

**UNIVERSITA KARLOVA V PRAZE**  
**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**  
**KATEDRA BIOCHEMIE**

Doktorský studijní program: Biochemie

*Autoreferát disertační práce*



**FUNKCE BIOTRANSFORMAČNÍCH ENZYMŮ VE VÝVOJI**  
**NEFROPATHÍ VYVOLANÝCH ARISTOLOCHOVOU**  
**KYSELINOU**

RNDr. František Bárta

*Školitelka:* prof. RNDr. Marie Stiborová, DrSc.

Praha, 2016

## 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 demethylovaného derivátu, AAIA (8-hydroxyaristolochové kyseliny), byla studována za využití indukce cytochromů P450 (CYP) 1A1 a 1A2, enzymů, které tuto reakci nejúčinněji 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.

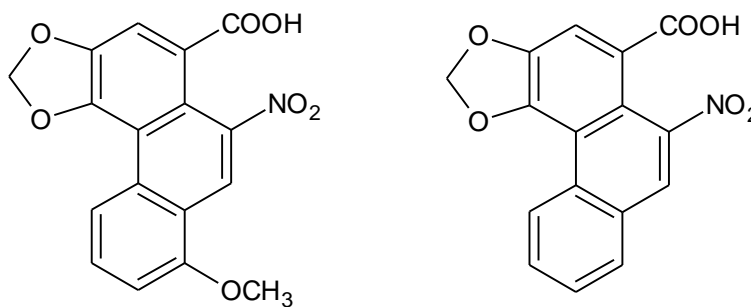
# 1. ÚVOD

## 1.1 Teorie chemické karcinogenese

Spojitosť mezi vývojem nádorového onemocnění a působením chemických látek byla pozorována již na sklonku 18. století. První práce tohoto druhu byly formulovány londýnskými lékaři Johnem Hillem a Percivallem Pottem (Hill, 1761; Pott, 1775). Následující dekády byly ve znamení intensivního studia vztahů mezi působením chemických látek a procesem karcinogenese. Zásadní převrat ovšem přišel až v polovině 20. století, kdy byla manželými Millerovými přednesena hypotéza, že chemické karcinogeny podstupují aktivaci katalysovanou enzymy za vzniku „proximálního“ karcinogenu (*proximate carcinogen*), který je následně 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). Vedle organických sloučenin se mezi chemické karcinogeny řadí rovněž anorganické látky (např. ionty arsenu, chromu, beryllia a kadmia) a látky přírodního původu. Mezi těmito látkami lze nalézt metabolity produkované plísněmi (např. aflatoxiny) a rostlinné produkty (safrol, aristolochová kyselina). Všechny tyto karcinogeny jsou každoročně předmětem odborných studií publikovanými Mezinárodní agenturou pro výzkum rakoviny (*International Agency for Research on Cancer, IARC*). 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.

## 1.2 Aristolochové kyseliny

Aristolochové kyseliny (AA) představují směs derivátů nitrofenanthrenových karboxylových kyselin, které jsou přítomny v rostlinné čeledi *Aristolochiaceae* (Podražcovité). Směs těchto alkaloidů je tvořena několika desítkami derivátů, z nichž převažují dva, *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. 1**) (Mix *et al.*, 1982; Kumar *et al.*, 2003). AA vykazují výrazné protizánětlivé účinky, pro něž rostliny obsahující AA byly a



Aristolochová kyselina I

Aristolochová kyselina II

**Obr. 1:** Struktura aristolochové kyseliny I a II.

nadále jsou využívány v tradičním léčení. Vedle toho byly AA rovněž studovány jako potenciální léčivé látky s cílem zařadit tyto látky do medicínské praxe (Möse, 1966, 1974a, 1974b). Nicméně zanedlouho byly objeveny a prokázány jejich toxické účinky, které spočívají v silné nefrotoxicitě a karcinogenitě. 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 klíčových genech (*p53*, *H-ras*) resultujících v tvorbu malignancí (Arlt *et al.*, 2007). Proto byly tyto rostlinné alkaloidy klasifikovány IARC jako *karcinogenní pro člověka* (skupina 1) (IARC, 2012).

