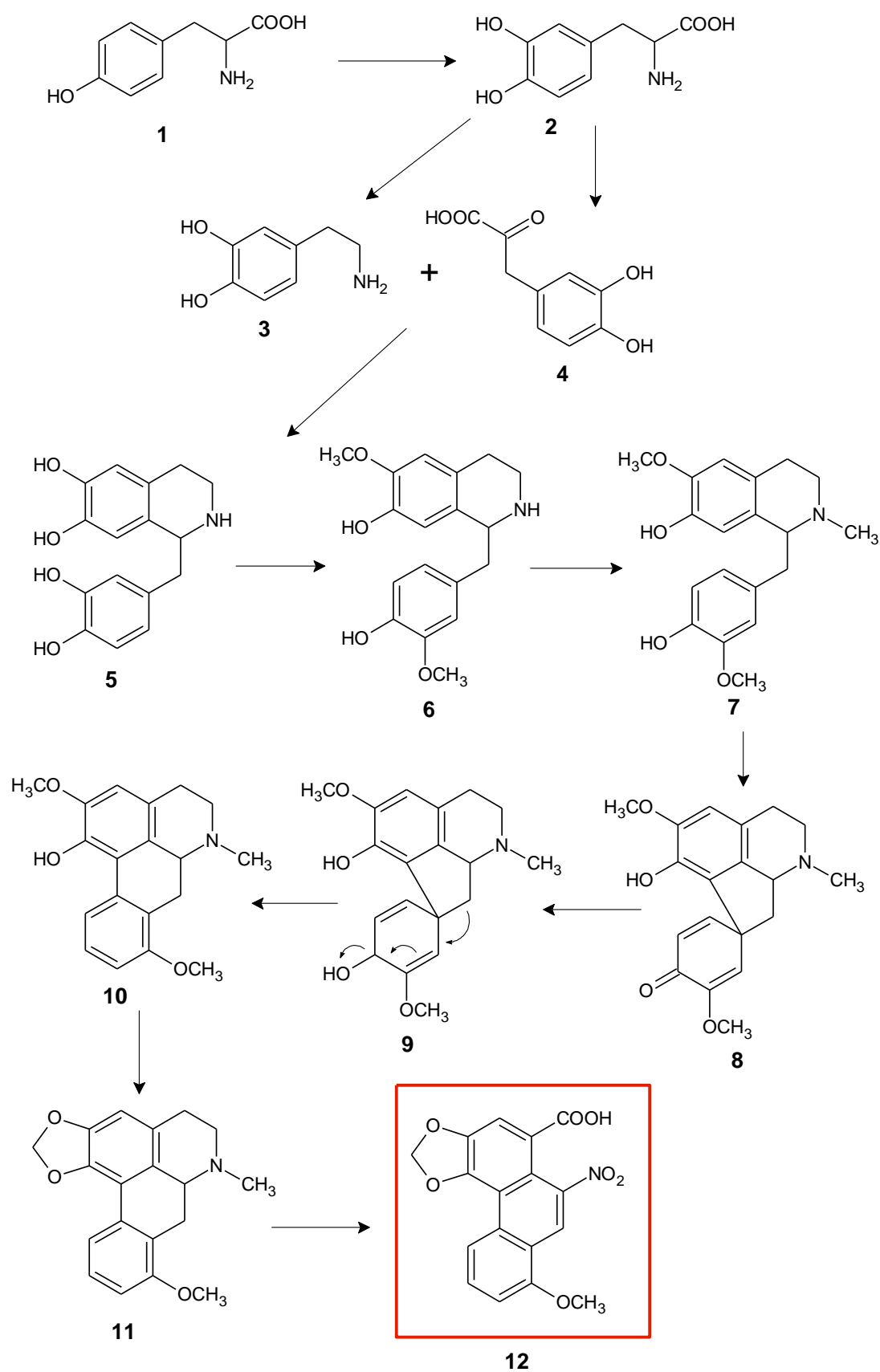
Vedle výše zmíněných účinků, AAI a AAI jsou jedněmi z mála prokazatelných lidských karcinogenů, které genotoxicky interagují s DNA za tvorby persistentních kovalentních aduktů (Bieler *et al.*, 1997; Stiborová *et al.*, 2012). Ty následně vedou k vývoji mutací v klíčovém genu (*p53*, *H-ras*) resultujících v tvorbu malignancí (Arlt *et al.*, 2007). Detailní epidemiologické a metabolické studie vedly k prokázání karcinogenity nejdříve vůči hlodavcům a později též vůči člověku. Z tohoto důvodu je AA (obsahující zejména AAI a AAI) klasifikována Mezinárodní agenturou pro výzkum rakoviny (*International Agency for Research on Cancer, IARC*) při Světové zdravotnické organizaci (*World Health Organisation*) jako *karcinogenní pro člověka* (skupina 1) (IARC, 2012c).

Aristolochové kyseliny jsou rovněž odpovědné za vývoj dvou závažných onemocnění. Prvním z nich je nefropathie vyvolaná aristolochovou kyselinou, poprvé popsána u více než 100 belgických pacientek na začátku 90. let 20. století (Vanherweghem *et al.*, 1993; Nortier *et al.*, 2000) (**kap. 1.3.3.1**, str. 34). Druhým onemocněním je pak Balkánská endemická nefropathie, která se vyskytuje v určitých oblastech Balkánského poloostrova podél řeky Dunaje (**kap. 1.3.3.2**, str. 37) (Toncheva *et al.*, 1998; Hranjec *et al.*, 2005). Navíc, karcinogenní AA vyvolávají v případech obou nefropathií tvorbu nádorů v urotheliální tkáni (**kap. 1.3.3.3**, str. 43).

1.3.1 Biosynthesa aristolochových kyselin v rostlinách

V následující kapitole jsou uvedeny informace o synthese AA v rostlinách. Problematika biosynthesy AA v rostlinách byla studována v druhé polovině 60. let minulého století, a to zejména z důvodu jisté exkluzivity AA jakožto přírodních nitrosloučenin (Spenser & Tiwari, 1966; Schütte *et al.*, 1967).

První studie se soustředily na spojení biosynthesy AA s aporfíny a benzylochinoliny, alkaloidy rovněž přítomnými v rostlinách čeledi *Aristolochiaceae* (Spenser & Tiwari, 1966). Na základě provedených experimentů s radioaktivně značenými prekursory byla navržena biosynthetická dráha vedoucí k tvorbě AAI (**Obr. 10**, str. 32): norlaudanosolin (**5**) → orientalin (**7**) → orientalinon (**8**) → orientalinol (**9**) → stefanin (**11**) → AAI (**12**) (Spenser & Tiwari, 1966). Drobnou komplikací představoval norlaudanosolin, alkaloid benzylochinolinového typu. Ačkoliv se předpokládalo, že je součástí biosynthesy AAI, jeho tvorba byla potvrzena až o dva roky později (Comer *et al.*, 1968). Tuto skutečnost potvrzovala studie Schütteho a jeho spolupracovníků, který dokázal, že norlaudanosolin je inkorporován rostlinnými enzymy do molekuly AAI a může sloužit jako velmi specifický prekursor biosynthesy AAI (Schütte *et al.*, 1967). O rok později bylo prostřednictvím experimentů s radioaktivně značenými sloučeninami dokázáno, že biosynthesa AAI vychází z molekuly tyrosinu (**1**) a jejími meziprodukty jsou 3,4-dihydroxyfenylalanin (**2**), dopamin (**3**), 3,4-dihydroxyfenylpyruvát (**4**) a norlaudanosolin (**5**) (Comer *et al.*, 1968). Navíc, tato studie prokázala, že nitroskupina AA je odvozena od aminoskupiny tyrosinu. Na začátku 80. let pak přibyla ještě jedna studie, která doplnila do té doby získané poznatky. Tato studie prokázala stereospecificitu reakcí vedoucích k AAI a navíc postulovala a dokázala přítomnost dalších meziproduktů – nororientalinu (**6**), prestefaninu (**10**) a stefaninu (**11**) (Sharma *et al.*, 1982).



Obr. 10: Předpokládaná biosynthetická dráha tvorby AAI v rostlinách (dle Spenser & Tiwari, 1966; Schütte *et al.*, 1967; Comer *et al.*, 1968; Sharma *et al.*, 1982).

Schema biosynthesy AAI je uvedeno na **Obr. 10** (str. 32). Jak bylo zmíněno výše, biosynthesa AAI vychází z molekuly tyrosinu (**1**), která je následně hydroxylována za vzniku 3,4-dihydroxyfenylalaninu (**2**). Z tohoto intermediátu vznikají dvě sloučeniny, dekarboxylací dopamin (**3**) a transaminací 3,4-dihydroxyfenylpyruvát (**4**), které podstupují spontánní kondensaci za vzniku benzylisochinolinového derivátu, norlaudanolinu (**5**). Dále dochází ke dvěma methylačním reakcím, při kterých jsou nejdříve methylovány dvě hydroxylové skupiny za vzniku nororientalinu (**6**) a následně je rovněž methylován heteroatom dusíku – tak vzniká orientalin (**7**). Orientalin následně podstupuje cyklizační reakci za vzniku pětičlenného kruhu spojenou s oxidací hydroxyly na uhlíku C4', čímž vzniká oxosloučenina orientalinon (**8**). Tento meziprodukt je posléze redukován za vzniku orientalinolu (**9**), který podstupuje aromatisační reakci resultující v tvorbu konjugovaného systému a v odštěpení molekuly vody. Těmito reakcemi vzniká aporfin prestefanin (**10**), ze kterého následně vzniká stefanin (**11**). Biosynthesa je završena oxidačním štěpením stefaninu (**11**) a vznikem AAI (**12**) (Spenser & Tiwari, 1966; Schütte *et al.*, 1967; Comer *et al.*, 1968; Sharma *et al.*, 1982).

1.3.3 Pathologie vyvolané aristolochovými kyselinami

Rostliny čeledi *Aristolochiaceae* byly a nadále jsou ve středu zájmu jak tradičního léčitelství, tak moderní medicíny. Vedle látek rozmanité struktury i funkcí uvedených v **kapitole 1.2.1** (str. 21) byly z tohoto hlediska studovány rovněž AA (Jackson *et al.*, 1964; Möse, 1966, 1974a, 1974b). Jak již bylo zmíněno v **kapitole 1.3.1** (str. 29), AA vykazují výrazné protizánětlivé účinky a dokonce bylo zvažováno jejich vážné využití ve farmaceutickém průmyslu. Nicméně, AA jsou prokazatelným lidským karcinogenem s velice silnými nefrotoxickými vlastnostmi (Jackson *et al.*, 1964; Mengers, 1988; IARC, 2012c; Tang *et al.*, 2014). Navíc, tento rostlinný alkaloid je odpovědný za vývoj dvou velice závažných ledvinných onemocnění, která jsou, vzhledem ke karcinogennímu potenciálu AA, spojena s vývojem nádorů v urotheliální tkáni (Vanherweghem *et al.*, 1993; Toncheva *et al.*, 1998; Nortier *et al.*, 2000; Hranjec *et al.*, 2005). V rámci této kapitoly bude pojednáno o těchto pathologiích vyvolaných AA včetně přidružených malignancí se zřetelem na aetiologii obou renálních chorob.

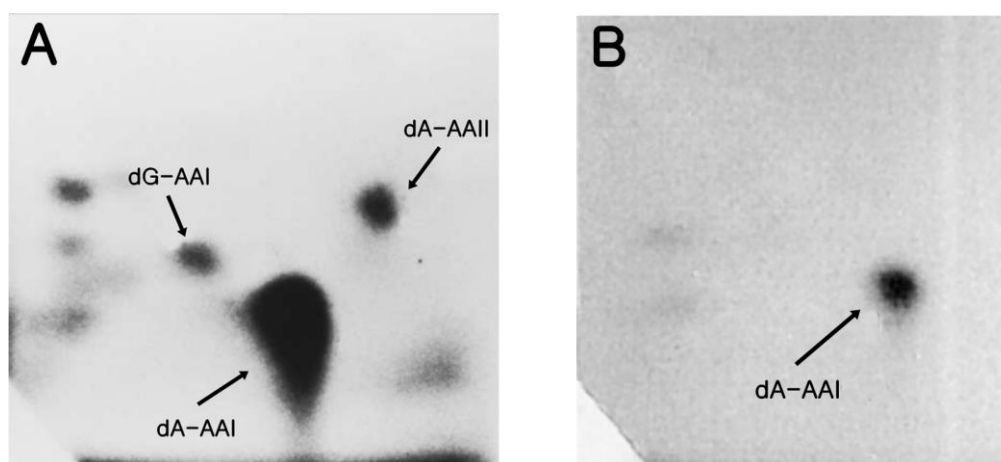
1.3.3.1 Nefropathie vyvolaná aristolochovou kyselinou

Prvním diskutovaným onemocněním je nefropathie vyvolaná aristolochovou kyselinou (*Aristolochic Acid Nephropathy, AAN*). Tato velice zvláštní ledvinná nedostatečnost byla prvně popsána na počátku 90. let 20. století v Belgii (Vanherweghem *et al.*, 1993). Na rozdíl od jiných onemocnění tohoto druhu je AAN charakterisována velice rychlým průběhem, který vede až ke konečnému renálnímu selhání (*End-Stage Renal Disease, ESRD*). Dalšími charakteristickými znaky této intersticiální fibrosy je absence glomerulárního poškození a závažný úbytek ledvinných tubulů. Již při objevení prvních případů bylo předpokládáno, že původcem AAN je aristolochová kyselina. Nicméně, zprvu se tuto hypotézu nedařilo jednoznačně prokázat (Vanherweghem *et al.*, 1993; But, 1993). V současné době je již původce AAN, tj. aristolochová kyselina, nad vší pochybnost prokázán (Vanhaelen *et al.*, 1994, Bieler *et al.*, 1997; Nortier *et al.*, 2000), ba příjem AA se zdá být klíčový v manifestaci tohoto onemocnění. Několikaletá studie ukázala, že v závislosti na různých dávkách medikamentů obsahujících AA se pravděpodobně mění rovněž fenotyp onemocnění. Vysoké dávky takových medikamentů u pacientů dokonce indukují irreversibilní akutní tubulární nekrosu, která může vést až k progresivnímu chronickému renálnímu selhání, popř. ESRD (Martinez *et al.*, 2002a).

Jak bylo zmíněno výše, první případy AAN byly popsány v Belgii, a to u skupiny pacientek, které podstoupily kúru pro redukci tělesné hmotnosti na tamní soukromé klinice. Po absolvování této procedury onemocněly tyto ženy zvláštním typem do té doby nepopsané nefropathie. Detailní studie zabývající se léčbou a aetiologií tohoto onemocnění zavedla vědeckou skupinu v čele s prof. Vanherweghem zpět na onu soukromou kliniku, kde pacientky trpící touto chorobou absolvovaly redukční kúru (Vanherweghem *et al.*, 1993). Na první pohled se nezdálo nic zvláštního, toto lékařské zařízení se specialisovalo na terapii nadváhy více než 15 let, aniž by byly zaznamenány jakékoliv zdravotní problémy pacientů. Kúra byla založena na nízkokalorické dietě a psychické podpoře. Dalšími podpůrnými procedurami byla aplikace intradermálních injekcí artyčokového extraktu a eufilinu, podávání malých dávek amfetaminů (fenfluramin, diethylpropion a meprobamát) a kapslí obsahujících směs acetazolamidu s extrakty živočišného (pankreatický extrakt) a rostlinného původu (extrakt z řešetláku a různých druhů mořských řas). Tento léčebný postup byl užíván od roku 1975 do května roku 1990, poté se složení kapslí s acetazolamidem změnilo: byly vypuštěny preparáty živočišného původu a extrakty z mořských řas byly nahrazeny extraktem z Rulíku zlomocného (*Atropa*

belladonna) a tzv. čínských bylin. Těmito bylinami byly *Stephania tetrandra* a *Magnolia officinalis*. Po změně ve složení podávaných medikamentů, které se takto užívaly po dobu dvou let (do května roku 1992), došlo u několika pacientek k vážným ledvinným abnormalitám (Vanherweghem *et al.*, 1993). V podezření padly právě nově začleněné preparáty z tzv. čínských bylin a nové onemocnění tedy bylo pojmenováno jako nefropathie vyvolaná čínskými bylinami (*Chinese Herbs Nephropathy*) (Cosyns *et al.*, 1994; Cosyns, 2003). Nicméně, ani *Stephania tetrandra*, ani *Magnolia officinalis*, nevykazují buď žádné, nebo vykazují velice nízké či nefrotoxické účinky (Yuan *et al.*, 2011). Naopak tetrandrin (**Obr. 5C**, str. 22), hlavní alkaloid obsažený v rostlinném druhu *Stephania tetrandra*, má prospěšné vlastnosti pro organismus, jako je modulace vápenatých iontů resultující ve vasodilataci a snižování krevního tlaku (Kwan & Achike, 2002). Klinický obraz onemocnění velmi připomínal jiný druh nefropathie, a to Balkánskou endemickou nefropathii, která byla prvně popsána na konci 50. let 20. století, u které již velmi brzy poté byla vyslovena hypotéza, že jejím původcem by mohly být AA a/nebo ochratoxin A (Ivić, 1969; Krogh *et al.*, 1977). Z tohoto důvodu byly při chemické analýze medikamentů podávaných na zmíněné belgické klinice hledány vedle alkaloidů vlastních druhu *Stephania tetrandra* a *Magnolia officinalis* rovněž AA a ochratoxin A (Vanherweghem *et al.*, 1993). Nadto, již při prvních studiích byla nalezena podobnost původních čínských názvů pro druh *Stephania tetrandra* (*Fangji*) a *Aristolochia fangchi* (*Fangchi*), což vedlo k domněnce, že mohlo dojít k záměně těchto rostlinných druhů.

První chemická analýza kapslí obsahujících extrakty z tzv. čínských bylin ovšem neodhalila přítomnost ani AA ani ochratoxinu A (Vanherweghem *et al.*, 1993). V následující fytochemické analýze však AA již byly nalezeny. Důvod byl prostý: při první analýze byly použity takové prepurifikační kroky, které vedly ke znehodnocení AA, které pak nemohly být detekovány. Testováno bylo 12 různých vzorků dovezených do Belgie pod názvem *Stephania tetrandra*, nicméně tetrandrin byl obsažen pouze ve dvou případech (Vanhaelen *et al.*, 1994). To byl první krok k předpokladu, že AA může být původcem AAN. Druhým krokem, který pak jednoznačně prokázal spojení AA a AAN, byla analýza ledvinné tkáně pacientů. Ta odhalila přítomnost kovalentních aduktů AA s DNA (**Obr. 11A**, str. 36). Po tomto nálezů bylo pak onemocnění přejmenováno na nefropathii vyvolanou aristolochovou kyselinou (Schmeiser *et al.*, 1996; Bieler *et al.*, 1997; Nortier *et al.*, 2000; Cosyns, 2003). Nyní je nadto známo, že tyto kovalentní adukty s DNA vykazují vysokou persistenci v tkáních: v nedávné studii byla potvrzena přítomnost aduktů AA s DNA ještě 20 let po začátku vývoje AAN (Schmeiser *et al.*, 2014).



Obr. 11: Autoradiogram aduktů AA s DNA analysovaných metodou „ ^{32}P -postlabelling“ v ledvinách pacientů postižených AAN (A) a BEN (B) (převzato z Nortier *et al.*, 2000; Arlt *et al.*, 2002b).

Jedinou efektivní léčbou je nasazení glukokortikoidů (prednisolonu), nicméně tyto medikamenty neléčí původní příčinu, ale pouze zpomalují vývoj AAN než dosáhne konečného stádia (ESRD) (Vanherweghem *et al.*, 1996; Martinez *et al.*, 2002b). Další možnou léčbou je dialýza a pacienti s ESRD musí podstoupit transplantaci ledvin, vedle toho byla u pacientek, které podstoupily terapii na výše zmíněné belgické klinice, pozorována komplikace ve formě srdečního onemocnění – chlopenní vady. Nicméně, toto onemocnění nebylo vyvoláno působením AA či jiným rostlinným alkaloidem, nýbrž fenfluraminem, látkou která byla používána v rámci redukční kúry pro tlumení chuti k jídlu (Vanherweghem, 1997). Ovšem ani transplantace ledviny neznamenala vyléčení AAN, po transplantaci sice nedocházelo k návratu onemocnění, zato však došlo k vývoji pozdní komplikace AAN, k vývoji urotheliálního karcinomu (Reginster *et al.*, 1997). Vskutku, vývoj malignancí v urotheliální tkáni je spojen s karcinogenním působením AA a je, naneštěstí, nedílnou součástí AAN (Nortier *et al.*, 2000, 2003; Chen *et al.*, 2012). O této problematice detailně pojednává **kapitola 1.3.3.3** (str. 43). V současné době hledání účinné léčby AAN pokračuje, ačkoliv zatím pouze na zvířecích modelech. Tyto studie se zabývají např. hledáním látek indukujících detoxikačních enzymů odstraňujících AA z organismu (Xiao *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2015), nicméně problém je, že stejné enzymy detoxikující AA mohou za určitých podmínek rovněž tento rostlinný produkt aktivovat za vzniku aduktů s DNA (viz **kap. 1.3.4.2**, str. 49). Jiné studie dále rozpracovávají použití léčiv na basi kortikoidů (Baudoux *et al.*, 2012) a další spoléhají na pochopení buněčné signální transdukce a její modulaci (Dai *et al.*, 2016) či využití mikroorganismů (Roumeguère *et al.*, 2015).

Již rok po objevení AAN v Belgii bylo popsáno na 70 případech tohoto onemocnění, z nichž 30 pacientů trpělo ESRD (Vanhaelen *et al.*, 1994) a jen v Belgii vzrostl počet pacientů na konci 90. let na více než 100 (Vanherweghem, 1998). V současné době je AAN diagnostikována na čtyřech kontinentech, zejména pak v Číně, Japonsku, Koreji a na Taiwanu a počty pacientů se pohybují v tisících (Gökmen *et al.*, 2013; Li & Wang, 2004; Poon *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2009, Yang *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2012; Ardalan *et al.*, 2015; Sun *et al.*, 2015).

1.3.3.2 Balkánská endemická nefropathie

Balkánská endemická nefropathie (*Balkan Endemic Nephropathy, BEN*), jejíž aetiologie je již více než 50 let zahalena rouškou tajemství, je onemocnění projevující se jako chronická intersticiální fibrosa. Zvláštním znakem tohoto renálního onemocnění, které bylo poprvé popsáno v roce 1956 (Bamias & Boletis, 2008), je výskyt pouze v určitých oblastech, ba vesnicích v povodí Dunaje, mezi něž se řadí Chorvatsko, Bosna a Hercegovina, Srbsko, Bulharsko a Rumunsko (**Obr. 12**, str. 38) (Radovanović, 2002; Trnacević *et al.*, 2002, Janković *et al.*, 2011; Jelaković *et al.*, 2015). Mezi dalšími charakteristickými znaky BEN lze nalézt výskyt v rodinách (často u mnoha členů), nicméně onemocnění není dědičné, vedle toho BEN nebyla dosud popsána u dětí (Bamias & Boletis, 2008; Grollman, 2013). Tato intersticiální fibrosa, která může resultovat v atrofii ledvin a v konečné selhání tohoto orgánu (Ležaić *et al.*, 2008, Jelaković *et al.*, 2015), je rovněž spojena s vývojem urotheliálního karcinomu ledvinové pánvičky a močovodu (Nikolić *et al.*, 2002; Janković Velicković *et al.*, 2009a, 2009b; Stefanović *et al.*, 2011). Aetiologie BEN byla dlouhou dobu pro vědce záhadou a ani dnes si vědecká obec není zcela jista tím, které látky se na vývoji tohoto závažného onemocnění podílejí. Od prvního popsání BEN bylo diskutováno několik hypotéz, o nichž bude detailně pojednáno níže. Zde bych pouze zmínil, že v současné době převládá názor, že hlavním původcem BEN je AA. Tato hypotéza byla poprvé vyslovena již na konci 60. let 20. století (Ivić, 1969) a na počátku 90. let byla prof. Vanherweghemem a jeho spolupracovníky pozorována až nápadná podobnost BEN s AAN (Vanherweghem *et al.* 1993). Vskutku, mezi AAN a BEN lze nalézt mnoho podobných klinických znaků, jako je častá a závažná anemie, proteinurie, glukosurie, funkční abnormality renálních tubulů a jejich atrofie, intersticiální fibrosa a v neposlední řadě rovněž vývoj urotheliálních malignancí (Stefanović, 2002). Nicméně, existují dva základní rozdíly mezi BEN a AAN, a

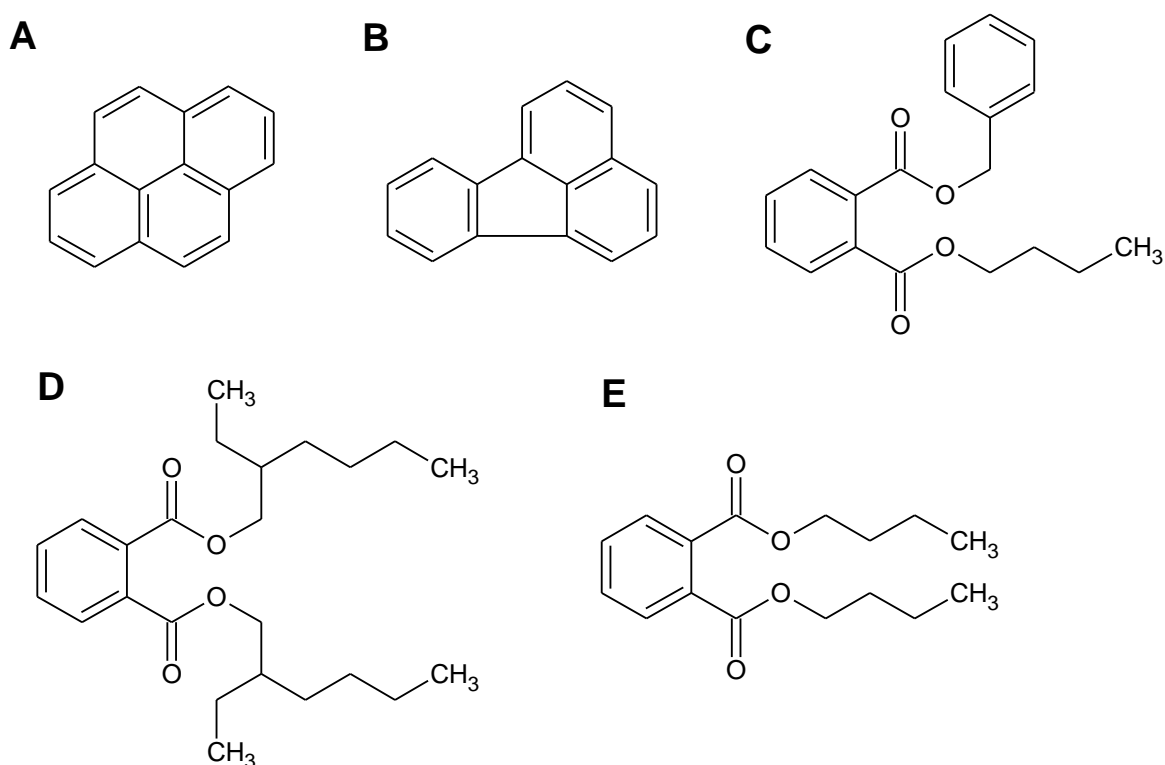
to onen výše zmíněný nedědičný výskyt v rodinách a také rychlost vývoje onemocnění. Zatímco AAN je charakterisována jako rychle postupující fibrosa, BEN je známa svým velmi pomalým vývojem (Stefanović, 2002; Pfohl-Leszkowicz, 2009). V následujících několika odstavcích budou zmíněny hlavní faktory podezřelé z participace na vývoji BEN, mezi něž se řadí organické látky uvolňované z lignitových podloží, těžké kovy, mykotoxiny a AA.



Obr. 12: Mapa s vyznačenými endemickými oblastmi BEN v Chorvantsku, Bosně a Hercegovině, Srbsku, Bulharsku a Rumunsku (převzato z Grollman, 2013).

V 90. letech 20. století byla formulována tzv. lignitová hypothesis, která předpokládala podíl aromatických uhlovodíků na vývoji BEN (Feder *et al.*, 1991). V té době byly prováděny geologické studie zkoumající složení lignitového podloží (Feder *et al.*, 1991, Goldberg *et al.*, 1994). Nadto bylo analysováno složení vod v endemických oblastech, které ukázalo přítomnost organických látek, které nebyly nalezeny v neendemických oblastech. Tyto výsledky vedly k hypotese, že podzemní vody byly kontaminovány organickými sloučeninami uvolněnými z lignitu (Feder *et al.*, 1991; Orem *et al.*, 1999). Takto kontaminovaná voda mohla být užívána ke konzumaci, čímž by obyvatelé postižených oblastí byly vystaveny dlouhodobé expozici těchto látek a jejich následné akumulaci, která by rezultovala ve vývoj urotheliálních malignancí (Tatu *et al.* 1998; Voice *et al.* 2006). Geochemické analýsy provedené na začátku 90. let odhalily

přítomnost polycyklických aromatických uhlovodíků (pyren, anthracen, fenantren, fluoranthen), aromatických aminů (anilin, naftylamin) a deriváty benzenu včetně ftalátů [dibutylftalát (DBP), bis(2-ethylhexyl)ftalát (DEHP), butylbenzylftalát (BBP)] (**Obr. 13**) (Tatu *et al.*, 1998; Maharaj *et al.*, 2014). Naneštěstí, další studie Federovy skupiny byly v průběhu 90. let přerušeny válkou v Jugoslávii a rovněž nedostatkem finančních zdrojů (Palca, 1990). Nicméně, ač často kritisována, zdá se, že lignitová hypotéza, tj. participace organických látek uvolňovaných z lignitu v endemických oblastech, by mohla hrát alespoň částečnou, resp. okrajovou úlohu ve vývoji BEN.

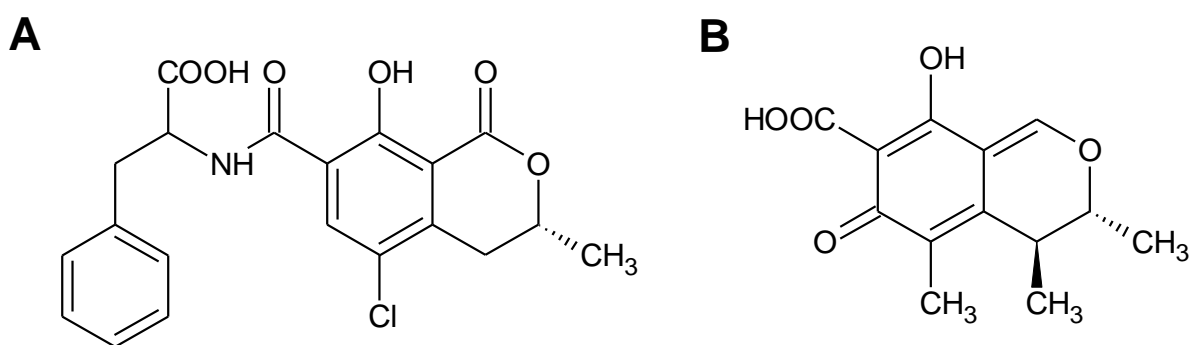


Obr. 13: Struktury vybraných organických látek podezřelých z participace na vývoji BEN: pyren (**A**), fluoranthen (**B**), DBP (**C**), DEHP (**D**) a BBP (**E**).

Další hypotézou, která byla velice detailně studována, bylo působení iontů toxických těžkých kovů. Půda v endemických oblastech byla testována na přítomnost uranu, mědi, kobaltu, zinku, manganu, arsenu, titanu, baria, hliníku, chromu, stroncia, kadmia, bismutu, molybdenu, wolframu, antimonu a cínu (Nichifor *et al.*, 1985; Radovanović, 1989; Wedeen, 1991; Maksimović *et al.*, 1992; Long *et al.*, 2001), nicméně až na studii Longovy skupiny nebyly nalezeny výraznější odchylky v koncentracích těchto prvků v endemických oblastech ve srovnání s oblastmi neendemickými. První studie Nichifora a jeho spolupracovníků však prokázala přítomnost nefrotoxických sloučenin

kadmia, chromu, molybdenu a kobaltu ve vodních zdrojích (Nichifor *et al.*, 1985). Zmíněná studie Longovy skupiny (Long *et al.*, 2001) ukázala zvýšenou koncentraci mědi, molybdenu, olova a kadmia v oblastech postižených BEN a vedle toho rovněž nízké koncentrace selenu. Právě deficit selenu, jakožto možný původce BEN a jeho případné protektivní vlastnosti vůči BEN byly studovány v 90. letech (Maksimović *et al.*, 1992; Maksimović & Djujić, 1997). Nicméně, dle pozdějších studií není pravděpodobné, že by těžké kovy, zejména kadmium, olovo, a toxické polokovy, selen a arsen, hrály významnější roli ve vývoji BEN (Karmaus *et al.*, 2008).

V 70. letech byla vyslovena tzv. mykotoxinová hypotéza, podle níž jsou původcem BEN mykotoxiny, a to zejména ochratoxin A (OTA) a citrinin (**Obr. 14**). Tato hypotéza byla z počátku stavěna na základě podobnosti BEN s prasečí nefropatií vyvolanou mykotoxiny (Krogh *et al.*, 1977; Bamias & Boletis, 2008). Nadto byly nalezeny zvýšené koncentrace OTA v krevním séru a moči pacientů trpících BEN. Nicméně, koncentrace OTA v organismu v balkánské populaci jsou velice rozdílné, což interpretaci značně komplikuje (Radić *et al.*, 1997). To ovšem nic nemění na skutečnosti, že v endemických oblastech byly nalezeny vysoké koncentrace OTA (Vrabcheva *et al.*, 2002, 2004; Abonzied *et al.*, 2002). Mykotoxinovou hypotézu podporuje rovněž skutečnost, že pacienti s BEN pochází takřka výhradně z rurálních oblastí, ve kterých je zvykem konzumovat vlastní, ba doma připravené potraviny. Není výjimkou, že obyvatelé endemických oblastí skladují potraviny až několik let a při špatných podmínkách může dojít ke vzniku plísní, které produkují OTA a citrinin (Pfohl-Lezskowicz & Manderville, 2007).



Obr. 14: Struktura ochratoxinu A (A) a citrininu (B).

Ochratoxin A je vysoce nefrotoxický mykotoxin produkovaný plísněmi druhu *Aspergillus* a *Penicillium* (van der Merwe *et al.*, 1965), který je jedním z nejčastějších kontaminantů potravin jako je káva, pivo, víno, pšenice, koření aj. (van Egmond & Speijers, 1994; Lombaert *et al.*, 2002; Vrabcheva *et al.*, 2002; Amézqueta *et al.*, 2005; Medina *et al.*, 2005). Vedle silných nefrotoxických vlastností vykazuje OTA rovněž karcinogenní účinky v experimentálních zvířatech (Kanigawa & Suzuki, 1978; Bendele *et al.*, 1985; Pfohl-Leszkowicz & Manderville, 2007). Ačkoliv jsou známy karcinogenní vlastnosti OTA, není dosud zcela objasněn mechanismus, kterým OTA působí za vzniku nádorů. Možnost metabolické přeměny OTA za vzniku elektrofilního agens, popř. reaktivního radikálu, které by se vážaly na DNA je extrémně nízká (Turesky, 2005; Gautier *et al.*, 2001a). Nicméně několik studií prokázalo radiosensitivní metodou „³²P-postlabelling“ tvorbu kovalentních aduktů v DNA vyvolaných OTA a strukturu aduktu tvořeného OTA s deoxyguaninem (Grosse *et al.*, 1995; El Adlouni *et al.*, 2000; Dai *et al.*, 2003; Faucet *et al.*, 2004). A to i navzdory metabolickým studiím, které vyloučily přítomnost reaktivních metabolitů schopných reagovat přímo s DNA za vzniku kovalentních aduktů (Gautier *et al.*, 2001a). Jedním z předpokládaných mechanismů genotoxického působení OTA je indukce tvorby ROS a oxidační poškození DNA, které je lokalizované zejména v ledvině a játrech (Creppy *et al.*, 1984; Gautier *et al.*, 2001b; Petrik *et al.*, 2003; Kamp *et al.*, 2005).

Ačkoliv v několika málo studiích byly nalezeny v renální tkáni pacientů postižených BEN adukty v DNA vyvolané OTA, jiné studie tento fakt nepotvrdily (Mally *et al.*, 2004, 2005; Pfohl-Leszkowicz & Manderville, 2007; Pfohl-Leszkowicz, 2009). Dosud tedy chybí definitivní potvrzení tvorby aduktů OTA s DNA a to je také jeden z nejsilnějších argumentů vyslovených proti tzv. mykotoxinové hypotéze. Dalšími závažnými protiargumenty je skutečnost, že dosud není popsáno, že OTA vyvolává nefropatii u člověka a je zde rovněž nesrovnalost v tom, že kontaminace OTA je velmi častá v mnoha zemích světa, ale vývoj BEN je typický pouze pro výše zmíněné endemické oblasti (Grollman & Jelaković, 2007; Bamias & Boletis, 2008). Navzdory této kritice nebyla mykotoxinová hypotéza do dnešních dnů opuštěna a stále probíhají studie, které zkoumají OTA jako hlavního původce BEN (Pfohl-Leszkowicz, 2009; Reljić *et al.*, 2014).

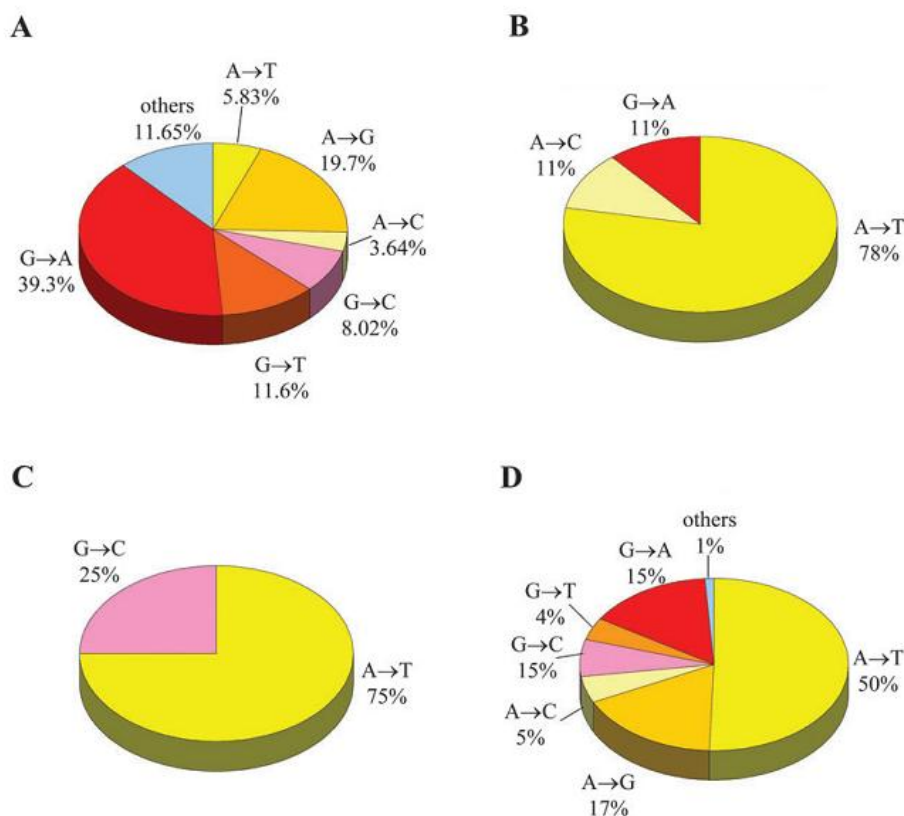
V poslední části této kapitoly bude pojednáno o dosud prokázaném hlavním původci BEN, a to aristolochové kyselině. Hypotéza považující AA za původce BEN byla formulována na konci 60. let srbským profesorem histologie a embryologie Milenkem Ivičem (Ivić, 1969). Tato hypotéza předpokládala kontaminaci obilného zrna semeny



Obr. 15: *Aristolochia clematitis*
(Lindman, 1922-1926)

Podražce křovištního (*Aristolochia clematitis*) (**Obr. 15**). Nadto zde byla rovněž nalezena analogie s ledvinným onemocněním koní po požití sena kontaminovaného *Aristolochia clematitis*. Jak bylo následně popsáno, tento druh podražce, podobně jako většina zástupců botanické čeledi *Aristolochiaceae*, obsahuje toxické AA (Košťálová *et al.*, 1991). Na základě těchto informací prof. Ivič podnikl polní průzkum a zjistil přítomnost *Aristolochia clematitis* v pšeničných polích a popsal nadto rovněž nulovou snahu o odstranění této toxické byliny při sklizních (Bamias & Boletis, 2008). Následně prof. Ivič prokázal karcinogenitu *Aristolochia clematitis*, když po podání této byliny došlo k vývoji sarkomů v experimentálních zvířatech a rovněž její silnou nefrotoxicitu vedoucí až k vývoji nefropathie (Ivič & Lovriæ, 1967). Nedávné studie ukázaly možnou kontaminaci zemědělských plodin AA z půdy, kde se následně hromadila, čímž byla identifikována další z možných cest AA do potravního řetězce (Pavlović *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2016). Jediná dosud provedená epidemiologická studie z roku 2005 navíc prokázala, že pacienti postižení BEN byli ve styku s *Aristolochia clematitis*, který byl před 30-40 lety v endemických oblastech široce rozšířen a opět akcentovala kontaminaci obilného zrna touto rostlinou (Hranjec *et al.*, 2005). Důležitým zlomem ve studiu AA jakožto potenciálního původce BEN bylo nalezení kovalentních aduktů AA s DNA v ledvinné tkáni pacientů s BEN (**Obr. 11B**, str. 36) (Arlt *et al.*, 2002b, 2007; Grollman *et al.*, 2007; Jelaković *et al.*, 2012; Schmeiser *et al.*, 2012; Turesky *et al.*, 2016) a zejména přítomnost typické transversní mutace AT→TA (**Obr. 16**, str. 43) (Arlt *et al.*, 2007; Grollman *et al.*, 2007; Hollstein *et al.*, 2013), které definitivně prokázaly kausalitu mezi AA a BEN. Naneštěstí byla Ivičova hypotéza brzy opuštěna a zastíněna jinými teoriemi, a to zejména hypotézami hledajícími původce BEN v působení mykotoxinů a organických sloučenin uvolněných z lignitu (Grollman, 2013). Až v 90. letech 20. století byl prof. Vanherweghemem vysloven předpoklad o potenciální podobnosti AAN s BEN (Vanherweghem *et al.*, 1993), která byla následně podpořena skupinou prof. Cosynse (Cosyns *et al.*, 1994).

Z výše uvedených informací je zřejmé, že BEN představuje závažný problém a vzhledem k dosud ne zcela jasné aetilogii tohoto onemocnění rovněž nebezpečný fenomen. Nedávné studie ukázaly, že nemoc sice není již tak častá, nicméně dosud nebyla z Balkánského poloostrova zcela vymýcena (Radovanović, 2002; Trnacević *et al.*, 2002; Janković *et al.*, 2011; Jelaković *et al.*, 2015)



Obr. 16: Schema mutací genu *p53* v urotheliálních nádorech (vyjma močového měchýře) dle IARC (**A**), v UUC u pacientů s BEN (**B**), v embryonálních fibroblastů získaných z kmene transgenních myší linie „*hupki mouse*“ vystavených AA (**C**) a v ledvinách transgenních potkanů linie Big Blue Rat vystavených AA (**D**) (upraveno dle Arlt *et al.*, 2007).

1.3.3.3 Urotheliální nádory vyvolané aristolochovou kyselinou

Jak bylo uvedeno v předchozích dvou kapitolách, obě zmíněné nefropatie jsou spojeny s vývojem urotheliálních nádorů v urogenitálním traktu (*upper urothelial carcinoma, UUC*). Tato pozdní komplikace BEN a AAN je, vzhledem k tvorbě aduktů AA s DNA v renální tkáni pacientů (**Obr. 11**, str. 36), jednoznačně způsobena karcinogenním působením AA (Nortier *et al.*, 2000, 2003; Chen *et al.*, 2012; Grollman *et al.*, 2007). Vývoj UUC je v běžné populaci relativně vzácný s incidencí jednoho až dvou případů

na 100 000 jednotlivců za rok a u pacientů jsou postiženy zejména ledvinová pánvička a močovod, přičemž nádory ledvinové pánvičky jsou přibližně čtyřikrát častější (Patel *et al.*, 2014). Léčba spočívá v radikálním operativním řešení, po němž podle nedávné studie nedochází k návratu onemocnění v horizontu 5 let u 69 % pacientů a míra přežití je 73 % (Margulis *et al.*, 2009). Mezi rizikové faktory, které se podílejí na vývoji UUC, náleží primárně chemikálie obsažené v tabáku (aromatické aminy, PAU, nitrosaminy aj.) (Colin *et al.*, 2009) a významným environmentálním faktorem zahrnutým v aetiologii UUC je rovněž AA (Nortier *et al.*, 2000; Grollman *et al.*, 2007).

V případě BEN je doloženo, že výskyt UUC je 60-100násobně větší právě v endemických oblastech než ve zbytku světa (Laing *et al.*, 2006). Zajímavým a charakteristickým znakem jak BEN, tak AAN je skutečnost, že ne všichni pacienti onemocní UUC. Tato zvláštnost může být vysvětlena různými genetickými predisposicemi pacientů a/nebo polymorfismem biotransformačních enzymů (Toncheva *et al.*, 2004; Atanasova *et al.*, 2005; Rouprêt *et al.*, 2007; Arlt *et al.*, 2011a), protože AA musí být metabolicky aktivována právě těmito enzymy za vzniku reaktivních agens schopných modifikace DNA. V současné době je naneštěstí popisováno stále více případů UUC většinou ve spojení s AA, a to zejména na asijském kontinentě (Yang *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 2012; Grollman, 2013; Yang *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014)

Vývoj malignancí v urotheliální tkáni je spojen s genotoxickým působením AA, která v organismu podstupuje metabolickou přeměnu za vzniku reaktivních elektrofilních agens, schopných kovalentně interagovat s DNA, zejména s deoxyadeninem a deoxyguaninem (Bieler *et al.*, 1997; Stiborová *et al.*, 2012). Tyto kovalentní adukty s DNA vykazují až pozoruhodně dlouhou dobu persistence v postižených tkáních, a to více než 20 let (Schmeiser *et al.*, 2014). Ačkoliv v rostlinách čeledi *Aristolochiaceae* jsou majoritně zastoupeny AAI a AAI, bylo již v 90. letech prokázáno, že AAI je v tvorbě aduktů s DNA efektivnější (Schmeiser *et al.*, 1997).

Výše zmíněné modifikace DNA vedou ke vzniku velice specifické mutace v klíčových genech, kterými jsou v případě experimentálních zvířat onkogen *H-ras* a v případě člověka tumorový supresorový gen *p53*. Zatímco onkogen *H-ras* u hlodavců je mutován na kodonu 61 (CAA) (Arlt, *et al.*, 2000), lidský tumorový supresorový gen *p53* je genotoxicky modifikován v kodonu 139 na exonu 5 (AAG) (Arlt *et al.*, 2001). Obě zmíněné mutace vedou k vývoji specifické transverse AT→TA (Arlt *et al.*, 2007; Grollman *et al.*, 2007; Hollstein *et al.*, 2013). Zdá se, že ke vzniku takové mutace dochází sekvenčně

specifickým způsobem (Schmeiser *et al.*, 2009), a to tak, že deoxyadenosinmonofosfát a deoxythymidinmonofosfát jsou při replikaci DNA inkorporovány proti aduktům AA s deoxyadenosinem se stejnou pravděpodobností. Naopak deoxyguanosinové adukty AA proti sobě komplementárně inkorporují deoxycytidinmonofosfát, takže nedochází k žádné mutaci (Schmeiser *et al.*, 1990, 1991). Takové mutace vedou k aberantní proteosynthese, která v případě onkogenu *H-ras* (CAA→CTA) resultuje v záměnu glutaminu za leucin. Nicméně, v případě lidského tumorového supresorového genu *p53* je důsledek transverse AT→TA (AAG→TAG) vážnější, neboť se projeví jako terminační kodon (Stiborová *et al.*, 2008). Výskyt výše zmíněné transversní mutace je v běžné populaci velmi vzácný a jak prokázalo několik studií, je primárně spojen s působením AA (**Obr. 16**, str. 43) (Kohara *et al.*, 2002; Feldmeyer *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2006). Tato skutečnost rovněž vedla k prokázání podílu AA na vývoji AAN a BEN, neboť v renálních tkáních pacientů byly nalezeny nejen kovalentní adukty AA s DNA, ale byla také přítomna tato exklusivní mutace (Arlt *et al.*, 2007; Grollman *et al.*, 2007; Hollstein *et al.*, 2013).

1.3.4 Metabolismus aristolochových kyselin

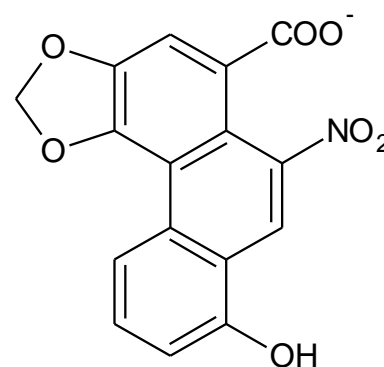
Aristolochové kyseliny, podobně jako ostatní xenobiotika podstupují v organismu metabolickou přeměnu, která primárně vede k jejich detoxikaci. Nicméně, jak bylo uvedeno v **kapitole 1.1.2** (str. 15), některé látky, ne jinak AA, mohou podstoupit reakce, které vedou k pravému opaku, tj. k metabolické aktivaci resultující v tvorbu reaktivních agens, která jsou podstatně více toxická (Miller *et al.*, 1966a; Miller & Miller, 1981). Následujících několik kapitol pojednává jak o reakcích detoxikujících AA, tak o bioaktivaci AA v organismu včetně detailní charakteristiky enzymů participujících na těchto procesech. Ještě před tím bude ovšem uvedeno, jakým způsobem je AA distribuována v organismu.

Cílovým orgánem působení AA je zejména ledvina, resp. epitheliální buňky proximálních tubulů (Nortier & Vanherweghem, 2007). Na těchto místech AA vyvolává rozsáhlé poškození, včetně atrofie renálních tubulů, vývoje intersticiální fibrosy a genotoxického působení resultujícího v tvorbu aduktů s DNA (Nortier *et al.*, 1997; 2000, 2003). Je tedy pravděpodobné, že tato velice specifická akumulace AA v proximálních tubulech, která je odpovědná za jejich selektivní poškození, je vedena speciálním mechanismem (Bakhiya *et al.*, 2009). Nedávné studie ukázaly, že významnou roli v transportu AA do ledviny hraje rodina proteinových přenašečů, které jsou exprimovány

v proximálních tubulech, a to zejména přenašeče organických aniontů (*Organic Anion Transporter, OAT*). Bakhiya se svými spolupracovníky dokázala za použití buněčných linií lidských epitheliálních ledvinných buněk (HEK293), že AA vykazuje vysokou afinitu vůči OAT1 a OAT3, přičemž může působit rovněž jako jejich inhibitor (Bakhiya *et al.*, 2009). Tyto dva přenašeče jsou lokalizovány na basolaterální membráně proximálních tubulů a jejich funkce spočívá ve výměně organických aniontů proti α -ketoglutarátu (Burckhardt & Burckhardt, 2003). Následné studie prokázaly klíčovou úlohu OAT1 a OAT3 ve specifickém transportu AA do proximálních tubulů *in vivo* (Dickman *et al.*, 2011; Xue *et al.*, 2011) a nadto zjistily, že přítomnost karboxylové skupiny (na rozdíl od methoxyskupiny AAI) je zásadní pro vysokou afinitu AA k OAT1 a OAT3 (Dickman *et al.*, 2011). Tyto výsledky byly poté rovněž potvrzeny užitím transgenních myších modelů, kterým byly deletovány geny pro tyto přenašeče, a vedle toho bylo též zjištěno, že inhibice, popř. inaktivace OAT1 a OAT3 snižuje toxický účinek AAI v ledvině (Xue *et al.*, 2011). Nicméně, transport těmito přenašeči není jediným faktorem, který ovlivňuje distribuci AA v organismu, neboť AA, podobně jako jiné látky, velice intensivně interaguje s plasmatickými proteiny, zejména se sérovým albuminem. Vazba AA na plasmatické bílkoviny je takřka 80 %, což v závěru zabraňuje vylučování AA glomerulární filtrací a zároveň to podtrhuje roli přenašečů z rodiny OAT (Dickman *et al.*, 2011).

1.3.4.1 Detoxikace aristolochových kyselin v organismu

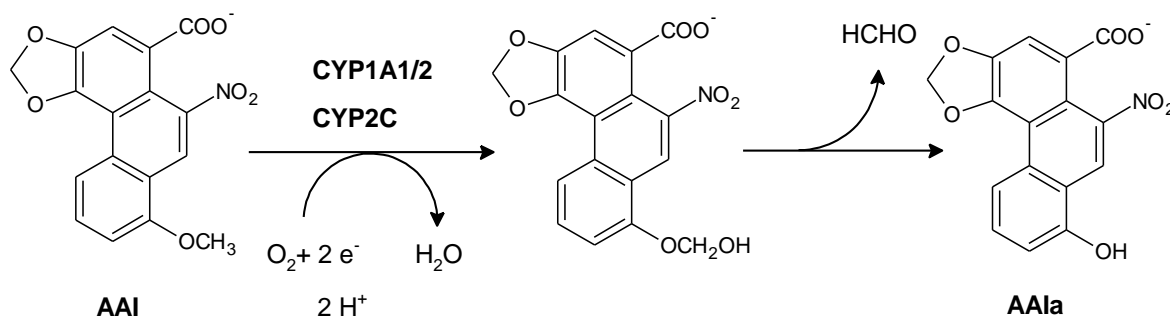
Detoxikace cizorodých látek v organismu je zprostředkována reakcemi vedoucími ke vzniku polárnějších sloučenin, které mohou být následně snadněji vyloučeny z těla ven. Taková polarizace xenobiotika probíhá během tzv. biotransformace a může být rozdělena do dvou základních fází: do fáze (1) *derivatisační*, kdy dochází zejména k hydroxylaci a oxidaci molekul xenobiotika a (2) *konjugační*, kdy dochází ke konjugaci s eobiotiky, např. aktivním sulfátem, acetátem, kyselinou



Obr. 17: Struktura AAIa.

glukuronovou, glutathionem aj. AAI podstupuje rovněž detoxikační reakce, konkrétně *O*-demethylaci, která je katalyzována cytochromy P450 (CYP). Výsledkem této reakce je tvorba hlavního detoxikačního metabolitu, aristolochové kyseliny Ia (AAIa, **Obr. 17**), která byla nalezena v moči a výkalech experimentálních zvířat (Chan *et al.*, 2006; Šístková

et al., 2008; Shibutani *et al.*, 2010; Arlt *et al.*, 2011a). Nicméně, není pravděpodobné, že by AAI byla hydroxylována na uhlíku C8 za vzniku AAIA podobně jako AAI (Chan *et al.*, 2006). Tvorba AAIA spočívá ve dvou základních krocích (Stiborová *et al.*, 2015). Nejdříve dochází k reakci mezi kyslíkem a methoxyskupinou AAI za vzniku α -C-hydroxylovaného meziprojektu, ze kterého se následně uvolňuje molekula formaldehydu, čímž vzniká AAIA (**Obr. 18**).



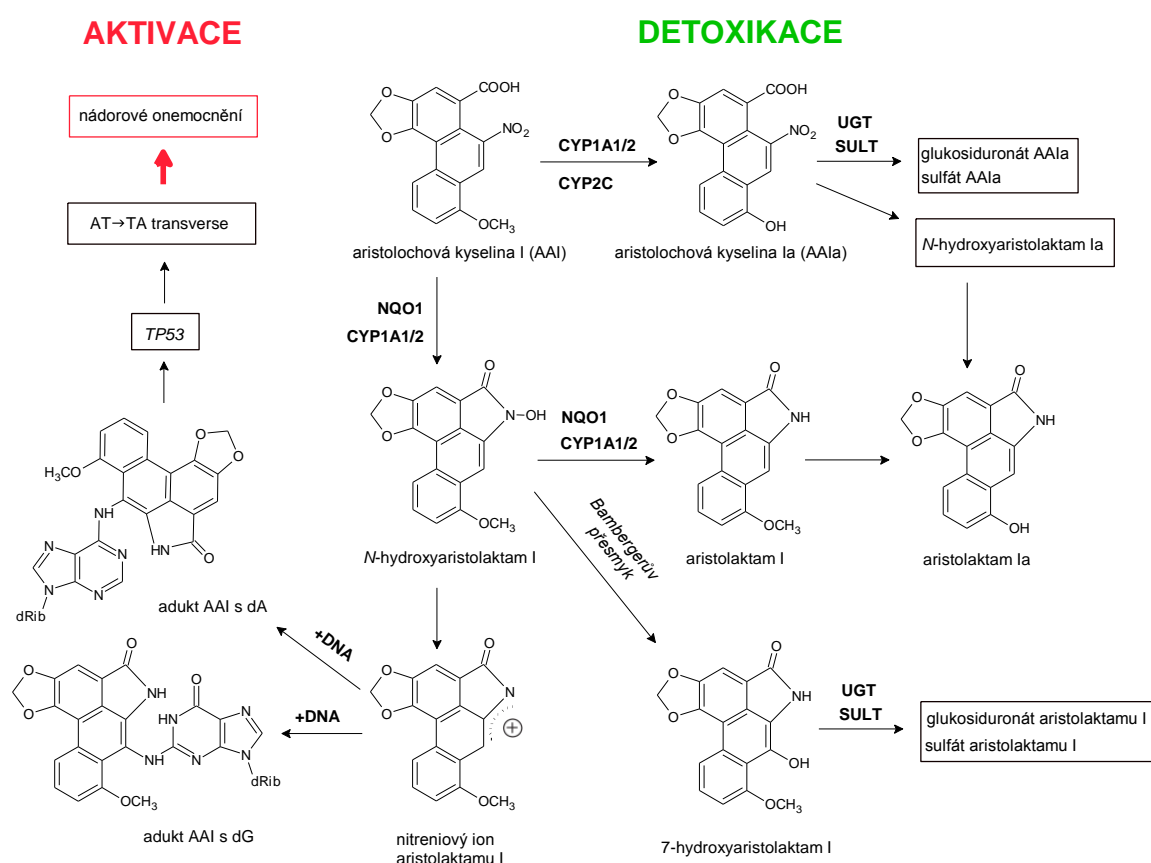
Obr. 18: O-demethylace AAI na AAIA (upraveno dle Stiborová *et al.*, 2015).

V procesu biotransformace AAI (**Obr. 19**, str. 48) se na vzniku AAIA se jak v lidském, tak potkaním organismu podílí zejména CYP podrodiny 1A a 2C (Arlt *et al.*, 2011a; Levová *et al.*, 2011; Stiborová *et al.*, 2011a, 2012). Klíčová úloha CYP1A1/2 v detoxikaci AAI byla potvrzena mnoha studii včetně prací z laboratoře, kde byla předkládána disertační práce vypracována. Pro objasnění úlohy CYP1A1/2 byly využity jak transgenické zvířecí modely (Arlt *et al.*, 2011a; Levová *et al.*, 2011; Stiborová *et al.*, 2012), tak experimenty *in vitro*, využívající specifické inhibitory lidských a potkaních CYP, a rovněž experimenty *in silico* (Stiborová *et al.*, 2011; Milichovský *et al.*, 2016). Shibutani se svými spolupracovníky navíc dokázal, že AAIA je podstatně méně toxická než AAI. V této studii byla demonstrována neochota AAIA tvořit adukty s DNA a nadto nebyly pozorovány významné patologické změny v ledvině, čímž bylo definitivně potvrzeno, že AAIA je hlavním detoxikačním metabolitem AAI (Shibutani *et al.*, 2010).

První studie, popisující detoxikaci AAI na AAIA lidskými CYP1A1/2 byla publikována již roku 2008 skupinou prof. Stiborové (Šístková *et al.*, 2008) a následně byla popsána klíčová úloha CYP1A2 v detoxikaci AAI v myších (Rosenquist *et al.*, 2010; Levová *et al.*, 2011). Na rozdíl od hlodavců, nejefektivnějším enzymem, který v lidském organismu oxidačně detoxikuje AAI na AAIA, je CYP1A1 (**Obr. 39**, str. 81). Tato skutečnost byla potvrzena několika studii, ve kterých byly využity rekombinantní lidské

CYP a humanisované myší modely, které nesly lidské geny *CYP1A1* a *CYP1A2* místo potkaních ortholog těchto enzymů. Rovněž použití lidských jaterních mikrosomů pomohlo objasnit kritickou úlohu CYP1A1/2 v oxidační detoxikaci AAI na AAIA, neboť enzymové aktivity CYP1A1/2 významně korelovaly s tvorbou AAIA (pro aktivitu CYP1A1: $r = 0,884$; $p < 0,0001$ a pro aktivitu CYP1A2: $r = 0,932$; $p < 0,0001$) (Šístková *et al.*, 2008; Stiborová *et al.*, 2012). Vedle CYP1A bylo prokázáno, že jak lidské, tak potkaní CYP2C hrají rovněž úlohu v oxidační *O*-demethylaci AAI. Vzhledem k vysoké expresi této podrodiny CYP v potkaních játrech, zejména pak CYP2C11 (samci) a CYP2C12 (samice) (Haduch *et al.*, 2011) je tato skutečnost zásadní pro interpretaci a pochopení detoxikace AAI na AAIA v organismu potkana ve srovnání s lidským organismem.

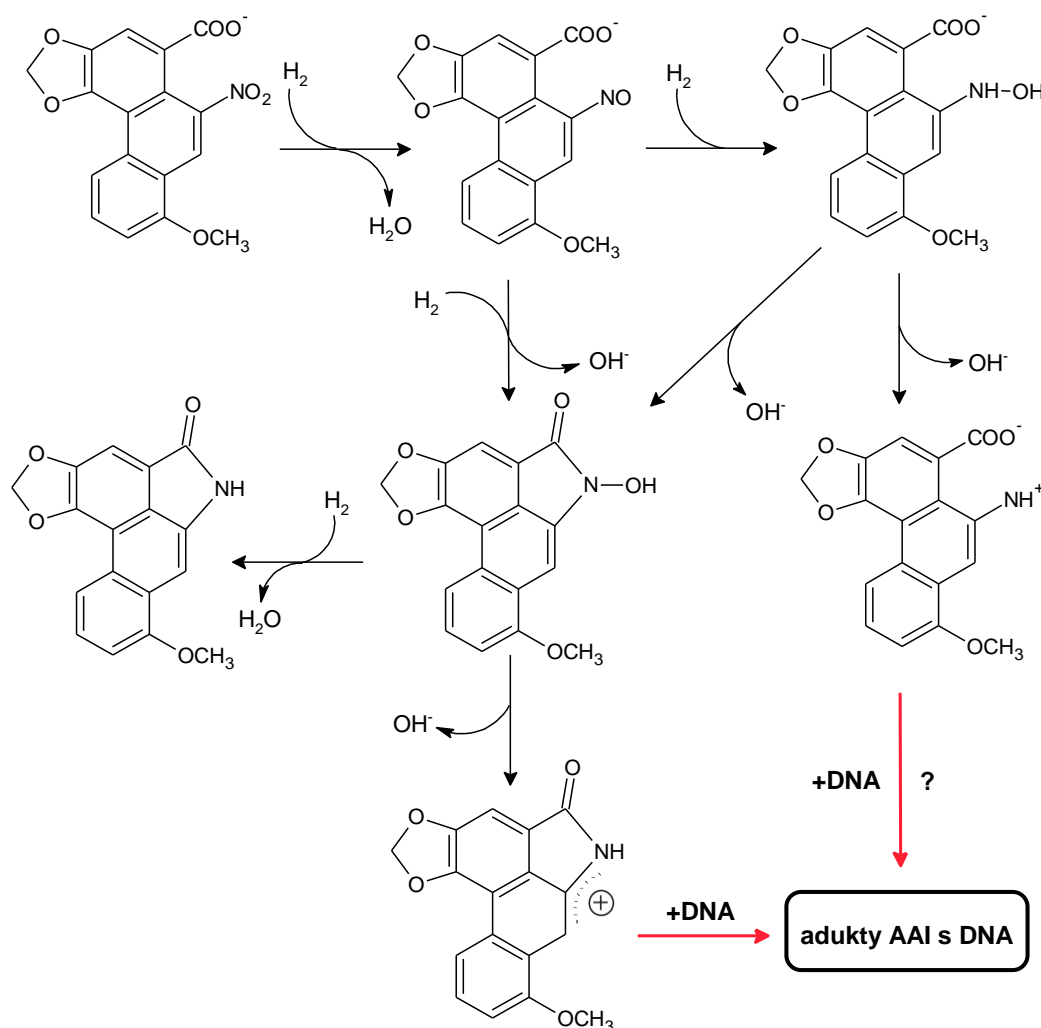
Co se týká konjugační fáze biotransformace AA, v provedených metabolických studiích byly nalezeny zejména konjugáty s glukuronovou kyselinou (*N*-glukosiduronáty a *O*-glukosiduronáty) a s aktivním sulfátem (Chan *et al.*, 2006; Priestap *et al.*, 2012b).



Obř. 19: Schema biotransformace AAI v organismech; UGT, UDP-glukuronosyltransferasa; SULT, sulfotransferasa. (upraveno dle Barta *et al.*, 2015).

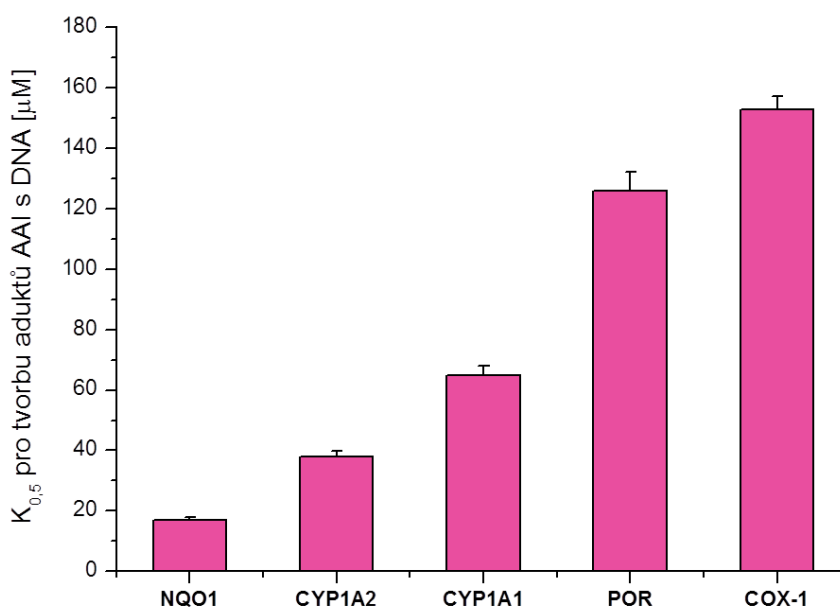
1.3.4.2 Metabolická aktivace aristolochových kyselin v organismu

Vedle detoxikační cesty, která vede k vyloučení AA z organismu, mohou být tyto karcinogeny rovněž metabolicky aktivovány (**Obr. 19**, str. 48). Hlavními produkty těchto reakcí jsou tzv. aristolaktamy, v průběhu jejichž tvorby se mohou tvořit adukty s DNA (Arlt *et al.*, 2000, 2002a; Stiborová *et al.*, 2005a, 2014). Prvním krokem redukční aktivace AAI je tvorba *N*-hydroxyaristolaktamu I (**Obr. 20**), který se snadno rozpadá na *N*-acylnitreniový ion (Stiborová *et al.*, 2013a, 2014). Toto elektrofilní agens interaguje s DNA, zejména pak s purinovými basemi, za tvorby stabilních kovalentních aduktů, které jsou dnes plně definované: jedná se o dva adukty s deoxyadenosinem, 7-(deoxyadenosin-*N*⁶-yl)aristolaktam I (dA-AAI) a 7-(deoxyadenosin-*N*⁶-yl)aristolaktam II (dA-AAII), a jeden adukt s deoxyguanosinem, 7-(deoxyguanosin-*N*²-yl)aristolaktam I (dG-AAI) (Schmeiser *et al.*, 1996, 1997; Bieler *et al.*, 1997; Stiborová *et al.*, 2005a).



Obr. 20: Předpokládaný mechanismus redukční aktivace AAI vedoucí ke tvorbě aduktů s DNA (upraveno dle Stiborová *et al.*, 2014)

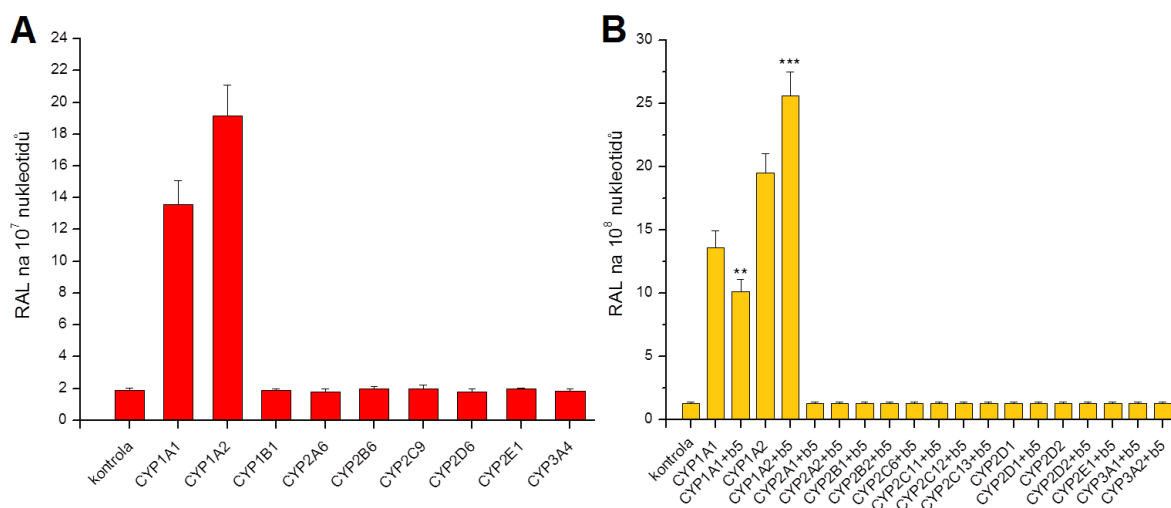
Na základě struktury aduktů AA s DNA, které byly nalezeny v ledvinách pacientů s AAN a BEN (Schmeiser *et al.*, 1996; Bieler *et al.*, 1997; Arlt *et al.*, 2002b), je velmi pravděpodobné, že *N*-acylnitreniový ion s delokalisovaným kladným nábojem působí jako tzv. ultimativní karcinogen. Ačkoliv tvorba *N*-hydroxyaristolaktamu I není dosud zcela objasněna, studie *in silico* naznačují, že nitroskupina AAI je postupně redukována nejdříve na nitrososkupinu a dále pak na *N*-hydroxylamin, které jsou stabilisovány interakcí s karboxylovou skupinou v *peri* posici (Obr. 20, str. 49). Karboxylová skupina následně podstupuje kondenzační reakci s *N*-hydroxyskupinou za vzniku *N*-hydroxyaristolaktamu I (Stiborová *et al.*, 2014).



Obr. 21: Efektivita NQO1, CYP1A1/2, NADPH:CYP reductasy (POR), a prostaglandin H synthasy 1 (COX-1) v aktivaci AAI za tvorby aduktů s DNA. $K_{0.5}$ představuje koncentraci AAI, která je nutná pro tvorbu poloviny maximálního množství aduktů s DNA (upraveno dle Stiborová *et al.*, 2011b).

Na redukční bioaktivaci AA se v organismu podílí několik druhů enzymů. Zdaleka nejefektivnějším enzymem katalysujícím nitroredukcí AA jak v potkaním, tak lidském organismu je NAD(P)H:chinonoxidoreduktasa 1 (NQO1) (Obr. 21) (Chen *et al.*, 2011; Stiborová *et al.*, 2011b; Levová *et al.*, 2012; Krajs *et al.*, 2015). Krucální úlohu NQO1 při aktivaci AA potvrdilo mnoho studií, které mj. odhalily rovněž potenciál AAI indukovat tuto cytosolární reductasu v játrech a ledvině, v orgánu konečného toxického působení AA. Z mechanistického pohledu na aktivaci AA katalysovanou NQO1 přichází v úvahu dvě cesty, kterými tento enzym redukuje AA: (1) interakce s isoalloxazinovým kruhem

resultující v přímý hydridový přenos nebo (2) tříkroková redukce stabilisovaná hydroxyskupinami tyrosinů v aktivním centru NQO1. Tyto výsledky byly získány z nedávno provedených studií *in silico* (Martínek *et al.*, 2011; Stiborová *et al.*, 2011b). Mezi další enzymy participující na aktivaci AA se řadí NADPH:CYP reduktasa (POR) a peroxidasa prostaglandin H synthasa 1 (COX-1). Nicméně, tyto enzymy aktivují AA s nepoměrně nižší účinností (**Obr. 21**, str. 50) (Stiborová *et al.*, 2001a, 2005a).



Obr. 22: Schopnost lidských (A) a potkaních (B) rekombinantních CYP aktivovat AA za tvorby aduktů s DNA. Kontrolní stanovení bylo provedeno v přítomnosti samotné NADPH:CYP reduktasy. RAL, relativní značení aduktů; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (převzato z Stiborová *et al.*, 2005a, 2011a).

V bioaktivaci AA hrají překvapivě významnou úlohu rovněž CYP1A1/2, které katalysují spíše detoxikační reakce (Šítková *et al.*, 2008; Arlt *et al.*, 2011a; Levová *et al.*, 2011). Nicméně, jak potkaní, tak lidské isoformy CYP1A1/2 redukují AA za tvorby aduktů s DNA, přičemž CYP1A2 je v obou zmíněných organismech efektivnější (Stiborová *et al.*, 2001b, 2005a, 2005b, 2011a). Tyto skutečnosti byly potvrzeny mnoha studiemi, a to za využití jednak specifických inhibitorů α -naftoflavonu (CYP1A1/2) a furafyllinu (CYP1A2) a jednak rekombinantních lidských a potkaních CYP (**Obr. 22**) (Stiborová *et al.*, 2005a, 2011a, 2012). Kritickou úlohu CYP1A1/2 *in vivo* potvrdily rovněž studie s transgenními myšimi modely linií *Cyp1a1*(-/-), *Cyp1a2*(-/-) a *Cyp1a1/1a2*(-/-), kterým byly deletovány geny kódující CYP1A1/2 (Arlt *et al.*, 2011a). Vedle těchto geneticky modifikovaných organismů byly provedeny rovněž studie s humanisovanými myšimi modely, které nesly lidské CYP1A1/2. Tyto studie potvrdily úlohu lidských CYP1A1/2 v aktivaci AA *in vivo* (Stiborová *et al.*, 2012). Nadto tvorba aduktů AA s DNA velice

významně korelovala s enzymovými aktivitami CYP1A ($r = 1,0$; $p < 0,001$), takže participace CYP1A1/2 je skutečně podstatná (Stiborová *et al.*, 2005a). Vedle CYP1A1/2 byla pozorována schopnost aktivovat AA rovněž prostřednictvím lidského CYP3A5, který je převážně exprimován zejména v ledvině (Levová *et al.*, 2011). Tyto výsledky mohou vysvětlit skutečnost, že AAI je rovněž aktivována v ledvině, neboť expresní hladiny CYP1A2 jsou v tomto orgánu velice nízké.

Zajímavá je duální role CYP1A1/2 v metabolismu AA. Jak bylo dříve prokázáno, zdá se, že koncentrace kyslíku v tkáních je klíčovým regulačním faktorem, který ovlivňuje, zda CYP1A1/2 budou detoxikovat AA anebo ji redukčně aktivovat. Je pravděpodobné, že za fyziologických podmínek je v organismu udržována rovnováha mezi *O*-demethylací a nitroredukcí (Levová *et al.*, 2011; Stiborová *et al.*, 2001b, 2012). Nicméně, zůstává předmětem studia, která z metabolických cest v organismech převažuje. V nedávno publikovaných studiích bylo demonstrováno, že v případě oxidační detoxikace AAI katalysované CYP1A1/2 v aerobních podmínkách se molekula AAI chová jako klasický substrát CYP, do kterého je zabudován atom kyslíku. V případě anaerobních podmínek se molekula AA váže k CYP1A1/2 jako ligand, což následně resultuje v redukcí tohoto karcinogenu (Stiborová *et al.*, 2005b; Jeřábek *et al.*, 2012). Co se týká mechanismu nitroredukce, je vyloučen přímý přenos hydridu, podobně jako u NQO1, protože v aktivním centru CYP1A1/2 chybí jeho vhodná donorová skupina. Je pravděpodobné, že redukce AA katalysovaná CYP je vícekroková. Jak již bylo uvedeno výše, AA se váže k CYP1A1/2 jako ligand a to tak, že karboxylová skupina je umístěna nad atomem železa hemu. Takto umístěná AA je stabilisována vodíkovými vazbami, a to zejména mezi atomem kyslíku nitroskupiny a hydroxyskupinami serinu 122 a threoninu 124. Další stabilisaci poskytují vodíkové vazby mezi atomem kyslíku dioxolanového kruhu a hydroxyskupiny threoninů 497 a 498 (Jeřábek *et al.*, 2012). Význam těchto nekovalentních interakcí ve stabilisaci molekuly AA během její metabolické redukce byl demonstrován v nedávno publikované studii, kdy byla testována schopnost mutantních CYP1A1, 1A2 a 1B1 aktivovat AAI. Tyto enzymy byly mutovány právě v aminokyselinách, které dle studií *in silico* stabilisují molekulu AA při nitroredukcí. V molekule CYP1A1 byl zaměněn serin 122 za alanin, v CYP1A2 threonin 124 za valin a v CYP1B1 byl mutován alanin 133 na serin. V případě CYP1A1/2 byly tedy odstraněny aminokyseliny nesoucí hydroxyskupiny, které se podílí na stabilisaci při aktivaci AA. V případě CYP1B1 byla do molekuly inkorporována aminokyselina nesoucí hydroxyskupinu, která je schopná

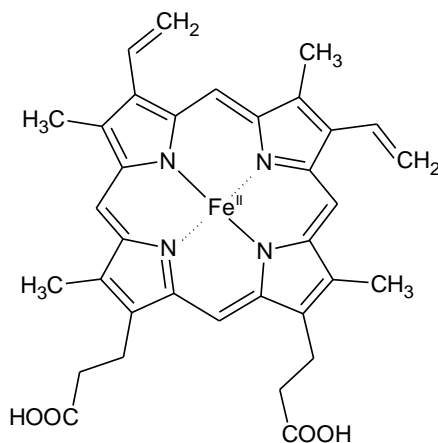
stabilisovat orientaci AAI v aktivním centru. Výsledky hovořily jasně: odstranění aminokyselin s hydroxyskupinou (serinu¹²² a threoninu¹²⁴) v CYP1A1 a 1A2 vedlo k až 20násobně nižší tvorbě aduktů AAI s DNA, zatímco přítomnost hydroxyskupiny v molekule CYP1B1 rezultovala v tvorbu aduktů AA s DNA katalyzovanou tímto enzymem, a to navzdory faktu, že CYP1B1 je v aktivaci AAI zcela neefektivní (Milichovský *et al.*, 2016).

Aktivace některých nitrosloučenin, např. 3-nitrobenzanthronu, může být potencována konjugačními enzymy, jako jsou *N*- a *O*-acetyltransferasy (NAT) a sulfotransferasy (SULT) (Stiborová *et al.*, 2010). Nedávná studie ukázala, že aktivace AAI by mohla být rovněž ovlivněna konjugačními enzymy, konkrétně lidskými SULT1A1/2 a 1B1 (Sidorenko *et al.*, 2014). Dle této studie není samotná nitroredukce AAI dostatečně efektivní ve srovnání s aktivací spojenou se sulfonací *N*-hydroxyaristolaktamu I. Tato studie z laboratoře prof. Grollmana ukázala efektivitu SULT1B1 a SULT1A1/2 sulfonovat *N*-hydroxyaristolaktam I za vzniku *N*-sulfoxyaristolaktamu I, který následně podstupuje heterolytické štěpení resultující v tvorbu *N*-acylnitreniového iontu. Nicméně, tyto závěry nejsou podporovány výsledky nedávno publikované studie *in vitro*, kdy byla prováděna aktivace AAI v přítomnosti SULT1A1/2 a NAT1/2 (Martínek *et al.*, 2011; Stiborová *et al.*, 2011b) – na rozdíl od předchozí studie, kdy byla zkoumána aktivace AAI vlastně až z *N*-hydroxyaristolaktamu I (Sidorenko *et al.*, 2014). Z výsledků těchto experimentů je patrné, že ani SULT1A1/2, ani NAT1/2 neovlivňují tvorbu aduktů AAI s DNA. Definitivní důkaz působení konjugačních enzymů by ovšem mohly přinést studie s transgenními zvířecími modely, kterým budou deletovány geny kódující SULT a/nebo které ponosou geny lidských SULT.

1.3.4.3 Enzymy oxidačně detoxikující aristolochovou kyselinu I

Jak bylo uvedeno v kapitole 1.3.4.1 (str. 46), enzymová detoxikace AAI vedoucí ke tvorbě demethylovaného derivátu AAI, AAIA, je katalyzována výhradně cytochromy P450. Tyto hemthiolátové enzymy, které byly objeveny na konci 50. let minulého století (Klingenberg, 1958; Garfinkel, 1958), hrají významnou úlohu v detoxikaci xenobiotik a podílejí se rovněž na metabolismu látek tělu vlastních, zejména pak sterolů a mastných kyselin (Keber *et al.*, 2013a, 2013b; Goyal *et al.*, 2014; Slominski *et al.*, 2014; Niwa *et al.*, 2015; Spector & Kim, 2015).

Název těchto enzymů obsahujících ferroprotoporfyrin IX (**Obr. 23**) je odvozen ze skutečnosti, že v redukovaném stavu tvoří komplex s oxidem uhelnatým, který poskytuje silný absorpční pás při vlnové délce 450 nm (Klingenberg, 1958; Garfinkel, 1958; Omura & Sato, 1964). K dubnu roku 2016 bylo identifikováno 35 166 genů a pseudogenů CYP, které byly nalezeny jak v živočišných organismech (10 477), tak v rostlinách (13 978), houbách (7 873), bakteriích (2 156) a virech (28), přičemž v lidském genomu je přítomno 57 genů a 58 pseudogenů těchto enzymů (Ingelman-Sundberg, 2005; Nelson, 2009). Pro snazší orientaci byl vypracován důkladný názvoslovný systém, podle něž se CYP dělí do tzv. rodin a podrodin. Ty se mezi sebou liší stupněm sekvenční homologie: 40% pro zařazení do příslušné rodiny a 55% a vyšší pro zařazení do příslušné podrodiny. V zápisu pak název sestává z třípísmenné zkratky CYP následované arabskou číslicí, která označuje rodinu, velkým písmenem představujícím podrodinu a arabskou číslicí, značí vlastní isoformu enzymu (např. CYP1A1) (Nebert *et al.*, 1987, 1991, 2013).

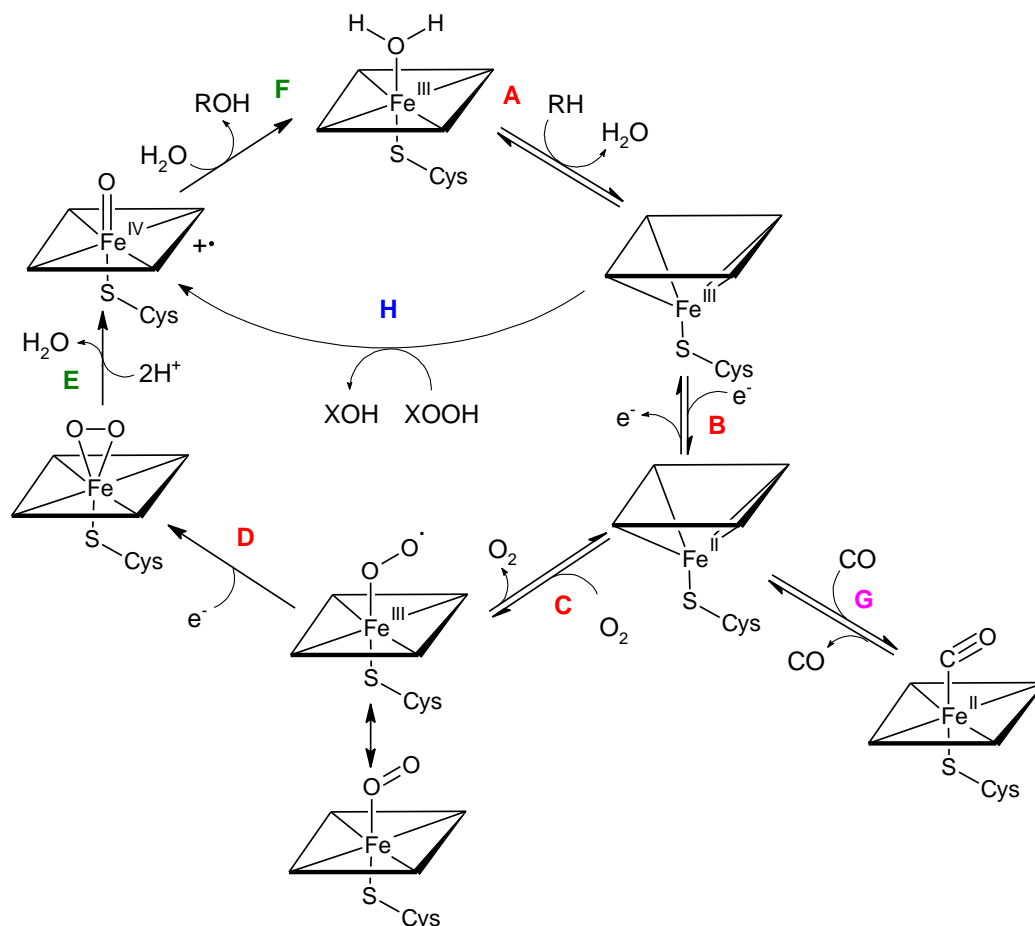


Obr. 23: Struktura ferroprotoporfyrinu IX (hemu b).

Jak bylo zmíněno výše, v organismu hrají CYP významnou úlohu, a to zejména při detoxikaci xenobiotik. Nicméně, jak bylo uvedeno v **kapitole 1.3.4.2** (str. 49), mohou tyto enzymy participovat rovněž na aktivaci prokarcinogenů. Jejich lokalizace v organismu zahrnuje různorodé tkáně, včetně ledvin, plic, prostaty, mozku, ale hlavním orgánem výskytu CYP jsou játra, ve kterých participují na biotransformačních reakcích (Lewis, 2001; Williams *et al.*, 2000). V buňce eukaryotních organismů se CYP nachází v membráně hladkého endoplasmatického retikula a v menší míře mitochondrií, kde společně s dalšími enzymy (POR, cytochrom b_5 a jeho reduktasa) tvoří tzv. systém oxidas/oxygenas se smíšenou funkcí (*mixed function oxidase/oxygenases system*, *MFO system*) (Hildebrandt & Estabrook, 1971; Edwards *et al.*, 1991; Bernhardt, 2006). V tomto systému mají CYP, které zde působí jako terminální oxidasy, dvě základní funkce: (i) oxidasovou a (ii) oxygenasovou.

Oxidasová funkce CYP spočívá v aktivaci molekulárního kyslíku, který může být dále využit v následujících reakcích. Druhá z uvedených funkcí, oxygenasová, pak resultuje v zabudování atomu kyslíku do molekuly substrátu (Kadkhodayan *et al.*, 1995; Isin & Guengerich, 2007). Hlavní úlohou MFO systému je katalýza monooxygenasových reakcí, které probíhají uspořádaným reakčním mechanismem a vedou k aktivaci molekulárního kyslíku. Takto aktivovaná molekula kyslíku poskytuje právě jeden atom, který je následně zabudován do molekuly substrátu (Isin & Guengerich, 2007, 2008). Pro navázání substrátu je důležité, aby CYP byl v tzv. vysokospinovém stavu (Schenkman *et al.*, 1967; Isin & Guengerich, 2007), který je charakterisován absorpčním maximem Soretova pásu při vlnové délce 390 nm. Při tomto stavu CYP leží ion železa mimo rovinu porfyrinového skeletu a je pentakoordinován. Tato forma vzniká po přiblížení substrátu k aktivnímu místu enzymu z nízkospinového stavu CYP, ve kterém je ion železa hexakoordinován. Nízkospinová forma CYP vykazuje absorpční maximum při vlnové délce 418 nm a ion železa je v rovině porfyrinového skeletu. Šestým ligandem iontu železa při tomto stavu může být např. molekula vody (Schenkman *et al.*, 1967; Isin & Guengerich, 2007).

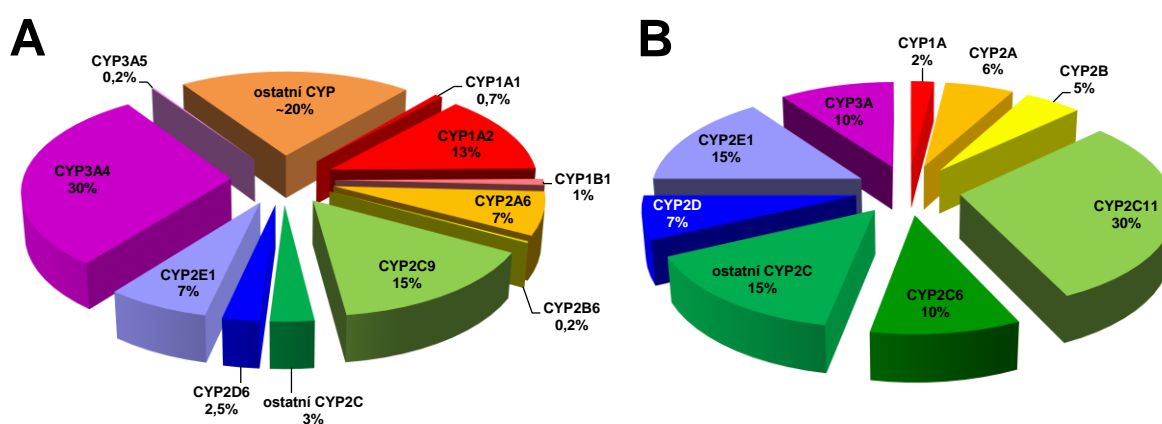
Reakční mechanismus katalýzy CYP (**Obr. 24**, str. 56) lze rozdělit do dvou základních fází. Pro první fázi je charakteristická aktivace dvouatomové molekuly kyslíku (**Obr. 24A-D**), v druhé fázi pak dochází k zabudování právě jednoho atomu kyslíku do molekuly substrátu (**Obr. 24E-F**). Jak bylo uvedeno výše, po přiblížení substrátu k aktivnímu místu CYP dochází k přeměně nízkospinové formy na vysokospinovou. V průběhu aktivace kyslíku rovněž musí dojít k redukci, neboť pouze dvojmocné železo je schopno koordinovat molekulu kyslíku, případně jiné ligandy (např. oxid uhelnatý, **Obr. 24G**). Elektrony potřebné k redukci iontu protoporfyrinového železa (1. a 2. redukce, **Obr. 24B a D**) jsou poskytovány zejména POR, nicméně druhá redukce může být zprostředkována rovněž elektrony dodávanými NADH:cytochrom b₅ reduktasou. Nedávné studie však naznačují, že NADH:cytochrom b₅ reduktasa se může podílet rovněž na první redukci (Stiborová *et al.*, 2016). Takto aktivovaná molekula kyslíku poskytuje dále jeden atom k hydroxylaci substrátu a druhý atom kyslíku je redukován na vodu. Vedle tohoto mechanismu CYP vykazují též peroxidasovou aktivitu, kdy využívají jako substrát organický peroxid (**Obr. 24H**) (Kadkhodayan *et al.*, 1995; Isin & Guengerich, 2007)



Obr. 24: Reakční mechanismus cytochromů P450 (upraveno dle Kadkhodayan *et al.*, 1995).

Jak bylo uvedeno výše, do roku 2016 bylo identifikováno 10 477 genů a pseudogenů živočišných CYP (Nelson, 2009), nicméně poslední část této kapitoly bude zaměřena pouze na dva živočišné druhy: potkana a člověka. Vzhledem k významu jater v procesu biotransformace se soustředím na jaterní CYP. Kvalitativní zastoupení CYP v lidských a potkaních játrech je velice podobné. V lidských, podobně jako v potkaních játrech můžeme nalézt podrodiny 1A, 2A, 2C, 2E, 2D a 3A. Nicméně, v lidských játrech je majoritně zastoupen CYP3A4 (~30 %), který je následován CYP2C9 (~15 %) a CYP1A2 (~13 %). Ostatní CYP, jako CYP2C19, 2E1, 2A6, 2D6, 2C8 a 3A5, jsou v lidských játrech přítomny v nižších množstvích (**Obr. 25A**, str. 57). Jak CYP1A1 a tak CYP3A5 představují klasické extrahepatální enzymy a jejich expresní hladiny v játrech jsou extrémně nízké, obsah CYP1A1 je <0,7 % a CYP3A5 <0,2 % (Rendić & DiCarlo, 1997; Rodrigues, 1999; Stiborová *et al.*, 2002, 2005b). Podobně jako v lidských játrech je majoritně exprimován CYP3A4, v játrech potkaních je převažuje CYP2C (CYP2C6, 2C11, 2C12 a 2C13). Expresní hladina této podrodiny v potkaních játrech je až 55 %

(Nedelcheva & Gut, 1994), přičemž CYP2C11 je exprimován zejména u samců (Haduch *et al.*, 2011), kde představuje 50 % celkového obsahu podrodiny 2C (Večeřa *et al.*, 2011; Zachařová *et al.*, 2012), a CYP2C12 je typický pro samice (Haduch *et al.*, 2011). Dalším zástupcem podrodiny 2C, který je exprimován v potkaních játrech, je CYP2C6, který přispívá k celkovému obsahu CYP2C 20 %. Jak CYP2C11, tak CYP2C6 mají velice podobnou substrátovou specificitu s lidským CYP2C9. Nadto s tímto enzymem sdílí rovněž sekvenční a funkční analogii (Večeřa *et al.*, 2011). Ostatní potkaní CYP jsou v játrech exprimovány podstatně méně, např. CYP1A představuje 2 % celkových jaterních CYP, a jejich zastoupení je znázorněno na **Obr. 25B** (Nedelcheva & Gut, 1994).



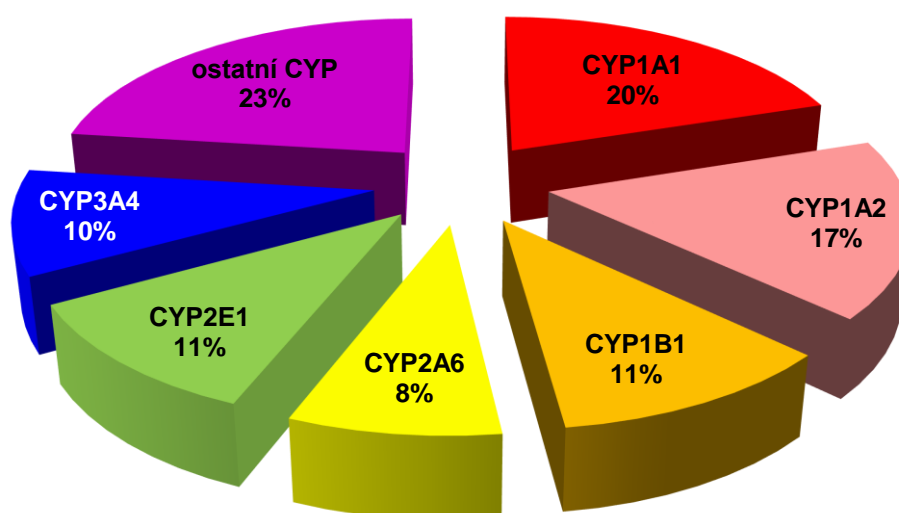
Obr. 25: Procentuální zastoupení CYP v lidských (A) a potkaních (B) játrech (upraveno dle Nedelcheva & Gut, 1994; Rendić & DiCarlo, 1997; Rodrigues, 1999; Stiborová *et al.*, 2002, 2005b; Večeřa *et al.*, 2011; Zachařová *et al.*, 2012).