### **1.3 Pathologie vyvolané aristolochovými kyselinami**

Aristolochové kyseliny jsou rovněž odpovědné za vývoj dvou závažných ledvinných onemocnění. Prvním z nich je nefropatie vyvolaná aristolochovou kyselinou (*Aristolochic Acid Nephropathy*, AAN), poprvé popsána u více než 100 belgických pacientek na začátku 90. let 20. století (Vanherweghem *et al.*, 1993; Nortier *et al.*, 2000). Tato zvláštní ledvinná nedostatečnost je charakterisována velice rychlým průběhem, který vede až ke konečnému renálnímu selhání. Záhy po popsání prvních případů bylo prokázáno, že onemocnění bylo vyvoláno působením AA, které se k pacientkám dostaly v rámci kúry pro redukci tělesné hmotnosti, a to záměnou dvou botanických druhů čínských bylin: neškodné *Stephania tetrandra* (čínsky *Fangji*) a toxické *Aristolochia fangchi* (čínsky *Fangchi*). Jedinou efektivní léčbou je nasazení glukokortikoidů (prednisolonu), nicméně tyto medikamenty neléčí původní příčinu, ale pouze zpomalují vývoj AAN než dosáhne konečného stádia (Martinez *et al.*, 2002). Vedle totálního selhání ledvin je AAN spojena rovněž s vývojem urotheliálních nádorů (*Upper Urothelial*

*Carcinoma, UUC*), který je přímým důsledkem karcinogenního působení AA (Nortier *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2012).

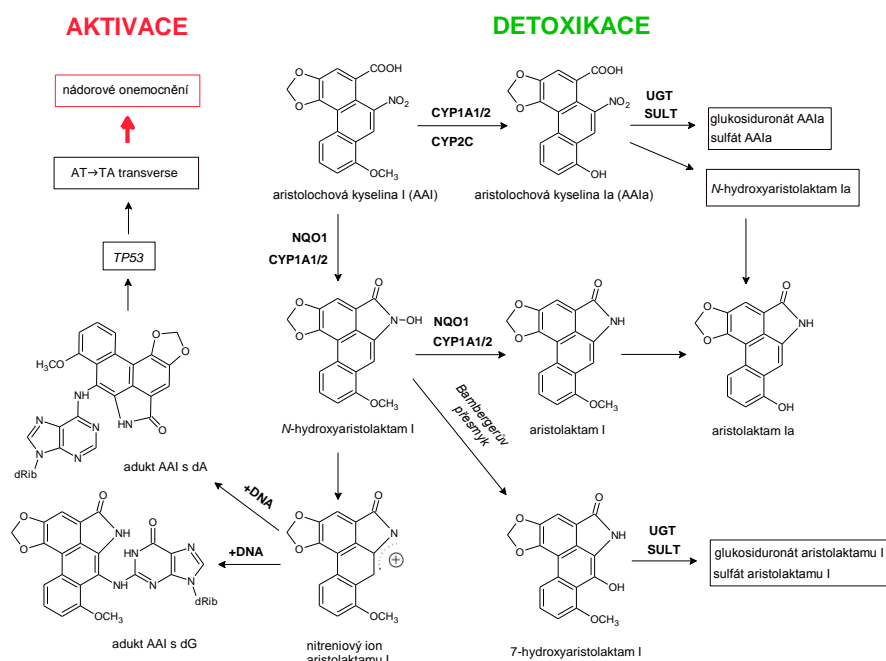
Druhým onemocněním je Balkánská endemická nefropatie (*Balkan Endemic Nephropathy, BEN*), která se projevuje jako chronická intersticiální fibrosa. Zvláštním znakem tohoto renálního onemocnění, které bylo poprvé popsáno v roce 1956 (Bamias & Boletis, 2008), je její výskyt pouze v určitých, endemických oblastech, ba vesnicích v povodí Dunaje (**Obr. 2**) (Toncheva *et al.*, 1998; Hranjec *et al.*, 2005; Jelaković *et al.*, 2015). Od prvního popsání BEN bylo diskutováno několik hypotéz její aetiologie, které zahrnovaly působení AA, ochratoxinu A (OTA), těžkých kovů a organických látek uvolňovaných z lignitových podloží (Ivić, 1969; Tatu *et al.* 1998; Long *et al.*, 2001; Pfohl-Leszkowicz & Manderville, 2007; Maharaj *et al.*, 2014), nicméně aetiologie BEN není dosud zcela jasná. Nedávné studie sice jednoznačně prokázaly majoritní úlohu AA ve vývoji BEN, a to na základě detekce kovalentních aduktů AA s DNA a charakteristické transversní mutace AT→TA v tumorovém supresorovém genu *p53* (Arlt *et al.*, 2002; Grollman *et al.*, 2007; Hollstein *et al.*, 2013), otázkou však zůstává, zda ostatní faktory nemohou k vývoji BEN/UUC nějakým způsobem přispívat. Ačkoliv můžeme mezi AAN a BEN nalézt mnoho shodných klinických rysů (závažná anemie, proteinurie, intersticiální fibrosa, UUC apod.), existuje základní rozdíl mezi BEN a AAN: rychlost vývoje obou onemocnění. Zatímco AAN je charakterisována jako rychle postupující fibrosa, BEN je známa svým velmi pomalým vývojem.