1.3.4.4 Enzymy redukčně aktivující aristolochové kyseliny

Na redukční aktivaci AA participují majoritně cytosolární reduktasa NQO1 a mikrosomální CYP1A1/2. Jak bylo uvedeno v **kapitole 1.3.4.2** (str. 49), jsou detoxikační a aktivační reakce katalysované CYP1A1/2 v rovnováze a záleží na koncentraci kyslíku v tkáních. Obecně ovšem platí, že CYP hrají významnou úlohu v metabolismu xenobiotik a bioaktivace prokarcinogenů není ničím zvláštním, přičemž podrodina 1A je v těchto reakcích velice efektivní (**Obr. 26**, str. 58) (Rendić & Guengerich, 2012).

Nicméně, s největší účinností redukuje AA za vzniku aduktů s DNA enzym NQO1 (**Obr. 21**, str. 50), který byl poprvé popsán Larsem Ernsterem a Francem Navaziem v roce 1958 (Ernster & Navazio, 1958). Tento enzym, který se vyskytuje zejména v cytosolární frakci (< 90 %), nesl nejdříve označení DT-diaforasa, které bylo odvozeno od skutečnosti, že tato oxidoreduktasa využívá jak NADH (DPNH), tak NADPH (TPNH) (Ernster *et al.*,

1960; Ernster, 1967). NQO1 je široce rozšířena v živočišné říši a v organismu se vyskytuje jako homodimer s nekovalentně vázaným FAD v každé podjednotce (Ernster, 1967). Charakteristickou reakcí, kterou NQO1 katalysuje, je jedнокroková dvouelektronová redukce chinonů na hydrochinony, která probíhá tzv. ping-pongovým mechanismem, kdy se nejdříve NAD(P)H váže na flavinový kofaktor a ještě než se naváže molekula substrátu je uvolněn NAD(P)⁺ (Li *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 2000; Ross *et al.*, 2000). Rovněž je pravděpodobné, že vedle tohoto mechanismu může NQO1 redukovat substrát na základě přímého hydridového přenosu (Li *et al.*, 1995; Martínek *et al.*, 2011; Stiborová *et al.*, 2011b).



Obr. 26: Procentuální zastoupení lidských CYP, které participují na aktivačních reakcích (upraveno dle Rendić & Guengerich, 2012).

V organismu je tento enzym exprimován takřka ve všech tkáních (Ernster, 1967), zejména pak v játrech, ledvinách, plicích a kosterních svalech (Jaiswal, 2000). V těchto tkáních se podílí na metabolismu vitamínu K, kde působí jako reduktasa (Wallin *et al.*, 1978), nicméně hlavní funkce NQO1 v organismu spočívá v detoxikaci chinonů vedoucí k tvorbě hydrochinonů, které mohou být následně konjugovány např. s glutathionem či glukuronovou kyselinou a vyloučeny z těla ven. Vzhledem ke skutečnosti, že NQO1 katalysuje dvouelektronovou redukci substrátu v jednom kroku, nedochází tak ke vzniku reaktivních semichinonů, které mohou vést ke vzniku ROS, popř. alkylačních agens schopných modifikovat DNA (Benson *et al.*, 1980, Chen *et al.*, 2000; Ross *et al.*, 2000). V organismu jsou jednoelektronové redukce, které vedou k tvorbě takových nestabilních semichinonů, zprostředkovány zejména CYP a POR (Jaiswal, 2000). Nadto tyto

jednoelektronové redukce kompetují s dvouelektronovými redukcemi katalysovanými NQO1 (Joseph & Jaiswal, 1994). Vedle reakcí detoxikujících chinony může NQO1 participovat rovněž na redukční aktivaci cytotoxických chinonů a jiných látek, jejichž produkty jsou méně chemicky stabilní a je více pravděpodobné, že bude docházet ke vzniku semichinonických struktur schopných poškozovat DNA (Ross *et al.*, 2000). NQO1 redukuje široké spektrum různých látek, vedle již uvedených chinonů participuje též na redukci azosloučenin, u kterých byla popsána dokonce čtyřelektronová redukce (Huang *et al.*, 1979), a nitrosloučenin (Levová *et al.*, 2012; Stiborová *et al.*, 2011b, 2013a, 2014).

V lidském organismu se vyskytují dvě formy chinonoxidoreduktasy: již uvedená NQO1, která využívá jako kofaktory NADH a NADPH, NQO2, která preferuje spíše dihydronikotinamidribosid. Oba proteiny mají relativně vysoký stupeň homologie, jak na úrovni cDNA (54 %) tak na úrovni sekvence aminokyselin (49 %) (Wu *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 2000). Vedle využívání různých donorů vodíku, NQO1 a NQO2 se liší rovněž v působení inhibitorů: již Lars Ernster popsal silnou kompetitivní inhibici NQO1 dikumarolem a warfarinem (Ernster *et al.*, 1960; Ernster, 1967; Hollander & Ernster, 1975). Nicméně, NQO2 není inhibována ani jednou z uvedených látek (Wu *et al.*, 1997). NQO2, která byla poprvé izolována již v roce 1962 (Liao *et al.*, 1962), je specificky exprimována v ledvině, kosterním svalstvu, játrech, srdci a plicích (Jaiswal *et al.*, 1990). Funkce NQO2 v organismu není dosud zcela objasněna, je však pravděpodobné, že, na rozdíl od NQO1, hraje roli v signální transdukci, apoptose a buněčné proliferaci (Leung & Shilton; 2015).

2. CÍL DISERTAČNÍ PRÁCE

Cílem předkládané disertační práce bylo studium enzymů metabolisujících AA, která je původcem dvou závažných onemocnění, a to nefropathie vyvolané AA (AAN) a Balkánské endemické nefropathie (BEN), u nichž rovněž dochází k tvorbě urotheliálních nádorů. Cíle práce byly rozděleny na dvě základní oblasti.

První oblast cílů práce se soustřeďuje na poznání molekulárního mechanismu AAN ve snaze přinést nové poznatky o procesu redukční bioaktivace a oxidační detoxikace AAI a o enzymech, které tento rostlinný alkaloid metabolisují. K poznání funkce cytosolární reduktasy NQO1 v redukční aktivaci AAI resultující v tvorbu aduktů s DNA *in vivo* bylo využito inhibitoru tohoto enzymu, dikumarolu. Konkrétně bylo studováno, zda dikumarol může ovlivňovat genotoxicitu AAI *in vivo* a zda jeho podání moduluje funkci enzymů biotransformujících AAI, včetně NQO1 a CYP1A1/2. Jako experimentální modely byli použiti potkani a myši, tj. organismy, které jsou v současné době hojně používány jako vhodné experimentální modely pro studium AAN.

Dalším cílem disertační práce bylo určení reálných příspěvků jednotlivých CYP k oxidační detoxikaci AAI v lidských a potkaních játrech, v hlavním orgánu metabolismu xenobiotik v organismu. Cílem bylo i poznání, které enzymy participují na oxidační detoxikaci AAI *in vivo*. Zejména pak CYP1A1 a 1A2 v této funkci, neboť oba enzymy jsou v oxidační detoxikaci AAI *in vitro* nejaktivnější. Vzhledem ke skutečnosti, že oba CYP rovněž katalysují redukční aktivaci AAI za tvorby aduktů s DNA *in vitro*, bylo cílem zodpovědět, která z metabolických drah katalysovaných CYP1A1/2 převládá v podmínkách *in vivo*.

Dalším cílem předkládané disertační práce bylo studium participace ochratoxinu A (OTA) na aetologii BEN. Cílem této oblasti studia bylo zhodnotit vliv OTA na metabolismus, resp. genotoxicitu rostlinného extraktu AA a participaci OTA na vývoji BEN/UUC. Posledním cílem disertační práce bylo studium úlohy ostatních suspektních environmentálních faktorů ve vývoji BEN/UUC, konkrétně vlivu toxických iontů těžkých kovů a polokovů, vybraných organických látek uvolňovaných z lignitu endemických oblastí a OTA, na detoxikaci AAI v podmínkách *in vitro*.

3. MATERIÁL A METODY

3.1 POUŽITÝ MATERIÁL A CHEMIKÁLIE

Materiál a chemikálie, které byly využity při vypracování předkládané disertační práce, jsou detailně popsány v publikacích, které laskavý čtenář nalezne jako součást práce v jejích přílohách (**Přílohy 1-7**).

3.2 METODY

Metody použité při vypracování předkládané disertační práce, jsou, podobně jako materiál a chemikálie, detailně popsány v publikacích, které jsou uvedeny v jejích přílohách (**Přílohy 1-7**). Nicméně, v následující kapitole jsou uvedeny vybrané metody tak, aby byla práce jako celek srozumitelnější.

3.2.1 Studie *in vivo*: premedikace laboratorního potkana

V rámci předkládané disertační práce byly provedeny tři zásadní studie *in vivo*, při kterých byly laboratorní potkani kmene Wistar premedikováni vybranými chemikáliemi, konkrétně dikumarolem, Sudanem I a ochratoxinem A společně s AAI nebo AA. Experimenty se zvířaty byly prováděny na pracovišti 1. Lékařské fakulty UK v Praze v souladu se Zákonem na ochranu zvířat proti týrání (359/2012 Sb.) a Vyhláškou Ministerstva zemědělství o ochraně pokusných zvířat (419/2012 Sb.).

V první studii byl potkanům podán dikumarol, silný inhibitor NQO1 (Ernster, 1967). Zvířata (~150 g, n = 3/skupina) byla premedikována dikumarolem rozpuštěným ve slunečnicovém oleji a sodnou solí AAI rozpuštěnou v 1% vodném roztoku NaHCO₃. Potkanům byl žaludeční sondou dvakrát podán dikumarol v dávce 30, resp. 60 mg/kg tělesné hmotnosti (konečná dávka tedy byla 60, resp. 120 mg/kg tělesné hmotnosti). První dávka dikumarolu byla podána první den v 15.00 a druhá v 8.00 následujícího dne. Jedna skupina zvířat byla premedikována AAI, která byla podána *i.p.* v dávce 20 mg/kg tělesné hmotnosti. Působení AAI byla rovněž vystavena zvířata premedikovaná dikumarolem, a to 2,5 hodiny po podání jeho druhé dávky. Kontrolní skupině byl podán pouze slunečnicový olej. Zvířata byla usmrcena 24 hodin po podání AAI a byly jim odebrány játra, ledviny a plíce, které byly zmrazeny a uloženy při -80 °C, dokud nebyly dále zpracovány.

V další provedené studii byla zvířata (~125-150 g, n = 3/skupina) vystavena působení Sudanu I (1-fenylazo-2-hydroxynaftalenu), který je induktorem CYP1A1/2 (Stiborová *et al.*, 2002, 2013b), a sodné soli AAI. První skupina byla premedikována AAI rozpuštěnou v 1% vodném roztoku NaHCO₃ (20 mg/kg tělesné hmotnosti; *i.p.*), druhé skupině byl podán Sudan I rozpuštěný ve slunečnicovém oleji (dvakrát 30 mg/kg tělesné hmotnosti ve dvou dnech; *i.p.*) a třetí skupina byla premedikována dvěma dávkami Sudanu I (30 mg/kg tělesné hmotnosti; *i.p.*), po kterých následovalo po 24 hodinách podání AAI (20 mg/kg tělesné hmotnosti; *i.p.*). Kontrolní zvířata byla vystavena slunečnicovému oleji a 1% NaHCO₃. Následný postup je totožný s výše popsaným.

V poslední studii byly potkani (~150 g, n = 3/skupina) premedikováni OTA, mykotoxinem podezřelým z participace na vývoji BEN/UUC (Pfohl-Lezskowicz & Manderville, 2007), a směsí AAI a AAII (v poměru přirozeně se vyskytujícím v přírodě, 33:64). OTA byl rozpuštěn v 0,1M NaHCO₃ a AA byla rozpuštěna v 0,15M NaCl s 5% přídavkem dimethylsulfoxidu (DMSO). Zvířatům byla 5 dní podávána AA (10 mg/kg tělesné hmotnosti, *i.p.*), OTA (2 mg/kg tělesné hmotnosti, *i.p.*) a obě látky dohromady v dávkách výše uvedených. Následující postup je totožný s tím, který je výše popsaný.

Orgány odebrané z experimentálních zvířat byly použity k izolaci mikrosomální a cytosolární frakce metodou frakční centrifugace, jak bylo popsáno dříve (Levová, 2009; Bárta 2012), a pro izolaci DNA a následnou analýsu tvorby aduktů s DNA.

3.2.2 Oxidace AAI nebo AA na AAIIa potkaními mikrosomy *in vitro*

Oxidace AAI potkaními jaterními a ledvinnými mikrosomy *in vitro* byla stanovena metodou RP-HPLC. V experimentech byly použity mikrosomální frakce izolované z potkanů premedikovaných dikumarolem, Sudanem I a OTA s AAI/AA (**kap. 3.2.1**, str. 61). Stanovení bylo provedeno vždy v „tripletním“ uspořádání a celkový objem inkubační směsi byl 500, popř. 250 μ l.

Složení inkubačních směsí:

1. fosfátový pufr (100 mM NaH₂PO₄), pH = 7,4
2. potkaní jaterní, resp. ledvinné mikrosomy $C_{proteinů} = 0,5$ mg/ml
3. sodná sůl AAI, popř. směs AA (10 μ M) rozpuštěné v destilované vodě, popř. v DMSO
4. NADPH-generující systém (NADPH-GS): 1 mM NADP⁺, 10 mM MgCl₂·6H₂O, 10 mM glukosa-6-fosfát, 1 U/ml glukosa-6-fosfátdehydrogenasy

Příslušné reagentie byly do inkubačních směsí pipetovány v takovém množství a takovém pořadí, které je uvedeno výše. Reakční směs byla míchána a inkubována za aerobních podmínek po dobu 10 minut za stálého třepání (400 RPM) a při teplotě 37 °C. Reakce byla zastavena přidáním 1 ml ethylacetátu a pro dobrou extrakci metabolitu do organického rozpouštědla byla reakční směs 2 minuty třepána. Poté byla organická fáze oddělena centrifugací (13 000 RPM, 3 min.). Organická fáze byla následně odebrána, k vodné fázi byl přidán 1 ml ethylacetátu a opět byla provedena extrakce dle stejného postupu. Spojené extrakty byly odpařeny na vakuové odparce a následně uchovávány při teplotě -20 °C. Před analysou byly extrakty rozpuštěny v 30 µl methanolu.

Látky obsažené v extraktech byly separovány metodou RP-HPLC. Byla použita kolona C₁₈ a separace probíhala v gradientovém uspořádání při teplotě 35 °C. Složení mobilní fáze se měnilo z 80 % elučního roztoku A a 20 % elučního roztoku B na konečné složení 40 % A a 60 % B. Mobilní fázi představovala směs (**A**) 100 mM triethylaminacetátu (pH = 7,0; úprava pH kyselinou octovou) a (**B**) 80% acetonitrilu. Jednotlivé roztoky byly připraveny těsně před analysou a byly sonikovány. Vnější standard AAI/AA byl připraven tak, že k 28 µl methanolu byly přidány 2 µl AAI/AA o koncentraci 1 mg/ml. Na kolonu bylo vždy nanášeno 20 µl vzorku. Jedna eluce probíhala 55 minut při průtoku mobilní fáze 0,5 ml/min. a při tlaku cca 80 bar. Separované látky obsažené v extraktech byly detekovány při vlnové délce 250 nm.

3.2.3 Stanovení aktivit enzymů biotransformujících AA v potkaním organismu

V rámci předkládané disertační práce byly stanoveny enzymové aktivity NQO1, CYP1A1/2 a CYP2C6/11 v potkaních játrech, ledvině a plicích. Aktivita NQO1 byla stanovena spektrofotometricky dle Ernster jako schopnost redukovat menadion v přítomnosti NADH s přidavkem cytochromu c (Ernster, 1967). Enzymová aktivita NQO1 byla vyjádřena v pmol redukováného cytochromu c/min./mg_{proteinu}. Enzymová aktivita CYP1A1 byla stanovena pomocí HPLC jako schopnost oxidovat Sudan I, který je markerovým substrátem tohoto enzymu, na 4'-hydroxy-, 6-hydroxy- a 4',6-dihydroxy-Sudan I (Stiborová *et al.*, 2002, 2005c). Aktivita CYP1A a 1A2 byla stanovena fluorimetricky dle Burka a Mayera jako schopnost *O*-deethylovat 7-ethoxyresorufin (EROD, CYP1A) a *O*-demethylovat 7-methoxyresorufin (MROD, CYP1A2) (Burke & Mayer 1974, Burke *et al.*, 1994). Aktivita CYP2C6 byla stanovena metodou HPLC jako

schopnost specificky hydroxylovat diklofenak na 4'-hydroxydiklofenak (Kobayashi *et al.*, 2002; Kaphalia *et al.*, 2006). Markerová reakce pro CYP2C11 je hydroxylace testosteronu na posici 16 α a jako taková byla enzymová aktivita CYP2C11 stanovena pomocí HPLC (Baltes *et al.*, 1998; Haduch *et al.*, 2011). Enzymová aktivita POR bylo stanovena spektrofotometricky dle Sottocasy (Sottocassa *et al.*, 1967) jako schopnost redukovat cytochrom c.

3.2.4 Stanovení proteinové exprese NQO1 a CYP1A1/2 v potkaním organismu

Proteinová exprese NQO1 a CYP1A1/2 byla provedena metodou elektropřenosu na polyvinylidenfluoridovou membránu („Western Blotting“). Studované proteiny byly detekovány za použití specifických polyklonálních protilátek proti NQO1, CYP1A1 a 1A2 postupy, které jsou detailně popsány v metodických částech publikací v přílohách předkládané disertační práce (**Přílohy 1-7**). Detekované expresní hladiny byly kvantifikovány za použití programu ELFOMAN 2.0 a ImageJ.

3.2.5 Analýsa tvorby aduktů AAI, AA a OTA s DNA

Analýsa aduktů AAI, AA či OTA s DNA v tkáních experimentálních zvířat vystavených působení dikumarolu, Sudanu I a OTA s AAI/AA a po redukční aktivaci AAI/AA jaterními a ledvinnými cytosoly, popř. mikrosomy izolovanými z těchto zvířat, jak je uvedeno v **kapitole 3.2.1** (str. 61), byla provedena školitelkou prof. RNDr. Marií Stiborovou, DrSc., metodou „³²P-postlabelling“ na spolupracujícím pracovišti v Německém centru pro výzkum rakoviny (*Deutsches Krebsforschungszentrum*) v Heidelbergu dle postupů, které jsou popsány v dřívějších pracích (Schmeiser *et al.*, 1996; Bieler *et al.*, 1997; Stiborová *et al.*, 2005a; 2012; Arlt *et al.*, 2011a).

3.2.6 Studie *in silico*: molekulární modelování interakcí AAI s lidskými cytochromy P540 1A1, 1A2, 2C9 a 3A4

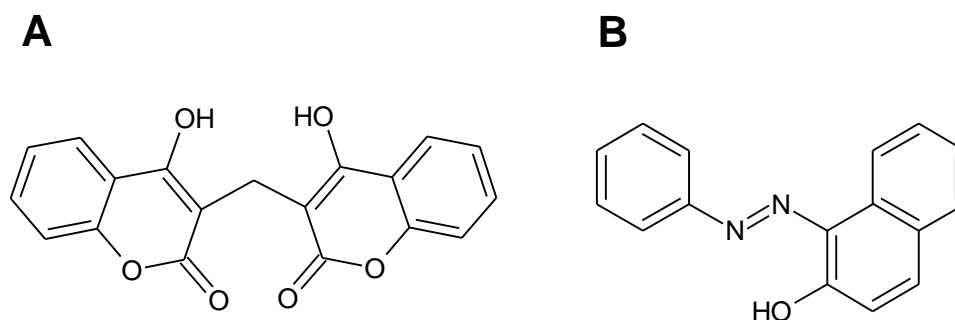
Homologní modely lidských CYP1A1, 1A2, 2C9 a 3A4 a simulace jejich interakcí s AAI byly připraveny doc. RNDr. Václavem Martínkem, Ph.D. dle postupů, které jsou detailně popsány v dřívějších pracích (Martínek *et al.*, 2011; Jeřábek *et al.*, 2012), včetně publikace, která je součástí přílohy předkládané disertační práce (**Příloha 4**).

4. VÝSLEDKY A DISKUSE

4.1 STUDIUM MOLEKULÁRNÍHO MECHANISMU VÝVOJE NEFROPATHIE VYVOLANÉ AA

V první části předkládané disertační práce byl studován metabolismus AAI v organismu laboratorního potkana. Cílem těchto studií bylo přispět k objasnění specifických rozdílů mezi AAN a BEN. Typickým znakem AAN je její rychlý vývoj oproti BEN. Jednou z možných příčin tohoto selektivního vývoje AAN může být krátkodobá expozice vyšším dávkám AA v případě pacientů s AAN oproti dlouhodobému chronickému vystavení nízkým koncentracím AA u pacientů s BEN. Na základě dříve publikovaných prací, včetně prací autorského kolektivu laboratoře, kde byla předkládaná disertační práce vypracována, je více než pravděpodobné, že za specifický vývoj AAN jsou odpovědné rovněž enzymy, které metabolisují AAI, tj. buď ji redukčně aktivují anebo oxidačně detoxikují.

V předkládané disertační práci byla studována úloha biotransformačních enzymů (NQO1, CYP1A1/2 a CYP2C6/11) v metabolismu AAI jak *in vitro*, tak *in vivo*. Jako nástroj byla použita modulace exprese těchto enzymů a jejich aktivit *in vivo*, které bylo dosaženo využitím inhibitorů a induktorů uvedených enzymů. Konkrétně byl použit dikumarol, silný inhibitor NQO1 (Ernster, 1967), a efektivní induktor CYP1A1/2, Sudan I (**Obr. 27**). Tyto látky byly podány experimentálnímu zvířecímu modelu (laboratornímu potkanovi) postupem popsáním v **kap. 3.2.1** (str. 61). Detailně byl studován jak aktivační (**kap. 4.1.1**, str. 66), tak detoxikační metabolismus AAI (**kap. 4.1.2**, str. 80). Nadto byla provedena srovnávací studie zkoumající úlohu NQO1 v metabolismu AAI v myším a potkaním organismu. Výsledky uvedené v této části disertační práce byly publikovány v originálních publikacích, které tvoří **přílohy 1-5**.



Obr. 27: Struktura dikumarolu (**A**) a Sudanu I (**B**).

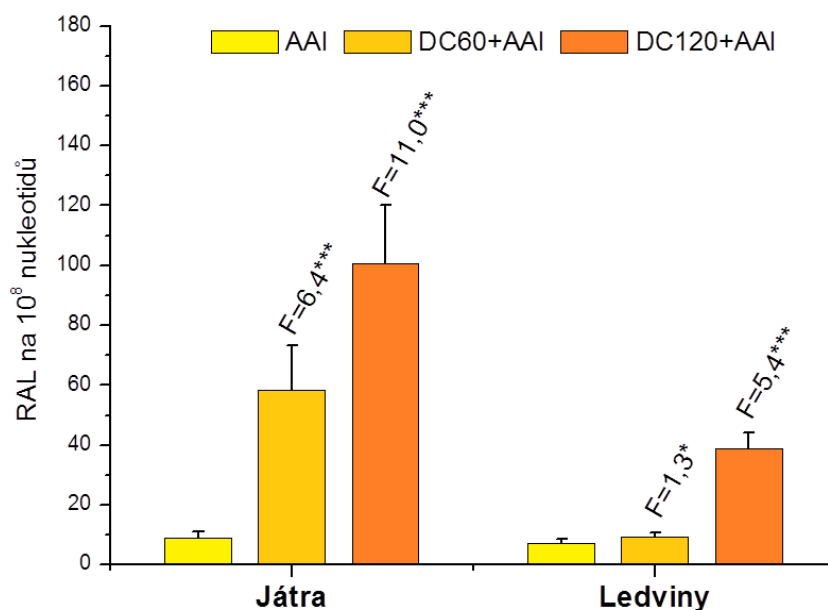
4.1.1 Studium redukční bioaktivace AAI

Jak bylo uvedeno v **kapitole 1.3.4.2** (str. 49) AAI je redukčně aktivována za tvorby aristolaktamů, v průběhu jejichž tvorby vznikají reaktivní agens schopná interakce s DNA za vzniku kovalentních aduktů (Schmeiser *et al.*, 1996; Bieler *et al.*, 1997, Stiborová *et al.*, 2005a). Tyto reakce jsou v podmínkách *in vitro* s největší efektivitou katalysovány cytosolárním enzymem NQO1 (**Obr. 21**, str. 50). Nicméně, dosud chyběly jednoznačné důkazy o tom, že NQO1 katalysuje tuto reakci rovněž v podmínkách *in vivo*. Proto byla provedena studie, při které byl laboratorním potkanům podán dikumarol, známý jako silný inhibitor tohoto enzymu, a následně byl studován jeho vliv na expresi a aktivitu NQO1. Tedy výsledně na úlohu NQO1 v metabolismu AAI *in vivo*, s cílem zodpovědět otázku, zda NQO1 hraje majoritní roli v redukční aktivaci AAI (tvorbě aduktů s DNA) nejen *in vitro*, ale rovněž v podmínkách *in vivo*. V nedávno publikované studii byl totiž dikumarol podán myším (C57BL/6) s cílem objasnit participaci NQO1 na metabolismu AAI v ledvině *in vivo* v tomto experimentálním modelu (Chen *et al.*, 2011). Výsledky z uvedené studie demonstrovaly potenciál dikumarolu inhibovat NQO1, a tím snižovat genotoxicitu a nefrotoxicitu AAI v myších.

4.1.1.1 Tvorba aduktů AAI s DNA in vivo

Prvním krokem studie prováděné v rámci vypracování disertační práce byla analýza tvorby aduktů AAI s DNA v játrech a ledvině potkanů, kterým byl podán dikumarol a AAI dle stejného premedikačního schématu jako ve studii Chenové a jejích spolupracovníků (Chen *et al.*, 2011), tj. dikumarol byl podán ve dvou dávkách (60, resp. 120 mg/kg, *gavage*) a 2,5 hodiny po poslední dávce dikumarolu byla podána AAI (20 mg/kg, *i.p.*). Jak v játrech, tak v ledvině studovaných experimentálních zvířat byly pomocí metody „³²P-postlabelling“ nalezeny adukty AAI s DNA, které byly shodné s adukty nalezenými v tkáních pacientů s AAN a BEN, konkrétně dA-AAI, dG-AAI a dA-AAII (**Obr. 28**, str. 67). V tkáních kontrolních zvířat, tj. zvířat, kterým byl podán pouze rostlinný olej, a zvířat, která byla premedikována samotným dikumarolem, nebyly detekovány žádné adukty AAI s DNA.

Tvorba aduktů s DNA byla vyšší v játrech než v ledvině, která je cílovým orgánem genotoxického působení AAI. Překvapivým výsledkem zjištěným v této studii byla skutečnost, že premedikace potkanů dikumarolem, který inhibuje enzymovou aktivitu



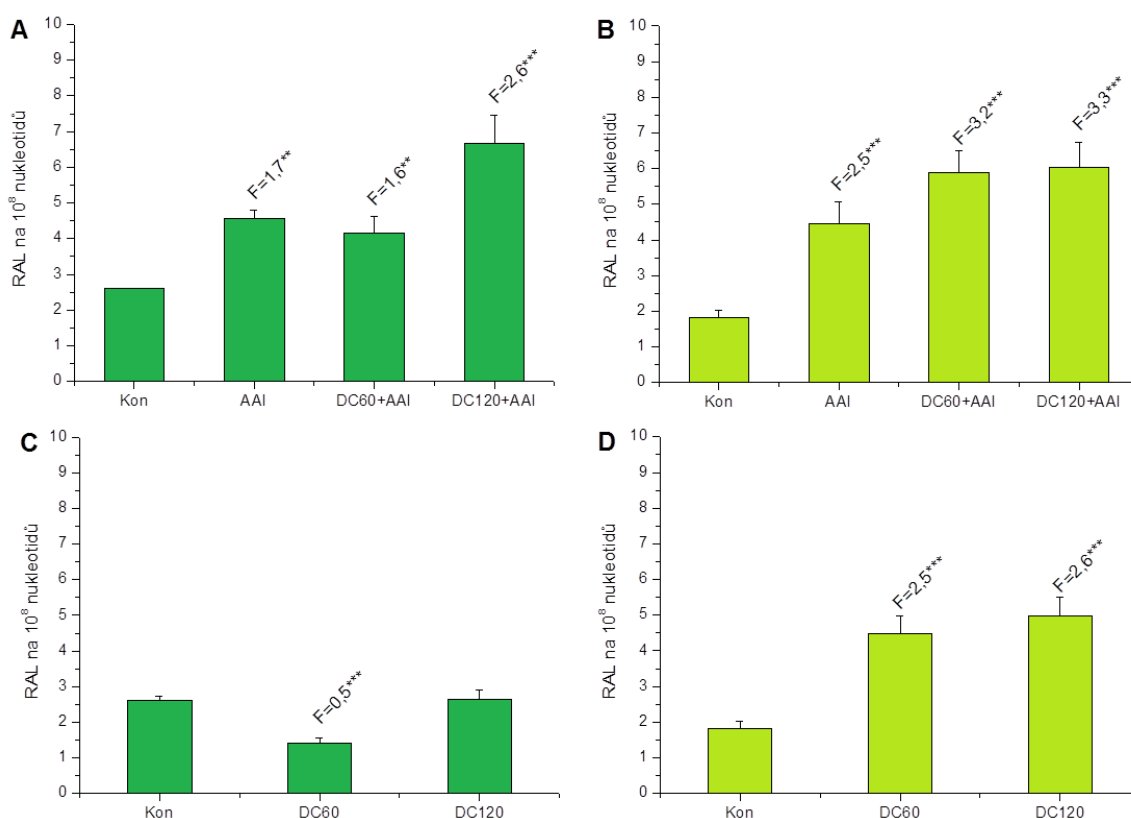
Obr. 28: Tvorba aduktů AAI s DNA v játrech a ledvině potkanů premedikovaných dikumarolem (DC) a AAI. Stanovení byla provedena metodou „³²P-postlabelling“. Hodnoty jsou průměrem ze tří stanovení; * $p < 0,05$ a *** $p < 0,001$. RAL, relativní značení aduktů. F, faktor představující násobek zvýšení množství aduktů s DNA oproti množství aduktů v orgánech zvířat premedikovaných pouze AAI.

NQO1 *in vitro*, vedla ke zvýšení tvorby aduktů AAI s DNA, a to jak v játrech, tak v ledvině *in vivo*, tzn. k opačnému efektu, než který byl očekáván (tedy inhibice redukční aktivity AAI za tvorby aduktů s DNA) (**Obr. 28**). Ve srovnání s potkany, kteří byli premedikováni pouze AAI, podání dikumarolu vedlo ke 6,4násobnému, resp. 11násobnému zvýšení tvorby aduktů AAI s DNA v játrech a 1,3násobné, resp. 5,4násobnému nárůstu v ledvině. Takové výsledky rovněž signalisovaly, že AAI je v organismu distribuována krevním oběhem k jednotlivým orgánům, které vykazovaly schopnost metabolicky aktivovat AAI za tvorby aduktů s DNA. V další fázi výzkumu byl tedy studován molekulární mechanismus tohoto zjištění. Hledána byla odpověď na otázku, co způsobuje nárůst tvorby aduktů AAI s DNA po expozici potkanů dikumarolu. Výsledně byl zjištěn unikátní výsledek, a to poznání, že podání dikumarolu vedlo k indukci enzymů participujících na aktivaci AAI *in vivo*. (**kap. 4.1.1.3**, str. 70).

4.1.1.2 Tvorba aduktů AAI s DNA *ex vivo*

V další části této studie byla nejdříve analysována tvorba aduktů AAI s DNA po aktivaci jaterními a ledvinnými cytosoly izolovanými z orgánů vystavených potkanů, kde je exprimována NQO1, *ex vivo*. Všechny cytosoly redukčně aktivovaly AAI za vzniku aduktů s DNA nalezených *in vivo* (**kap. 4.1.1.1**, str. 66) a v tkáních pacientů s AAN a BEN. Premedikace AAI samotnou a v kombinaci s dikumarolem vedla podobně jako

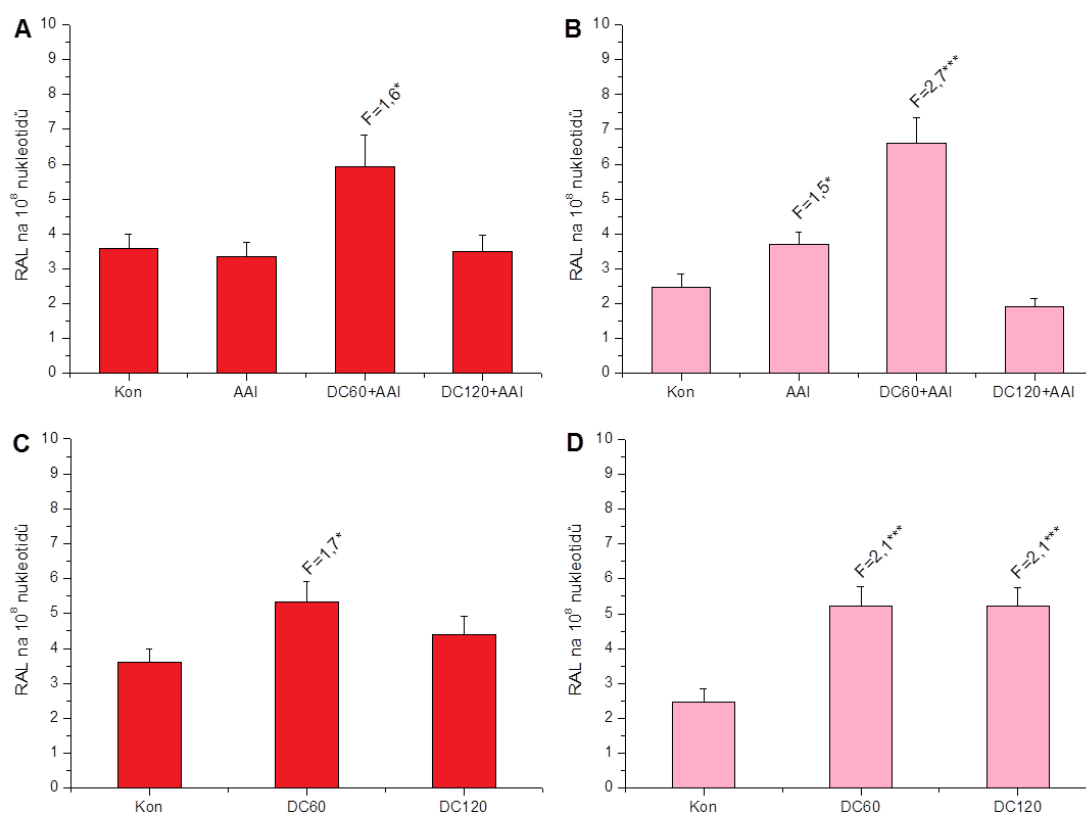
in vivo k nárůstu tvorby aduktů s DNA po aktivaci jaterními a ledvinnými cytosoly (**Obr. 29AB**). Podání samotného dikumarolu potkanům (60 mg/kg) vedlo ke snížení tvorby aduktů AAI s DNA po aktivaci jaterními cytosoly o polovinu (**Obr. 29C**), což odpovídá inhibičnímu působení dikumarolu na cytosolární enzymy (NQO1). V případě vyšší podané dávky dikumarolu (120 mg/kg) však aktivace AAI za tvorby aduktů s DNA nebyla ovlivněna. Ledvinné cytosoly izolované ze zvířat, kterým byl podán samotný dikumarol (60 nebo 120 mg/kg) aktivovaly AAI za zvýšené, cca 2,5násobné tvorby aduktů s DNA ve srovnání s aktivací cytosoly izolovanými z nevystavených (kontrolních) zvířat (**Obr. 29D**).



Obr. 29: Tvorba aduktů AAI s DNA *ex vivo* po redukci jaterními (**A a C**) a ledvinnými (**B a D**) cytosoly izolovanými ze zvířat, kterým byla podána kombinace dikumarolu (DC) a AAI (**A a B**) a ze zvířat premedikovaných pouze dikumarolem (**C a D**). Stanovení byla provedena metodou „³²P-postlabelling“. Hodnoty jsou průměrem ze tří stanovení; ***p* < 0,01 a ****p* < 0,001. RAL, relativní značení aduktů. F, faktor představující násobek zvýšení množství aduktů s DNA oproti množství aduktů tvořených kontrolními cytosoly, které byly izolovány z nepremedikovaných zvířat.

Vzhledem ke skutečnosti, že na redukční metabolické aktivaci AAI se podílí rovněž CYP1A1 a 1A2, byla také analysována schopnost jak jaterních, tak ledvinných mikrosomů izolovaných ze studovaných zvířat redukovat AAI za vzniku aduktů s DNA. Všechny testované mikrosomy aktivovaly AAI za tvorby takových aduktů, které byly nalezeny

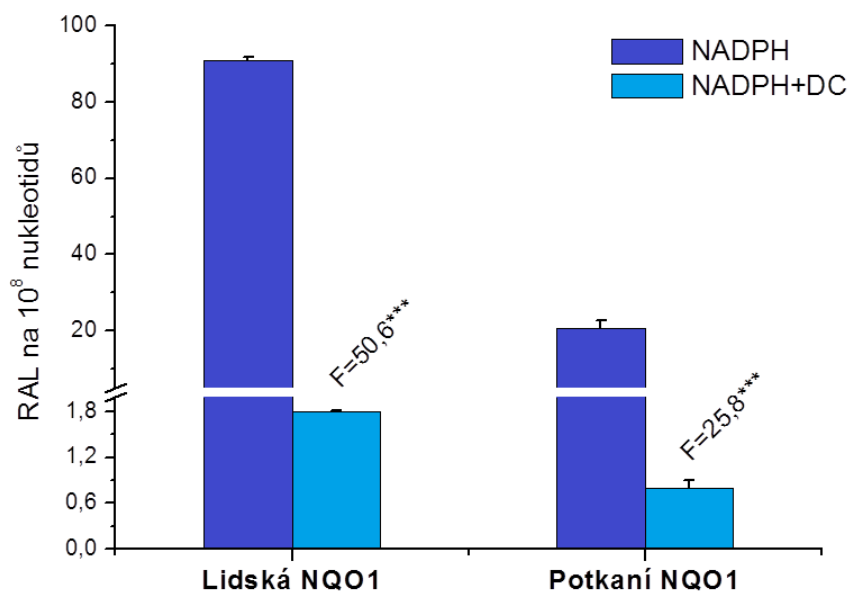
in vivo (kap. 4.1.1.1, str. 66). Signifikantní, 1,6násobný, nárůst tvorby aduktů AAI s DNA byl nalezen po aktivaci AAI jaterními mikrosomy izolovanými z potkana vystaveného dikumarolu (60 mg/kg) s AAI, nicméně při dávce dikumarolu 120 mg/kg tělesné hmotnosti takový efekt nebyl pozorován (Obr. 30A). Podobný vliv byl nalezen i při aktivaci jaterními mikrosomy izolovanými ze zvířat premedikovaných dikumarolem (60 mg/kg), nicméně ostatní mikrosomy takový efekt nevykazovaly (Obr. 30C). Ledvinné mikrosomy izolované ze zvířat, které byly vystaveny AAI samotné, popř. v kombinaci s dikumarolem, aktivovaly AAI za zvýšené, až 2,7násobné tvorby aduktů s DNA, nicméně kombinované podání dikumarolu ve vyšší dávce (120 mg/kg) a AAI vedlo ke snížení tvorby aduktů ve srovnání s kontrolními mikrosomy (Obr. 30B). Důvod pro nález uvedených výsledků dosud není znám, nicméně předpokládáme, že bude vysvětlen v následujících studiích. Ledvinné mikrosomy izolované ze zvířat, která byla vystavena pouze dikumarolu, aktivovaly AAI s 2,1násobně větší mírou než kontrolní mikrosomy (Obr. 30D).



Obr. 30: Tvorba aduktů AAI s DNA *ex vivo* po redukci jaterními (A a C) a ledvinnými (B a D) mikrosomy izolovanými ze zvířat, kterým byla podána kombinace dikumarolu (DC) a AAI (A a B) a ze zvířat premedikovaných pouze dikumarolem (C a D). Stanovení byla provedena metodou „³²P-postlabelling“. Hodnoty jsou průměrem ze tří stanovení; * $p < 0,05$ a *** $p < 0,001$. RAL, relativní značení aduktů. F, faktor představující násobek zvýšení množství aduktů s DNA oproti množství aduktů tvořených kontrolními mikrosomy, které byly izolovány z nepremedikovaných zvířat.

4.1.1.3 NQO1 diktuje bioaktivaci AAI *in vivo*

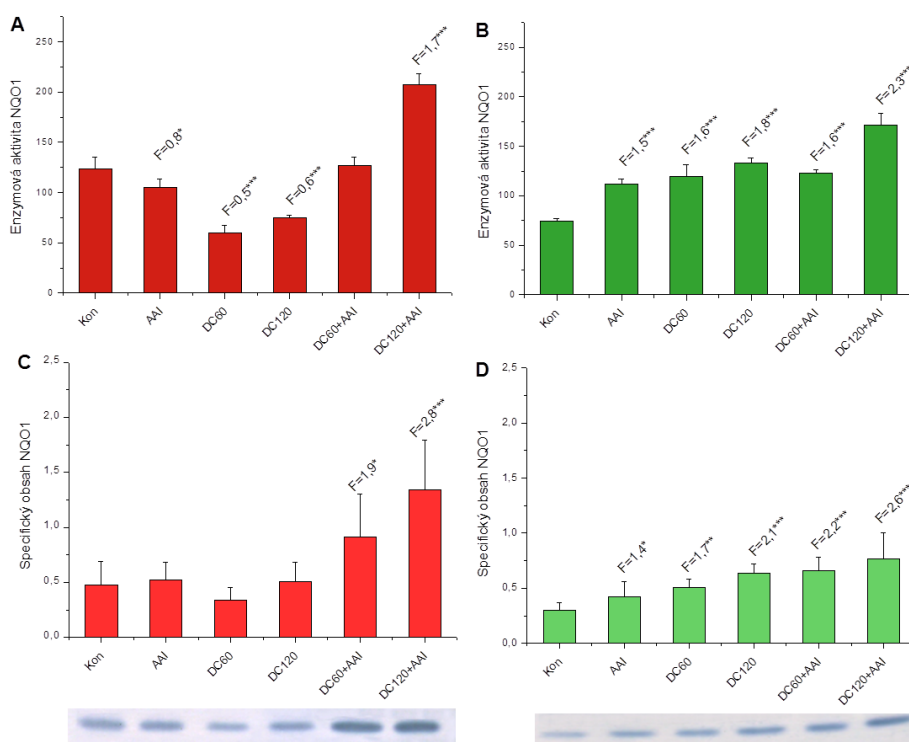
Vedle experimentů uvedených v předchozích kapitolách byl rovněž studován vliv dikumarolu na tvorbu aduktů AAI s DNA katalysovanou rekombinantní lidskou a potkaní NQO1, a to v jednoznačně definovaném systému *in vitro* (**Obr. 31**). Získané výsledky demonstrují potenciál dikumarolu silně inhibovat tuto reakci. Tvorba aduktů AAI s DNA katalysovaná potkaní NQO1 *in vitro* byla snížena 25,8násobně (96% inhibice) a v případě lidského enzymu byla tato tvorba snížena dokonce 50,6násobě (98% inhibice). Vzhledem k těmto výsledkům jsou, jak již bylo uvedeno výše, výsledky analýsy aduktů AAI s DNA v játrech a ledvině potkana premedikovaného dikumarolem (**kap. 4.1.1.1**, str. 66) překvapivé. Sledováno proto dále bylo, zda-li vystavení potkanů dikumarolu (samotnému či v kombinaci s AAI) nebo AAI vedoucí k nárůstu množství tvořených aduktů AAI s DNA *in vivo* neovlivňuje expresní hladiny NQO1 a její enzymové aktivity, které by v jednotlivých orgánech výše zmíněných experimentálních modelů mohly efektivněji aktivovat AAI.



Obr. 31: Vliv dikumarolu (10 μ M) na tvorbu aduktů AAI (100 μ M) s DNA lidskou a potkaní NQO1 *in vitro*. Stanovení byla provedena metodou „³²P-postlabelling“. Hodnoty jsou průměrem ze čtyř stanovení; *** $p < 0,001$. RAL, relativní značení aduktů. F, faktor představující násobek snížení množství aduktů s DNA oproti množství aduktů tvořených v přítomnosti pouze kofaktoru (NADPH).

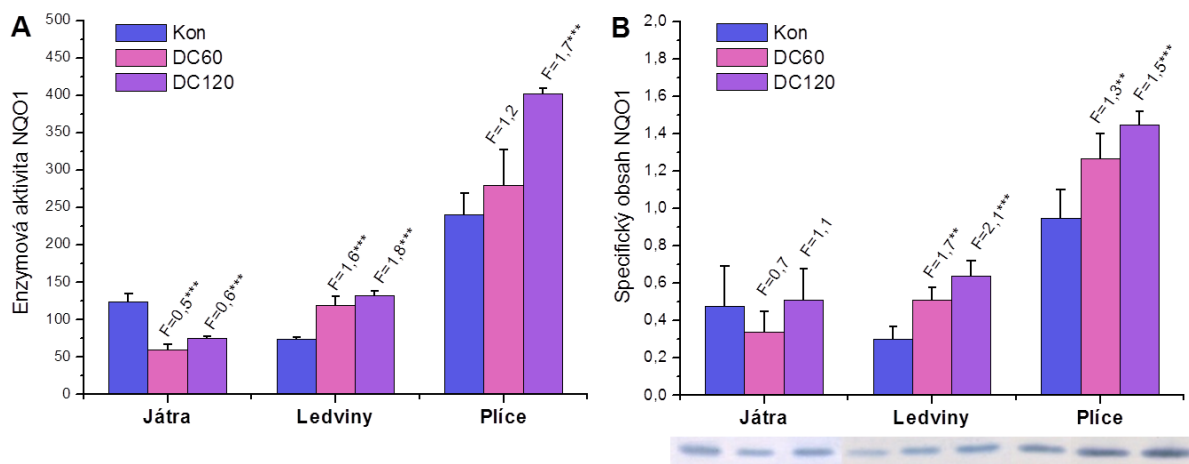
Podání dikumarolu samotného resultovalo až v 50% inhibici enzymové aktivity NQO1 v jaterních cytosolech (**Obr. 32A**, str. 71). To odpovídá jeho silnému inhibičnímu účinku vůči NQO1 pozorovanému při použití rekombinantní lidské a potkaní NQO1 (**Obr. 31**). Tato skutečnost může být způsobena vazbou dikumarolu na NQO1, protože

dikumarol vykazuje jak silné vazebné vlastnosti, tak dlouhý eliminační poločas (5-25 hodin) v organismu. Zbytkový dikumarol tedy může být stále přítomný v tkáni, zejména pak v játrech, kde probíhá jeho hlavní metabolismus (Lai *et al.*, 1976). Podání AAI samotné vedlo k mírnému, 20% poklesu aktivity NQO1 v játrech ve srovnání s kontrolními zvířaty, nicméně kombinované podání dikumarolu a AAI, konkrétně v případě vyšší dávky dikumarolu (120 mg/kg tělesné hmotnosti) rezultovalo v 70% nárůst enzymové aktivity NQO1 (**Obr. 32A**). Také na úrovni proteinové exprese byla NQO1 v játrech indukována kombinovaným podáním dikumarolu a AAI (**Obr. 32C**). Aktivita NQO1 v ledvinných cytosolech studovaných zvířat byla indukována jak samostatnou premedikací AAI, tak kombinovaným podáním AAI a dikumarolu (**Obr. 32B**). Signifikantní, 2,3násobná indukce enzymové aktivity NQO1 v ledvině byla nalezena po kombinovaném podání dikumarolu a AAI, konkrétně při dávce dikumarolu 120 mg/kg. Tyto výsledky byly rovněž v souladu s expresními hladinami proteinu NQO1, které vykazovaly závislost na dávce dikumarolu (**Obr. 32D**).



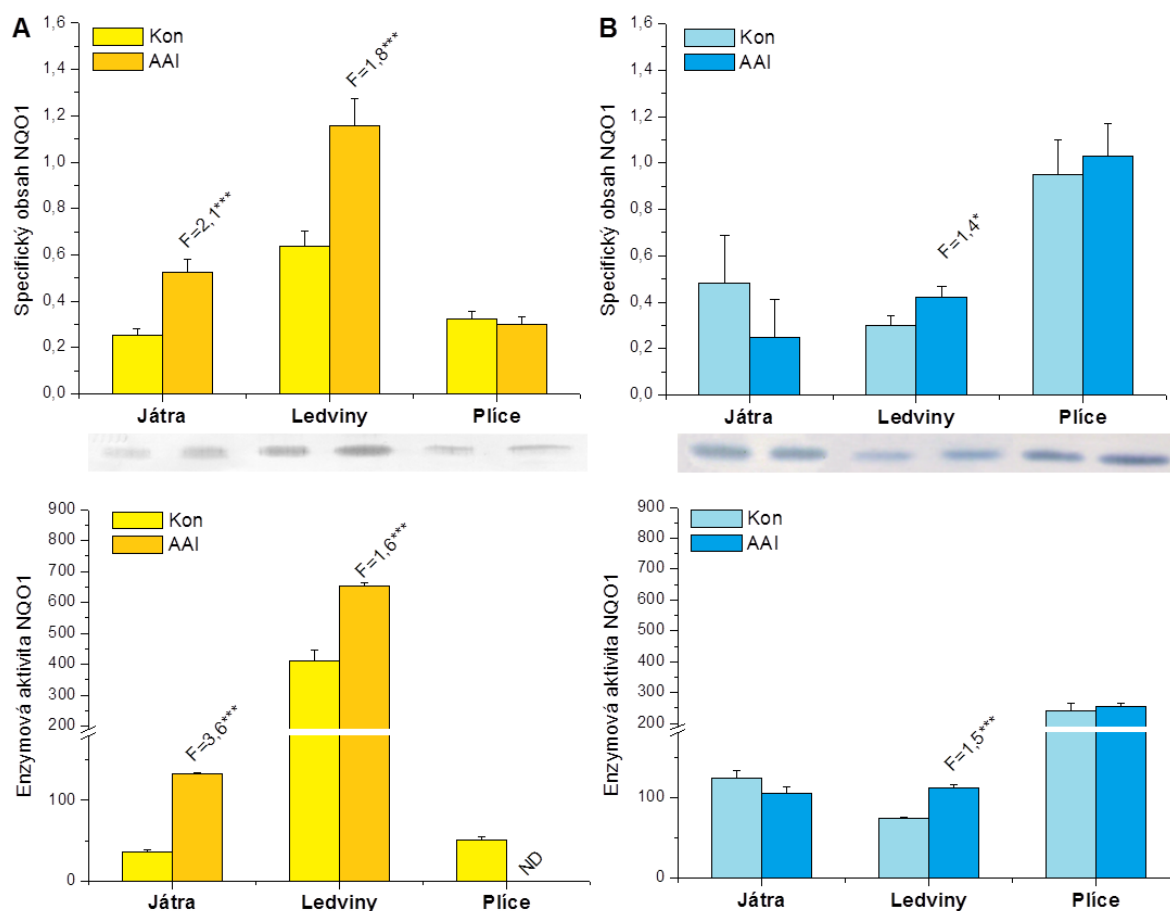
Obr. 32: Enzymová aktivita NQO1 (**A a B**) a expresní hladiny proteinu NQO1 (**C a D**) v jaterních (**A a C**) a ledvinných (**B a D**) cytosolech izolovaných z potkanů premedikovaných dikumarolem (DC) samotným, popř. v kombinaci s AAI. Aktivita NQO1 je vyjádřena v nanomol redukováného cytochromu c vztažených na minutu a miligram proteinu. Proteinová exprese NQO1 je vyjádřena v relativních jednotkách AU/mg proteinu. Hodnoty jsou průměrem ze tří stanovení; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ a *** $p < 0,001$. F, faktor představující násobek zvýšení oproti kontrole.

Podání dikumarolu samotného (60 nebo 120 mg/kg) ovlivnilo jak enzymové aktivity, tak expresní hladiny proteinu NQO1 v jaterních, ledvinných a rovněž v plicích cytosolech (**Obr. 33**). Zatímco v játrech podání této látky vedlo ke snížení aktivity a exprese NQO1, v ledvině a v plicích rezultovalo v neočekávanou indukci NQO1 ve srovnání s kontrolními zvířaty, a to dokonce v závislosti na dávce. Nejvyšší aktivita NQO1 byla pozorována v plicích, nicméně největší indukce, až 1,8násobná, byla nalezena v ledvinných cytosolech izolovaných ze zvířat, kterým byl podán dikumarol v dávce 60 mg/kg, resp. 120 mg/kg (**Obr. 33A**). Tyto výsledky jsou v souladu s proteinovými expresními hladinami NQO1 v těchto orgánech (**Obr. 33B**) a rovněž se schopností tvořit adukty AAI s DNA *ex vivo* (**Obr. 29CD**, str. 68). Ačkoliv zbytková množství dikumarolu v játrech mohla vést ke snížení enzymové aktivity NQO1, v ledvině byl pozorován opačný efekt, neboť role zbytkového dikumarolu v tomto orgánu je minoritní a jeho koncentrace podstatně nižší než v játrech (Lai *et al.*, 1976). Získané výsledky jednoznačně ukazují, že dikumarol, do této doby známý jako silný inhibitor NQO1, vykazuje duální vlastnosti a může se vedle funkce inhibitoru NQO1 rovněž chovat jako induktor tohoto enzymu.



Obr. 33: Enzymová aktivita NQO1 (**A**) a expresní hladiny proteinu NQO1 (**B**) v jaterních, ledvinných a plicích cytosolech, které byly izolovány z potkanů premedikovaných dikumarolem (DC) dávkou 60, resp. 120 mg/kg tělesné hmotnosti. Aktivita NQO1 je vyjádřena v nanomol redukovaného cytochromu c vztažených na minutu a miligram proteinu. Proteinová exprese NQO1 je vyjádřena v relativních jednotkách AU/mg proteinu. Hodnoty jsou průměrem ze tří stanovení; ** $p < 0,01$ a *** $p < 0,001$. F, faktor představující násobek zvýšení oproti kontrole.

Vedle výše uvedených studií, kde byl využit jako experimentální model laboratorní potkan, byla provedena rovněž srovnávací studie, která analysovala vliv AAI na enzymovou aktivitu a expresní hladinu proteinu NQO1 v různých orgánech myši a potkanů. Získané výsledky signalisují, že NQO1 byla jak druhově, tak orgánově specificky ovlivněna. AAI indukovala proteinovou expresi cytosolární NQO1 v ledvině u obou organismů, přičemž v myši ledvině byly nalezeny vyšší expresní hladiny tohoto enzymu (**Obr. 34A**, str. 74). Indukce exprese proteinu NQO1 vyvolaná AAI byla rovněž nalezena v myších jaterních cytosolech, zatímco v potkaních játrech nebyly expresní hladiny tohoto enzymu ovlivněny. Na rozdíl od myši, v potkaním organismu nebyla nejvyšší proteinová exprese NQO1 pozorována v ledvině, cílovém orgánu působení AAI, nýbrž v plicích, nicméně v tomto orgánu nebyla její proteinová exprese ovlivněna AAI (**Obr. 34B**, str. 74). Podobné výsledky byly získány i při stanovení enzymové aktivity NQO1. V myších játrech a ledvině byla tato aktivita indukována AAI 3,6násobně a 1,6násobně, přičemž nejvyšší aktivita NQO1 byla nalezena právě v ledvině (**Obr. 34C**, str. 74). V souladu s expresními hladinami byla rovněž enzymová aktivita NQO1, a to zejména v ledvině, kde podání AAI vedlo k jejímu 1,5násobnému zvýšení (**Obr. 34D**, str. 74). Zjištěné rozdíly v proteinové expresi a enzymové aktivitě NQO1 v jednotlivých orgánech myších a potkaních modelů signalisují, že metabolismus tohoto karcinogenního a nefrotoxického agens může být druhově odlišný. Tyto závěry jsou nadto podporovány rovněž dřívějšími studiemi, které demonstrovaly rozdílný vývoj intersticiální fibrosy, resp. AAN, která je spojena s tvorbou urotheliálních nádorů, potažmo rozdílnou biotransformací AAI v myším a potkaním organismu (Mengs, 1988; Stiborová *et al.*, 2008; Rosenquist *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2011; Priestap *et al.*, 2012b). Nižší indukce expresních hladin a enzymové aktivity NQO1 v potkaních cytosolech mohla být navíc důsledkem rozdílné premedikace AAI, neboť ta se lišila jak v dávce, tak ve způsobu podání (myši byly vystaveny 50 mg/kg, *gavage*, zatímco potkani 20 mg/kg, *i.p.*). Z tohoto důvodu, tj. vzhledem k rozdílné farmakokinetice, není přímé srovnání úplně možné.



Obr. 34: Expres proteinu NQO1 a její enzymová aktivita v myšičích (A) a potkaních (B) cytosolech izolovaných z jater, ledvin a plic zvířat premedikovaných AAI. Proteinová exprese NQO1 je vyjádřena v relativních jednotkách AU/mg proteinu. Aktivita NQO1 je vyjádřena v nanomol redukováného cytochromu c vztažených na minutu a miligram proteinu. Hodnoty jsou průměrem ze tří stanovení; ** $p < 0,01$ a *** $p < 0,001$. F, faktor představující násobek zvýšení oproti kontrole.

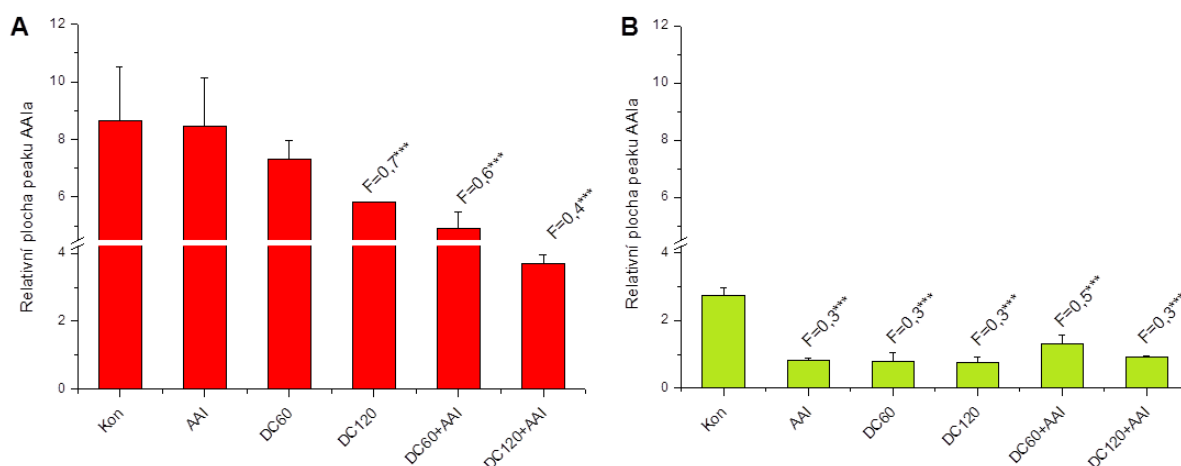
Na základě těchto výsledků a výsledků získaných z analýzy aduktů AAI s DNA *in vivo*, resp. *ex vivo* lze potvrdit klíčovou úlohu NQO1 v bioaktivaci AAI nejen v podmínkách *in vitro*, ale rovněž *in vivo*. Tedy, že NQO1 je enzym, který je majoritně odpovědný za nitroredukcí AAI resultující v tvorbu aduktů s DNA *in vivo*. Nadto bylo dokázáno, že dikumarol může tento enzym efektivně indukovat jak v játrech, tak v ledvině, která je cílovým orgánem genotoxického působení AAI v organismu. Získané výsledky ovšem nejsou v souladu s výsledky, kterých dosáhla skupina dr. Chenové, kde dikumarol působil pouze jako inhibitor NQO1 (Chen *et al.*, 2011). Možných vysvětlení je více. Jedním z nich může být skutečnost, že v případě dřívější studie byly myši usmrceny 30 min. po podání AAI následovaném po expozici dikumarolu, zatímco v naší studii byly

usmrceny až po 24 hodinách. Je tedy pravděpodobné, že dlouhodobá expozice dikumarolu může vést k opačnému efektu, tj. k indukci NQO1. V prvním případě tedy dikumarol působil dle očekávání jako inhibitor NQO1, kdežto naše studie demonstrovala indukční potenciál dikumarolu při dlouhodobém působení. Je více než pravděpodobné, že dostupnost do různých tkání a délka expozice AAI a dikumarolu a forma jejich podání představují zásadní kritérium pro ovlivnění metabolismu AAI dikumarolem. Poznatek, že dikumarol je nejen inhibitorem NQO1 *in vitro* a *in vivo*, ale rovněž induktorem tohoto enzymu je originálním výsledkem, který nebyl v literatuře dříve popsán.

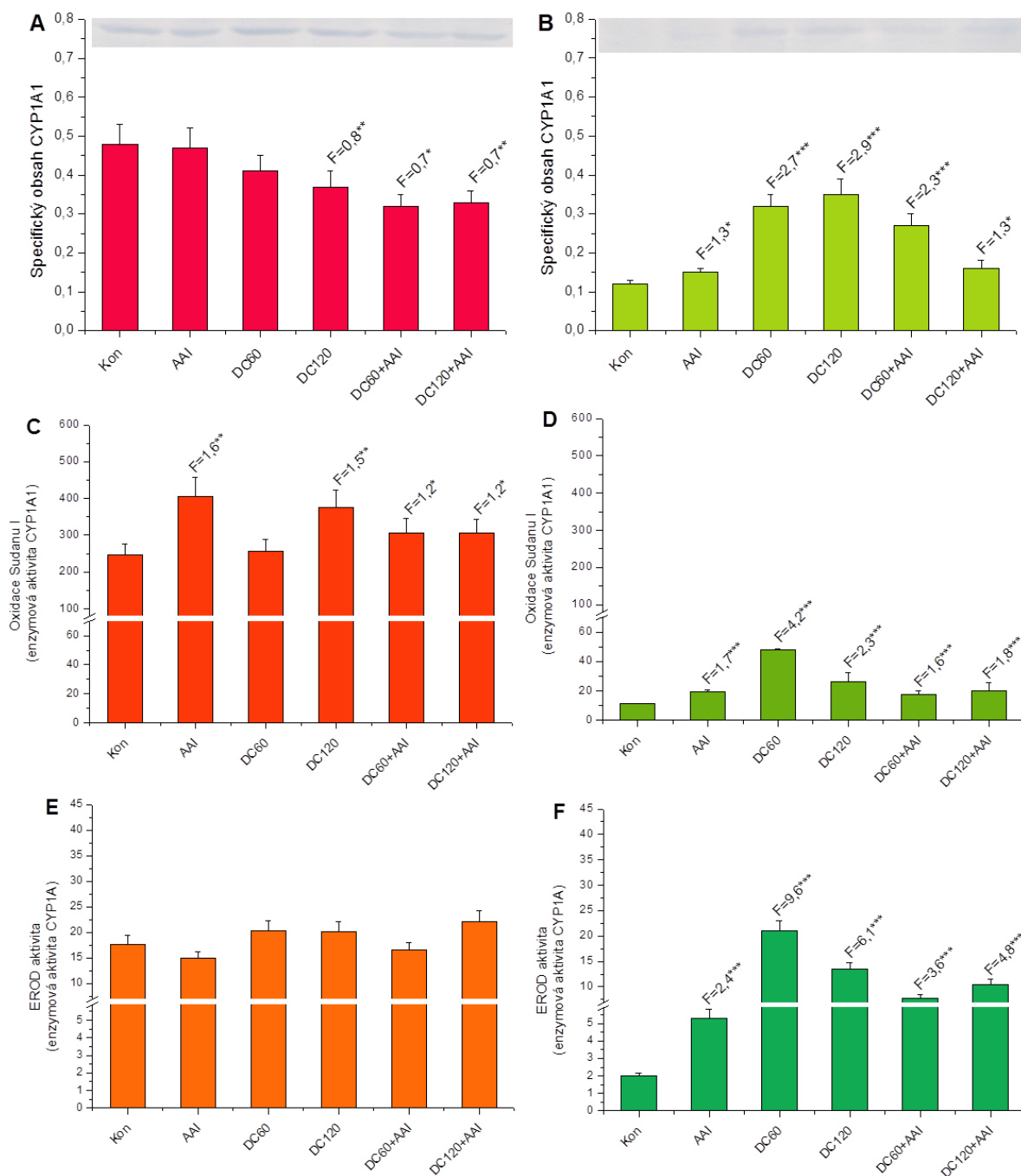
4.1.1.4 Úloha cytochromů P450 1A1 a 1A2 v bioaktivaci AAI

Jak již bylo popsáno výše, CYP1A1 a 1A2 hrají duální úlohu v metabolismu AAI, tj. mohou AAI jak oxidačně detoxikovat, tak redukčně aktivovat. V další části studie byla proto zkoumána role CYP1A1/2 v obou zmíněných procesech. Nejdříve byly provedeny experimenty, které měly demonstrovat schopnost jaterních a ledvinných mikrosomů (subcelulárních frakcí obsahujících CYP-dependentní enzymový systém) *O*-demethylvat, tj. detoxikovat AAI na AAIA.

Z výsledků je patrné, že podání dikumarolu samotného a po následné premedikaci AAI vedlo ke snížení míry detoxikace AAI katalysované jaterními mikrosomy studovaných potkanů (**Obr. 35A**). V případě ledvinných mikrosomů vedlo k signifikantnímu poklesu tvorby AAIA jak po podání samotných AAI a dikumarolu, tak jejich kombinace (**Obr. 35B**).

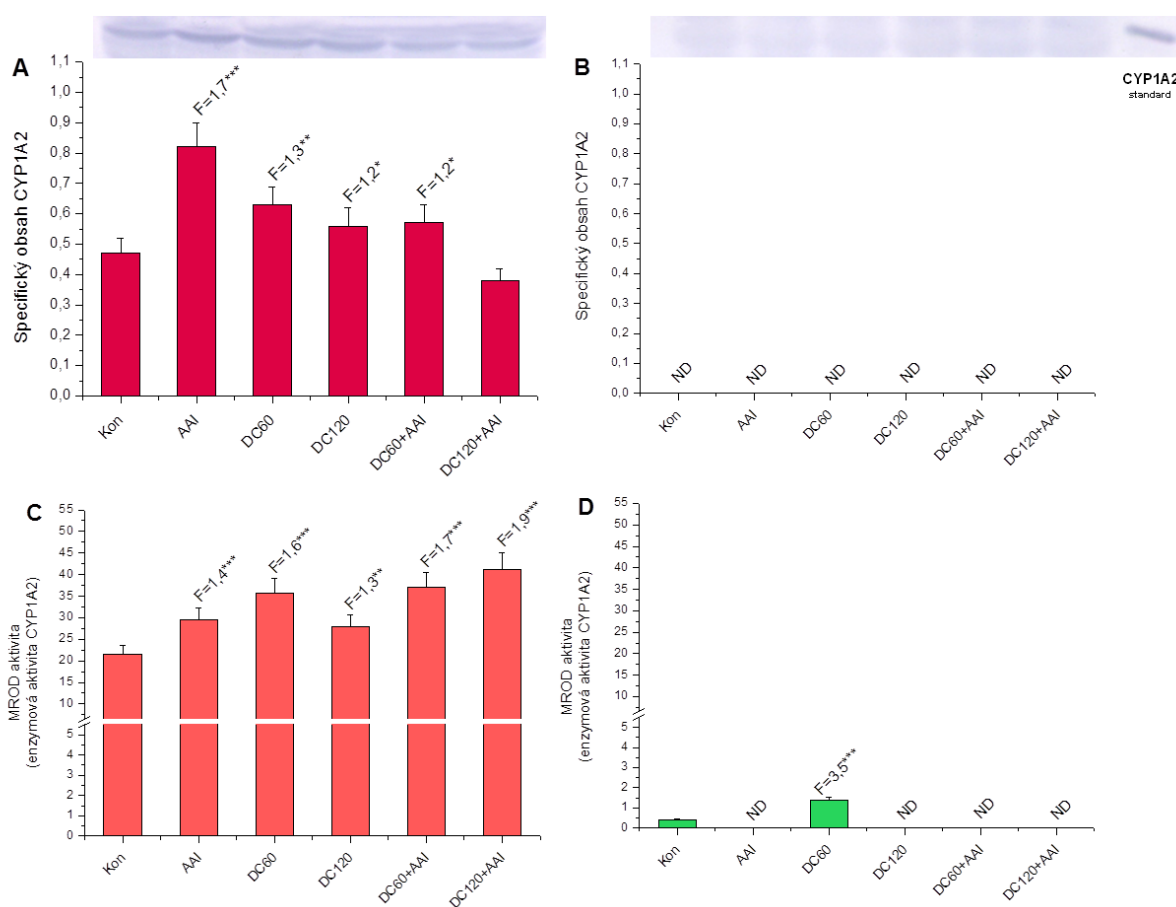


Obr. 35: *O*-demethylace AAI na AAIA katalysovaná jaterními (**A**) a ledvinnými (**B**) mikrosomy izolovanými z potkanů premedikovaných dikumarolem (DC) či AAI samotnými, popř. jejich kombinací. Tvorba AAIA je vyjádřena jako relativní plocha peaku vztažená na minutu a mg proteinu. Hodnoty jsou průměrem ze tří stanovení; *** $p < 0,001$. F, faktor představující násobek změny oproti kontrole.



Obr. 36: Expresní hladiny proteinu CYP1A1 v jaterních (A) a ledvinných (B) mikrosomech izolovaných z potkanů premedikovaných dikumarolem (DC) či AAI samotnými, popř. jejich kombinací. Enzymová aktivita CYP1A1 v játrech (C) a ledvině (D) byla stanovena jako schopnost oxidovat Sudan I (vyjádřena v pmol celkových hydroxylovaných derivátů vztažených na minutu a miligram proteinu). Enzymová aktivita CYP1A v játrech (E) a ledvině (F) byla stanovena jako EROD (vyjádřena v pmol resorufinu vztažených na minutu a miligram proteinu). Proteinová exprese CYP1A1 je vyjádřena v relativních jednotkách AU/mg proteinu. Hodnoty jsou průměrem ze tří stanovení; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ a *** $p < 0,001$. F, faktor představující násobek zvýšení oproti kontrole.

Tyto výsledky ovšem nejsou zcela v souladu se stanovenými expresními hladinami a enzymovými aktivitami CYP1A1/2 v játrech a ledvině, které byly měřeny jako schopnost oxidovat Sudan I (CYP1A1), EROD (CYP1A) a MROD (CYP1A2). Proteinové exprese CYP1A1 v játrech byly ve srovnání s kontrolními zvířaty sice působením samotného dikumarolu, popř. dikumarolu v kombinaci s AAI sníženy (**Obr. 36A**, str. 76), nicméně aktivita tohoto enzymu v játrech byla až 1,5násobná (**Obr. 36CE**). V ledvině byla pozorována indukce exprese proteinu CYP1A1 zejména po podání samotného dikumarolu, která byla takřka 3násobná (**Obr. 36B**). Nadto tyto zvýšené proteinové exprese korelovaly s aktivitou CYP1A1 měřenou jako schopnost oxidovat Sudan I a EROD (**Obr. 36DF**).

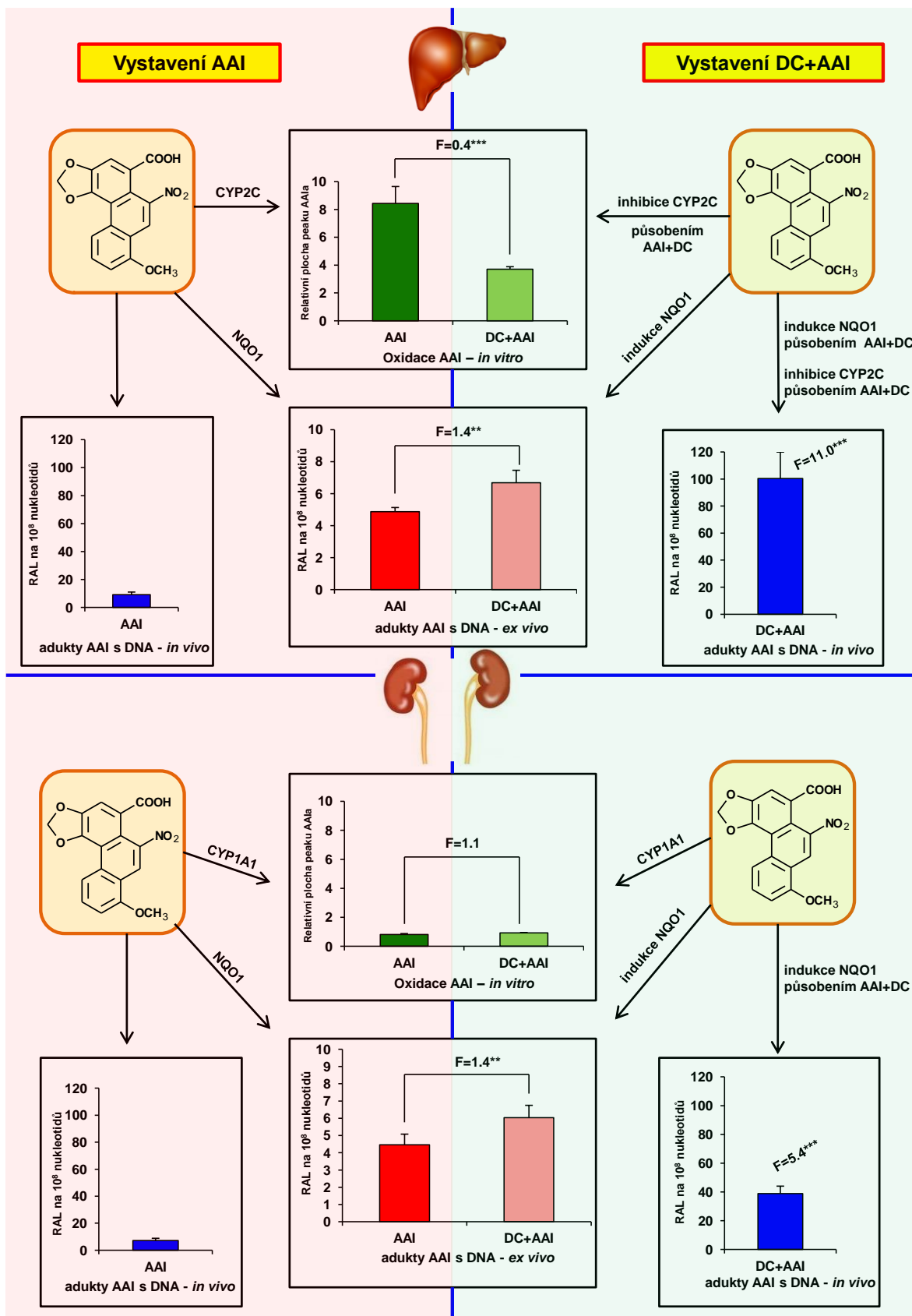


Obr. 37: Expresní hladiny proteinu CYP1A2 v jaterních (A) a ledvinných (B) mikrosomech izolovaných z potkanů premedikovaných dikumarolem (DC) a AAI samotnými, popř. jejich kombinaci. Enzymová aktivita CYP1A2 v játrech (C) a ledvině (D) byla stanovena jako MROD (vyjádřena v pmol resorufinu vztažených na minutu a miligram proteinu). Proteinová exprese CYP1A2 je vyjádřena v relativních jednotkách AU/mg proteinu. Hodnoty jsou průměrem ze tří stanovení; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ a *** $p < 0,001$. F, faktor představující násobek zvýšení oproti kontrole. ND, nedetekováno.

CYP1A2 byl exprimován pouze v játrech (**Obr. 37**, str. 77), čímž byla potvrzena již dříve popsaná skutečnost, že tento enzym je takřka výhradně jaterní (Rendić & DiCarlo, 1997). Jeho exprese byla v játrech zvýšena jak samotným dikumarolem, tak dikumarolem s AAI, nicméně podání vyšší dávky dikumarolu (120 mg/kg) následované podáním AAI neovlivnilo proteinovou expresi CYP1A2 v tomto orgánu (**Obr. 37A**). Tyto výsledky korelovaly se stanovenou aktivitou CYP1A2 (MROD), až na výše zmíněnou kombinaci dikumarolu s AAI, která sice neovlivnila expresi CYP1A1, zato aktivita tohoto enzymu v játrech byla 1,9násobná (**Obr. 37C**). Tuto drobnou diskrepanci lze vysvětlit tak, že ne zcela výrazná zóna stanovená metodou elektropřenosu na membránu („Western blotting“) nemusí přesně odpovídat expresi CYP1A2 a stanovení enzymové aktivity tedy představuje přesnější nástroj k určení jeho enzymové indukce.

Vedle těchto výsledků jsou stanovené proteinové exprese a enzymové aktivity CYP1A1/2 rovněž v souladu s tvorbou aduktů AAI s DNA *ex vivo*, což poukazuje na úlohu CYP1A1/2 v nitroredukci AAI. Nalezené zvýšené expresní hladiny a enzymové aktivity CYP1A1 v ledvinách a CYP1A2 v játrech toto tvrzení potvrzují. Není tedy pravděpodobné, že by v tomto případě CYP1A1/2 významně přispíval k oxidační demethylaci AAI a tato reakce je tedy katalysována i jinými enzymy. To bylo skutečně prokázáno, neboť demethylace AAI je také katalysována CYP2C (viz **kap. 4.2.1.1**, str. 94). Vliv dikumarolu na metabolismus AAI v potkaním organismu je přehledně shrnut ve schématu uvedeném na **Obr. 38** (str. 79).

Obr 38: Schematické shrnutí ilustrující vliv podání dikumarolu (DC) na metabolismus AAI v potkanech (str. 79). Indukce NQO1 vyvolaná působením dikumarolu rezultovala ve vyšší tvorbu aduktů AAI s DNA po redukcí cytosoly *ex vivo*. Inhibice CYP2C vyvolaná dikumarolem vedla ke snížení oxidační detoxikace AAI na AAIA v jaterních mikrosomech. Jak indukce NQO1, tak inhibice CYP2C vedla k vyššímu množství aduktů AAI s DNA v játrech *in vivo*. Tvorba aduktů AAI s DNA *in vivo* byla v ledvině ovlivněna pouze indukcí NQO1. F, faktor představující násobek zvýšení oproti množství aduktů u zvířat premedikovaných pouze AAI. Porovnání bylo analysováno Studentovým *t*-testem: ***p* < 0,01 a ****p* < 0,001. RAL, relativní značení aduktů.



Obr. 38: Legenda k obrázku je umístěna na předchozí straně.

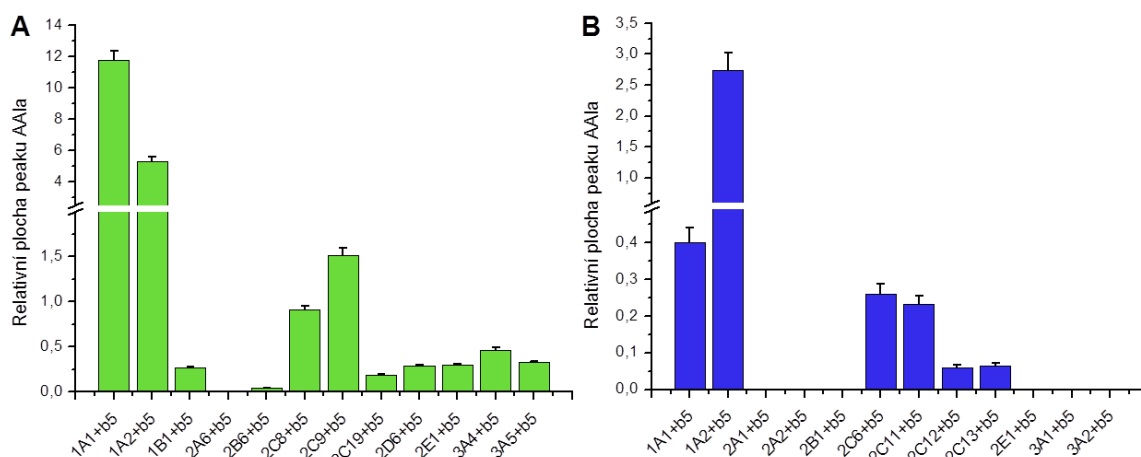
4.1.2 Studium oxidační detoxikace AAI

Vedle aktivace AAI spočívající v nitroredukci za tvorby aristolaktamů je tento rostlinný alkaloid v organismu rovněž detoxikován. Oxidační detoxikace AAI resultují v tvorbu jejího *O*-demethylovaného produktu, AAIA, katalysují zejména enzymy MFO systému. V této části předkládané disertační práce jsou uvedeny výsledky studie, jejímž cílem bylo objasnění metabolické detoxikace AAI v potkaním organismu. Vedle studie *in vivo* zkoumající vliv dikumarolu (**kap. 4.1.1**, str. 66), byly provedeny experimenty, ve kterých byla modulována exprese CYP1A1 a 1A2, a to podáním induktoru těchto enzymů, Sudanu I, experimentálním zvířatům (laboratornímu potkanovi). Cílem takové studie bylo objasnit, které z reakcí metabolismu AAI, které jsou katalysovány těmito enzymy, jmenovitě oxidační demethylace AAI na AAIA a redukční aktivace za tvorby aduktů AAI s DNA, převládají v podmínkách *in vivo* (**kap. 4.1.2.3**, str. 86). Nadto byly rovněž určeny reálné příspěvky jednotlivých lidských a potkaních CYP k oxidační detoxikaci AAI v játrech, v orgánu, kde dochází k nejintenzivnější biotransformaci xenobiotik, včetně AAI (**kap. 4.1.2.2**, str. 83).

4.1.2.1 Mechanismus O-demethylace AAI

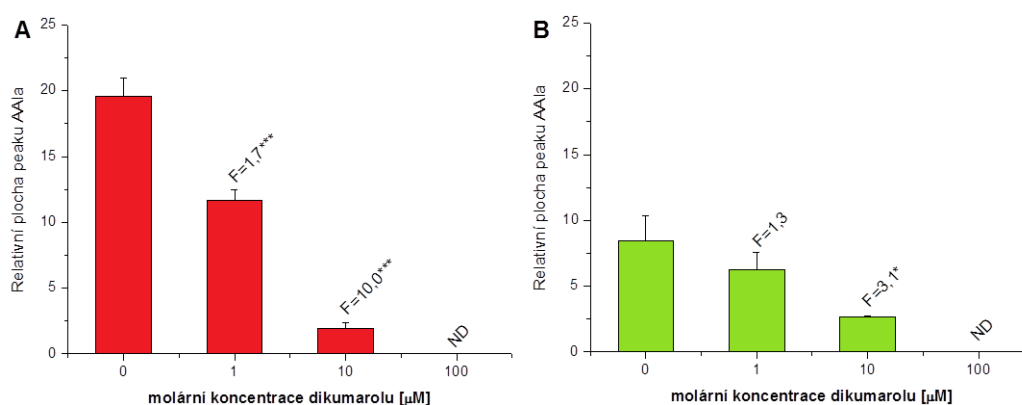
V nedávných studiích, ve kterých bylo využito specifických inhibitorů CYP, rekombinantních lidských a potkaních CYP a rovněž geneticky upravených myších modelů, které měly deletované geny pro CYP1A1/2 (Arlt *et al.*, 2011a; Levová *et al.*, 2011; Stiborová *et al.*, 2011a, 2012), bylo prokázáno, že nejefektivnějšími enzymy detoxikujícími AAI jsou CYP1A1/2, popř. CYP2C. Z lidských CYP oxiduje AAI na AAIA s největší efektivitou CYP1A1 > 1A2 > 2C9 > 2C8 > 3A4 (**Obr. 39A**, str. 81), nicméně majoritně se na těchto reakcích podílí právě podrodina CYP1A. Z potkaních CYP jsou nejefektivnější CYP1A2, 1A1 2C6 a 2C11 s malým příspěvkem CYP2C12 a 2C13 (**Obr. 39B**, str. 81). Jedním z cílů předkládané disertační práce bylo objasnit reálné příspěvky těchto enzymů jak v lidských, tak potkaních játrech.

Jak bylo uvedeno v předchozí části práce (**kap. 4.1.1**), ve studii, ve které byl potkanům podáván dikumarol samostatně (60, resp. 120 mg/kg) a v kombinaci s AAI (20 mg/kg), výsledky naznačují, že *in vivo* CYP1A1/2 tomto případě nehrají majoritní úlohu v detoxikaci AAI na AAIA. Schopnost jaterních a ledvinných mikrosomů nekorespondovala ani s proteinovou expesí, ani s enzymovými aktivitami CYP1A1/2 (**Obr. 35-37**, str. 75-77). Vzhledem k vysoké proteinové expresi CYP podrodiny 2C v potkaních játrech (**Obr. 25B**, str. 57) (Nedelcheva & Gut, 1994) jsme se soustředili právě



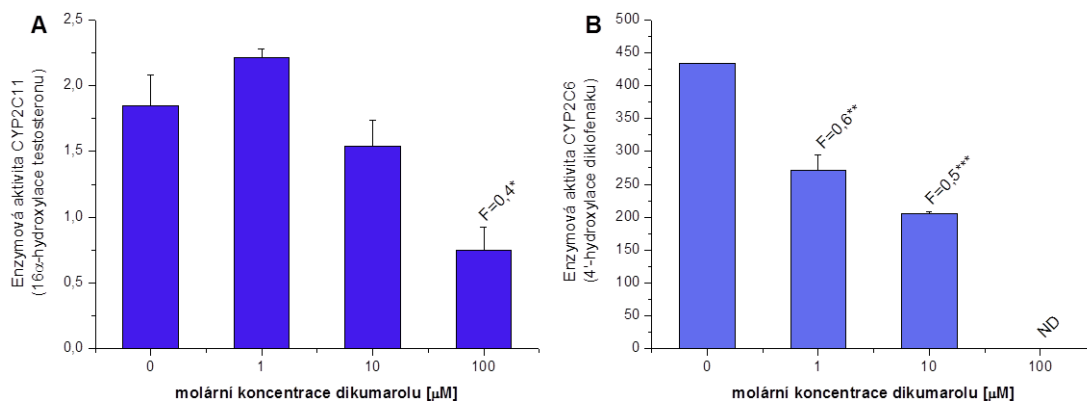
Obr. 39: Lidské (A) a potkaní (B) rekombinantní CYP oxidačně detoxikující AAI na AAIa. (převzato z Levová *et al.*, 2011; Stiborová *et al.*, 2012).

na tuto podrodinu CYP. Nejprve byl studován vliv dikumarolu na *O*-demethylaci AAI katalysovanou jaterními a ledvinnými mikrosomy *in vitro*, které byly izolovány z nepremedikovaných zvířat. Dikumarol se ukázal jako silný inhibitor tvorby AAIa jak jaterními ($IC_{50} = 1,6 \mu M$), tak ledvinnými ($IC_{50} = 4,6 \mu M$) mikrosomy *in vitro* (Obr. 40). Proto by i malé zbytkové množství dikumarolu v tkáni, podobně jako v případě bioaktivace katalysované NQO1 (kap. 4.1.1.3, str. 70), mohlo ovlivnit detoxikaci AAI na AAIa. Toto zjištění by mohlo částečně vysvětlit pokles tvorby AAIa katalysované jaterními a ledvinnými mikrosomy, které byly izolovány z potkanů premedikovaných dikumarolem a/nebo AAI (kap. 4.1.1.4, str. 75). Nicméně, tyto výsledky jsou v ostrém rozporu s výše uvedenou studií dr. Chenové, ve které byly detekovány zvýšené hladiny AAIa v plasmě studovaných zvířat (Chen *et al.* 2011). Takové výsledky signalisují, že v myším organismu musí být AAI detoxikována i jinými enzymy.



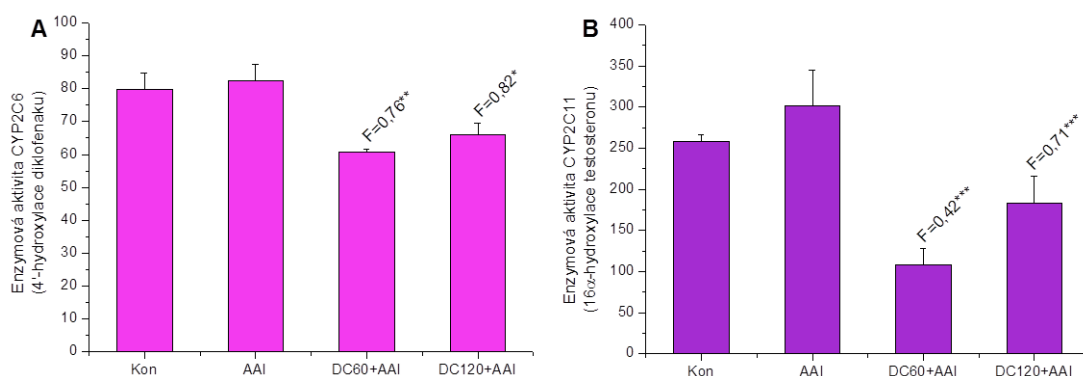
Obr. 40: Vliv dikumarolu na *O*-demethylaci AAI (10 μM) na AAIa katalysovanou jaterními (A) a ledvinnými (B) mikrosomy izolovanými z nepremedikovaných potkanů. Tvorba AAIa je vyjádřena jako relativní plocha peaku vztahovaná na minutu a mg proteinu. Hodnoty jsou průměrem ze tří stanovení; * $p < 0,05$ a *** $p < 0,001$. F, faktor představující násobek snížení oproti tvorbě AAIa bez přítomnosti dikumarolu. ND, nedetekováno.

Vliv dikumarolu na enzymové aktivity CYP1A1/2, který by odpovídal jeho vlivu na oxidaci AAI, však nebyl nalezen (výsledky nejsou uvedeny). Dikumarol ovšem inhiboval aktivity CYP2C6/11 *in vitro* (**Obr. 41**): CYP2C6 větší měrou ($IC_{50} = 7,6 \mu M$) a CYP2C11 měrou menší ($IC_{50} = 50,31 \mu M$).



Obr. 41: Vliv dikumarolu na enzymové aktivity potkaních rekombinantních CYP2C11 (**A**) a CYP2C6 (**B**). Aktivita CYP2C11 je vyjádřena v nmol 16 α -hydroxytestosteronu na minutu a mg proteinu a aktivita CYP2C6 v pmol 4'-hydroxydiklofenaku vztažených na minutu a mg proteinu. Hodnoty jsou průměrem ze tří stanovení; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ a *** $p < 0,001$. F, faktor představující násobek zvýšení oproti kontrole bez přítomnosti dikumarolu. ND, nedetekováno.

Tyto výsledky podporovaly naši hypotézu, že na detoxikaci AAI v potkaním organismu po premedikaci dikumarolem, popř. kombinací dikumarolu a AAI převážně participují CYP2C6 a 2C11. Následně byly tedy stanoveny enzymové aktivity CYP2C6/11 v potkaních játrech. Ze získaných výsledků je patrné, že aktivita CYP2C6 byla po podání dikumarolu a AAI snížena o 20 % (**Obr. 42A**) a inhibice aktivity CYP2C11 dosáhla až hodnoty 60 % (**Obr. 42B**).



Obr. 42: Enzymové aktivity CYP2C6 (**A**) a CYP2C11 (**B**) v jaterních mikrosomech potkanů premedikovaných dikumarolem (DC) a/nebo AAI. Aktivita CYP2C6 je vyjádřena v pmol 4'-hydroxydiklofenaku vztažených na minutu a mg proteinu a aktivita CYP2C11 je uvedena v nmol 16 α -hydroxytestosteronu vztažených na minutu a mg proteinu. Hodnoty jsou průměrem ze tří stanovení; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ a *** $p < 0,001$. F, faktor představující násobek zvýšení oproti kontrole.

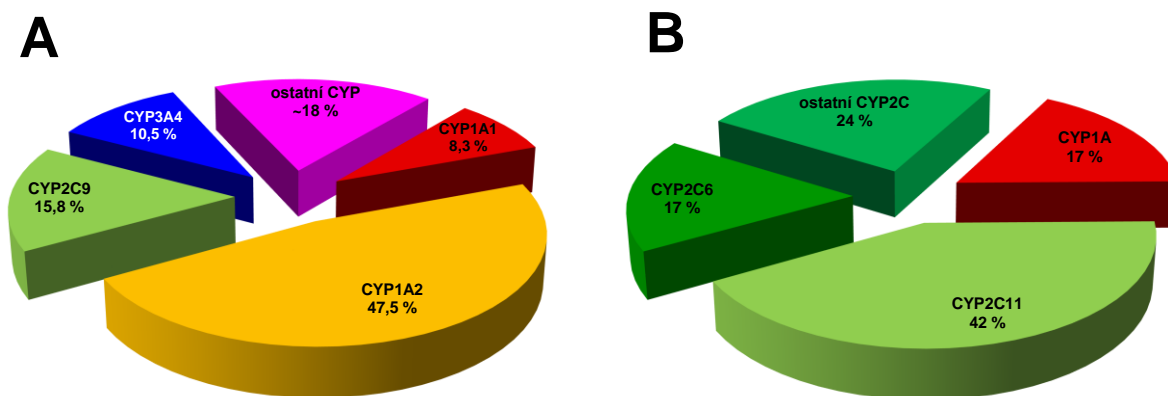
Na základě získaných výsledků a výsledků dříve publikovaných (Pearce *et al.*, 1992) lze říci, že CYP2C6/11 mohou být kompetitivně inhibovány zbytkovým dikumarolem, který se vzhledem k jeho dlouhému eliminačnímu poločasu (Lai *et al.*, 1976) mohl v tkáních stále vyskytovat. Zvýšená tvorba aduktů AAI s DNA v játrech (**Obr. 28**, str. 67) tedy mohla být výsledkem nejen indukce NQO1, ale rovněž snížené míry detoxikace AAI na AAIA, která byla vyvolána inhibicí CYP2C6/11.

Zjištěné výsledky podtrhují význam CYP2C6/11 v oxidační detoxikaci AAI na AAIA v organismu laboratorního potkana. Navzdory malé efektivitě v tvorbě AAIA *in vitro* (**Obr. 39B**, str. 81) je pravděpodobné, že CYP2C6/11 participují na tomto procesu v potkaních játrech podstatně větší měrou, a to především vzhledem k vysoké expresi v této potkaní tkáni (Nedelcheva & Gut, 1994; Večeřa *et al.*, 2011; Zachařová *et al.*, 2012).

4.1.2.2 Příspěvky jednotlivých lidských a potkaních cytochromů P450 k oxidační detoxikaci AAI

V další části studie zkoumající oxidační detoxikaci AAI na AAIA byly určeny reálné příspěvky lidských a potkaních CYP k této reakci, a to s přihlédnutím jak k jejich vlastní aktivitě, tak i proteinové expresi těchto enzymů v lidských a potkaních játrech (**Obr. 25 a 39**, str. 57 a 80). K výpočtu těchto příspěvků byly využity stanovené rychlosti oxidace AAI lidskými a potkaními rekombinantními CYP v přítomnosti cytochromu b₅ (**Obr. 39**, str. 81), který je fakultativní součástí MFO systému a který moduluje efektivitu CYP oxidovat AAI (Stiborová *et al.*, 2011a). Takto získané výsledky se poněkud liší od absolutních účinností lidských a potkaních CYP oxidovat AAI a vrhají tak na *O*-demethylaci AAI nové světlo.

V lidských játrech nejvíce přispívá k detoxikaci AAI na AAIA CYP1A2 (~47,5 %), který je následován CYP2C9 (~15,8 %), CYP3A4 (~10,5 %) a CYP1A1 (~8,3 %) (**Obr. 43A**, str. 83). Takové výsledky jsou částečně překvapivé, neboť nejvyšší aktivitu oxidovat AAI na AAIA měl právě lidský rekombinantní CYP1A1, nicméně jeho nízká expresní hladina v játrech (< 0,7 %) (Stiborová *et al.*, 2002, 2005c) je důvodem tak malého reálného příspěvku k oxidační detoxikaci AAI, a to dokonce nižšího než jsou příspěvky CYP1A2, 2C9 a 3A4. Ostatní CYP jako CYP2E1, 2C8 a 2C19 sice také přispívají k detoxikaci v lidských játrech, ale jejich úloha je nepatrná (~1,1 %; ~1,0 % a ~0,6 %).



Obr. 43: Reálné příspěvky jednotlivých lidských (A) a potkaních (B) CYP k oxidační detoxikaci AAI na AAIA v játrech těchto organismů.

Reálné příspěvky k tvorbě AAIA potkaními jaterními CYP byly rovněž odlišné od absolutních účinností určených za použití rekombinantních enzymů. Nadto se lišily rovněž v jednotlivých příspěvcích ve srovnání s lidským organismem: nejvyšší efektivitu ve tvorbě AAIA vykazovaly CYP podrodiny 2C (~83 %), zejména pak CYP2C11 (~42 %) a CYP2C6 (~17 %), které byly následovány podrodinou 1A (~17 %). Nízké příspěvky CYP1A lze vysvětlit zejména tím, že proteinová exprese této podrodiny je v potkaních játrech ~2%, zatímco expresní hladiny CYP2C zaujímají až 55 % celkových CYP (Nedelcheva & Gut, 1994). Tyto výsledky navíc zcela podporují závěry ze studie, ve které byli zkoumáni potkani premedikovaní dikumarolem, resp. dikumarolem a AAI, a to že CYP2C hrají v oxidační detoxikaci AAI v potkaním organismu klíčovou úlohu, kterou nelze opomíjet, a to navzdory skutečnosti, že největší aktivitu *O*-demethylovat AAI na AAIA vykazovaly CYP1A2, resp. 1A1 (Obr. 39, str. 81).

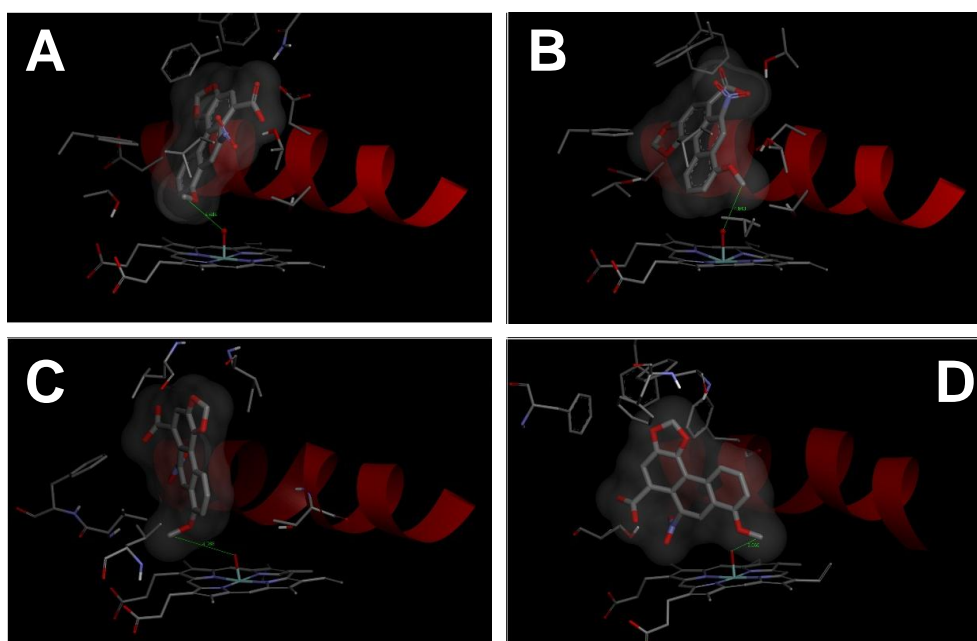
Rozdíly v účinnosti jednotlivých CYP *O*-demethylovat AAI na AAIA (Obr. 39, str. 81) mohou být, vzhledem k předpokládanému mechanismu reakce (Obr. 18, str. 47), způsobeny rozdílnou afinitou AAI k těmto enzymům a rovněž vazebnou orientací methoxyskupiny AAI v jejich aktivním centru. Z tohoto důvodu byly provedeny studie *in silico*, ve kterých byla studována vazba AAI do aktivního centra lidských CYP1A1, 1A2, 2C9 a 3A4 (Obr. 44, str. 85), tj. enzymů, které jsou nejefektivnější v tvorbě AAIA, nicméně jejich účinnost je značně rozdílná (Obr. 39A, str. 81). Výsledky ze získaných modelů *in silico* demonstrují, že ve vazbě mezi methoxyskupinou AAI a atomem kyslíku v aktivním centru studovaných CYP jsou krátké vzdálenosti (3,7-4,4 Å). Nicméně, afinita AAI k CYP2C9 a 3A4 byla signifikantně nižší než k CYP1A1/2 (Tab. 2, str. 85). Ačkoliv

je CYP1A1 nejúčinnější enzym, který oxidačně detoxikuje AAI na AAIA, afinita AAI k CYP1A1 byla dle získaného modelu nižší než k CYP1A2. Nicméně vzhledem ke skutečnosti, že vzdálenost methoxyskupiny AAI od aktivního centra CYP1A2 je větší o 0,5 Å, může být tímto způsobem vysvětlena nižší efektivita CYP1A2 *O*-demetylovat AAI na AAIA. Na základě těchto výsledků lze konstatovat, že vysoká účinnost CYP1A1/2 v oxidaci AAI na AAIA je výsledkem optimální orientace molekuly AAI v aktivním centru těchto enzymů a jejich afinity k jednotlivým CYP.

Tabulka 2: Stanovené volné vazebné energie a vzdálenosti v komplexu AAI a CYP

Simulovaný systém	Stanovená volná vazebná energie	Vzdálenost reaktantů ^a
	[kcal/mol]	[Å]
CYP1A1	-7,0	4,4
CYP1A2	-7,7	4,9
CYP2C9	-5,3	4,3
CYP3A4	-6,0	3,7

^a vzdálenost mezi uhlíkem methoxyskupiny AAI a kyslíkem koordinovaným hemovým atomem železa v komplexu CYP a AAI.

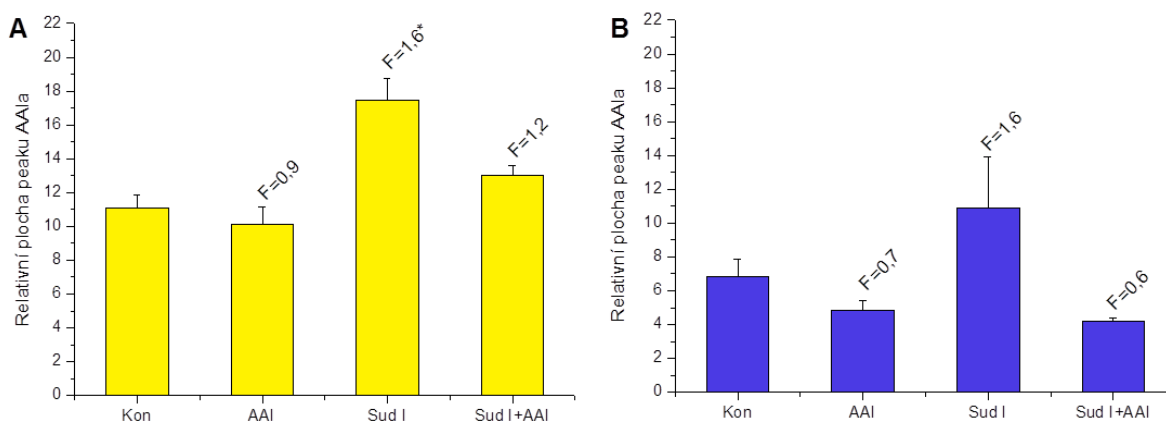


Obr. 44: Vazebné orientace stanovené metodou molekulárního modelování *in silico* v komplexu AAI s CYP1A1 (A), CYP1A2 (B), CYP2C9 (C) a CYP3A4 (D).

4.1.2.3 Úloha cytochromů P450 1A1/2 v oxidační detoxikaci AAI

Cílem následující části předkládané disertační práce bylo zjistit, která ze dvou popsaných metabolických cest katalysovaných CYP1A1/2, tj. oxidační detoxikace a redukční bioaktivace AAI, převažuje v podmínkách *in vivo*. K dosažení tohoto cíle bylo použito modulace exprese těchto enzymů prostřednictvím jejich induktoru, Sudanu I. Laboratornímu potkanovi byl podáván Sudan I, AAI a jejich kombinace. Ze získaných výsledků je patrné (tato kapitola a **kap. 4.1.2.4**, str. 90), že podání Sudanu I bylo vhodným nástrojem přinášejícím odpověď na zkoumané otázky.

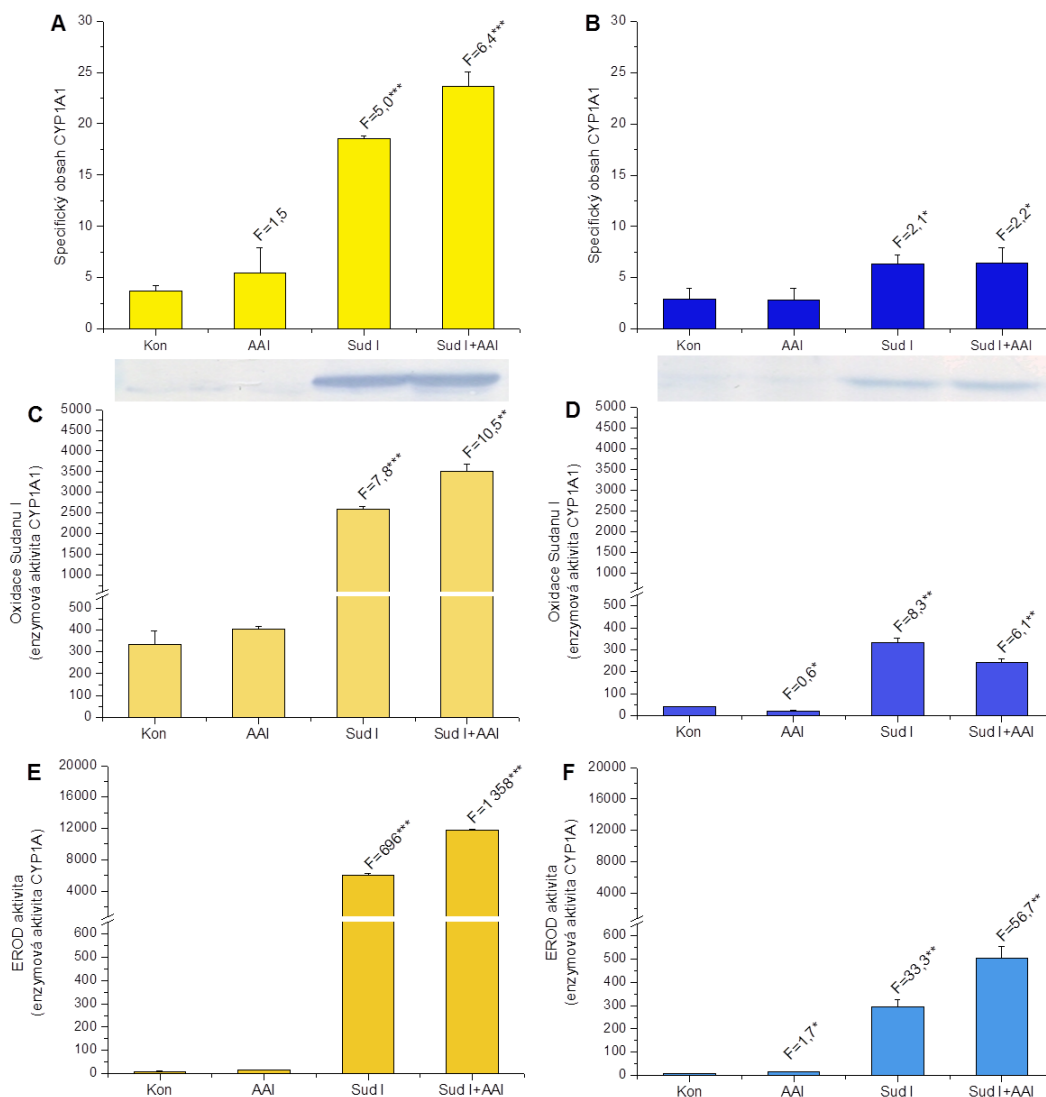
Nejprve byla testována schopnost mikrosomů izolovaných z jater a ledvin experimentálních zvířat oxidačně detoxikovat AAI *in vitro*. Všechny studované mikrosomy *O*-demethylovaly AAI na AAIA. Expozice laboratorního potkana Sudanu I samostatně rezultovala ve zvýšení tvorby AAIA jak v játrech, tak v ledvině ve srovnání s kontrolními mikrosomy (**Obr. 45**). Nicméně kombinované podání Sudanu I a AAI zvyšovalo *O*-demethylaci AAI na AAIA pouze v játrech. V ledvině byl u jaterních mikrosomů izolovaných z těchto zvířat nalezen 1,6násobný pokles ve tvorbě AAIA oproti kontrolním zvířatům (**Obr. 45B**). Tyto výsledky sice potvrzují význam CYP1A1/2 v oxidační detoxikaci AAI na AAIA, nicméně aktivita *O*-demethylovat tento rostlinný produkt není příliš významně indukována podáním Sudanu I, resp. jeho kombinací s AAI.



Obr. 45: *O*-demethylace AAI na AAIA katalysovaná jaterními (A) a ledvinými (B) mikrosomy izolovanými z potkanů premedikovaných Sudanem I (Sud I), AAI a jejich kombinací. Tvorba AAIA je vyjádřena jako relativní plocha peaku vztahovaná na minutu a mg proteinu. Hodnoty jsou průměrem ze tří stanovení; * $p < 0,05$. F, faktor představující násobek zvýšení oproti kontrole.

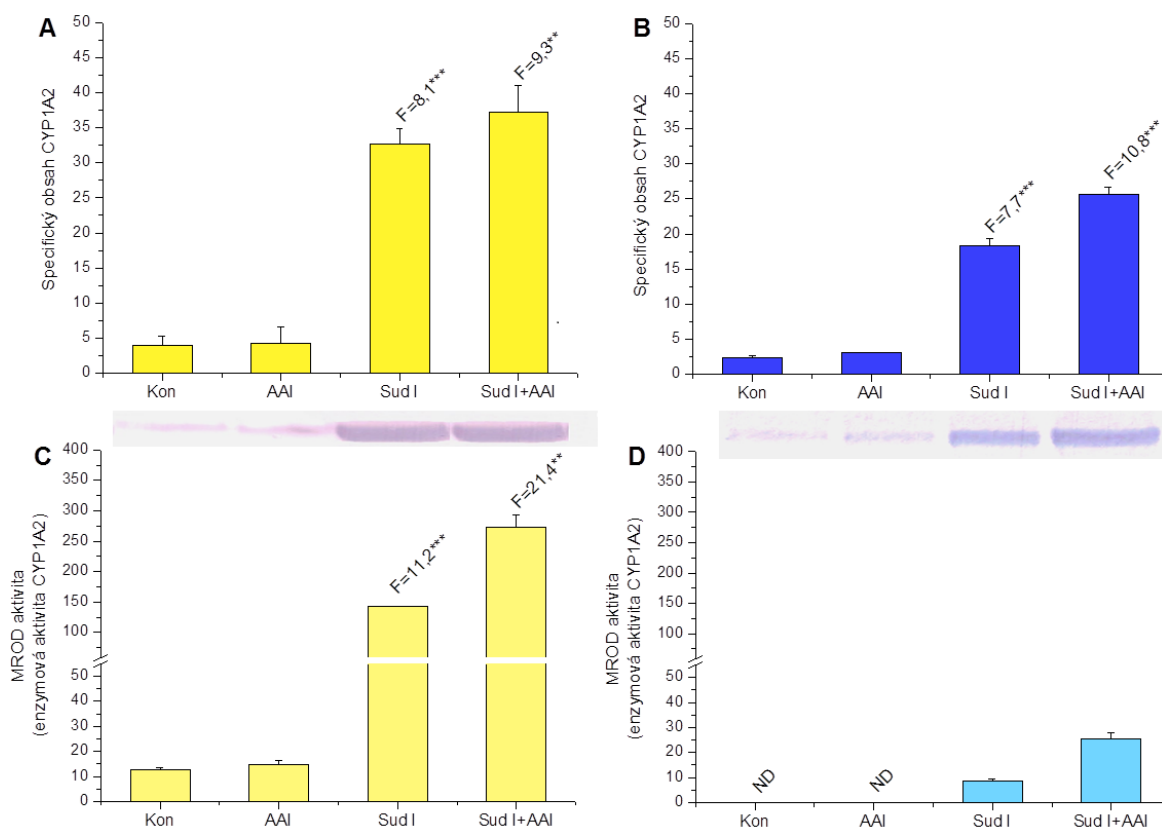
Proto byly analysovány proteinové exprese a enzymové aktivity CYP1A1 a 1A2, aby tyto hypotézy buď potvrdily anebo vyvrátily. Expres proteinu CYP1A1 byla indukována podáním jak Sudanu I samotného, tak kombinací s AAI v játrech i ledvině (**Obr. 46AB**, str. 87), přičemž v játrech byla tato indukce nejen patrnější, ale rovněž byla

ve srovnání s kontrolními zvířaty v případě kombinovaného podání Sudanu I a AAI vyšší, jmenovitě 6,4násobná, ve srovnání s podáním Sudanu I samotného (**Obr. 46A**). Uvedené výsledky exprese proteinů CYP1A1/2 byly v souladu s enzymovou aktivitou CYP1A1, která byla měřena jako schopnost oxidovat Sudan I *in vitro* (**Obr. 46CD**), a aktivitou CYP1A stanovenou jako EROD (**Obr. 46EF**). Aktivita CYP1A1 a CYP1A v játrech byla významně zvýšena podáním Sudanu I samotného, resp. v kombinaci s AAI (**Obr. 46C-F**).



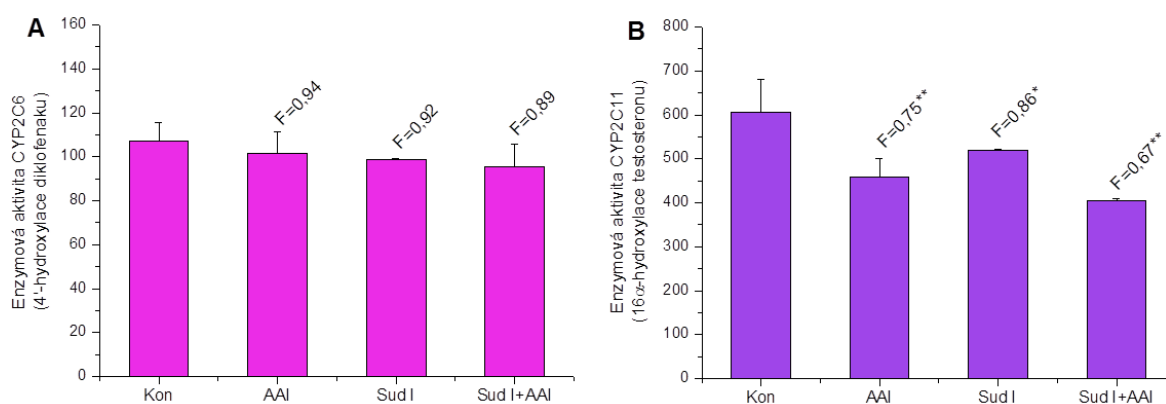
Obr. 46: Expresní hladiny proteinu CYP1A1 v jaterních (**A**) a ledvinných (**B**) mikrosomech izolovaných z potkanů premedikovaných Sudanem I (Sud I), AAI a jejich kombinací. Enzymová aktivita CYP1A1 v játrech (**C**) a ledvině (**D**) byla stanovena jako schopnost oxidovat Sudan I (vyjádřena v pmol celkových hydroxylovaných derivátů/min./mg proteinu). Enzymová aktivita CYP1A v játrech (**E**) a ledvině (**F**) byla stanovena jako EROD (vyjádřena v pmol resorufinu/min./mg proteinu). Proteinová exprese CYP1A1 je vyjádřena v relativních jednotkách AU/mg proteinu. Hodnoty jsou průměrem ze tří stanovení; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ a *** $p < 0,001$. F, faktor představující násobek zvýšení oproti kontrole.

Vedle proteinové exprese a enzymové aktivity CYP1A1 testovaných zvířat byly tyto charakteristiky sledovány i pro CYP1A2. Výsledky jsou analogické jako u CYP1A1. Sudan I jak sám, tak v kombinaci s AAI indukoval expresní hladiny CYP1A2 v játrech i v ledvině (**Obr. 47AB**), což se projevilo též v aktivitě tohoto enzymu měřené jako MROD. Samotné podání Sudanu I vedlo k 11,2násobnému zvýšení enzymové aktivity CYP1A2 ve srovnání s kontrolou v játrech a kombinované podání Sudanu I a AAI tuto aktivitu zvýšilo dokonce 21,4násobně (**Obr. 47C**). Ačkoliv CYP1A2 je typickým jaterním enzymem, podání Sudanu I indukovalo tento protein rovněž v ledvině. Tyto výsledky potvrzují skutečnost, že Sudan I je silným induktorem CYP1A1 a 1A2 a nadto demonstrují, že kombinované podání této látky s AAI tyto vlastnosti ještě zesiluje.



Obr. 47: Expresní hladiny proteinu CYP1A2 v jaterních (A) a ledvinných (B) mikrosomech izolovaných z potkanů premedikovaných Sudanem I (Sud I), AAI a jejich kombinací. Enzymová aktivita CYP1A2 v játrech (C) a ledvině (D) byla stanovena jako MROD (vyjádřena v pmol resorufinu vztahených na minutu a miligram proteinu). Proteinová exprese CYP1A2 je vyjádřena v relativních jednotkách AU/mg proteinu. Hodnoty jsou průměrem ze tří stanovení; ** $p < 0,01$ a *** $p < 0,001$. F, faktor představující násobek zvýšení oproti kontrole. ND, nedetekováno.

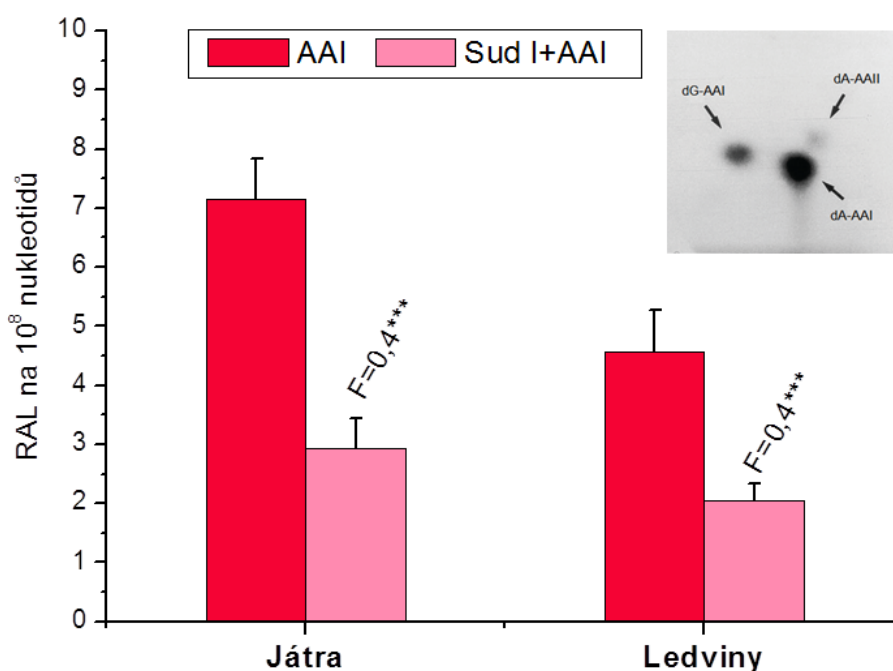
Nicméně, výsledky získané ze stanovení exprese proteinu a enzymových aktivit CYP1A1/2 nejsou zcela v souladu se zjištěnou tvorbou AAIa jaterními a ledvinnými mikrosomy. Zejména skutečnost, že kombinované podání Sudanu I a AAI vedlo ke zvýšeným proteinovým expresím, resp. aktivitám CYP1A1/2 (**Obr. 46-47**, str. 87-88), které se současně neprojevily v *O*-demethylaci AAI na AAIa (**Obr. 45**). Vzhledem k významu CYP2C v oxidační detoxikaci AAI v potkaních játrech, o kterém pojednávají předchozí kapitoly (**kap. 4.1.2.1 a 4.1.2.2**, str. 80 a 83), bylo sledováno, jak jsou v experimentu ovlivněny enzymové aktivity CYP2C6 a 2C11, tedy enzymů, které jsou v potkaních játrech majoritně zastoupeny (Nedelcheva & Gut, 1994). Stanovení enzymové aktivity CYP2C6 (4'-hydroxylace diklofenaku) a CYP2C11 (16 α -hydroxylace testosteronu) ukázalo, že Sudan I podaný jak samostatně, tak v kombinaci s AAI snižoval aktivitu CYP2C6 o 10 % a CYP2C11 dokonce o 33 % (**Obr. 48**). Uvedené výsledky tak mohou vysvětlit výše zmíněné diskrepance, které byly pozorovány mezi aktivitami CYP1A1/2 a tvorbou AAIa jaterními mikrosomy izolovanými ze zvířat, kterým byl podán Sudan I a AAI.



Obr. 48: Enzymové aktivity CYP2C6 (**A**) a CYP2C11 (**B**) v jaterních mikrosomech izolovaných z potkanů premedikovaných Sudanem I (Sud I), AAI a jejich kombinací. Aktivita CYP2C6 je vyjádřena v pmol 4'-hydroxydiklofenaku vztažených na minutu a mg proteinu a aktivita CYP2C11 je uvedena v nmol 16 α -hydroxytestosteronu vztažených na minutu a mg proteinu. Hodnoty jsou průměrem ze tří stanovení; * $p < 0,05$ a ** $p < 0,01$. F, faktor představující násobek zvýšení oproti kontrole.

4.1.2.4 Indukce cytochromů P450 1A1/2 snižuje tvorbu aduktů AAI s DNA

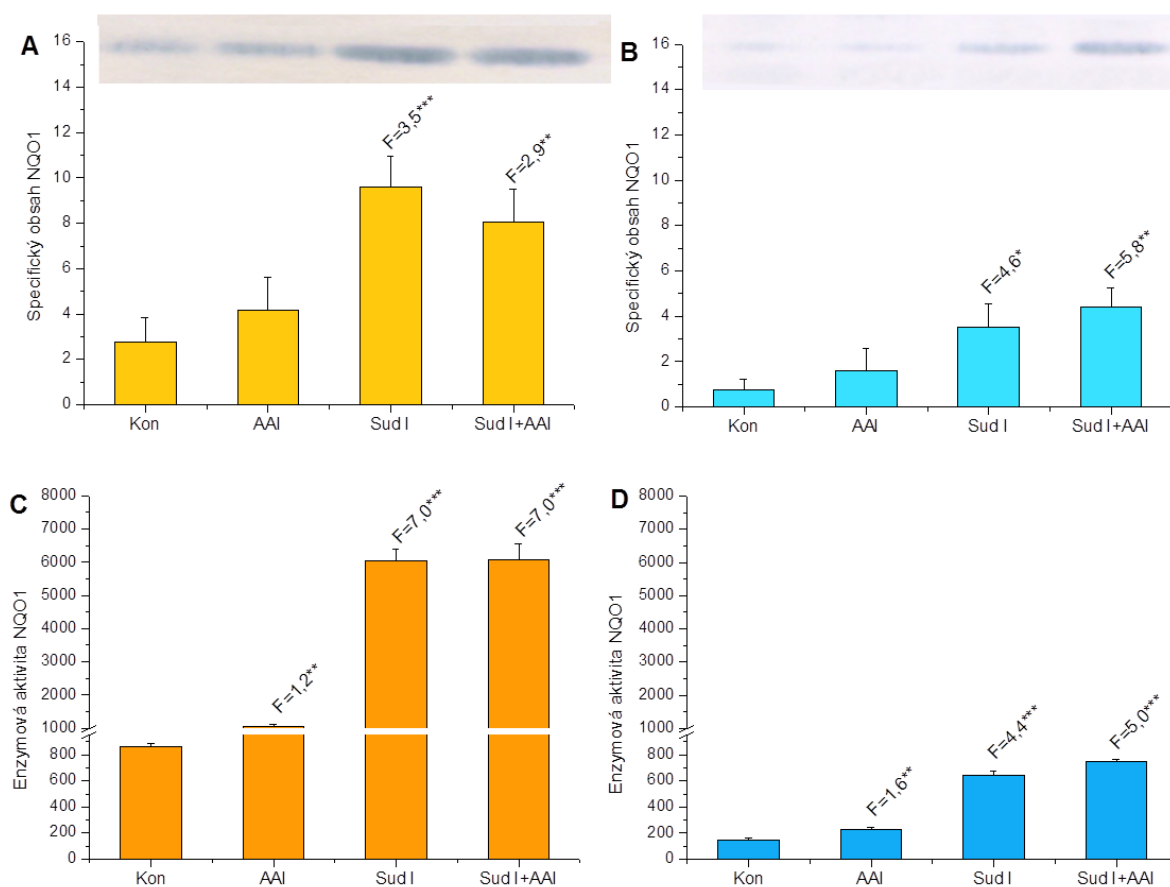
V játrech a ledvině potkanů premedikovaných AAI a kombinací Sudanu I s AAI byla rovněž analysována tvorba aduktů AAI s DNA *in vivo*, konkrétně metodou „³²P-postlabelling“. V obou zmíněných orgánech byly tvořeny adukty AAI s DNA shodné s těmi, které byly přítomny v tkáních pacientů s AAN a BEN, jmenovitě adukty, u nichž byla již dříve potvrzena jejich struktura, tj. dA-AAI, dG-AAI a dA-AAII (Obr. 49). Větší množství aduktů AAI s DNA bylo detekováno v játrech, která jsou hlavním biotransformačním orgánem. Podání Sudanu I před AAI vedlo k 2,5násobnému poklesu tvorby těchto aduktů, a to jak v játrech, tak v ledvině studovaných zvířat (Obr. 49). Indukce CYP1A1/2 Sudanem I tedy výsledně vedla ke snížení genotoxicity AAI.



Obr. 49: Tvorba aduktů AAI s DNA v játrech a ledvině potkanů premedikovaných AAI a kombinací Sudanu I (Sud I) a AAI. Stanovení byla provedena metodou „³²P-postlabelling“. Hodnoty jsou průměrem ze tří stanovení; *** $p < 0,001$. RAL, relativní značení aduktů. F, faktor představující násobek zvýšení množství aduktů s DNA oproti množství aduktů u zvířat premedikovaných pouze AAI. Vložený obrázek představuje autoradiogram aduktů AAI s DNA v játrech potkanů vystavených AAI.

Vedle silných indukčních efektů Sudanu I na expresi CYP1A1/2 je tato sloučenina známá rovněž jako induktor NQO1 (Stiborová *et al.*, 2013b). V dalších experimentech proto bylo studováno, jak se tento jeho indukční potenciál projeví i po působení s AAI. Rovněž bylo sledováno, zda indukce Sudanem I ovlivní aktivaci AAI za tvorby aduktů s DNA. Stanovené exprese a enzymové aktivity NQO1, enzymu majoritně odpovědného

za tvorbu aduktů AAI s DNA *in vitro* a *in vivo*, skutečnost poklesu tvorby aduktů s DNA po podání Sudanu I před AAI, neobjasní. Proteinová exprese NQO1 v játrech i ledvině byla indukována jak Sudanem I samotným, tak kombinací Sudanu I a AAI, a to ve srovnání s kontrolními zvířaty i se zvířaty vystavenými AAI samotné (**Obr. 50A**). Podobné výsledky byly zjištěny i v ledvině, kde indukce expresní hladiny NQO1 po podání Sudanu I, resp. Sudanu I a AAI byla dokonce vyšší než v játrech (**Obr. 50B**). Nadto, enzymové aktivity NQO1 s těmito výsledky zcela korespondovaly (**Obr. 50CD**). Snížená tvorba aduktů AAI s DNA není tedy výsledkem zvýšené exprese NQO1, resp. její enzymové aktivity v játrech a ledvině, ale zřejmě odpovídá působení CYP1A1 a 1A2.



Obr. 50: Expresní hladiny proteinu NQO1 (**A** a **B**) a její enzymová aktivita (**C** a **D**) v jaterních (**A** a **C**) a ledvinných (**B** a **D**) cytosolech izolovaných z potkanů premedikovaných Sudanem I (Sud I), AAI a jejich kombinací. Aktivita NQO1 je vyjádřena v nanomol redukováného cytochromu c vztažených na minutu a miligram proteinu. Proteinová exprese NQO1 je vyjádřena v relativních jednotkách AU/mg proteinu. Hodnoty jsou průměrem ze tří stanovení; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ a *** $p < 0,001$. F, faktor představující násobek zvýšení oproti kontrole.

Výsledky získané ze stanovení exprese a enzymových aktivit CYP1A1 (**Obr. 46**, str. 87) a 1A2 (**Obr. 47**, str. 88) podporují závěr, že indukce těchto enzymů vyvolaná působením Sudanu I vede k vyšší detoxikaci AAI na AAIA. Tím se snižují koncentrace AAI v organismu, která je redukčně aktivována za tvorby aduktů s DNA. Tyto výsledky navíc podtrhují úlohu CYP1A1/2 v oxidační detoxikaci AAI *in vivo* v potkaním organismu, která resultuje v modulaci metabolismu AAI vedoucí k ovlivnění množství aduktů tohoto rostlinného alkaloidu s DNA *in vivo*. Ačkoliv množství podané AAI je podstatně vyšší než množství, kterým byli vystaveni pacienti s AAN, a její efekt je tedy nižší, musí být bráno v potaz rovněž dlouhodobé, chronické vystavení pacientů působení AAI. Získané výsledky jsou v souladu s dříve publikovanými studiemi, ve kterých bylo za využití myších transgenních linií *Cyp1a1(-/-)*, *Cyp1a2(-/-)* a *Cyp1a1/2(-/-)* zjištěno, že chybějící gen pro CYP1A1/2 vede ke snížené tvorbě AAIA, zatímco genotoxicita AAI (tvorba aduktů AAI s DNA) je zvýšená (Rosenquist *et al.*, 2010; Arlt *et al.*, 2011). Výsledky získané v předkládané disertační práci rovněž potvrzují závěry, podle kterých je koncentrace kyslíku v tkáni zásadním faktorem, který ovlivňuje rovnováhu mezi redukční aktivací a oxidační detoxikací AAI katalysovanými CYP1A1/2. Pokud probíhá reakce v hypoxickém (anaerobním) prostředí, chová se AAI jako ligand atomu železa ve struktuře hemu b, který je prosthetickou skupinou CYP1A1/2, a je redukčně aktivován. V aerobních podmínkách ovšem reaguje AAI jako klasický substrát těchto enzymů, do kterého je zabudován právě jeden atom kyslíku, což resultuje v *O*-demethylaci AAI za tvorby AAIA (Jeřábek *et al.*, 2012; Stiborová *et al.*, 2005b, 2014).

Získané výsledky ilustrují, že koncentrace kyslíku v tkáních jsou dostatečné k oxidační detoxikaci AAI katalysované CYP1A1/2, která tak převládá nad její bioaktivací *in vivo*. Tyto výsledky jsou rovněž v souladu se studií, která zkoumala tvorbu aduktů AAI s DNA mikrosomálními a cytosolárními enzymy v aerobních podmínkách *in vitro*, která demonstrovala silnou inhibici této reakce v přítomnosti kyslíku (Schmeiser *et al.*, 1997). Na základě těchto výsledků a výsledků dříve publikovaných studií (Arlt *et al.*, 2011a; Stiborová *et al.*, 2012) je zřejmé, že oxidační detoxikace AAI na AAIA katalysovaná CYP1A1/2 převažuje nad jejich funkcí v redukční aktivaci AAI vedoucí k tvorbě aduktů s DNA *in vivo*. Z tohoto hlediska jsou tyto enzymy důležitým cílem dalšího vědeckého bádání, neboť jejich variabilita, včetně genetického polymorfismu může vysvětlit specifickou individuální vnímavost vůči AAI mezi pacienty s AAN, popř. BEN.

4.2 STUDIUM AETOLOGIE BALKÁNSKÉ ENDEMICKÉ NEFROPATHIE

Druhá oblast studovaná v předkládané disertační práci byla zaměřena na příspěvek k dalšímu poznání aetiologie BEN, onemocnění, které se vyskytuje pouze v určitých rurálních oblastech v povodí řeky Dunaje na území Chorvatska, Bosny a Hercegoviny, Srbska, Bulharska a Rumunska (**Obr. 12**, str. 38) (Radovanović, 2002; Trnacević *et al.*, 2002, Janković *et al.*, 2011; Jelaković *et al.*, 2015). V období minulých 60 let byla aetiologie BEN detailně studována celou řadou pracovišť a mezi potenciálními původci tohoto onemocnění byly řazeny nejen AA, ale i mykotoxiny (OTA, citrinin), toxické ionty těžkých kovů a organické látky uvolňované z lignitových podloží endemických oblastí. Nicméně, hypotéza předpokládající, že OTA je majoritním původcem BEN/UUC, byla na počátku 21. století vyloučena Evropským úřadem pro bezpečnost potravin (*European Food Safety Authority, EFSA*), a to především kvůli absenci relevantních vědeckých výsledků prokazujících genotoxicitu OTA (EFSA, 2006).

Na základě posledních komplexních studií byla jednoznačně prokázána klíčová úloha AA ve vývoji BEN/UUC a zejména v UUC. Nicméně je rovněž pravděpodobné, že vývoj tohoto onemocnění je multifaktoriální. Ačkoliv je BEN vyvolána AA podobně jako AAN, nejsou jejich klinické manifestace totožné (Stefanović, 2002; Pfohl-Leszkowicz, 2009). V úvahu tedy přichází další environmentální faktory, které mohou ovlivňovat metabolismus AA v organismu, a tím modulovat vývoj BEN/UUC. Nicméně, do současnosti taková studie chybí. Proto byl v předkládané disertační práci studován vliv některých suspektních environmentálních faktorů považovaných za původce BEN/UUC na metabolismus AA *in vivo* (**kap. 4.2.1**, str. 93) a *in vitro* (**kap. 4.2.2**, str. 103). Výsledky uvedené v této části disertační práce jsou součástí publikací uvedených v **přílohách 6-7**.

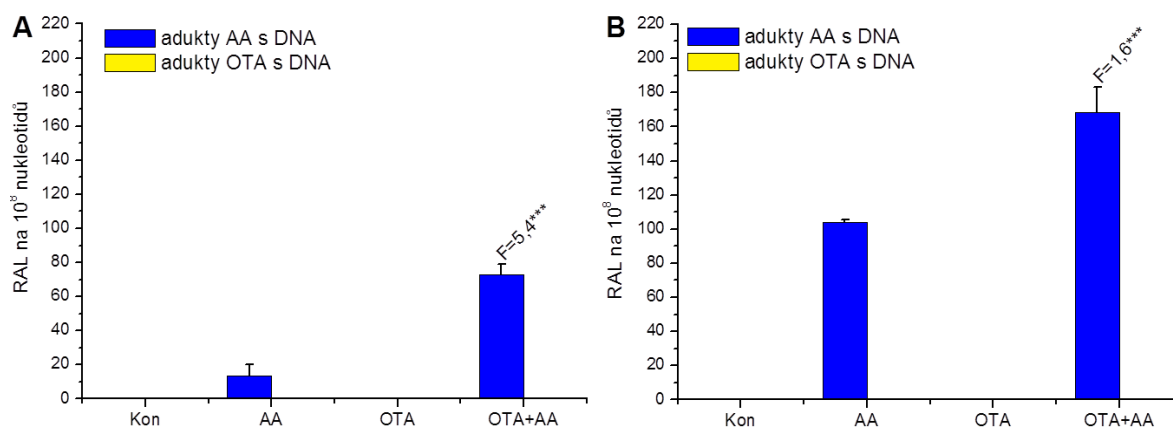
4.2.1 Úloha ochratoxinu A ve vývoji Balkánské endemické nefropathie

V první části studie zkoumající vliv suspektních faktorů na aetologii BEN byl studován vliv OTA na metabolismus AA *in vivo*, a to v experimentálním modelu laboratorního potkana. Abychom objasnili úlohu OTA, mykotoxinu detailně studovaného jako možná příčina BEN/UUC od 70. let minulého století, ve vývoji BEN/UUC, byl modelován experiment, ve kterém byly alespoň částečně simulovány podmínky v endemických oblastech Balkánského poloostrova. Laboratornímu potkanovi byla

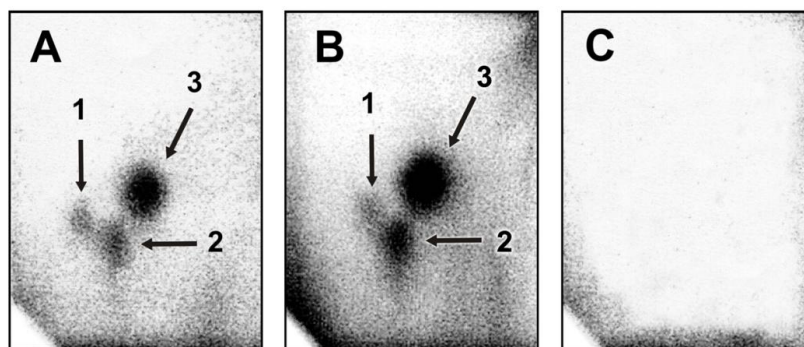
podávána směs AAI a AAII (v poměru přirozeně se vyskytujícím v rostlinách čeledi *Aristolochiaceae*, 33:64) a OTA po dobu 5 dnů (**kap. 3.2.1**, str. 61). Následně byla studována jak na redukční aktivace (tvorba aduktů AA s DNA), tak oxidační detoxikace tohoto rostlinného alkaloidu.

4.2.1.1 Tvorba aduktů aristolochové kyseliny a ochratoxinu A s DNA *in vivo*

Nejprve byla analysována tvorba aduktů s DNA odvozených jak od AA, tak od OTA v játrech a ledvině potkanů vystavených samostatně podaných AA, OTA a jejich kombinaci (**Obr. 51**). Pro stanovení aduktů OTA s DNA byla použita modifikovaná metoda „³²P-postlabelling“ (detailní informace jsou uvedeny v **příloze 6** této práce). V játrech a ledvině potkanů premedikovaných AA a kombinaci AA a OTA byly detekovány adukty AA s DNA shodné s adukty nalezenými v tkáních pacientů s AAN a BEN, tzn. dG-AAI, dA-AAI a dA-AAII (**Obr. 52AB**, str. 95). Naopak, adukty OTA s DNA nebyly v játrech a ledvině nalezeny ani po podání OTA samotného, ani po kombinovaném podání s AA (**Obr. 52C**), což naznačuje, že OTA nereaguje jako klasické genotoxické agens, které je schopné přímé modifikace DNA. Získané výsledky jsou v souladu s dříve publikovanými studiemi, které signalisovaly klíčovou úlohu AA ve vývoji urotheliálních nádorů, které jsou pozdní komplikací BEN (Arlt *et al.*, 2002b; Grollman *et al.*, 2007; Jelaković *et al.*, 2012; Schmeiser *et al.*, 2012; Gökmen *et al.*, 2013).



Obr. 51: Tvorba aduktů AA a/nebo OTA s DNA v játrech (**A**) a ledvině (**B**) kontrolních (nepremedikovaných) potkanů a potkanů premedikovaných AA, OTA a jejich kombinací. Stanovení byla provedena metodou „³²P-postlabelling“. Hodnoty jsou průměrem ze tří stanovení; ****p* < 0,001. RAL, relativní značení aduktů. F, faktor představující násobek zvýšení množství aduktů s DNA oproti množství aduktů u zvířat premedikovaných pouze AA.

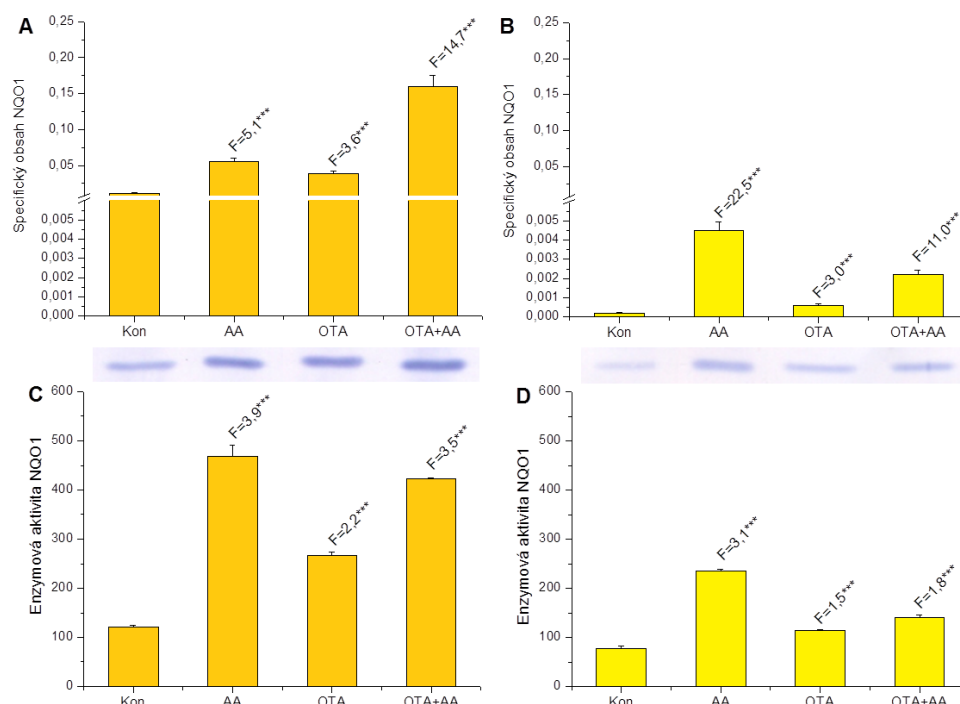


Obr. 52: Autoradiogramy aduktů AA (**A** a **B**) a OTA (**C**) s DNA v játrech potkanů premedikovaných AA (**A**), OTA a AA (**B**) a OTA samotným (**C**). Skvrna 1, dG-AAI; skvrna 2, dA-AAI a skvrna 3, dA-AAII.

Množství aduktů AA s DNA v ledvině, cílovém orgánu genotoxického působení AA, bylo vyšší než v játrech (**Obr. 51**, str. 94). V obou orgánech byly po kombinovaném podání AA a OTA nalezeny vyšší hladiny aduktů AA s DNA: v játrech byl detekován 5,4násobný nárůst a v ledvině 1,6násobný nárůst tvorby aduktů (**Obr. 51**). Na základě těchto výsledků lze předpokládat, že OTA ovlivňuje metabolismus AA, který pak resultuje ve vyšší tvorbu aduktů s DNA. Proto byl dále studován mechanismus, který může být za tento efekt odpovědný. Nejdříve byly sledovány proteinové exprese a enzymové aktivity NQO1, CYP1A1/2, POR a CYP2C6/11, tedy enzymů, které majoritně přispívají k metabolismu AA.

4.2.1.2 Ochratoxin A a aristolochová kyselina indukují NQO1 v játrech a ledvině

Jak již bylo uvedeno výše, na redukční aktivaci AA *in vivo* a *in vitro* majoritně participuje cytosolární reduktasa NQO1 (Chen *et al.*, 2011; Stiborová *et al.*, 2011b; Levová *et al.*, 2012; Krais *et al.*, 2015). Podání AA po dobu 5 dní vedlo ke zvýšení expresních hladin tohoto enzymu jak v játrech, kde byla nalezena ve srovnání s kontrolními zvířaty jeho více než 5násobná indukce, tak v ledvině, kde byl nárůst dokonce více než 22násobný (**Obr. 53AB**, str. 96). Podobně jako expresní hladiny proteinu NQO1, byly i aktivity tohoto enzymu po podání AA zvýšené. Zatímco v játrech bylo nalezeno 3,9násobná zvýšení, v ledvině byla detekována 3,1násobná indukce enzymové aktivity NQO1. (**Obr. 53CD**). Podání samotného OTA vedlo rovněž k indukci jak exprese proteinu, tak enzymových aktivit NQO1 v játrech a ledvině. Ve srovnání s kontrolními (nepremedikovanými) zvířaty byla indukce proteinové exprese NQO1 v játrech takřka 4násobná a v ledvině 3násobná (**Obr. 53AB**), což bylo rovněž v souladu se zjištěnými enzymovými aktivitami (**Obr. 53CD**).

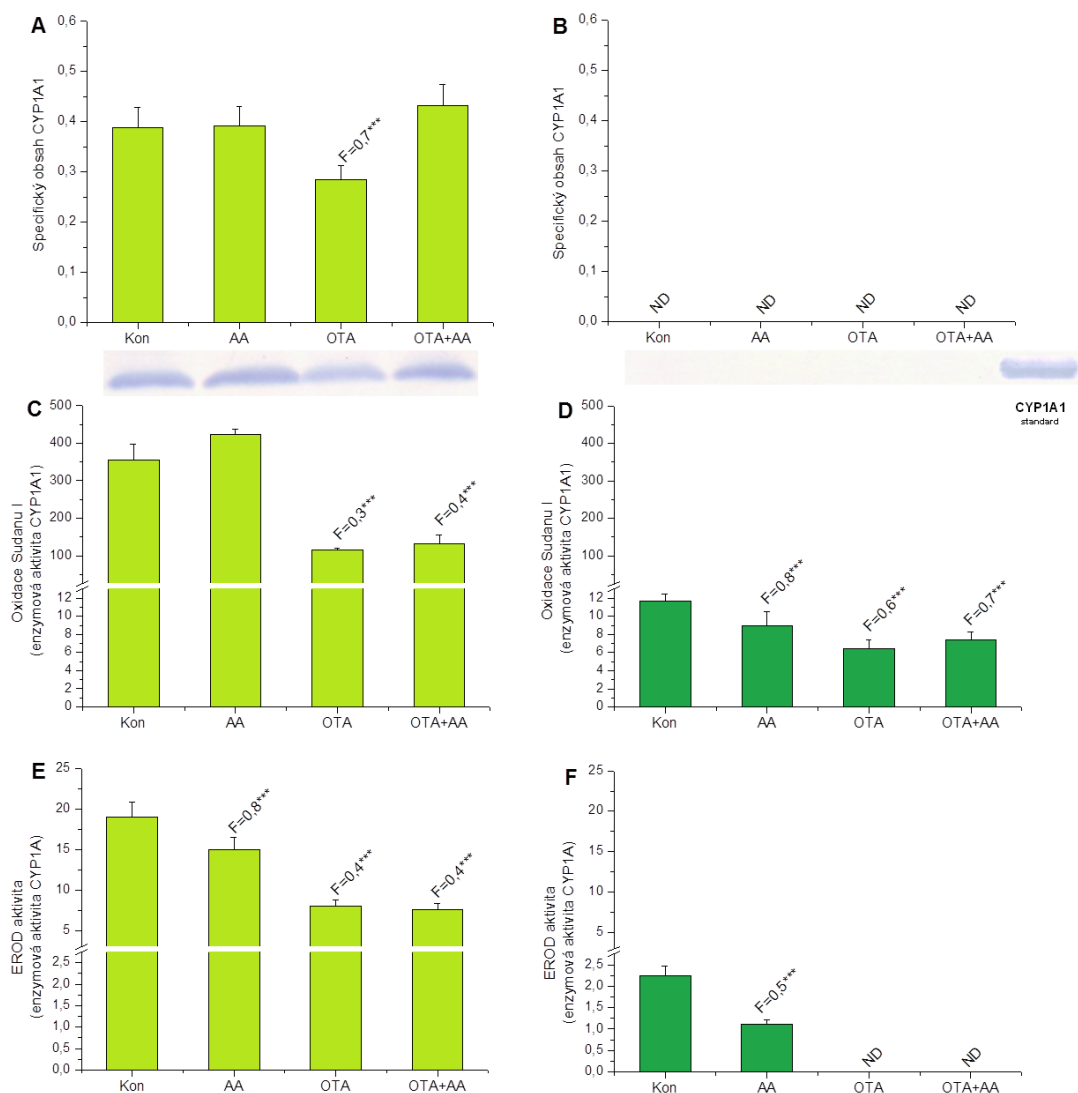


Obr. 53: Expresní hladiny proteinu NQO1 (**A** a **B**) a její enzymová aktivita (**C** a **D**) v jaterních (**A** a **C**) a ledvinných (**B** a **D**) cytosolech izolovaných z potkanů premedikovaných AA, OTA a jejich kombinací. Aktivita NQO1 je vyjádřena v nanomol redukovaného cytochromu c vztažených na minutu a miligram proteinu. Proteinová exprese NQO1 je vyjádřena v relativních jednotkách AU/mg proteinu. Hodnoty jsou průměrem ze tří stanovení; *** $p < 0,001$. F, faktor představující násobek zvýšení oproti kontrole.

Tyto výsledky demonstrují, že OTA může působit jako induktor potkaní NQO1 *in vivo*. V případě kombinovaného podání byla sice ve srovnání s kontrolními zvířaty pozorována indukce NQO1 v játrech a ledvině jak na úrovni proteinové exprese, tak enzymové aktivity, nicméně ve srovnání se zvířaty, kterým byla podána pouze AA, byly expresní hladiny NQO1 v játrech cca 3násobné (**Obr. 53A**). Pozorovaný nárůst exprese NQO1 však nebyl v souladu se stanovenými enzymovými aktivitami (**Obr. 53C**). V ledvině byl po kombinovaném podání AA a OTA pozorován dokonce 2násobný pokles expresních hladin NQO1 oproti indukci zprostředkované AA (**Obr. 53B**), tedy ve srovnání s potkany premedikovanými pouze AA. Tento pokles se projevil rovněž v nižší enzymové aktivitě NQO1 (**Obr. 53D**). Získané výsledky potvrdily schopnost AA indukovat NQO1 v obou zmíněných orgánech popsanou v dřívějších studiích (Arlt *et al.*, 2011b; Levová *et al.*, 2012) a demonstrovaly, že OTA rovněž přispívá k indukci tohoto enzymu. Takové výsledky signalisují, že obě látky mohou indukovat NQO1, nejúčinnější enzym redukčně aktivující AA za tvorby aduktů s DNA, rovněž v tkáních pacientů s BEN, čímž mohou přispívat ke zvýšenému riziku vývoje nádorového onemocnění.

4.2.1.3 Ochratoxin A snižuje aktivitu enzymů detoxikujících AA

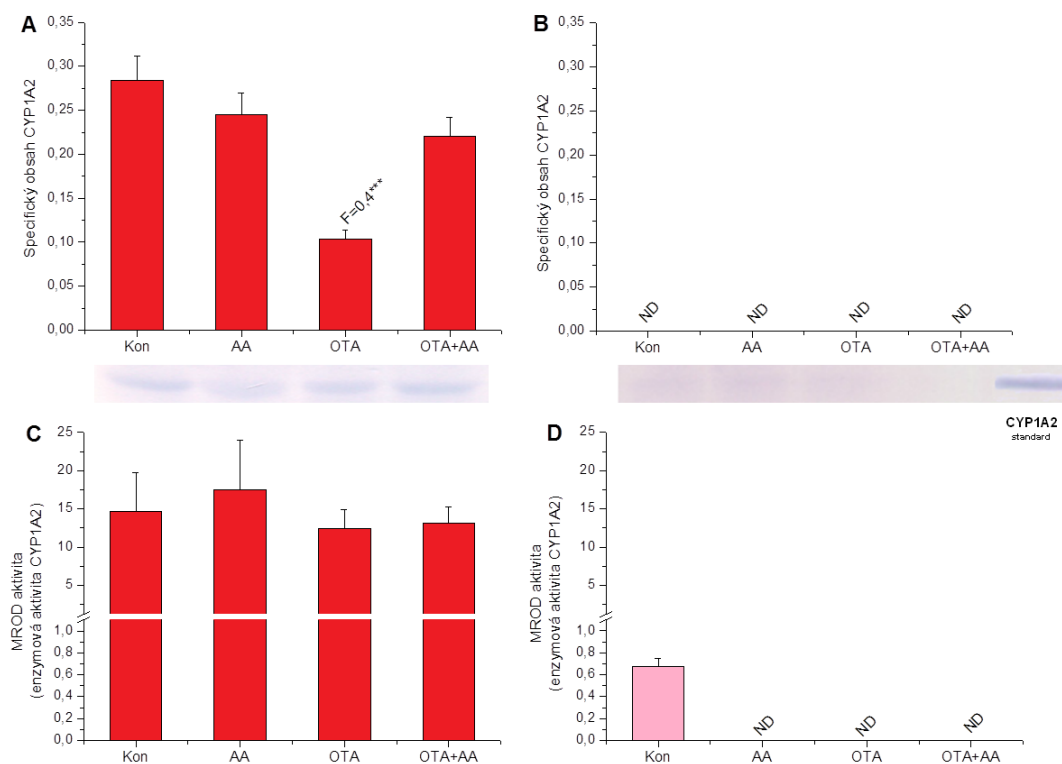
Vzhledem k dvojí úloze CYP1A1/2 v metabolismu AA, tj. schopnosti za anaerobních podmínek redukovat AA a v podmínkách oxidačních ji detoxikovat, byly zkoumány jak expresní hladiny, tak aktivity těchto enzymů v játrech a ledvině studovaných zvířat. Zatímco proteinová exprese CYP1A1 byla v potkaních játrech detekována (**Obr. 54A**), v ledvině bylo její stanovení na pomezí detekčního limitu (**Obr. 54B**) a exprimované množství CYP1A1 proto nebylo v tomto orgánu kvantifikováno.



Obr. 54: Expresní hladiny proteinu CYP1A1 v jaterních (**A**) a ledvinných (**B**) mikrosomech izolovaných z potkanů premedikovaných AA, OTA a jejich kombinací. Enzymová aktivita CYP1A1 v játrech (**C**) a ledvině (**D**) byla stanovena jako schopnost oxidovat Sudan I (vyjádřena v pmol celkových hydroxylovaných derivátů/min/mg proteinu). Enzymová aktivita CYP1A v játrech (**E**) a ledvině (**F**) byla stanovena jako EROD (vyjádřena v pmol resorufinu/min/mg proteinu). Proteinová exprese CYP1A1 je vyjádřena v relativních jednotkách AU/mg proteinu. Hodnoty jsou průměrem ze tří stanovení; *** $p < 0,001$. F, faktor představující násobek zvýšení oproti kontrole. ND, nedetekováno.

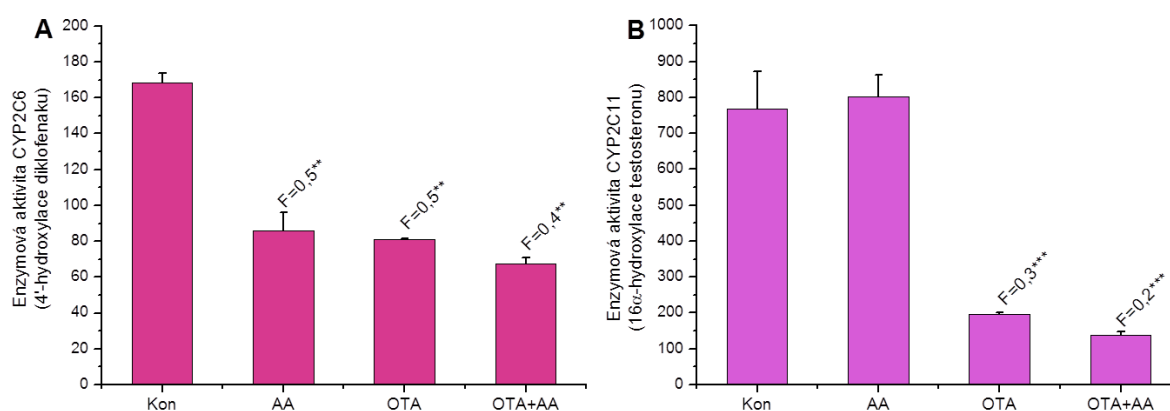
Na základě výsledků detekce expresních hladin CYP1A1 v játrech není pravděpodobné, že OTA samotný, popř. v kombinaci s AA ovlivňuje expresi CYP1A1 v tomto orgánu. Nicméně, výsledky ze stanovení enzymových aktivit CYP1A1 (oxidace Sudanu I) a CYP1A (EROD) v játrech a ledvině ukazují, že jak samotné podání OTA, tak kombinované podání OTA a AA vedlo ke statisticky významnému poklesu těchto enzymových aktivit v obou orgánech (**Obr. 54C-F**, str. 97). Na základě těchto skutečností je pravděpodobné, že zóny detekované po stanovení metodou elektropřenosu na membránu („Western blotting“) neodpovídají přesně expresi CYP1A1 a stanovení enzymové aktivity představuje vhodnější nástroj k určení proteinové exprese sledovaných enzymů.

Expresní hladiny CYP1A2 byly detekovány pouze v játrech, což je ve shodě se skutečností, že se jedná o takřka výlučně hepatální protein (Rendić & DiCarlo, 1997). Podání samotného OTA rezultovalo v 2,7násobné snížení proteinové exprese CYP1A2, nicméně obecně OTA ani sám, ani v kombinaci s AA neovlivňoval expresní hladiny CYP1A2 a enzymovou aktivitu stanovenou jako MROD (**Obr. 55**).



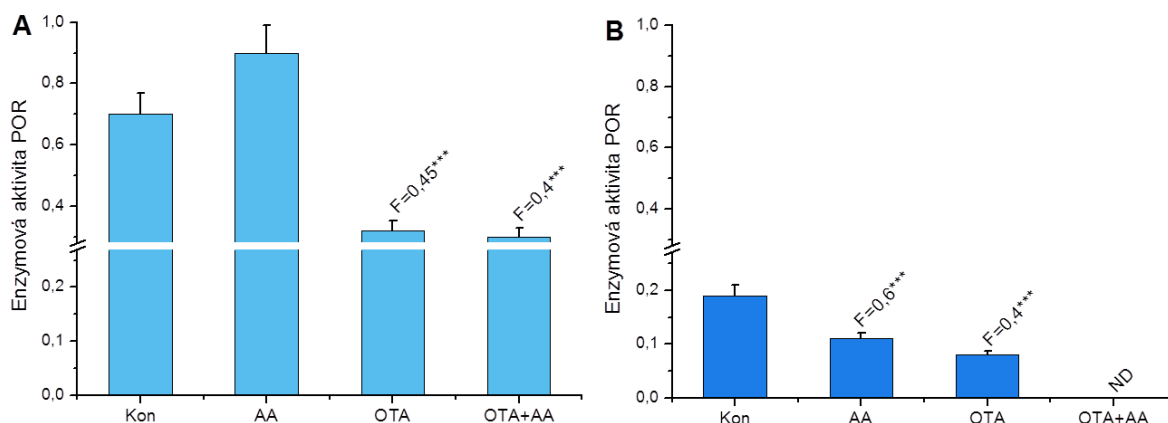
Obr. 55: Expresní hladiny proteinu CYP1A2 v jaterních (**A**) a ledvinných (**B**) mikrosomech izolovaných z potkanů premedikovaných AA, OTA a jejich kombinací. Enzymová aktivita CYP1A2 v játrech (**C**) a ledvině (**D**) byla stanovena jako MROD (vyjádřena v pmol resorufinu/min/mg proteinu). Proteinová exprese CYP1A2 je vyjádřena v relativních jednotkách AU/mg proteinu. Hodnoty jsou průměrem ze tří stanovení; *** $p < 0,001$. F, faktor představující násobek zvýšení oproti kontrole. ND, nedetekováno.

Vzhledem k významu CYP2C v detoxikaci AAI na AAIa (**kap. 4.1.2.1 a 4.1.2.2**, str. 80 a 83) bylo sledováno ovlivnění aktivit CYP2C působení AA a OTA podávaných experimentálními zvířaty. Enzymová aktivita CYP2C11 byla po podání OTA samotného i v kombinaci s AA významně snížena ve srovnání s kontrolními zvířaty, a to až 5,2násobně v případě kombinovaného podání OTA a AA. Nicméně premedikace samotnou AA významně aktivitu CYP2C11 neovlivnila (**Obr. 56B**). Podobné výsledky byly zjištěny rovněž v případě enzymové aktivity CYP2C6, neboť OTA podaný samostatně 2násobně snížil aktivitu tohoto enzymu a kombinované podání OTA a AA rezultovalo dokonce v její 2,5násobný pokles ve srovnání s kontrolními zvířaty (**Obr. 56A**). Na rozdíl od enzymové aktivity CYP2C11, aktivita CYP2C6 byla snížena rovněž podáním samostatné AA.



Obr. 56: Enzymové aktivity CYP2C6 (**A**) a CYP2C11 (**B**) v jaterních mikrosomech izolovaných z potkanů premedikovaných AA, OTA a jejich kombinací. Aktivita CYP2C6 je vyjádřena v pmol 4'-hydroxydiclofenaku vztažených na minutu a mg proteinu a aktivita CYP2C11 je uvedena v nmol 16α-hydroxytestosteronu vztažených na minutu a mg proteinu. Hodnoty jsou průměrem ze tří stanovení; ** $p < 0,01$ a *** $p < 0,001$. F, faktor představující násobek zvýšení oproti kontrole.

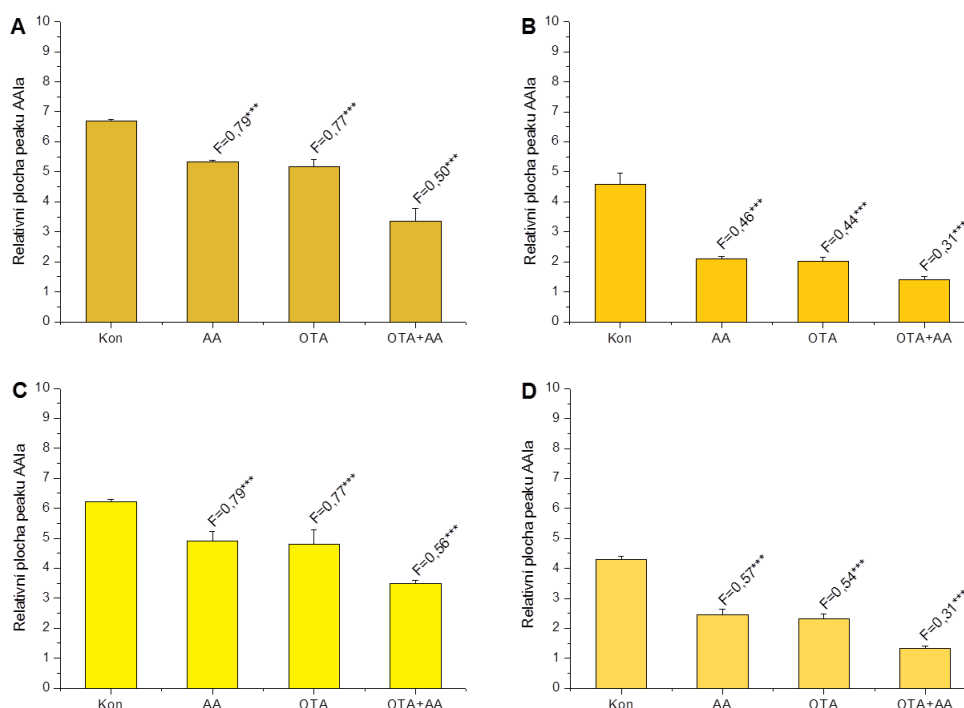
Vedle enzymových aktivit CYP1A1/2 a CYP2C6/11 byla stanovena také aktivita POR, reduktasy, která je nedílnou součástí systému MFO a která tak může modulovat aktivitu CYP v biotransformačních reakcích. Získané výsledky demonstrují schopnost OTA inhibovat enzymovou aktivitu POR jak v játrech, tak v ledvině (**Obr. 57**, str. 99). V játrech bylo po podání jak samotného OTA, tak kombinace OTA a AA detekováno až 2,3násobné snížení aktivity POR (**Obr. 57A**) a v ledvině byla pozorována dokonce totální inhibice enzymové aktivity POR po kombinovaném podání OTA a AA (**Obr. 57B**).



Obr. 57: Enzymová aktivita POR v jaterních (**A**) a ledvinných (**B**) mikrosomech izolovaných z potkanů premedikovaných AA, OTA a jejich kombinací. Aktivita POR je vyjádřena v nanomol redukovaného cytochromu c vztažených na minutu a miligram proteinu. Hodnoty jsou průměrem ze tří stanovení; *** $p < 0,001$. F, faktor představující násobek změny oproti kontrole. ND, nedetekováno.

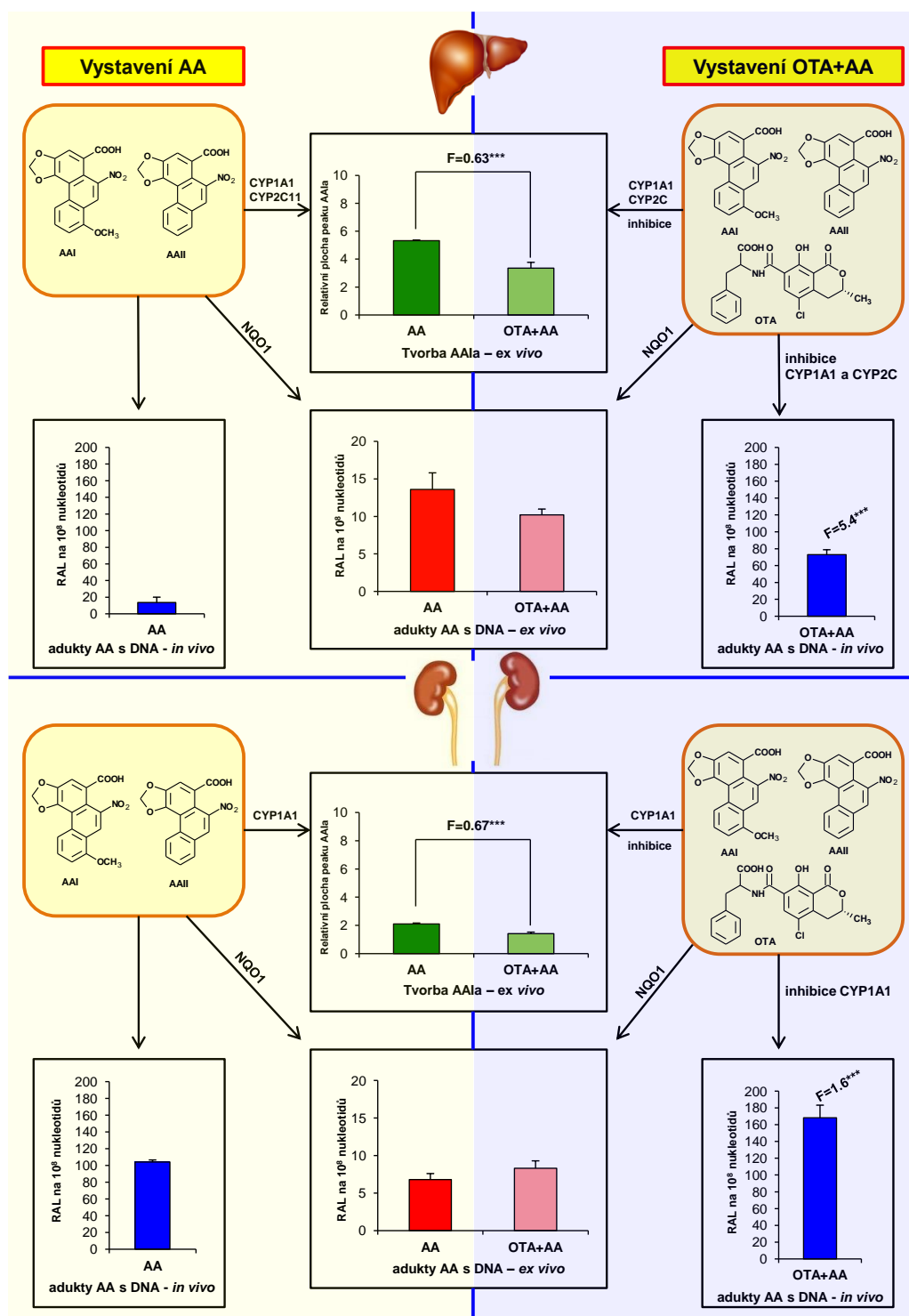
4.2.1.4 Vliv ochratoxinu A a aristolochové kyseliny na detoxikaci AA a AAI

Dalším krokem v naší studii bylo testování schopnosti jaterních a ledvinných mikrosomů oxidačně detoxikovat AA, resp. AAI na AAIa *ex vivo*. Ačkoliv AAI je *O*-demetylována na AAIa, AAI, další hlavní složka přírodní směsi AA, tuto reakci nepodstupuje a zdá se, že je v organismu pouze redukčně aktivována za tvorby *N*-hydroxyaristolaktamu II (Schmeiser *et al.*, 1986, Chan *et al.*, 2006). Nicméně, všechny studované mikrosomy oxidovaly AA/AAI za tvorby AAIa (**Obr. 58**, str. 101). Podání AA zvířatům snížilo schopnost jaterních mikrosomů tvořit AAIa o 21 %, podání samotného OTA o 23 % a kombinované podání OTA a AA dokonce vedlo pouze k 50% tvorbě AAIa (**Obr. 58A**). Tato inhibice byla patrná rovněž při oxidaci AA ledvinnými mikrosomy, kdy kombinované podání OTA a AA vedlo až k ~70% snížení tvorby AAIa (**Obr. 58B**). Při oxidaci čisté AAI bylo pozorováno snížení míry její *O*-demethylace jak jaterními, tak ledvinnými mikrosomy, přičemž nejvýraznější byla pozorována v mikrosomech izolovaných ze zmíněných orgánů potkanů premedikovaných kombinací OTA a AA. V játrech byl tento pokles tvorby AAIa 1,8násobný a ledvinách dokonce 3,1násobný (**Obr. 58CD**).



Obr. 58: O-demethylace AA (**A** a **B**) a AAI (**C** a **D**) na AAIA katalyzovaná jaterními (**A** a **C**) a ledvinnými (**B** a **D**) mikrosomy izolovanými z potkanů premedikovaných AA, OTA a jejich kombinací. Tvorba AAIA je vyjádřena jako relativní plocha peaku vztažená na minutu a mg proteinu. Hodnoty jsou průměrem ze tří stanovení; *** $p < 0,001$. F, faktor představující násobek zvýšení oproti kontrole.

Získané výsledky jsou v souladu se stanovenými enzymovými aktivitami CYP1A1/2, POR a zejména CYP2C11. Tyto skutečnosti signalisují, že OTA vede k inhibici aktivit základních potkaních enzymů detoxikujících AA, čímž nepřímo přispívá ke zvýšení genotoxického působení (tvorbě aduktů AA s DNA) tohoto rostlinného alkaloidu. Na základě těchto výsledků soudíme, že zvýšená tvorba kovalentních aduktů AA s DNA v játrech a ledvině potkanů vystavených kombinaci OTA a AA *in vivo* může být výsledkem nejen zvýšené proteinové exprese NQO1 ve zmíněných orgánech, ale rovněž inhibice enzymů oxidačně detoxikujících AA, tj. CYP1A1, 1A2 a zejména CYP2C6 a 2C11, která byla vyvolána působením OTA. Vzhledem ke snížené detoxikaci AA (tvorbě AAIA) zůstává v organismu vyšší koncentrace AA, která může být redukčně aktivována za tvorby kovalentních aduktů s DNA *in vivo*. Výsledky získané v této studii poprvé demonstrují schopnost OTA ovlivnit metabolismus AA, a tím přispívat k vyššímu riziku vývoje BEN/UUC, a to navzdory skutečnosti, že podávané dávky OTA byly podstatně vyšší než dávky, kterým jsou vystaveni obyvatelé z postižených oblastí (Yordanova *et al.*, 2010), avšak jejich vystavení je dlouhodobé, ba chronické. Působení OTA na metabolismus AA v potkaním organismu je přehledně shrnuto na **Obr. 59** (str. 102).



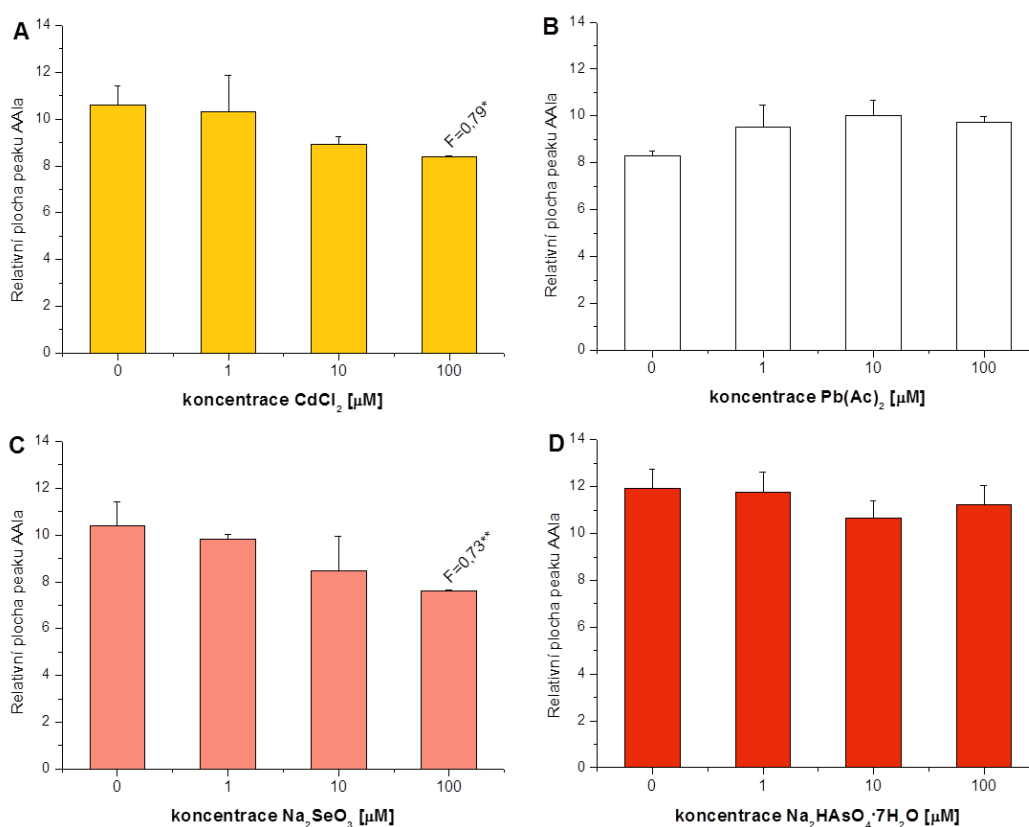
Obr. 59: Schematické shrnutí ilustrující vliv podání OTA na metabolismus AA v potkanech. Inhibice CYP1A1 a CYP2C6/11 v jaterních mikrosomech a inhibice CYP1A1 ledvinných mikrosomech vyvolaná kombinovaným podáním OTA a AA rezultovala ve snížení tvorby AAIa v obou orgánech, což vedlo ke zvýšeným koncentracím AAI v organismu. Tato nedetoxikovaná AAI mohla být následně aktivována za tvorby aduktů s DNA *in vivo*. Tvorba aduktů AA s DNA *ex vivo* potkaními cytosoly nevykazovala signifikantní změny. F, faktor představující násobek zvýšení oproti množství aduktů u zvířat premedikovaných pouze AA. Porovnání bylo analysováno Studentovým *t*-testem: $***p < 0,001$. RAL, relativní značení aduktů.

4.2.2 Studium dalších hypotetických faktorů ovlivňujících vývoj

Balkánské endemické nefropatie

V další části studie zkoumající aetiologii BEN byl studován vliv ostatních suspektních environmentálních faktorů na oxidační *O*-demethylaci AAI na AAIA *in vitro*, konkrétně toxických iontů těžkých kovů, vybraných organických sloučenin a OTA. Studován byl rovněž vliv těchto látek na biotransformační enzymy zahrnuté do oxidačního metabolismu AAI, tj. na CYP1A1/2 a CYP2C6/11.

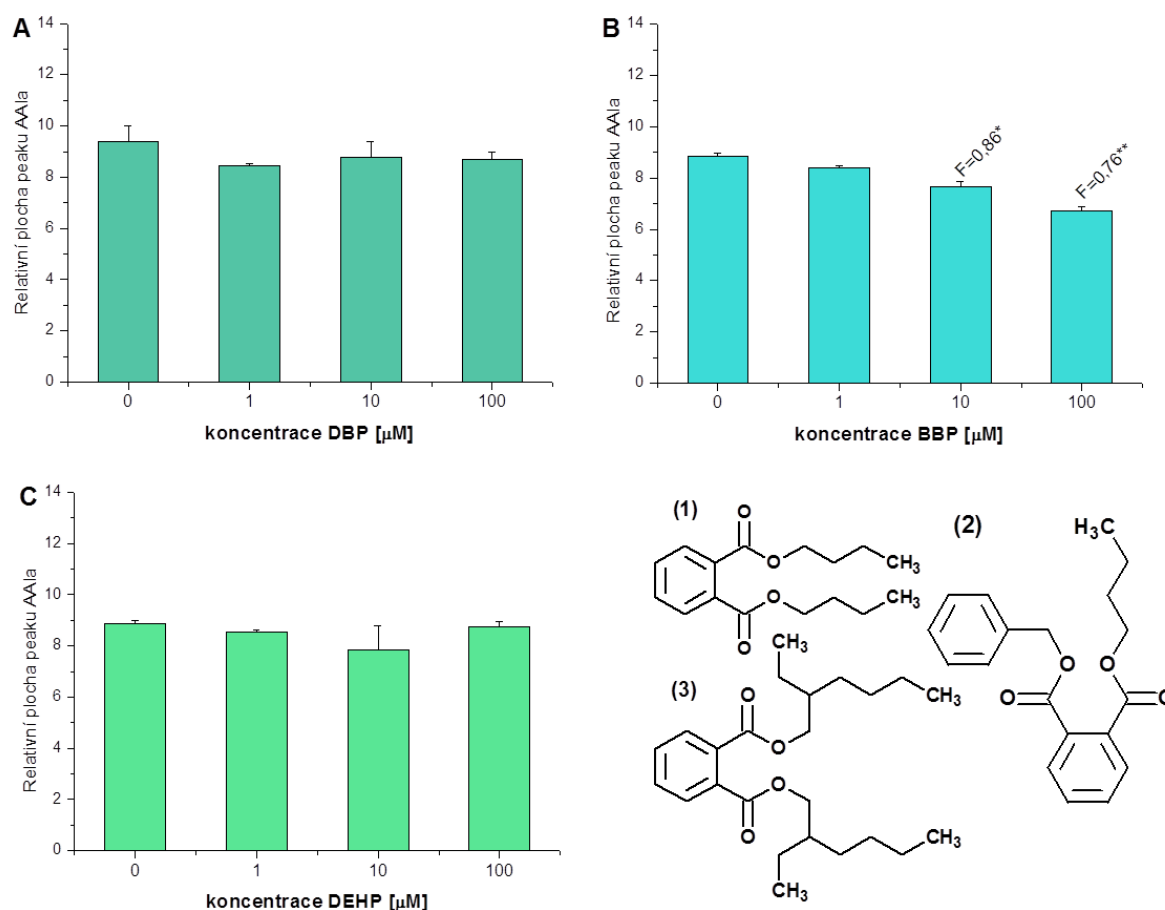
Na základě publikovaných epidemiologických studií byly vybrány ionty těžkých kovů, resp. polokovů a organických látek, jejichž koncentrace v endemických oblastech byly podstatně zvýšené (Karmaus *et al.*, 2008; Yordanova *et al.*, 2010; Maharaj *et al.*, 2014). V předkládané disertační práci byly testovány ionty kadmia (CdCl_2), olova [$\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, $\text{Pb}(\text{Ac})_2$], selenu (Na_2SeO_3) a arsenu ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). Z organických látek uvolňovaných z lignitového podloží byly vybrány dibutylftalát (DBP), bis(2-ethylhexyl)ftalát (DEHP) a butylbenzylftalát (BBP) (Obr. 61D, str. 104).



Obr. 60: Oxidace AAI na AAIA potkaními jaterními mikrosomy v přítomnosti CdCl_2 (A), $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ [$\text{Pb}(\text{Ac})_2$, B], Na_2SeO_3 (C) a $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (D). Tvorba AAIA je vyjádřena jako relativní plocha peaku vztažená na minutu a mg proteinu. Hodnoty jsou průměrem ze tří stanovení; * $p < 0,05$ a ** $p < 0,01$. F, faktor představující násobek zvýšení oproti kontrole bez iontů studovaných těžkých kovů a polokovů.

4.2.2.1 Vliv vybraných iontů těžkých kovů a polokovů na detoxikaci AAI *in vitro*

Nejprve byl studován vliv iontů kadmia, olova, arsenu a selenu na oxidační detoxikaci AAI na AAIA *in vitro* katalysovanou potkaními jaterními mikrosomy. Koncentrace studovaných látek byly určeny tak, aby byly desetkrát menší nebo větší než koncentrace použité AAI, popř. stejné. Zatímco $\text{Pb}(\text{Ac})_2$ a $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ tvorbu AAIA neovlivňovaly, ionty kadmia a selenu snižovaly oxidaci AAI o 21 % (CdCl_2) a o 27 % (Na_2SeO_3). Nicméně, inhibice tvorby AAIA byly pozorovány až při koncentraci kadmia a selenu, která byla desetkrát vyšší než koncentrace AAI, tj. 100 μM (Obr. 60, str. 103).



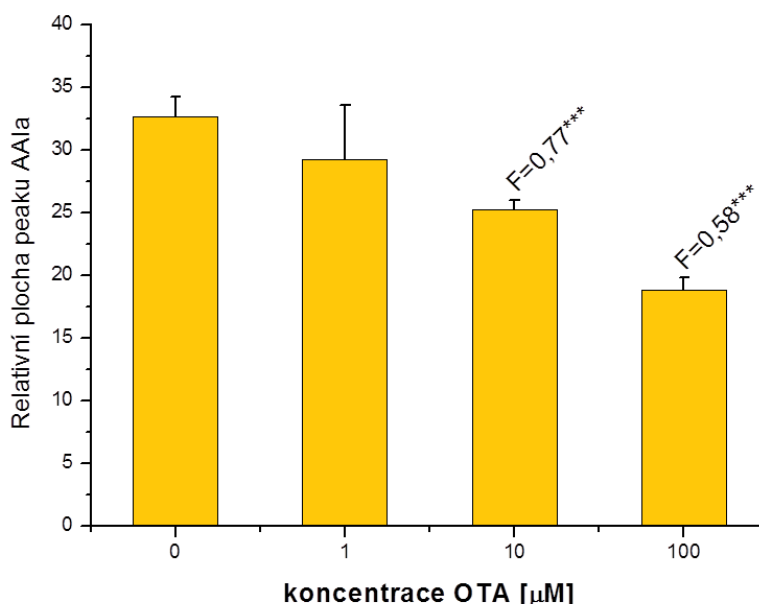
Obr. 61: Oxidace AAI na AAIA potkaními jaterními mikrosomy v přítomnosti DBP (A), BBP (B) a DEHP (C). Tvorba AAIA je vyjádřena jako relativní plocha peaku vztahovaná na minutu a mg proteinu. Hodnoty jsou průměrem ze tří stanovení; * $p < 0,05$ a ** $p < 0,01$. F, faktor představující násobek zvýšení oproti kontrole bez studovaných ftalátů. V panelu D jsou uvedeny struktury testovaných látek: (1), DBP; (2), BBP a (3), DEHP.

4.2.2.2 Vliv vybraných ftalátů na detoxikaci AAI *in vitro*

Podobně jako ionty toxických těžkých kovů, byly i vybrané ftaláty (BBP, DBP a DEHP) testovány ve schopnosti ovlivnit *O*-demethylaci AAI na AAIA. V případě studovaných ftalátů vykazoval inhibiční potenciál pouze BBP, který při koncentraci 10 μM snižoval tvorbu AAIA o ~15 % a při koncentraci 100 μM o 25 % (**Obr. 61**, str. 104). Ostatní testované ftaláty DBP a DEHP, které jsou známy jako významné toxické environmentální polutanty (Ferguson *et al.*, 2014; Yan *et al.*, 2015), takový efekt na oxidaci AAI na AAIA nevykazovaly.

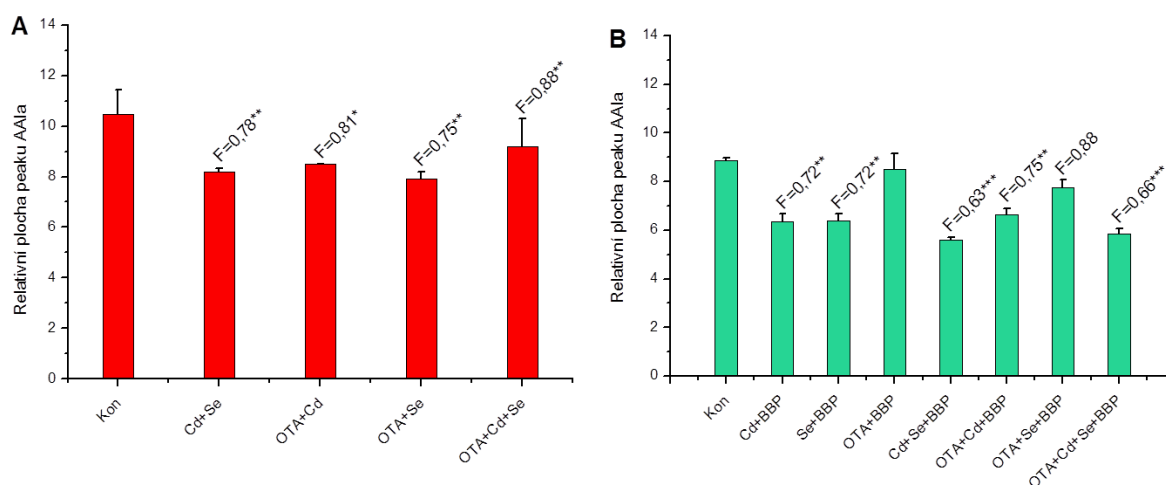
4.2.2.3 Vliv ochratoxinu A a kombinovaný efekt studovaných polutantů na detoxikaci AAI *in vitro*

Kontaminace potravin OTA v endemických oblastech byla potvrzena několika studii, proto byl studován rovněž vliv tohoto silného nefrotoxinu na *O*-demethylaci AAI resultující v tvorbu AAIA. OTA se ukázal být silným inhibitorem oxidace AAI na AAIA, neboť ji inhiboval již při koncentraci 1 μM , nicméně statisticky významný pokles tvorby AAIA byl pozorován až při koncentraci OTA 10 μM (23 %) a 100 μM (42 %) (**Obr. 62**). Tyto výsledky jsou v souladu se studií, která je uvedena v **kap. 4.2.1** (str. 93), která demonstrovala schopnost OTA inhibovat oxidaci AAI na AAIA *in vivo*.



Obr. 62: Oxidace AAI na AAIA potkaními jaterními mikrosomy v přítomnosti OTA. Tvorba AAIA je vyjádřena jako relativní plocha peaku vztažená na minutu a mg proteinu. Hodnoty jsou průměrem ze tří stanovení; *** $p < 0,001$. F, faktor představující násobek zvýšení oproti kontrole v přítomnosti sodného fosfátového pufru.

Vzhledem ke skutečnosti, že obyvatelé žijící v endemických oblastech nejsou vystaveni působení testovaných polutantů samostatně, byl zkoumán rovněž kombinovaný efekt těchto látek na oxidaci AAI na AAIA, konkrétně CdCl_2 , Na_2SeO_3 , BBP a OTA (**Obr. 63**). Navzdory očekávání OTA a BBP dohromady neovlivnily tvorbu AAIA, nicméně působení všech testovaných látek (CdCl_2 , Na_2SeO_3 , BBP a OTA) přidaných do inkubačních směsí vedlo k 34% inhibici *O*-demethylace AAI. Nejsilnější, 37% inhibice oxidační detoxikace AAI *in vitro* byla vyvolána kombinovaným působením OTA s BBP a Na_2SeO_3 (**Obr. 63B**). Obecně nebyl pozorován aditivní efekt ve srovnání s působením polutantů samostatně. Tento fenomen může být vyvolán kompeticí mezi polutanty jako substráty enzymů detoxikujících AAI, nebo intermolekulárními interakcemi, které mohly v závěru vést ke snížení jejich aktuální koncentrace. Nicméně, tyto hypotézy vyžadují další zkoumání.



Obr. 63: Kombinovaný efekt CdCl_2 , Na_2SeO_3 , BBP a OTA na oxidační detoxikaci AAI na AAIA potkaními jaterními mikrosomy. Tvorba AAIA byla studována v přítomnosti CdCl_2 , Na_2SeO_3 a OTA, kde kontrolu představovala inkubace s přidavkem sodného fosfátového pufru (pH 7,4) místo výše zmíněných látek (**A**), a v přítomnosti těchto látek s BBP, kde kontrolu představovala inkubace s přidavkem acetonitrilu, ve kterém byl rozpuštěn BBP, místo výše zmíněných látek (**B**). Tvorba AAIA je vyjádřena jako relativní plocha peaku vztážená na minutu a mg proteinu. Hodnoty jsou průměrem ze tří stanovení; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ a *** $p < 0,001$. F, faktor představující násobek zvýšení oproti kontrole bez přítomnosti studovaných látek.

4.2.2.4 Ochratoxin A, butylbenzylftalát a ionty kadmia a selenu inhibují aktivitu enzymů oxidačně detoxikujících AAI

V následující části studie bylo sledováno ovlivnění aktivit enzymů majoritně participujících na oxidační detoxikaci AAI na AAIA v potkaních játrech, tj. CYP1A1/2 a CYP2C6/11, testovanými látkami, resp. látkami, u kterých byl pozorován potenciál inhibovat tvorbu AAIA *in vitro*. Enzymové aktivity CYP1A (EROD) a CYP1A1 (oxidace Sudanu I) byly inhibovány působením CdCl₂ a BBP, přičemž CdCl₂ snižoval aktivitu CYP1A1 o více než 50 % a BBP dokonce o 75 % (**Tab. 3**). Enzymové aktivity CYP2C6 a CYP2C11 byly ovlivněny zejména působením BBP a OTA. Aktivita CYP2C6, která byla stanovena jako 4'-hydroxylace diklofenaku, byla silně inhibována působením BBP, který ji snižoval o 97 %. BBP rovněž inhiboval enzymovou aktivitu CYP2C11, a to z 32 %, nicméně efektivnější v této inhibici byl OTA, který ji snižoval o 82 %. Aktivita CYP2C11 byla rovněž mírně inhibována Na₂SeO₃, a to o 18 %.

Tabulka 3: Vliv CdCl₂, Na₂SeO₃, BBP a OTA na enzymové aktivity CYP1A1/2 a CYP2C6/11 v potkaních jaterních mikrosomech.

Polutant	EROD (CYP1A)	Oxidace Sudanu I (CYP1A1)	4'-hydroxylace diklofenaku (CYP2C6)	16 α -hydroxylace testosteronu (CYP2C11)
CdCl ₂	83±0,09*	46±4,27**	89±0,44*	NE
Na ₂ SeO ₃	95±0,83	NE	94±5,59	82±1,01**
BBP	83±1,24*	25±1,27***	7±0,26***	68±12,48**
OTA	NE ^a	NE	NE	18±1,24***

Hodnoty jsou vyjádřeny jako procento kontroly bez polutantu. Inkubační směsi obsahovaly 10 μ M AAI; 100 μ M polutant (CdCl₂ a Na₂SeO₃ byly rozpuštěny v destilované vodě; OTA v 0,1 M NaHCO₃, pH 7 a BBP v acetonitrilu); 0,5 mg/ml mikrosomálních proteinů; NADPH-generující systém; fosfátový pufr pH 7,4. Hodnoty jsou průměrem ze tří stanovení, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ a *** $p < 0,001$.

^a NE, žádný efekt.

Na základě těchto výsledků lze konstatovat, že snížení tvorby AAIA v přítomnosti CdCl₂, Na₂SeO₃, BBP a OTA je možné, a to alespoň částečně vysvětlit inhibicí enzymů, které majoritně participují na oxidační detoxikaci AAI, tj. CYP1A1/2 a CYP2C6/11.

Ačkoliv AAN a BEN jsou vyvolány stejnou látkou, tj. AA, nevykazují stejnou klinickou manifestaci. Jedním ze základních rozdílů je rychlost vývoje obou uvedených

onemocnění. Zatímco AAN je charakterisována jako rychle postupující intersticiální fibrosa (Vanherweghem *et al.*, 1993), BEN vykazuje pomalý postupný vývoj (Grollman *et al.*, 2007; Stiborová *et al.*, 2008; Jelaković *et al.*, 2012). Tento fenomen může být vysvětlen např. různým stupněm vystavení AA, protože pacienti s AAN byli vystaveni vysokým dávkám AAI, kdežto pacienti s BEN nízkým, ale zato dlouhodobým dávkám AA (Gökmen *et al.*, 2013). Nicméně, získané výsledky by mohly signalisovat, že tyto rozdíly mezi AAN a BEN mohou být i výsledkem ovlivnění metabolismu AA v organismu, konkrétně snížením oxidační detoxikace tohoto rostlinného produktu, dalšími environmentálními faktory jako jsou sloučeniny kadmia, selenu, BBP a OTA. Ačkoliv byly uvedené látky detekovány ve vodách a lignitovém podloží endemických oblastí (Karmaus *et al.*, 2008; Maharaj *et al.*, 2014), nejsou dosud známe jejich přesné koncentrace v těchto vzorcích. Nelze tedy jednoznačně říci, zda zjištěné koncentrace polutantů, které vykazovaly schopnost inhibovat detoxikaci AAI, představují koncentrace, kterým jsou vystavováni pacienti s BEN/UUC. Nicméně jejich koncentrace resultující v inhibici detoxikace AAI na AAIa jsou obecně násobně vyšší než jejich koncentrace ve složkách životního prostředí, *ergo* jejich působení na vývoj BEN/UUC je minimální, což je v souladu i s výsledky dříve publikovaných prací (Karmaus *et al.*, 2008).

5. ZÁVĚR

V předkládané disertační práci byl studován metabolismus AA, která je původcem dvou závažných ledvinných onemocnění: nefropathie vyvolané AA (AAN) a Balkánské endemické nefropathie (BEN). Charakteristickým znakem obou nefropathií je vývoj urotheliálních nádorů. Ačkoliv je jak AAN, tak BEN vyvolána AA, není jejich klinická manifestace totožná. Jedním z důvodů této diskrepance mohou být rozdílné odpovědi pacientů na vystavení této látky dané rozdílnou expresí enzymů, které participují na metabolismu AA. Předkládaná disertační práce se zaměřila na identifikaci těchto enzymů, tj. enzymů redukčně aktivujících AA za tvorby aduktů s DNA a oxidačně detoxikujících tuto látku za tvorby AAIA. V předkládané práci byla rovněž studována aetiologie BEN/UUC, konkrétně úloha ostatních environmentálních faktorů, které by mohly vývoj tohoto onemocnění ovlivňovat prostřednictvím modulace metabolismu AA.

Získané výsledky jednoznačně prokazují zásadní úlohu cytosolární reduktasy NQO1 v bioaktivaci AAI resultující v tvorbu aduktů AAI s DNA nejen v podmínkách *in vitro*, ale rovněž *in vivo*. V menší míře jsou to pak mikrosomální enzymy, cytochromy P450 (CYP) 1A1 a 1A2. Originálním poznatkem, který nebyl v literatuře dosud popsán, je zjištění, že dikumarol je nejen inhibítozem NQO1 *in vitro* a *in vivo*, ale rovněž induktorem tohoto enzymu. Na detoxikaci AAI na AAIA participují oxidační reakce katalysované CYP. V předkládané práci bylo zjištěno, že v lidských játrech přispívají k detoxikaci AAI zejména CYP1A2 > CYP2C9 > CYP3A4 > CYP1A1, zatímco v potkaních játrech je AAI detoxikována převážně CYP2C (83 %). Důležitým poznatkem je skutečnost, že CYP1A1/2 katalysují v podmínkách *in vivo* detoxikační reakce, tzn. jejich potenciál redukčně aktivovat AAI za tvorby aduktů s DNA je *in vivo* potlačen.

V rámci studie zkoumající aetologii BEN/UUC bylo zjištěno, že mykotoxin OTA moduluje metabolismus AA v potkaním organismu, konkrétně potencuje tvorbu aduktů AA s DNA *in vivo* a snižuje rovněž detoxikaci tohoto rostlinného alkaloidu. Ostatní studované suspektní environmentální faktory, jmenovitě ionty kadmia, olova, arsenu a selenu a ftaláty (DBP, BBP a DEHP) ovlivňovaly metabolismus AAI minimálně.

Výsledky presentované v předkládané disertační práci představují originální poznatky o funkci enzymů, které metabolisují rostlinný alkaloid AA, a významně přispívají k poznání molekulárního mechanismu vývoje AAN a BEN a problematice AA obecně. Některé výsledky jsou vědecké obci představovány poprvé a jsou plně publikovány ve vědeckých časopisech s impaktním faktorem. Uvedené publikace jsou součástí disertační práce jako **přílohy 1-7**.

Seznam použité literatury

- Abedin, Z., Sen, S., Morocco, E., Field, J. (2011). *p53 and Ras Mutation in Cancer and Experimental Carcinogenesis*. In: T.M. Penning (ed.) *Chemical Carcinogenesis*. Humana Press. New York. 401-422.
- Abel, E.L., Angel, J.M., Kiguchi, K., DiGiovanni, J. (2009). Multi-stage chemical carcinogenesis in mouse skin: fundamentals and applications. *Nat. Protoc.* 4(9): 1350-1362.
- Abel, E.L., DiGiovanni, J. (2011). *Multistage Carcinogenesis*. In: T.M. Penning (ed.) *Chemical Carcinogenesis*. Humana Press. New York. 27-53.
- Abouzied, M.M., Horvath, A.D., Podlesny, P.M., Regina, N.P., Metodiev, V.D., Kamenova-Tozeva, R.M., Niagolova, N.D., Stein, A.D., Petropoulos, E.A., Ganev, V.S. (2002). Ochratoxin A concentrations in food and feed from a region with Balkan Endemic Nephropathy. *Food Addit. Contam.* 19(8): 755-764.
- Akindele, A.J., Wani, Z., Mahajan, G., Sharma, S., Aigbe, F.R., Satti, N., Adeyemi, O.O., Mondhe, D.M. (2015). Anticancer activity of *Aristolochia ringens* Vahl. (Aristolochiaceae). *J. Tradit. Complement. Med.* 5(1): 35-41.
- Amézqueta, S., González-Peñas, E., Murillo, M., de Cerain, A.L. (2005). Occurrence of ochratoxin A in cocoa beans: effect of shelling. *Food Addit. Contam.* 22(6): 590-596.
- André, É. (1870) *l'Illustration horticole. Revue mensuelle des serres et des jardins* 17.
- Angerhofer, C.K., Guinaudeau, H., Wongpanich, V., Pezzuto, J.M., Cordell, G.A. (1999). Antiplasmodial and cytotoxic activity of natural bisbenzylisoquinoline alkaloids. *J. Nat. Prod.* 62(1): 59-66.
- Apers, S., Vlietinck, A., Pieters, L. (2003). Lignans and neolignans as lead compounds. *Phytochemistry Rev.* 2: 201-217.
- Ardalan, M.R., Khodaie, L., Nasri, H., Jouyban, A. (2015). Herbs and hazards: risk of aristolochic acid nephropathy in Iran. *Iran J. Kidney Dis.* 9(1): 14-17.
- Arlt, V.M., Wiessler, M., Schmeiser, H.H. (2000). Using polymerase arrest to detect DNA binding specificity of aristolochic acid in the mouse H-ras gene. *Carcinogenesis* 21(2): 235-242.
- Arlt, V.M., Schmeiser, H.H., Pfeifer, G.P. (2001). Sequence-specific detection of aristolochic acid-DNA adducts in the human p53 gene by terminal transferase-dependent PCR. *Carcinogenesis* 22(1): 133-140.
- Arlt, V.M., Stiborova, M., Schmeiser, H.H. (2002a). Aristolochic acid as a probable human cancer hazard in herbal remedies. *Mutagenesis.* 17(4): 265-277.
- Arlt, V.M., Ferluga, D., Stiborová, M., Pfohl-Leskowicz A., Vukelić, M., Ceović, S., Schmeiser, H.H., Cosyns, J-P. (2002b). Is aristolochic acid a risk factor for Balkan endemic nephropathy-associated urothelial cancer? *Int. J. Cancer* 101(5): 500-502.
- Arlt, V.M., Stiborová, M., vom Brocke, J., Simões, M.L., Lord, G.M., Nortier, J.L., Hollstein, M., Phillips, D.H., Schmeiser, H.H. (2007). Aristolochic acid mutagenesis: molecular clues to the aetiology of Balkan endemic nephropathy-associated urothelial cancer. *Carcinogenesis* 28(11): 2253-2261.

- Arlt, V.M., Levová, K., Bárta, F., Shi, Z., Evans, J.D., Frei, E., Schmeiser, H.H., Nebert, D.W., Phillips, D.H., Stiborová, M. (2011a). Role of P450 1A1 and P450 1A2 in bioactivation versus detoxication of the renal carcinogen aristolochic acid I: studies in *Cyp1a1*^{-/-}, *Cyp1a2*^{-/-}, and *Cyp1a1/1a2*^{-/-} mice. *Chem. Res. Toxicol.* 24(10): 1710-1719.
- Arlt, V.M., Zuo, J., Trenz, K., Roufosse, C.A., Lord, G.M., Nortier, J.L., Schmeiser, H.H., Hollstein, M., Phillips, D.H. (2011b). Gene expression changes induced by the human carcinogen aristolochic acid I in renal and hepatic tissue of mice. *Int. J. Cancer.* 128(1): 21-32.
- Atanasova, S.Y., von Ahsen, N., Toncheva, D.I., Dimitrov, T.G., Oellerich, M., Armstrong, V.W. (2005). Genetic polymorphisms of cytochrome P450 among patients with Balkan endemic nephropathy (BEN). *Clin. Biochem.* 38(3): 223-228.
- Bakhiya, N., Arlt, V.M., Bahn, A., Burckhardt, G., Phillips, D.H., Glatt, H. (2009). Molecular evidence for an involvement of organic anion transporters (OATs) in aristolochic acid nephropathy. *Toxicology* 264(1-2): 74-79.
- Baltes, M.R., Dubois, J.G., Hanocq, M. (1998). Ethyl acetate extraction procedure and isocratic high-performance liquid chromatographic assay for testosterone metabolites in cell microsomes. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 706(2): 201-207.
- Baltimore, D. (1976). Viruses, polymerases and cancer. *Science* 192(4240):632-636.
- Bamias, G., Boletis, J. (2008). Balkan nephropathy: evolution of our knowledge. *Am. J. Kidney Dis.* 52(3): 606-616.
- Bárta, F. (2012). *Mechanismus karcinogenity a nefrotoxicity aristolochových kyselin*. Diplomová práce. Katedra biochemie Přírodovědecké fakulty University Karlovy v Praze. Praha. 46-47.
- Bárta, F., Levová, K., Hodek, P., Schmeiser, H.H., Arlt, V.M., Stiborová, M. (2015). The effects of heavy metal ions, phthalates and ochratoxin A on oxidation of carcinogenic aristolochic acid I causing Balkan endemic nephropathy. *Neuroendocrinol. Lett.* 36 (Suppl. 1): 13-21.
- Bartha, S.G., Quave, C.L., Balogh, L., Papp, N. (2015). Ethnoveterinary practices of Covasna County, Transylvania, Romania. *J. Ethnobiol. Ethnomed.* 11: 35-56.
- Baudoux, T.E.R., Pozdzik, A.A., Arlt, V.M., De Prez, E.G., Antoine, M-H., Quellard, N., Goujon, J-M., Nortier, J.L. (2012). Probenecid prevents acute tubular necrosis in a mouse model of aristolochic acid nephropathy. *Kidney Int.* 82(10): 1105-1113.
- Bendele, A.M., Carlton, W.W., Krogh, P., Lillehoj, E.B. (1985). Ochratoxin A carcinogenesis in the (C57BL/6J/C3H) F1 mouse. *J. Natl. Cancer Inst.* 75: 733-742.
- Benson, A.M., Hunkeler, M.J., Talalay, P. (1980). Increase of NAD(P)H:quinone reductase by dietary antioxidants: possible role in protection against carcinogenesis and toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77(9): 5216-5220.
- Bernhardt, R. (2006). Cytochromes P450 as versatile biocatalysts. *J. Biotechnol.* 124(1): 128-45.

- Bhattacharjee, P., Bhattacharyya, D. (2013). Characterization of the aqueous extract of the root of *Aristolochia indica*: Evaluation of its traditional use as an antidote for snake bites. *J. Ethnopharmacology* 145(1): 220-226.
- Bhattacharjee, P., Bhattacharyya, D. (2015). An Enzyme from *Aristolochia indica* Destabilizes Fibrin- β Amyloid Co-Aggregate: Implication in Cerebrovascular Diseases. *PLoS One* 10(11): 1-20.
- Bieler, C.A., Stiborova, M., Wiessler, M., Cosyns, J.P., van Ypersele de Strihou, C., Schmeiser, H.H. (1997). 32 P-post-labelling analysis of DNA adducts formed by aristolochic acid in tissues from patients with Chinese herbs nephropathy. *Carcinogenesis* 18(5): 1063-1067.
- Borchert, P., Wislocki, P.G., Miller, J.A., Miller, E.C. (1973). The Metabolism of the Naturally Occurring Hepatocarcinogen Safrole to 1'-Hydroxysafrole and the Electrophilic Reactivity of 1'-Acetoxysafrole. *Cancer Res.* 33(3):575-589.
- Boutwell, R.K. (1976). The biochemistry of preneoplasia in mouse skin. *Cancer Res.* 36: 2631-2635.
- Braicu, O., Pileczki, V., Braicu, C., Achimas-Cadariu, P., Irimie, A., Berindan-Neagoe, I. (2015). p53 siRNA - a therapeutic tool with significant implication in the modulation of apoptosis and angiogenic pathways. *Clujul. Med.* 88(3): 333-337
- Brookes, P., Lawley, P.D. (1964). Evidence for the Binding of Polynuclear Aromatic Hydrocarbons to the Nucleic Acids of Mouse Skin: Relation between Carcinogenic Power of Hydrocarbons and Their Binding to Deoxyribonucleic Acid. *Nature* 202: 781-784.
- Burckhardt, B.C., Burckhardt, G. (2003) Transport of organic anions across the basolateral membrane of proximal tubule cells. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 146: 95-158.
- Burgess, K.S., Singfield, J., Melendez, V., Kevan, P.G. (2004). Pollination biology of *Aristolochia grandiflora* (Aristolochiaceae) in Veracruz, Mexico. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 91(2): 346-356.
- Burke, M.D., Mayer, R.T. (1974). Ethoxyresorufin: direct fluorimetric assay of a microsomal *O*-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholanthrene. *Drug Metab. Dispos.* 2(6):583-588.
- Burke, M.D., Thompson, S., Weaver, R.J., Wolf, C.R., Mayer, R.T. (1994). Cytochrome P450 specificities of alkoxyresorufin *O*-dealkylation in human and rat liver. *Biochem. Pharmacol.* 48(5): 923-936.
- But, P.P-H. (1993). Need for correct identification of herbs in herbal poisoning. *Lancet* 341(8845): 637.
- Colin, P., Koenig, P., Ouzzane, A., Berthon, N., Villers, A., Biserte, J., Rouprêt, M. (2009). Environmental factors involved in carcinogenesis of urothelial cell carcinomas of the upper urinary tract. *BJU Int.* 104(10): 1436-1440.
- Comer, F., Tiwari, H.P., Spenser, I.D. (1969). Biosynthesis of Aristolochic Acid. *Can. J. Chem.* 47(3): 481-487.
- Cook, J.W., Hewett, C.L., Hieger, I. (1933): The isolation of a cancer-producing hydrocarbon from coal tar. *J. Chem. Soc.*, 395-405 .

- Cosyns, J-P, Jadoul, M., Squifflet, J-P., De Plaen, J-F., Ferluga, D., van Ypersele de Strihou, C. (1994). Chinese herbs nephropathy: a clue to Balkan endemic nephropathy? *Kidney Int.* 45(6): 1680-1688.
- Cosyns, J-P., Goebbels, R.M., Liberton, V., Schmeiser, H.H., Bieler, C.A., Bernard, A.M. (1998). Chinese herbs nephropathy-associated slimming regimen induces tumours in the forestomach but no interstitial nephropathy in rats. *Arch. Toxicol.* 72(11): 738-743.
- Cosyns, J-P. (2003). Aristolochic acid and 'Chinese herbs nephropathy': a review of the evidence to date. *Drug Saf.* 26(1): 33-48.
- Creppy, E.E., Rösenthaller, R., Dirheimer, G. (1984). Inhibition of protein synthesis in mice by ochratoxin A and its prevention by phenylalanine. *Food Chem. Toxicol.* 22(11): 883-886.
- Dai, J., Wright, M.W., Manderville, R.A. (2003). Ochratoxin a forms a carbon-bonded C8-deoxyguanosine nucleoside adduct: implications for C8 reactivity by a phenolic radical. *J. Am. Chem. Soc.* 125(13): 3716-3717.
- Dai, X.Y, Huang, X.R., Zhou, L., Zhang, L., Fu, P., Manthey, C., Nikolic-Paterson, D.J., Lan, H.Y. (2016) Targeting c-fms kinase attenuates chronic aristolochic acid nephropathy in mice. *Oncotarget* 7(10): 10841-10856.
- Danihelka, J., Chrtěk Jr., J., Kaplan, Z. (2012). Checklist of Vascular Plants of the Czech Republic. *Preslia* 84: 647-811.
- Debelle, F., Nortier, J., Arlt, V.M., De Prez, E., Vienne, A., Salmon, I., Phillips, D.H., Deschodt-Lanckman, M., Vanherweghem, J-L. (2003). Effects of dexfenfluramine on aristolochic acid nephrotoxicity in a rat model for Chinese-herb nephropathy. *Arch. Toxicol.* 77(4): 218-226.
- Desgrouas, C., Chapus, C., Desplans, J., Travaille, C., Pascual, A., Baghdikian, B., Ollivier, E., Parzy, D., Taudon, N. (2014). *In vitro* antiplasmodial activity of cepharanthine. *Malar. J.* 13: 327
- Dickman, K.G., Sweet, D.H., Bonala, R., Ray, T., Wu, A. (2011). Physiological and molecular characterization of aristolochic acid transport by the kidney. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 338(2): 588-597.
- Do, T.V., Nghiem, T.D., Wanke, S., Neinhuis, C. (2014). *Aristolochia quangbinhensis* (Aristolochiaceae), a new species from Central Vietnam. *PhytoKeys* 33:51-9.
- Edwards, R.J., Murray, B.P., Singleton, A.M., Boobis, A.R. (1991). Orientation of cytochromes P450 in the endoplasmic reticulum. *Biochemistry* 30(1): 71-6.
- EFSA, European Safety Authority (2006). Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to ochratoxin a in food. *EFSA J.* 365: 1-56.
- Van Egmond, H.P., Speijers, G.J.A. (1994). Survey of data on the incidence and levels of ochratoxin A in food and animal feed worldwide. *J. Nat. Toxins* 3: 125-143.
- El Adlouni, C., Pinelli, E., Azémar, B., Zaoui, D., Beaune, P., Pfohl-Leszkowicz, A. (2000). Phenobarbital increases DNA adduct and metabolites formed by ochratoxin A: role of CYP 2C9 and microsomal glutathione-S-transferase. *Environ. Mol. Mutagen.* 35(2): 123-31.

- Ernster, L. (1967). 56. *DT Diaphorase In: Estabrook, R.W., Pullman, M.E. (eds.) Methods in Enzymology: Oxidation and phosphorylation 10*, Academic Press, New York. 309-317.
- Ernster, L., Ljunggren, M., Danielson, L. (1960). Purification and some properties of a highly dicumarol-sensitive liver diaphorase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2(2): 88-92.
- Ernster, L., Navazio, F. (1958). Soluble diaphorases in animal tissues. *Acta Chem. Scand* 12: 595.
- Faucet, V., Pfohl-Leszkowicz, A., Dai, J., Castegnaro, M., Manderville, R.A. (2004). Evidence for covalent DNA adduction by ochratoxin A following chronic exposure to rat and subacute exposure to pig. *Chem. Res. Toxicol.* 17(9): 1289-1296.
- Feder, G.L., Radovanović, Z., Finkelman, R.B. (1991) Relationship between weathered coal deposits and the aetiology of Balkan endemic nephropathy. *Kidney Int. Suppl.* 34: S9-S11.
- Feldmeyer, N., Schmeiser, H.H., Muehlbauer, K.R., Belharazem, D., Knyazev, Y., Nedelko, T., Hollstein, M. (2006). Further studies with a cell immortalization assay to investigate the mutation signature of aristolochic acid in human p53 sequences. *Mutat. Res.* 608(2): 163-168.
- Ferguson, K.K., McElrath, T.F., Meeker, J.D. (2014). Environmental phthalate exposure and preterm birth. *JAMA Pediatr.* 168(1): 61-67.
- Francisco, C.S., Messiano, G.B., Lopes, L.M.X., Tininis, A.G., de Oliveira, J.E., Capellari Jr., L. (2008). Classification of *Aristolochia* species based on GC-MS and chemometric analyses of essential oils. *Phytochemistry* 69(1): 168-175.
- Fuss, E. (2003). Lignans in plant cell and organ cultures: An overview. *Phytochemistry Rev.* 2: 307-320.
- Garfinkel, D. (1958). Studies on pig liver microsomes. I. Enzymic and pigment composition of different microsomal fractions. *Arch. Biochem. Biophys.* 77(2): 493-509.
- Gautier, J.C., Richoz, J., Welti, D.H., Markovic, J., Gremaud, E., Guengerich, F.P., Turesky, R.J. (2001a). Metabolism of ochratoxin A: absence of formation of genotoxic derivatives by human and rat enzymes. *Chem. Res. Toxicol.* 14(1): 34-45.
- Gautier, J.C., Holzhaeuser, D., Markovic, J., Gremaud, E., Schilter, B., Turesky, R.J. (2001b). Oxidative damage and stress response from ochratoxin a exposure in rats. *Free Radic. Biol. Med.* 30(10):1089-1098.
- GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. Přístupné online: <http://globocan.iarc.fr> (přístup 11.1.2016).
- Gökmen, M.R., Cosyns, J-P., Arlt, V.M., Stiborová, M., Phillips, D.H., Schmeiser, H.H., Simmonds, M.S., Cook, H.T., Vanherweghem, J-L., Nortier, J.L., Lord, G.M. (2013). The epidemiology, diagnosis, and management of aristolochic acid nephropathy: a narrative review. *Ann. Intern. Med.* 158(6): 469-477.
- Goldberg, M.C., Feder, G.L., Radovanović, Z. (1994) Correlation of Balkan endemic nephropathy with fluorescent organic compounds in shallow ground water. *Appl. Hydrogeol.* 2: 15-23.

- Goyal, S., Xiao, Y., Porter, N.A., Xu, L., Guengerich, F.P. (2014). Oxidation of 7-dehydrocholesterol and desmosterol by human cytochrome P450 4A1. *J. Lipid. Res.* 55(9): 1933-1943.
- Grollman, A.P., Shibutani, S., Moriya, M., Miller, F., Wu, L., Moll, U., Suzuki, N., Fernandes, A., Rosenquist, T., Medverec, Z., Jakovina, K., Brdar, B., Slade, N., Turesky, R.J., Goodenough, A.K., Rieger, R., Vukelić, M., Jelaković, B. (2007). Aristolochic acid and the etiology of endemic (Balkan) nephropathy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104(29): 12129-12134.
- Grollman, A.P., Jelaković, B. (2007). Role of environmental toxins in endemic (Balkan) nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* 18(11): 2817-2823.
- Grollman, A.P. (2013). Aristolochic acid nephropathy: Harbinger of a global iatrogenic disease. *Environ. Mol. Mutagen.* 54(1): 1-7.
- Grosse, Y., Baudrimont, I., Castegnaro, M., Betbeder, A.M., Creppy, E.E., Dirheimer, G., Pfohl-Leszkowicz, A. (1995). Formation of ochratoxin A metabolites and DNA-adducts in monkey kidney cells. *Chem. Biol. Interact.* 95(1-2): 175-187.
- Haduch, A., Wójcikowski, J., Daniel, W.A. (2011). Effect of neuroleptics on cytochrome P450 2C11 (CYP2C11) in rat liver. *Pharmacol. Rep.* 63(6): 1491-1499.
- Hanahan, D., Weinberg, R.A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell* 100(1): 57-70.
- Harris, C.C. (1991). Chemical and physical carcinogenesis: advances and perspectives for the 1990s. *Cancer Res. (Suppl.)* 51: 5023s-5044s.
- Harvey, R.G. (2011). Historical Overview of Chemical Carcinogenesis. In: T.M. Penning (ed.) *Chemical Carcinogenesis*. Humana Press. New York. 1-26.
- Heinrich, M., Chan, J., Wanke, S., Neinhuis, C., Simmonds, M.S. (2009). Local uses of *Aristolochia* species and content of nephrotoxic aristolochic acid 1 and 2 - a global assessment based on bibliographic sources. *J. Ethnopharmacol.* 125(1): 108-144.
- Hildebrandt, A., Estabrook, R.W. (1971). Evidence for the participation of cytochrome b 5 in hepatic microsomal mixed-function oxidation reactions. *Arch. Biochem. Biophys.* 143(1): 66-79.
- Hill, J. (1761). *Cautions against the immoderate use of snuff. Founded on the known Qualities of the tobacco plant and the Effects it must produce when in this Way Taken into the Body; and enforced by Instances of Persons who have perished miserably of Disease, occassioned or rendered incurable by its Use*. Baldwin and Jackson, London.
- Hipólito, J., Viana, B.F., Selbach-Schnadelbach, A., Galetto, L., Kevan, P.G. (2012). Pollination biology and genetic variability of a giant perfumed flower (*Aristolochia gigantea* Mart. and Zucc., Aristolochiaceae) visited mainly by small Diptera. *Botany* 90(9): 815-829.
- Hollander, P.M., Ernster, L. (1975). Studies on the reaction mechanism of DT diaphorase. Action of dead-end inhibitors and effects of phospholipids. *Arch. Biochem. Biophys.* 169(2): 560-567.
- Hollstein, M., Moriya, M., Grollman, A.P., Olivier, M. (2013). Analysis of TP53 mutation spectra reveals the fingerprint of the potent environmental carcinogen, aristolochic acid. *Mutat. Res.* 753(1): 41-49.

- Holzbach, J.C., Lopes, L.M.X. (2010). Aristolactams and Alkamides of *Aristolochia gigantea*. *Molecules* 15(12): 9462-9472.
- Hranjec, T., Kovač, A., Kos, J., Mao, W., Chen, J.J., Grollman, A.P., Jelaković, B. (2005). Endemic Nephropathy: the Case for Chronic Poisoning by *Aristolochia*. *Croat. Med. J.* 46(1): 116-125.
- Huang, M-T., Miwa, G.T., Cronheim, N., Lu, A.Y.H. (1979). Rat liver cytosolic azoreductase. Electron transport properties and the mechanism of dicumarol inhibition of the purified enzyme. *J. Biol. Chem.* 254(22): 11223-11227.
- Huber, H., Gottlieb, O.R. (1993). *Aristolochiaceae*. In: Kubitzki, K., Rohwer, J.G, Bittrich, V. (eds): *The Families and Genera of Vascular Plants, Volume II: Flowering Plants - Dicotyledons: Magnoliid, Hamamelid and Caryophyllid Families*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg GmbH. 129-137.
- Chan, W., Cui, L., Xu, G., Cai, Z. (2006). Study of the phase I and phase II metabolism of nephrotoxin aristolochic acid by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* 20(11): 1755-1760.
- Chen, C-H., Dickman, K.G., Moriya, M., Zavadil, J., Sidorenko, V.S., Edwards, K.L., Gnatenko, D.V., Wu, L., Turesky, R.J., Wu, X-R., Pu, Y-S., Grollman, A.P. (2012). Aristolochic acid-associated urothelial cancer in Taiwan. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109(21): 8241-8246.
- Chen, L., Mei, N., Yao, L., Chen, T. (2006). Mutations induced by carcinogenic doses of aristolochic acid in kidney of Big Blue transgenic rats. *Toxicol. Lett.* 165(3):250-256.
- Chen, M., Gong, L., Qi, X., Xing, G., Luan, Y., Wu, Y., Xiao, Y., Yao, J., Li, Y., Xue, X., Pan, G., Ren, J. (2011). Inhibition of renal NQO1 activity by dicoumarol suppresses nitroreduction of aristolochic acid I and attenuates its nephrotoxicity. *Toxicol. Sci.* 122(2): 288-296.
- Chen, S., Wu, K., Knox, R. (2000). Structure-function studies of DT-diaphorase (NQO1) and NRH: quinone oxidoreductase (NQO2). *Free Radic. Biol. Med.* 29(3-4): 276-284.
- IARC, International Agency for Research on Cancer (1976). *Some naturally occurring substances. IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum.* 10.
- IARC, International Agency for Research on Cancer (2001). *Ionizing Radiation, Part 2: Some Internally Deposited Radionuclides. IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum.* 78.
- IARC, International Agency for Research on Cancer (2012a). *A Review of Human Carcinogens: Radiation. IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum.* 100D.
- IARC, International Agency for Research on Cancer (2012b). *A Review of Human Carcinogens: Part C: Arsenic, Metals Fibres, and Dusts. IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum.* 100C.
- IARC, International Agency for Research on Cancer (2012c). *A Review of Human Carcinogens: Pharmaceuticals. IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum.* 100A.
- Ingelman-Sundberg, M. (2005), The human genome project and novel aspects of cytochrome P450 research. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 207(Suppl. 2): 52-56.

- Isin, E.M., Guengerich, F.P. (2007). Complex reactions catalyzed by cytochrome P450 enzymes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1770(3): 314-329.
- Isin, E.M., Guengerich, F.P. (2008). Substrate binding to cytochromes P450. *Anal. Bioanal. Chem.* 392(6): 1019-1030.
- Ivić, M., Lovriæ, B. (1967). Carcinogenic action of Aristolochia. *Acta Medica Med.* 5: 1-3.
- Ivić, M. (1969). Etiology of endemic nephropathy. *Lijec. Vjesn.* 91(12): 1273-1281.
- Jackson, L., Kofman, S., Weiss, A., Brodovsky, H. (1964). Aristolochic Acid (NSC-50413) - Phase-I Clinical Study. *Cancer Chemother. Rep.* 42: 35-37.
- Jahodář, L. (2011). Farmakobotanika, semenné rostliny (3. upravené a doplněné vydání). Nakladatelství Karolinum. Universita Karlova v Praze.
- Jaiswal, A.K., Burnett, P., Adesnik, M., McBride, O.W. (1990). Nucleotide and deduced amino acid sequence of a human cDNA (NQO2) corresponding to a second member of the NAD(P)H:quinone oxidoreductase gene family. Extensive polymorphism at the NQO2 gene locus on chromosome 6. *Biochemistry* 29(7): 1899-1906.
- Jaiswal, A.K. (2000). Regulation of genes encoding NAD(P)H:quinone oxidoreductases. *Free Radic. Biol. Med.* 29(3-4): 254-262.
- Janković Velicković, L., Hattori, T., Stefanović, V. (2009a). Molecular markers in upper urothelial carcinoma associated to Balkan endemic nephropathy. Aristolochic acid as the major risk factor of the worldwide disease. *ScientificWorldJournal* 9: 1360-1373.
- Janković Velicković, L., Hattori, T., Dolicanin, Z., Visnjić, M., Krstić, M., Ilić, I., Cukuranović, R., Rajić, M., Stefanović, V. (2009b). Upper urothelial carcinoma in Balkan endemic nephropathy and non-endemic regions: a comparative study of pathological features. *Pathol. Res. Pract.* 205(2): 89-96.
- Janković, S., Bukvić, D., Marinković, J., Janković, J., Marić, I., Djukanović, L. (2011). Time trends in Balkan endemic nephropathy incidence in the most affected region in Serbia, 1977-2009: the disease has not yet disappeared. *Nephrol. Dial. Transplant.* 26(10): 3171-3176.
- Jarić, S., Popović, Z., Macukanović-Jocić, M., Djurdjević, L., Mijatović, M., Karadžić, B., Mitrović, M., Pavlović, P. (2007). An ethnobotanical study on the usage of wild medicinal herbs from Kopaonik Mountain (Central Serbia). *J. Ethnopharmacol.* 111(1): 160-175.
- Jelaković, B., Karanović, S., Vuković-Lela, I., Miller, F., Edwards, K.L., Nikolić, J., Tomić, K., Slade, N., Brdar, B., Turesky, R.J., Stipančić, Ž., Dittrich, D., Grollman, A.P., Dickman, K.G. (2012). Aristolactam-DNA adducts are a biomarker of environmental exposure to aristolochic acid. *Kidney Int.* 81(6): 559-567.
- Jelaković, B., Vuković Lela, I., Karanović, S., Dika, Ž., Kos, J., Dickman, K., Šekoranja, M., Poljičanin, T., Mišić, M., Premužić, V., Abramović, M., Matijević, V., Miletić Medved, M., Cvitković, A., Edwards, K., Fuček, M., Leko, N., Teskera, T., Laganović, M., Čvorišćec, D., Grollman, A.P. (2015). Chronic dietary exposure to aristolochic acid and kidney function in native farmers from a Croatian endemic area and Bosnian immigrants. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 10(2): 215-223.

- Jeřábek, P., Martínek, V., Stiborová M. (2012). Theoretical investigation of differences in nitroreduction of aristolochic acid I by cytochromes P450 1A1, 1A2 and 1B1. *Neuroendocrinol. Lett.* 33(Suppl. 3): 25-32.
- Jiménez-Ferrer, J.E., Pérez-Terán, Y.Y., Román-Ramos, R., Tortoriello, J. (2005). Antitoxin activity of plants used in Mexican traditional medicine against scorpion poisoning. *Phytomedicine* 12: 116-122.
- Joseph, P., Jaiswal, A.K. (1994). NAD(P)H:quinone oxidoreductase1 (DT diaphorase) specifically prevents the formation of benzo[a]pyrene quinone-DNA adducts generated by cytochrome P4501A1 and P450 reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91(18): 8413-8417.
- Kadkhodayan, S., Coulter, E.D., Maryniak, D.M., Bryson, T.A., Dawson, J.H. (1995). Uncoupling oxygen transfer and electron transfer in the oxygenation of camphor analogues by cytochrome P450-CAM. Direct observation of an intermolecular isotope effect for substrate C-H activation. *J. Biol. Chem.* 270(47): 28042-28048.
- Kamp, H.G., Eisenbrand, G., Janzowski, C., Kiossev, J., Latendresse, J.R., Schlatter, J., Turesky, R.J. (2005). Ochratoxin A induces oxidative DNA damage in liver and kidney after oral dosing to rats. *Mol. Nutr. Food. Res.* 49(12): 1160-1167.
- Kanisawa, M., Suzuki, S. (1978). Induction of renal and hepatic tumors in mice by ochratoxin A, a mycotoxin. *Gan.* 69(4): 599-600.
- Kaphalia, L., Kaphalia, B.S., Kumar, S., Kanz, M.F., Treinen-Moslen, M. (2006). Efficient high performance liquid chromatograph/ultraviolet method for determination of diclofenac and 4'-hydroxydiclofenac in rat serum. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 830(2): 231-237.
- Karmaus, W., Dimitrov, P., Simeonov, V., Tsoleva, S., Bonev, A., Georgieva, R. (2008). Metals and kidney markers in adult offspring of endemic nephropathy patients and controls: a two-year follow-up study. *Environ. Health* 7: 11.
- Keber, R., Rozman, D., Horvat, S. (2013a). Sterols in spermatogenesis and sperm maturation. *J. Lipid. Res.* 54(1): 20-33.
- Keber, R., Ačimovič, J., Majdič, G., Motaln, H., Rozman, D., Horvat, S. (2013b). Male germ cell-specific knockout of cholesterologenic cytochrome P450 lanosterol 14 α -demethylase (*Cyp51*). *J. Lipid. Res.* 54(6): 1653-1661.
- Kelly, L.M., Gonzáles, F. (2003). Phylogenetic Relationships in Aristolochiaceae. *Syst. Bot.* 28(2): 236-249.
- Kemp, C.J. (2005). Multistep skin cancer in mice as a model to study the evolution of cancer cells. *Semin. Cancer Biol.* 15(6):460-473.
- Klingenberg, M. (1958). Pigments of rat liver microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.* 75(2): 376-386.
- Klitzke, C.F., Brown Jr, K.S. (2000) The occurrence of aristolochic acids in neotropical troidine swallowtails (Lepidoptera: Papilionidae). *Chemoecology* 10(2): 99-102.
- Knudson, A.G. (1971). Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68(4): 820-823.
- Knudson, A.G. (1985). Hereditary cancer, oncogenes, and antioncogenes. *Cancer Res.* 45(4): 1437-1443.

- Knudson, A.G. (2001). Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nat. Rev. Cancer* 1(2): 157-162.
- Kobayashi, K., Urashima, K., Shimada, N., Chiba, K. (2002). Substrate specificity for rat cytochrome P450 (CYP) isoforms: screening with cDNA-expressed systems of the rat. *Biochem. Pharmacol.* 63(5): 889-896.
- Kohara, A., Suzuki, T., Honma, M., Ohwada, T., Hayashi, M. (2002). Mutagenicity of aristolochic acid in the lambda/lacZ transgenic mouse (MutaMouse). *Mutat. Res.* 515(1-2): 63-72.
- Košťálová, D., Hrochová, V., Pronayová, N., Leško, J. (1991). Constituents of *Aristolochia clematitis* L. *Chem. Papers* 45(5): 713-716.
- Kotova, N., Hemminki, K., Segerbäck, D. (2005). Urinary thymidine dimer as a marker of total body burden of UV-inflicted DNA damage in humans. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 14(12): 2868-2872.
- Krais, A.M., Mühlbauer, K.R., Kucab, J.E., Chinbuah, H., Cornelius, M.G., Wei, Q.X., Hollstein, M., Phillips, D.H., Arlt, V.M., Schmeiser, H.H. (2015). Comparison of the metabolic activation of environmental carcinogens in mouse embryonic stem cells and mouse embryonic fibroblasts. *Toxicol. In Vitro* 29(1): 34-43.
- Krogh, P., Hald, B., Plestina, R., Ceović, S. (1977). Balkan (endemic) nephropathy and foodborn ochratoxin A: preliminary results of a survey of foodstuffs. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. B.* 85(3): 238-240.
- Kumar, V., Poonam, Prasad, A.K., Parmar, V.S. (2003). Naturally occurring aristolactams, aristolochic acids and dioxoaporphines and their biological activities. *Nat. Prod. Rep.* 20(6): 565-583.
- Kwak, D.H., Lee, S. (2016). Aristolochic Acid I Causes Testis Toxicity by Inhibiting Akt and ERK1/2 Phosphorylation. *Chem. Res. Toxicol.* 29(1): 117-124.
- Kwan, C.Y., Achike, F.I. (2002). Tetrandrine and related bis-benzylisoquinoline alkaloids from medicinal herbs: cardiovascular effects and mechanisms of action. *Acta Pharmacol. Sin.* 23(12): 1057-1068.
- Lai, C.M., Yacobi, A., Levy, G. (1976). Relationship between dicumarol distribution and the effect of enzyme induction on dicumarol elimination in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 199(1): 74-81.
- Laing, C., Hamour, S., Sheaff, M., Miller, R., Woolfson, R. (2006). Chinese herbal uropathy and nephropathy. *Lancet* 368(9532): 338.
- Lee, M.Y., Lee, N.H., Jung, D., Lee, J.A., Seo, C.S., Lee, H., Kim, J.H., Shin, H.K. (2010). Protective effects of allantoin against ovalbumin (OVA)-induced lung inflammation in a murine model of asthma. *Int. Immunopharmacol.* 10(4): 474-480.
- Leporatti, M.L., Ivancheva, S. (2003). Preliminary comparative analysis of medicinal plants used in the traditional medicine of Bulgaria and Italy. *J. Ethnopharmacol.* 87(2-3): 123-142.
- Leung, K.K.K., Shilton, B.H. (2015). Quinone reductase 2 is an adventitious target of protein kinase CK2 inhibitors TBBz (TBI) and DMAT. *Biochemistry* 54(1): 47-59.
- Levová, K. (2009). *Metabolická detoxikace karcinogenních aristolochových kyselin cytochromy P450*. Diplomová práce. Katedra biochemie Přírodovědecké fakulty University Karlovy v Praze. Praha. 38.

- Levová, K., Moserová, M., Kotrbová, V., Šulc, M., Henderson, C.J., Wolf, C.R., Phillips, D.H., Frei, E., Schmeiser, H.H., Mareš, J., Arlt, V.M., Stiborová, M. (2011). Role of cytochromes P450 1A1/2 in detoxication and activation of carcinogenic aristolochic acid I: studies with the hepatic NADPH:cytochrome P450 reductase null (HRN) mouse model. *Toxicol. Sci.* 121(1): 43-56.
- Levová, K., Moserová, M., Nebert, D.W., Phillips, D.H., Frei, E., Schmeiser, H.H., Arlt, V.M., Stiborová, M. (2012). NAD(P)H:quinone oxidoreductase expression in *Cyp1a*-knockout and CYP1A-humanized mouse lines and its effect on bioactivation of the carcinogenic aristolochic acid I. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 265(3): 360-367.
- Lewis, F.V.D. (2001). *Occurrence and distribution* In: Lewis, F.V.D., *Guide to Cytochromes P450, Structure and Function*. Taylor & Francis. London. 3-7.
- Ležaić, V., Marić, I., Jovanović, D., Radović, M., Kovacević, Z., Bukvić, D., Pavlović, S., Matić, M., Ajdačić, M., Djukanović, L. (2008). Comparison of kidney size between patients with Balkan endemic nephropathy and other kidney diseases. *Kidney Blood Press. Res.* 31(5): 307-312.
- Li, R.B., Bianchet, M.A., Talalay, P., Amzel, L.M. (1995). The three-dimensional structure of NAD(P)H:quinone reductase, a flavoprotein involved in cancer chemoprotection and chemotherapy: mechanism of the two-electron reduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92(19): 8846-8850.
- Li, W., Hu, Q., Chan, W. (2016). Uptake and Accumulation of Nephrotoxic and Carcinogenic Aristolochic Acids in Food Crops Grown in *Aristolochia clematitis*-Contaminated Soil and Water. *J. Agric. Food Chem.* 64(1): 107-12.
- Li, X., Wang, H. (2004). Aristolochic acid nephropathy: what we know and what we have to do. *Nephrology (Carlton)* 9(3): 109-111.
- Li, Z.-J., Njateng, G.S.S., He, W.-J., Zhang, H.-X., Gu, J.-L., Chen, S.-N., Du, Z.-Z. (2013). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil from the edible aromatic plant *Aristolochia delavayi*. *Chem. Biodivers.* 10(11): 2032-2041.
- Liao, J.B. (2006). Viruses and human cancer. *Yale J. Biol. Med.* 79(3-4):115-22.
- Liao, S., Dulaney, J.T., Williams-Ashman, H.G. (1962). Purification and properties of a flavoprotein catalyzing the oxidation of reduced ribosyl nicotinamide. *J. Biol. Chem.* 237: 2981-2987.
- Lindman, C.A.M. (1922-1926). *Bilder ur Nordens Flora, Vol. 2, 362*. Wahlström & Wildstrand, Stockholm.
- Lombaert, G.A., Pellaers, P., Chettiar, M., Lavalee, D., Scott, P.M., Lau, B.P. (2002). Survey of Canadian retail coffees for ochratoxin A. *Food Addit. Contam.* 19(9): 869-877.
- Long, D.T., Icopini, G., Ganev, V., Petropoulos, E., Havezov, I., Voice, T., Chou, K., Spassov, A., Stein, A. (2001). Geochemistry of Bulgarian soils in villages affected and not affected by Balkan endemic nephropathy: a pilot study. *Int. J. Occup. Med. Environ. Health* 14(2): 193-196.
- Lopes, L.M.X., Humpfer, E. (1997). 8-benzylberbine and *N*-oxide alkaloids from *Aristolochia gigantea*. *Phytochemistry* 45(2): 431-435.

- Maharaj, S.V., Orem, W.H., Tatu, C.A., Lerch III, H.E., Szilagyi, D.N. (2014). Organic compounds in water extracts of coal: links to Balkan endemic nephropathy. *Environ. Geochem. Health* 36(1): 1-17.
- Maksimović, Z.J., Djujić, I., Jović, V., Rsumović, M. (1992). Selenium deficiency in Yugoslavia. *Biol. Trace Elem. Res.* 33: 187-196.
- Maksimović, Z.J., Djujić, I. (1997). Selenium deficiency in Serbia and possible effects on health. *Biomed. Environ. Sci.* 10(2-3): 300-306.
- Malik, A., Bissinger, R., Calabrò, S., Faggio, C., Jilani, K., Lang, F. (2014). Aristolochic acid induced suicidal erythrocyte death. *Kidney Blood Press. Res.* 39(5):408-419.
- Mally, A., Zepnik, H., Wanek, P., Eder, E., Dingley, K., Ihmels, H., Völkel, W., Dekant, W. (2004). Ochratoxin A: lack of formation of covalent DNA adducts. *Chem. Res. Toxicol.* 17(2): 234-242.
- Mally, A., Pepe, G., Ravoori, S., Fiore, M., Gupta, R.C., Dekant, W., Mosesso, P. (2005). Ochratoxin a causes DNA damage and cytogenetic effects but no DNA adducts in rats. *Chem. Res. Toxicol.* 18(8): 1253-1261.
- Margulis, V., Shariat, S.F., Matin, S.F., Kamat, A.M., Zigeuner, R., Kikuchi, E., Lotan, Y., Weizer, A., Raman, J.D., Wood, C.G.; Upper Tract Urothelial Carcinoma Collaboration. (2009). Outcomes of radical nephroureterectomy: a series from the Upper Tract Urothelial Carcinoma Collaboration. *Cancer.* 115(6): 1224-1233.
- Marchesini, A.M., Prado, G.G., Messiano, G.B., Machado, M.B., Lopes, L.M.X. (2009). Chemical constituents of *Aristolochia giberti*. *J. Braz. Chem. Soc.* 20(9): 1598-1608.
- Marshall, S.J., Russell, P.F., Wright, C.W., Anderson, M.M., Phillipson, J.D., Kirby, G.C., Warhurst, D.C., Schiff Jr., P.L. (1994). In vitro antiplasmodial, antiamoebic, and cytotoxic activities of a series of bisbenzylisoquinoline alkaloids. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 38(1): 96-103.
- Martínek, V., Kubíčková, B., Arlt, V.M., Frei, E., Schmeiser, H.H., Hudeček, J., Stiborová, M. (2011). Comparison of activation of aristolochic acid I and II with NADPH:quinone oxidoreductase, sulphotransferases and N-acetyltransferases. *Neuroendocrinol. Lett.* 32(Suppl. 1): 57-70.
- Martinez, M-C., Nortier, J., Vereerstraeten, P., Vanherweghem, J-L. (2002a). Progression rate of Chinese herb nephropathy: impact of *Aristolochia fangchi* ingested dose. *Nephrol. Dial. Transplant.* 17(3): 408-412.
- Martinez, M-C., Nortier, J., Vereerstraeten, P., Vanherweghem, J-L. (2002b). Steroid therapy in chronic interstitial renal fibrosis: the case of Chinese-herb nephropathy. *Nephrol Dial Transplant.* 17(11): 2033-2034.
- McLaughlin-Drubin, M.E., Munger, K. (2008). Viruses associated with human cancer. *Biochim. Biophys. Acta* 1782: 127-150.
- Mebs, D., Schneider, M. (2002). Aristolochic acid content of South-East Asian troidine swallowtails (Lepidoptera: Papilionidae) and of *Aristolochia* plant species (Aristolochiaceae). *Chemoecology* 12(1): 11-13.

- Medina, A., Jiménez, M., Gimeno-Adelantado, J.V., Valle-Algarra, F.M., Mateo, R. (2005). Determination of ochratoxin A in beer marketed in Spain by liquid chromatography with fluorescence detection using lead hydroxyacetate as a clean-up agent. *J. Chromatogr. A* 1083(1-2): 7-13.
- Mengs, U., Lang, W., Poch, J-A. (1982). The carcinogenic action of aristolochic acid in rats. *Arch. Toxicol.* 51(2): 107-119.
- Mengs, U. (1988). Acute toxicity of aristolochic acid in rodents. *Arch. Toxicol.* 59(5): 328-331.
- van der Merwe, K.J., Steyn, P.S., Fourie, L., Scott, D.B., Theron, J.J. (1965). Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. *Nature* 205(976): 1112-1113.
- Michl, J., Ingrouille, M.J., Simmonds, M.S., Heinrich, M. (2014). Naturally occurring aristolochic acid analogues and their toxicities. *Nat. Prod. Rep.* 31(5): 676-693.
- Milichovský, J., Bárta, F., Schmeiser, H.H., Arlt, V.M., Frei, E., Stiborová, M., Martínek, V. (2016). Active Site Mutations as a Suitable Tool Contributing to Explain a Mechanism of Aristolochic Acid I Nitroreduction by Cytochromes P450 1A1, 1A2 and 1B1. *Int. J. Mol. Sci.* 17(2): 213.
- Miller, E.C., Lotlikar, P.D., Pitot, H.C., Fletcher, T.L., Miller, J.A. (1966a). *N*-hydroxy metabolites of 2-acetylaminophenanthrene and 7-fluoro-2-acetylaminofluorene as proximate carcinogens in the rat. *Cancer Res.* 26(11): 2239-2247.
- Miller, E.C., Miller, J.A. (1966b). Mechanisms of chemical carcinogenesis: nature of proximate carcinogens and interactions with macromolecules. *Pharmacol. Rev.* 18(1): 805-838.
- Miller, E.C., Miller, J.A. (1981). Searches for Ultimate Chemical Carcinogens and Their Reactions with Cellular Macromolecules. *Cancer* 47, 2327-2345.
- Mix, D.B., Guinaudeau, H., Shamma, M. (1982). The Aristolochic Acids and Aristolactams. *J. Nat. Prod.* 45(6): 657-666.
- Morren, C.J.É. (1869). *La Belgique horticole, journal des jardins et des vergers* 19.
- Möse, J.R. (1966). Weitere Untersuchungen über die Wirkung der Aristolochia-Säure. *Drug Res.* 16(2): 118-122.
- Möse, J.R. (1974a). Further Studies on Aristolochic Acid .1. Communication. *Drug Res.* 24(1): 52-54.
- Möse, J.R. (1974b). Further Studies on Aristolochic Acid .2. *Drug Res.* 24(2): 151-153.
- Nebert, D.W., Adesnik, M., Coon, M.J., Estabrook, R.W., Gonzalez, F.J., Guengerich, F.P., Gunsalus, I.C., Johnson, E.F., Kemper, B., Levin, W., Phillips, I.R., Sato, R., Waterman, M.R. (1987). The P450 gene superfamily: recommended nomenclature. *DNA.* 6(1): 1-11.
- Nebert, D.W., Nelson, D.R., Coon, M.J., Estabrook, R.W., Feyereisen, R., Fujii-Kuriyama, Y., Gonzalez, F.J., Guengerich, F.P., Gunsalus, I.C., Johnson, E.F., Loper, J.C., Sato, R., Waterman, M.R., Waxman, D.J. (1991). The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, and recommended nomenclature. *DNA Cell Biol.* 10(1): 1-14.
- Nebert, D.W., Wikvall, K., Miller, W.L. (2013). Human cytochromes P450 in health and disease. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 368(1612): 20120431.

- Nedelcheva, V., Gut, I. (1994). P450 in the rat and man: methods of investigation, substrate specificities and relevance to cancer. *Xenobiotica* 24(12): 1151-1175.
- Nelson, D.R. (2009). The Cytochrome P450 Homepage. *Hum. Genomics* 4(1): 59-65.
- Nichifor, E., Balea, M., Rusu, G., Melencu, M., Ghiordanescu, N., Cristescu, I., Dovlete, C., Sonoc, S. (1985). Studies on the familial character of endemic Balkan nephropathy. Possible role of the toxic hydric factor in the determination of "familial agglomerations" in endemic Balkan nephropathy. *Med. Interne*, 23(3): 229-237.
- Nikolić, J., Djokić, M., Crnomarković, D., Marinković, J. (2002). Upper urothelial tumors and Balkan nephropathy - dose responsible diseases. *Facta Univ Med Biol* 9(1): 114-118.
- Nishida, R. (2002). Sequestration of Defensive Substances from Plants by Lepidoptera. *Annu. Rev. Entomol.* 47: 57-92.
- Nitzsche, D., Melzig, M.F., Arlt, V.M. (2013). Evaluation of the cytotoxicity and genotoxicity of aristolochic acid I - a component of *Aristolochiaceae* plant extracts used in homeopathy. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 35(2): 325-34.
- Niwa, T., Murayama, N., Imagawa, Y., Yamazaki, H. (2015). Regioselective hydroxylation of steroid hormones by human cytochromes P450. *Drug Metab. Rev.* 47(2): 89-110.
- Nortier, J.L., Deschodt-Lanckman, M.M., Simon, S., Thielemans, N.O., de Prez, E.G., Depierreux, M.F., Tielemans, C.L., Richard, C., Lauwerys, R.R., Bernard, A.M., Vanherweghem, J-L. (1997). Proximal tubular injury in Chinese herbs nephropathy: monitoring by neutral endopeptidase enzymuria. *Kidney Int.* 51(1): 288-293.
- 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. (2000). Urothelial Carcinoma Associated with the Use of a Chinese Herb (*Aristolochia Fangchi*). *N. Engl. J. Med.* 342(23), 1686-1682.
- Nortier, J.L., Schmeiser, H.H., Muniz Martinez, M-C., Arlt, V.M., Vervaet, C., Garbar, C.H., Daelemans, P., Vanherweghem, J-L. (2003). Invasive urothelial carcinoma after exposure to Chinese herbal medicine containing aristolochic acid may occur without severe renal failure. *Nephrol. Dial. Transplant.* 18(2): 426-428.
- Nortier, J.L., Vanherweghem, J-L. (2007). For patients taking herbal therapy--lessons from aristolochic acid nephropathy. *Nephrol. Dial. Transplant.* 22(6): 1512-1517.
- Oelschlägel, B., Nuss, M., von Tschirnhaus, M., Pätzold, C., Neinhuis, C., Dötterl, S., Wanke, S. (2015). The Betrayed Thief - the Extraordinary Strategy of *Aristolochia rotunda* to Deceive Its Pollinators. *New Phytol.* 206(1): 342-51.
- Omole, R.A., Gathirwa, J., Akala, H., Malebo, H.M., Machocho, A.K., Hassanali, A., Ndiege, I.O. (2014). Bisbenzylisoquinoline and hasubanane alkaloids from *Stephania abyssinica* (Dillon & A. Rich) (Menispermaceae). *Phytochemistry* 103: 123-128.
- Omura, T., Sato, R. (1964). The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. *J. Biol. Chem.* 239: 2370-2378.

- Orem, W.H., Feder, G.L., Finkelman, R.B. (1999) A possible link between Balkan endemic nephropathy and the leaching of toxic organic compounds from Pliocene lignites by groundwater: *Int. J. Coal. Geol.* 40: 237-252.
- Palca, J. (1990). Eastern Europe: Missing an Opportunity. *Science* 248(4951): 20-21.
- de Pascoli, I.C., Nascimento, I.R., Lopes, L.M.X. (2006) Configurational analysis of cubebins and bicubebin from *Aristolochia lagesiana* and *Aristolochia pubescens*. *Phytochemistry* 67(7):735-742.
- Patel, N., Arya, M., Muneer, A., Powles, T., Sullivan, M., Hines, J., Kelly, J. (2014). Molecular aspects of upper tract urothelial carcinoma. *Urol. Oncol.* 32(1): 28.e11-28.e20.
- Pavlović, N.M., Maksimović, V., Maksimović, J.D., Orem, W.H., Tatu, C.A., Lerch, H.E., Bunnell, J.E., Kostić, E.N., Szilagyi, D.N., Paunescu, V. (2013). Possible health impacts of naturally occurring uptake of aristolochic acids by maize and cucumber roots: links to the etiology of endemic (Balkan) nephropathy. *Environ. Geochem. Health* 35(2): 215-226.
- Pearce, R., Greenway, D., Parkinson, A. (1992). Species differences and interindividual variation in liver microsomal cytochrome P450 2A enzymes: effects on coumarin, dicumarol, and testosterone oxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 298(1): 211-225.
- Pelengaris, S., Khan, M. (2013a). *Overview of Cancer Biology*. In: S. Pelengaris, M. Khan (eds) *The Molecular Biology of Cancer (2nd Edition)*. Wiley-Blackwell. 3-42.
- Pelengaris, S., Khan, M. (2013b). *Oncogenes*. In: S. Pelengaris, M. Khan (eds) *The Molecular Biology of Cancer (2nd Edition)*. Wiley-Blackwell. 188-238.
- Petrik, J., Zanić-Grubisić, T., Barisić, K., Pepeljnjak, S., Radić, B., Ferencić, Z., Cepelak, I. (2003). Apoptosis and oxidative stress induced by ochratoxin A in rat kidney. *Arch. Toxicol.* 77(12): 685-693.
- Pfohl-Leszkowicz, A., Manderville, R.A. (2007). Ochratoxin A: An overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans. *Mol. Nutr. Food Res.* 51(1): 61-99.
- Pfohl-Leszkowicz A. (2009). Ochratoxin A and aristolochic acid involvement in nephropathies and associated urothelial tract tumours. *Arh. Hig. Rada Toksikol.* 60(4): 465-483.
- Poon, W-T., Lai, C-K., Chan, A.Y-W. (2007). Aristolochic Acid Nephropathy: The Hong Kong Perspective. *Hong Kong J. Nephrol.* 9(1): 7-14.
- Pott, P. (1775). Chirurgical observations relative to the cancer of the scrotum. London. In: *CA Cancer J. Clin.* 24(2), 110-116 (1974).
- Pradeepa, V., Sathish-Narayanan, S., Kirubakaran, S.A., Thanigaivel, A., Senthil-Nathan, S. (2015). Toxicity of aristolochic acids isolated from *Aristolochia indica* Linn (Aristolochiaceae) against the malarial vector *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culicidae). *Exp. Parasitol.* 153: 8-16.
- Priestap, H.A., Velandia, A.E., Johnson, J.V., Barbieri, M.A. (2012a). Secondary metabolite uptake by the *Aristolochia*-feeding papilionoid butterfly *Battus polydamas*. *Biochem. System. Ecol.* 40: 126-137.
- Priestap, H.A., Torres, M.C., Rieger, R.A., Dickman, K.G., Freshwater, T., Taft, D.R., Barbieri, M.A., Iden, C.R. (2012b). Aristolochic acid I metabolism in the isolated perfused rat kidney. *Chem. Res. Toxicol.* 25(1): 130-139.

- Pu, Y.S., Jan, K.Y., Wang, T.C., Wang, A.S., Gurr, J.R. (2007). 8-Oxoguanine DNA glycosylase and MutY homolog are involved in the incision of arsenite-induced DNA adducts. *Toxicol. Sci.* 95(2):376-82.
- Quievryn, G., Peterson, E., Messer, J., Zhitkovich, A. (2003). Genotoxicity and mutagenicity of chromium(VI)/ascorbate-generated DNA adducts in human and bacterial cells. *Biochemistry* 42(4):1062-1070.
- Radić, B., Fuchs, R., Peraica, M., Lucić, A. (1997). Ochratoxin A in human sera in the area with endemic nephropathy in Croatia. *Toxicol. Lett.* 91(2): 105-109.
- Radovanović, Z. (1989). Aetiology of Balkan nephropathy: a reappraisal after 30 years. *Eur. J. Epidemiol.* 5(3): 372-377.
- Radovanović, Z. (2002). Balkan endemic nephropathy in Serbia: Current status and future research. *Facta Univ Med Biol* 9(1): 26-30.
- Rak, J., Chomicz, L., Wiczek, J., Westphal, K., Zdrowowicz, M., Wityk, P., Żyndul, M., Makurat, S., Golon, Ł. (2015). Mechanisms of Damage to DNA Labeled with Electrophilic Nucleobases Induced by Ionizing or UV Radiation. *J. Phys. Chem. B* 119(26): 8227-8238.
- Reginster, F., Jadoul, M., van Ypersele de Strihou, C. (1997). Chinese herbs nephropathy presentation, natural history and fate after transplantation. *Nephrol. Dial. Transplant.* 12(1): 81-86.
- Rehn, L. (1895). Blasengeschwülste bei Fuchsin-Arbeitern. *Arch. Klin. Chir.* 50:588–600.
- Reljić, Z., Zlatović, M., Savić-Radojević, A., Pekmezović, T., Djukanović, L., Matić, M., Pljesa-Ercegovac, M., Mimić-Oka, J., Oспенica, D., Simic, T. (2014). Is increased susceptibility to Balkan endemic nephropathy in carriers of common GSTA1 (*A/*B) polymorphism linked with the catalytic role of GSTA1 in ochratoxin a biotransformation? Serbian case control study and in silico analysis. *Toxins (Basel)* 6(8): 2348-2362.
- Rendić, S., DiCarlo F.J. (1997). Human cytochrome P450 enzymes: a status report summarizing their reactions, substrates, inducers, and inhibitors. *Drug Metab. Rev.* 29(1-2): 413-580.
- Rendić, S., Guengerich, F.P. (2012). Contributions of human enzymes in carcinogen metabolism. *Chem. Res. Toxicol.* 25(7): 1316-1383.
- Reynolds J.E.F. (1989). *Martindale: The Extra Pharmacopoeia (29th Editon)*, Pharmaceutical Press, London. 130.
- Rodrigues, A.D. (1999). Integrated cytochrome P450 reaction phenotyping: attempting to bridge the gap between cDNA-expressed cytochromes P450 and native human liver microsomes. *Biochem. Pharmacol.* 57(5): 465-480.
- Romanov, V., Whyard, T.C., Waltzer, W.C., Grollman, A.P., Rosenquist, T. (2015). Aristolochic acid-induced apoptosis and G2 cell cycle arrest depends on ROS generation and MAP kinases activation. *Arch. Toxicol.* 89(1): 47-56.
- Rosenquist, T.A., Einolf, H.J., Dickman, K.G., Wang, L., Smith, A., Grollman, A.P. (2010). Cytochrome P450 1A2 detoxicates aristolochic acid in the mouse. *Drug Metab. Dispos.* 38(5): 761-768.

- Ross, D., Kepa, J.K., Winski, S.L., Beall, H.D., Anwar, A., Siegel, D. (2000). NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1): chemoprotection, bioactivation, gene regulation and genetic polymorphisms. *Chem. Biol. Interact.* 129(1-2): 77-97.
- Roumeguère, T., Broeders, N., Jayaswal, A., Rorive, S., Quackels, T., Pozdzik, A., Arlt, V.M., Schmeiser, H.H., Nortier, J.L. (2015). Bacillus Calmette-Guerin therapy in non-muscle-invasive bladder carcinoma after renal transplantation for end-stage aristolochic acid nephropathy. *Transpl. Int.* 28(2): 199-205.
- Rouprêt, M., Cancel-Tassin, G., Comperat, E., Fromont, G., Sibony, M., Molinié, V., Allory, Y., Triau, S., Champigneulle, J., Gaffory, C., Larré, S., de la Taille, A., Richard, F., Hamdy, F.C., Cussenot, O. (2007). Phenol sulfotransferase SULT1A1*2 allele and enhanced risk of upper urinary tract urothelial cell carcinoma. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 16(11): 2500-2503.
- Roussel, M.F. (2013). Tumor Suppressors. In: S. Pelengaris, M. Khan (eds) *The Molecular Biology of Cancer (2nd Edition)*. Wiley-Blackwell. 239-265.
- Ruddon, R.W. (2007). Molecular Genetics of Cancer. In: R.W. Ruddon, *Cancer Biology (4th Edition)*, Oxford University Press. 321-352.
- Rundhaug, J.E., Fischer, S.M. (2010), Molecular Mechanisms of Mouse Skin Tumor Promotion. *Cancers* 2: 436-482.
- Ruth, A.F., Olaide, A.O., Oluwatoyin, S.M. (2014). The aqueous root extract of *Aristolochia ringens* (Vahl.) Aristolochiaceae inhibits chemically-induced inflammation in rodents. *Pak. J. Pharm. Sci.* 27(6): 1885-1889.
- Sands, D.P.A., New, T.R. (2013). The Food Plants of the Richmond Birdwing. In: Sands D.P.A., New, T.R., *Conservation of the Richmond Birdwing Butterfly in Australia*. Springer Science & Business Media. Dordrecht. 49-76.
- Santander, R., Urzúa, A., Olguín, Á., Sánchez, M. (2015). Temporal Variation of *Aristolochia chilensis* Aristolochic Acids during Spring. *Molecules* 20(11): 20391-20396
- Savić, V.Lj., Nikolić, V.D., Arsić, I.A., Stanojević, L.P., Najman, S.J., Stojanović, S., Mladenović-Ranisavljević, I.I. (2015). Comparative Study of the Biological Activity of Allantoin and Aqueous Extract of the Comfrey Root. *Phytother. Res.* 29(8): 1117-1122.
- Sharma, V., Jain, S., Bhakuni, D.S., Kapil, R.S. (1982). Biosynthesis of Aristolochic Acid. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* 5: 1153-1155.
- Shi, L.S., Kuo, P.C., Tsai, Y.L., Damu, A.G., Wu, T.S. (2004). The alkaloids and other constituents from the root and stem of *Aristolochia elegans*. *Bioorg. Med. Chem.* 12(2): 439-46.
- Shibutani, S., Bonala, R.R., Rosenquist, T., Rieger, R., Suzuki, N., Johnson, F., Miller, F., Grollman, A.P. (2010). Detoxification of aristolochic acid I by O-demethylation: less nephrotoxicity and genotoxicity of aristolochic acid Ia in rodents. *Int. J. Cancer* 127(5): 1021-1027.
- Shiff Jr., P.L. (1991). Bisbenzylisoquinoline Alkaloids. *J. Nat. Prod.* 54(3): 645-749.
- Schenkman, J.B., Remmer, H., Estabrook, R.W. (1967). Spectral studies of drug interaction with hepatic microsomal cytochrome. *Mol. Pharmacol.* 3(2): 113-123.

- Schmeiser, H.H., Pool, B.L., Wiessler, M. (1986). Identification and mutagenicity of metabolites of aristolochic acid formed by rat liver. *Carcinogenesis*. 7(1): 59-63.
- Schmeiser, H.H., Janssen, J.W., Lyons, J., Scherf, H.R., Pfau, W., Buchmann, A., Bartram, C.R., Wiessler, M. (1990). Aristolochic acid activates ras genes in rat tumors at deoxyadenosine residues. *Cancer Res.* 50(17): 5464-5469.
- Schmeiser, H.H., Scherf, H.R., Wiessler, M. (1991). Activating mutations at codon 61 of the c-Ha-ras gene in thin-tissue sections of tumors induced by aristolochic acid in rats and mice. *Cancer Lett.* 59(2): 139-143.
- Schmeiser, H.H., Bieler, C.A., Wiessler, M., van Ypersele de Strihou, C., Cosyns, J-P. (1996). Detection of DNA adducts formed by aristolochic acid in renal tissue from patients with Chinese herbs nephropathy. *Cancer Res.* 56(9): 2025-2028.
- Schmeiser, H.H., Frei, E., Wiessler, M., Stiborova, M. (1997). Comparison of DNA adduct formation by aristolochic acids in various *in vitro* activation systems by ³²P-post-labelling: evidence for reductive activation by peroxidases. *Carcinogenesis* 18(5): 1055-1062.
- Schmeiser, H.H., Stiborová, M., Arlt, V.M. (2009). Chemical and molecular basis of the carcinogenicity of Aristolochia plants. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* 12(1): 141-148.
- Schmeiser, H.H., Kucab, J.E., Arlt, V.M., Phillips, D.H., Hollstein, M., Gluhovschi, G., Gluhovschi, C., Modilca, M., Daminescu, L., Petrica, L., Velcirov, S. (2012). Evidence of exposure to aristolochic acid in patients with urothelial cancer from a Balkan endemic nephropathy region of Romania. *Environ. Mol. Mutagen.* 53(8): 636-641.
- Schmeiser, H.H., Nortier, J-L., Singh, R., Gamboa da Costa, G., Sennesael, J., Cassuto-Viguier, E., Ambrosetti, D., Rorive, S., Pozdzik, A., Phillips, D.H., Stiborova, M., Arlt V.M. (2014). Exceptionally long-term persistence of DNA adducts formed by carcinogenic aristolochic acid I in renal tissue from patients with aristolochic acid nephropathy. *Int. J. Cancer* 135(2): 502-507.
- Schmid, G., Strosznajder, J.B., Węsierska-Gądek, J.(2006). Interplay between the p53 tumor suppressor protein family and Cdk5: novel therapeutic approaches for the treatment of neurodegenerative diseases using selective Cdk inhibitors. *Mol. Neurobiol.* 34(1), 27-49.
- Schulte-Frohlinde D. (1987). Biological consequences of strand breaks in plasmid and viral DNA. *Br. J. Cancer* 55:129-134.
- Schütte, H.R., Orban, U., Mothes, K. (1967). Biosynthesis of Aristolochic Acid. *European J. Biochem.* 1(1): 70-72.
- Sidorenko, V.S., Attaluri, S., Zaitseva, I., Iden, C.R., Dickman, K.G., Johnson, F., Grollman, A.P. (2014). Bioactivation of the human carcinogen aristolochic acid. *Carcinogenesis* 35(8): 1814-1822.
- Slominski, A.T., Zmijewski, M.A., Semak, I., Zbytek, B., Pisarchik, A., Li, W., Zjawiony, J., Tuckey, R.C. (2014). Cytochromes P450 and skin cancer: role of local endocrine pathways. *Anticancer Agents Med. Chem.* 14(1): 77-96.

- Sottocasa, G.L., Kuylenstierna, B., Ernster, L., Bergstrand, A. (1967). An electron-transport system associated with the outer membrane of liver mitochondria. A biochemical and morphological study. *J. Cell Biol.* 32(2): 415-438.
- Spector, A.A., Kim, H-Y. (2015). Cytochrome P450 epoxygenase pathway of polyunsaturated fatty acid metabolism. *Biochim. Biophys. Acta.* 1851(4): 356-365.
- Spenser, I.D., Tiwari, H.P. (1966). Biosynthesis of Aristolochic Acid. *Chem. Commun.* 2: 55-56.
- Stashenko, E.E., Ordóñez, S.A., Marín, N.A., Martínez, J.R. (2009). Determination of the volatile and semi-volatile secondary metabolites, and aristolochic acids in *Aristolochia ringens* Vahl. *J. Chromatogr. Sci.* 47(9): 817-821.
- Stefanović, V. (2002). Analgesic nephropathy, Balkan endemic nephropathy and Chinese herbs nephropathy: separate tubulointerstitial kidney diseases associated with urothelial malignancy. *Facta Univ Med Biol* 9(1): 1-6.
- Stefanović, V., Polenaković, M., Toncheva, D. (2011). Urothelial carcinoma associated with Balkan endemic nephropathy. A worldwide disease. *Pathol. Biol. (Paris)* 59(5): 286-291.
- Stiborová, M., Frei, E., Breuer, A., Wiessler, M., Schmeiser, H.H. (2001a). Evidence for reductive activation of carcinogenic aristolochic acids by prostaglandin H synthase - ³²P-postlabeling analysis of DNA adduct formation. *Mutat. Res.* 493(1-2): 149-160.
- Stiborová, M., Frei, E., Wiessler, M., Schmeiser, H.H. (2001b). Human enzymes involved in the metabolic activation of carcinogenic aristolochic acids: evidence for reductive activation by cytochromes P450 1A1 and 1A2. *Chem. Res. Toxicol.* 14(8): 1128-1137.
- Stiborová, M., Martínek, V., Rýdlová, H., Hodek, P., Frei, E. (2002). Sudan I is a potential carcinogen for humans: evidence for its metabolic activation and detoxication by human recombinant cytochrome P450 1A1 and liver microsomes. *Cancer. Res.* 62(20): 5678-5684.
- Stiborová, M., Frei, E., Sopko, B., Sopková, K., Marková, V., Lanková, M., Kumštýrová, T., Wiessler, M., Schmeiser, H.H. (2003). Human cytosolic enzymes involved in the metabolic activation of carcinogenic aristolochic acid: evidence for reductive activation by human NAD(P)H:quinone oxidoreductase. *Carcinogenesis* 24(10): 1695-1703.
- Stiborová, M., Frei, E., Hodek, P., Wiessler, M., Schmeiser, H.H. (2005a). Human hepatic and renal microsomes, cytochromes P450 1A1/2, NADPH:cytochrome P450 reductase and prostaglandin H synthase mediate the formation of aristolochic acid-DNA adducts found in patients with urothelial cancer. *Int. J. Cancer.* 113(2): 189-197.
- Stiborová, M., Sopko, B., Hodek, P., Frei, E., Schmeiser, H.H., Hudecek, J. (2005b). The binding of aristolochic acid I to the active site of human cytochromes P450 1A1 and 1A2 explains their potential to reductively activate this human carcinogen. *Cancer Lett.* 229(2): 193-204.

- Stiborová, M., Martínek, V., Rýdlová, H., Koblas, T., Hodek, P. (2005c). Expression of cytochrome P450 1A1 and its contribution to oxidation of a potential human carcinogen 1-phenylazo-2-naphthol (Sudan I) in human livers. *Cancer Lett.* 220(2): 145-154.
- Stiborová, M., Frei, E., Arlt, V.M., Schmeiser, H.H. (2008). Metabolic activation of carcinogenic aristolochic acid, a risk factor for Balkan endemic nephropathy. *Mutat. Res.* 658(1-2): 55-67.
- Stiborová, M., Martínek, V., Svobodová, M., Šístková, J., Dvořák, Z., Ulrichová, J., Šimánek, V., Frei, E., Schmeiser, H.H., Phillips, D.H., Arlt, V.M. (2010). Mechanisms of the different DNA adduct forming potentials of the urban air pollutants 2-nitrobenzanthrone and carcinogenic 3-nitrobenzanthrone. *Chem. Res. Toxicol.* 23(7): 1192-1201.
- Stiborová, M., Mareš, J., Levová, K., Pavlíčková, J., Bárta, F., Hodek, P., Frei, E., Schmeiser, H.H. (2011a). Role of cytochromes P450 in metabolism of carcinogenic aristolochic acid I: evidence of their contribution to aristolochic acid I detoxication and activation in rat liver. *Neuroendocrinol. Lett.* 32(Suppl. 1): 121-130.
- Stiborová, M., Mareš, J., Frei, E., Arlt, V.M., Martínek, V., Schmeiser, H.H. (2011b). The human carcinogen aristolochic acid I is activated to form DNA adducts by human NAD(P)H:quinone oxidoreductase without the contribution of acetyltransferases or sulfotransferases. *Environ. Mol. Mutagen.* 52(6): 448-459.
- Stiborová, M., Levová, K., Bárta, F., Shi, Z., Frei, E., Schmeiser, H.H., Nebert, D.W., Phillips, D.H., Arlt, V.M. (2012). Bioactivation versus detoxication of the urothelial carcinogen aristolochic acid I by human cytochrome P450 1A1 and 1A2. *Toxicol. Sci.* 125(2): 345-358.
- Stiborová, M., Martínek, V., Frei, E., Arlt, V.M., Schmeiser, H.H. (2013a). Enzymes metabolizing aristolochic acid and their contribution to the development of aristolochic acid nephropathy and urothelial cancer. *Curr. Drug. Metab.* 14(6): 695-705.
- Stiborová, M., Dračínská, H., Martínek, V., Svášková, D., Hodek, P., Milichovský, J., Hejduková, Ž., Brotánek, J., Schmeiser, H.H., Frei, E. (2013b). Induced expression of cytochrome P450 1A and NAD(P)H:quinone oxidoreductase determined at mRNA, protein, and enzyme activity levels in rats exposed to the carcinogenic azo dye 1-phenylazo-2-naphthol (Sudan I). *Chem. Res. Toxicol.* 26(2): 290-299.
- Stiborová, M., Frei, E., Schmeiser, H.H., Arlt, V.M., Martínek, V. (2014). Mechanisms of enzyme-catalyzed reduction of two carcinogenic nitro-aromatics, 3-nitrobenzanthrone and aristolochic acid I: Experimental and theoretical approaches. *Int. J. Mol. Sci.* 15(6): 10271-10295.
- Stiborová, M., Bárta, F., Levová, K., Hodek, P., Schmeiser, H.H., Arlt, V.M., Martínek, V. (2015). A Mechanism of O-Demethylation of Aristolochic Acid I by Cytochromes P450 and Their Contributions to This Reaction in Human and Rat Livers: Experimental and Theoretical Approaches. *Int. J. Mol. Sci.* 16(11): 27561-27575.

- Stiborová, M., Indra, R., Moserová, M., Šulc, M., Hodek, P., Frei, E., Schmeiser, H.H., Arlt, V.M. (2016). NADPH- and NADH-dependent metabolism of and DNA adduct formation by benzo[a]pyrene catalyzed with rat hepatic microsomes and cytochrome P450 1A1. *Monatsh. Chem.* **147**: 847-855.
- Sugiyama, M. (1994a). Role of cellular antioxidants in metal-induced damage. *Cell Biol. Toxicol.* **10**(1):1-22.
- Sugiyama, M. (1994b). Role of paramagnetic chromium in chromium(VI)-induced damage in cultured mammalian cells. *Environ. Health Perspect.* **102**:31-33.
- Sun, M., Zhang, J., Zheng, C., Liu, Y., Lin, F., Xu, F., Chen, C. (2015). Analysis of potential risk factors for cancer incidence in patients with aristolochic acid nephropathy from Wenzhou, China. *Ren. Fail.* **37**(2): 209-213.
- SVOD, Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice. Přístupné online: <http://www.svod.cz> (přístup 9.11.2016).
- Šístková, J., Hudeček, J., Hodek, P., Frei, E., Schmeiser, H.H., Stiborová, M. (2008). Human cytochromes P450 1A1 and 1A2 participate in detoxication of carcinogenic aristolochic acid. *Neuroendocrinol. Lett.* **29**(5): 733-737.
- Tang, G-H., Chen, Z-W., Lin, T-T., Tan, M., Gao, X-Y., Bao J-M., Cheng, Z-B., Sun, Z-H., Huang, G., Yin, S. (2015). Neolignans from *Aristolochia fordiana* Prevent Oxidative Stress-Induced Neuronal Death through Maintaining the Nrf2/HO-1 Pathway in HT22 Cells. *J. Nat. Prod.* **78**: 1894-1903.
- Tang, Z., Chen, D., Zhang, Y., Chen, Z., Chen, H., Zeng, C., Liu, Z. (2014). Acute kidney injury induced by aristolochic acid in patients with primary glomerular nephritis. *Ren. Fail.* **36**(3): 367-71.
- Tatu, C.A., Orem, W.H., Finkelman, R.B., Feder, G.L. (1998) The etiology of Balkan endemic nephropathy: still more questions than answers. *Environ. Health Perspect.* **106**(11): 689-700.
- Temin, H.M. (1976). The DNA provirus hypothesis. *Science* **192**(4244):1075-1080.
- Toncheva, D., Dimitrov, T., Stojanova, S. (1998). Etiology of Balkan endemic nephropathy: a multifactorial disease? *Eur. J. Epidemiol.* **14**(4): 389-394.
- Toncheva, D.I., Von Ahsen, N., Atanasova, S.Y., Dimitrov, T.G., Armstrong, V.W., Oellerich, M. (2004). Identification of NQO1 and GSTs genotype frequencies in Bulgarian patients with Balkan endemic nephropathy. *J. Nephrol.* **17**(3): 384-389.
- Trnacević, S., Halilbasic, A., Imamović, G., Mesić, E. (2002). Balkan endemic nephropathy in Bosnia and Hercegovina. *Facta Univ Med Biol* **9**(1): 31-33.
- TSGene, Tumor Suppressor Gene Database, Vanderbilt University. Přístupné online: <http://bioinfo.mc.vanderbilt.edu/TSGene/> (přístup: 12.1.2016).
- Turesky, R.J. (2005). Perspective: ochratoxin A is not a genotoxic carcinogen. *Chem. Res. Toxicol.* **18**(7): 1082-1090.
- Turesky, R.J., Yun, B.H., Brennan, P., Mates, D., Jinga, V., Harnden, P., Banks, R.E., Blanche, H., Bihoreau, M.T., Chopard, P., Letourneau, L., Lathrop, G.M., Scelo, G. (2016). Aristolochic acid exposure in Romania and implications for renal cell carcinoma. *Br. J. Cancer.* **114**(1): 76-80.
- Umezawa, T. (2003). Diversity in lignan biosynthesis. *Phytochemistry Rev.* **2**: 371-390.

- Urzúa, A., Freyer, A.J., Shamma, M. (1987). (-)-aristotetralone: a 4-aryltetralone from *Aristolochia chilensis*. *Phytochemistry* 26(8): 2414-2415.
- Urzúa, A., Olguín, A., Santander, R. (2013). Fate of Ingested Aristolactams from *Aristolochia chilensis* in *Battus polydamas archidamas* (Lepidoptera: Papilionidae). *Insects* 4(4): 533-541.
- Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol J, Izakovic M, Mazur M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.* 160(1): 1-40.
- Vanhaelen, M., Vanhaelen-Fastre, R., But, P., Vanherweghem, J-L. (1994) Identification of aristolochic acid in Chinese herbs. *Lancet* 343(8890): 174.
- Vanherweghem, J-L., Depierreux, M., Tielemans, C., Abramowicz, D., Dratwa, M., Jadoul, M., Richard, C., Vandervelde, D., Verbeelen, D., Vanhaelen-Fastre, R., Vanhaelen, M. (1993). Rapidly progressive interstitial renal fibrosis in young women: association with slimming regimen including Chinese herbs. *Lancet* 341(8842): 387-391.
- Vanherweghem, J-L., Abramowicz, D., Tielemans, C., Depierreux, M. (1996). Effects of steroids on the progression of renal failure in chronic interstitial renal fibrosis: a pilot study in Chinese herbs nephropathy. *Am. J. Kidney Dis.* 27(2): 209-215.
- Vanherweghem, J-L. (1997). Association of valvular heart disease with Chinese-herb nephropathy. *Lancet* 350(9094): 1858.
- Vanherweghem, L-J. (1998). Misuse of herbal remedies: the case of an outbreak of terminal renal failure in Belgium (Chinese herbs nephropathy). *J. Altern. Complement. Med.* 4(1): 9-13.
- Varmus, H.E. (1985). Viruses, genes, and cancer. I. The discovery of cellular oncogenes and their role in neoplasia. *Cancer* 55(10):2324-2328.
- Večeřa, R., Zachařová, A., Orolin, J., Strojil, J., Skottová, N., Anzenbacher, P. (2011). Fenofibrate-induced decrease of expression of CYP2C11 and CYP2C6 in rat. *Biopharm. Drug Dispos.* 32(8): 482-487.
- Voice, T.C., McElmurry, S.P., Long, D.T., Dimitrov, P., Ganey, V.S., Petropoulos, E.A. (2006). Evaluation of the hypothesis that Balkan endemic nephropathy is caused by drinking water exposure to contaminants leaching from Pliocene coal deposits. *J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol.* 16(6): 515-524.
- Vrabcheva, T., Stroka, J., Anklam, E. (2002). Occurrence of fumonisin B1 in Bulgarian maize samples determined by ELISA and TLC methods using different clean up steps. *Mycotoxin Res.* 18(2): 46-56.
- Vrabcheva, T., Petkova-Bocharova, T., Grosso, F., Nikolov, I., Chernozemsky, I.N., Castegnaro, M., Dragacci, S. (2004). Analysis of ochratoxin A in foods consumed by inhabitants from an area with balkan endemic nephropathy: a 1 month follow-up study. *J. Agric. Food. Chem.* 52(8): 2404-2410.
- Wagner, S.T., Isnard, S., Rowe, N.P., Samain, M-S., Neinhuis, C., Wanke, S. (2012). Escaping the lianoid habit: evolution of shrub-like growth forms in *Aristolochia* subgenus *Isotrema* (*Aristolochiaceae*). *Am. J. Bot.* 99(10): 1609-29.

- Wallin, R., Gebhardt, O., Prydz, H. (1978). NAD(P)H dehydrogenase and its role in the vitamin K (2-methyl-3-phytyl-1,4-naphthaquinone)-dependent carboxylation reaction. *Biochem. J.* 169:95–101
- Wang, T.C., Jan, K.Y., Wang, A.S., Gurr, J.R. (2007). Trivalent arsenicals induce lipid peroxidation, protein carbonylation, and oxidative DNA damage in human urothelial cells. *Mutat. Res.* 615(1-2):75-86.
- Wang, S.M., Lai, M.N., Chen, P.C., Pu, Y.S., Lai, M.K., Hwang, J.S., Wang, J.D. (2014). Increased upper and lower tract urothelial carcinoma in patients with end-stage renal disease: a nationwide cohort study in Taiwan during 1997-2008. *Biomed. Res. Int.* 2014: 149750.
- Wang, K., Feng, C., Li, C., Yao, J., Xie, X., Gong, L., Luan, Y., Xing, G., Zhu, X., Qi, X., Ren, J. (2015). Baicalin Protects Mice from Aristolochic Acid I-Induced Kidney Injury by Induction of CYP1A through the Aromatic Hydrocarbon Receptor. *Int. J. Mol. Sci.* 16(7): 16454-16468.
- Wanke, S., González, F., Neinhuis, C. (2006). Systematics of Pipevines: Combining Morphological and Fast-Evolving Molecular Characters to Investigate the Relationships within Subfamily *Aristolochioideae* (Aristolochiaceae). *Int. J. Plant Sci.* 167(6): 1215-1227.
- Wedeen, R.P. (1991). Environmental renal disease: lead, cadmium and Balkan endemic nephropathy. *Kidney Int. Suppl.* 34: S4-S8.
- Williams, J.A., Martin, F.L., Muir, G.H., Hewer, A., Grover, P.L., Phillips, D.H. (2000). Metabolic activation of carcinogens and expression of various cytochromes P450 in human prostate tissue. *Carcinogenesis* 21(9): 1683-1689.
- Winkler, R., Hertweck, C. (2007). Biosynthesis of nitro compounds. *Chembiochem.* 8(9): 973-977.
- Woodworth, C.D., Michael, E., Smith, L., Vijayachandra, K., Glick, A., Hennings, H., Yuspa, S.H. (2004). Strain-dependent differences in malignant conversion of mouse skin tumors is an inherent property of the epidermal keratinocyte. *Carcinogenesis* 25(9):1771-1778.
- Wu, K., Knox, R., Sun, X.Z., Joseph, P., Jaiswal, A.K., Zhang, D., Deng, P.S., Chen, S. (1997). Catalytic properties of NAD(P)H:quinone oxidoreductase-2 (NQO2), a dihydronicotinamide riboside dependent oxidoreductase. *Arch. Biochem. Biophys.* 347(2): 221-228.
- Wu, T-S., Damu, A.G., Su, C-R., Kuo, P.-C. (2005). Chemical constituents and pharmacology of *Aristolochia* species. *Stud. Nat. Prod. Chem.* 32 (Part L): 855-1018.
- Wu, L., Sun, W., Wang, B., Zhao, H., Li, Y., Cai, S., Xiang, L., Zhu, Y., Yao, H., Song, J., Cheng, Y-C., Chen, S. (2015). An integrated system for identifying the hidden assassins in traditional medicines containing aristolochic acids. *Sci. Rep.* 5: 11318.
- Xiao, Y., Xue, X., Wu, Y.F., Xin, G.Z., Qian, Y., Xie, T.P., Gong, L.K., Ren, J. (2009). β -Naphthoflavone protects mice from aristolochic acid-I-induced acute kidney injury in a CYP1A dependent mechanism. *Acta Pharmacol. Sin.* 30(11): 1559-1565.

- Xue, X., Gong, L-K., Maeda, K., Luan, Y., Qi, X-M., Sugiyama, Y., Ren, J. (2011). Critical role of organic anion transporters 1 and 3 in kidney accumulation and toxicity of aristolochic acid I. *Mol. Pharm.* 8(6): 2183-2192.
- Yamagawa, K., Ichikawa, K. (1915). Experimentelle Studie über die Pathogenese der Epithel geschwülste. *Mitt. Med. Fak. Kaiserl. Univ. Tokyo* 15: 295-344.
- Yamani, A., Bunel, V., Antoine, M-H., Husson, C., Stévigny, C., Duez, P., Elachouri, M., Nortier, J. (2015). Substitution between *Aristolochia* and *Bryonia* genus in North-Eastern Morocco: toxicological implications. *J. Ethnopharmacol.* 166: 250-60.
- Yan, Z., Wang, W., Zhou, J., Yi, X., Zhang, J., Wang, X., Liu, Z. (2015). Screening of high phytotoxicity priority pollutants and their ecological risk assessment in China's surface waters. *Chemosphere* 128: 28-35.
- Yang, H.Y., Chen, P.C., Wang, J.D. (2014). Chinese herbs containing aristolochic acid associated with renal failure and urothelial carcinoma: a review from epidemiologic observations to causal inference. *Biomed. Res. Int.* 2014: 569325.
- Yang, H.Y., Wang, J.D., Lo, T.C., Chen, P.C. (2009). Increased mortality risk for cancers of the kidney and other urinary organs among Chinese herbalists. *J. Epidemiol.* 19(1): 17-23.
- Yang, L., Su, T., Li, X.M., Wang, X., Cai, S.Q., Meng, L.Q., Zou, W.Z., Wang, H.Y. (2012). Aristolochic acid nephropathy: variation in presentation and prognosis. *Nephrol. Dial. Transplant.* 27(1): 292-298.
- Yordanova, P., Karmaus, W., Tsoleva, S., Dimitrov, P. (2010). Ochratoxin A and β 2-microglobulin in BEN patients and controls. *Toxins (Basel)*. 2(4): 780-792.
- Yuan, S.Y., Yang, C.R., Cheng, C.L., Hsu, S.L., Liao, J.W., Lin, C.C., Chou, Y.Y., Cheng, Y.W. (2011). Comparative nephrotoxicity of aristolochic acid and tetrandrine *in vitro* and *in vivo*. *Int. J. Toxicol.* 30(1): 35-46
- Zachařová, A., Siller, M., Špičáková, A., Anzenbacherová, E., Skottová, N., Anzenbacher, P., Večera, R. (2012). Rosuvastatin suppresses the liver microsomal CYP2C11 and CYP2C6 expression in male Wistar rats. *Xenobiotica* 42(8): 731-736.
- Zamilpa, A., Abarca-Vargas, R., Ventura-Zapata, E., Osuna-Torres, L., Zavala, M.A., Herrera-Ruiz, M., Jiménez-Ferrer, E., González-Cortazar, M. (2014). Neolignans from *Aristolochia elegans* as antagonists of the neurotropic effect of scorpion venom. *J. Ethnopharmacol.* 157: 156-160.
- Zhang, L., Wang, F., Wang, L., Wang, W., Liu, B., Liu, J., Chen, M., He, Q., Liao, Y., Yu, X., Chen, N., Zhang, J-E., Hu, Z., Liu, F., Hong, D., Ma, L., Liu, H., Zhou, X., Chen, J., Pan, L., Chen, W., Wang, W., Li, X., Wang, H. (2012). Prevalence of chronic kidney disease in China: a cross-sectional survey. *Lancet* 379(9818): 815-822.
- Zhou, L., Cao, Y.L., Li, W.G., Fu, F.T., Zhang, L., Wang, X., Shi, X.H. (2011). Transitional cell carcinoma associated with aristolochic acid nephropathy: most common cancer in chronic hemodialysis patients in China. *Chin. Med. J. (Engl.)* 125(24): 4460-4465.

Seznam příloh

Příloha 1

Stiborová, M., Levová, K., **Bárta, F.**, Šulc, M., Frei, E., Arlt, V.M., Schmeiser, H.H. (2014). The Influence of Dicoumarol on the Bioactivation of the Carcinogen Aristolochic Acid I in Rats. *Mutagenesis* 29(3): 189-200. **IF₂₀₁₃ = 2,797.**

Příloha 2

Stiborová, M., Levová, K., **Bárta, F.**, Dračínská, H., Šulc, M., Hodek, P., Frei, E., Arlt, V.M., Schmeiser, H.H. (2014). Dicoumarol Inhibits Rat NAD(P)H:quinone Oxidoreductase *in vitro* and Induces its Expression *in vivo*. *Neuroendocrinol. Lett.* 35 (Suppl. 2): 123-132. **IF₂₀₁₄ = 0,799.**

Příloha 3

Bárta, F., Levová, K., Frei, E., Schmeiser, H.H., Arlt, V.M., Stiborová, M. (2014). The Effect of Aristolochic Acid I on Expression of NAD(P)H:Quinone Oxidoreductase in Mice and Rats – A Comparative Study. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 768: 1-7. **IF₂₀₁₄ = 2.415.**

Příloha 4

Stiborová, M., **Bárta, F.**, Levová, K., Hodek, P., Schmeiser, H.H., Arlt, V.M., Martínek, V. (2015). A Mechanism of *O*-Demethylation of Aristolochic Acid I by Cytochromes P450 and Their Contributions to This Reaction in Human and Rat Livers: Experimental and Theoretical Approaches. *Int. J. Mol. Sci.* 16(11): 27561-27575. **IF₂₀₁₅ = 3,257.**

Příloha 5

Dračínská, H., **Bárta, F.**, Levová, K., Hudecová, A., Moserová, M., Schmeiser, H.H., Kopke, K., Frei, E., Arlt, V.M., Stiborová, M. (2016). Induction of cytochromes P450 1A1 and 1A2 suppresses formation of DNA adducts by carcinogenic aristolochic acid I in rats *in vivo*. *Toxicology* 344-346: 7-18. **IF₂₀₁₅ = 3,817.**

Příloha 6

Stiborová, M., **Bárta, F.**, Levová, K., Hodek, P., Frei, E., Arlt, V.M., Schmeiser, H.H. (2015). The Influence of Ochratoxin A on DNA Adduct Formation by the Carcinogen Aristolochic Acid in Rats. *Arch. Toxicol.* 89(11): 2141-2158. **IF₂₀₁₅ = 6,637.**

Příloha 7

Bárta, F., Levová, K., Hodek, P., Schmeiser, H.H., Arlt, V.M., Stiborová, M. (2015). The Effect of Heavy Metal Ions, Phthalates and Ochratoxin A on Oxidation of Carcinogenic Aristolochic Acid I Causing Balkan Endemic Nephropathy. *Neuroendocrinol. Lett.* 36 (Suppl. 1): 13-21. **IF₂₀₁₅ = 0,946.**