**Obr. 2:** Mapa s vyznačenými endemickými oblastmi BEN v Chorvantsku, Bosně a Hercegovině, Srbsku, Bulharsku a Rumunsku (převzato z Grollman, 2013).

## 1.4 Metabolismus aristolochových kyselin

Aristolochové kyseliny, podobně jako ostatní xenobiotika, podstupují v organismu metabolickou přeměnu (**Obr. 3**), která primárně vede k jejich detoxikaci. Nicméně, jak bylo uvedeno v kapitole 1.1, 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 toxičtější (Miller *et al.*, 1966a; Miller & Miller, 1981).



**Obr. 3:** Schema biotransformace AAI v organismech; UGT, UDP-glukuronosyltransferasa; SULT, sulfotransferasa. (upraveno dle Bárta *et al.*, 2015).

V organismu může být AAI oxidačně detoxikována za vzniku *O*-demethylovaného produktu, AAIa (8-hydroxyaristolochové kyseliny) (Arlt *et al.*, 2011; Levová *et al.*, 2011; Stiborová *et al.*, 2012). AAIa, další 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). Oxidační reakce resultující v tvorbu AAIa je katalysována výhradně hemovými enzymy, cytochromy P450 (CYP). Nejúčinnější isoformy detoxikující AAI jak v lidském, tak potkaním organismu jsou CYP1A a 2C.

Vedle detoxikačních reakcí CYP katalysují rovněž redukční aktivaci AAI, která vede ke vzniku aduktů s deoxyadenosinem a deoxyguaninem (Stiborová *et al.*, 2005, 2011a). Nejefektivnější enzym v nitroredukci AAI vedoucím ke vzniku *N*-hydroxyaristolaktamu I je cytosolární NAD(P)H:chinonoxidoreduktasa 1 (NQO1) (Stiborová *et al.*, 2011b). Právě tvorba *N*-hydroxyaristolaktamu I je zásadním krokem bioaktivace AAI, neboť tento produkt se snadno rozpadá na *N*-acylnitreniový ion, který interaguje s purinovými basemi DNA za vzniku persistentních kovalentních aduktů.

## **2. CÍL DISERTAČNÍ PRÁCE**

Cílem předkládané disertační práce bylo studium enzymů metabolisujících aristolochové kyseliny (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* neaktivnější. 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

Použitý materiál a metody, které byly využity při vypracování předkládané disertační práce, jsou detailně popsány v publikacích, které laskavý čtenář nalezne v seznamu publikací na konci tohoto autoreferátu (**Publikace 4-9 a 11**). Pro plnou srozumitelnost výsledkové části jsou některé metody krátce charakterisovány zde.

V rámci experimentů *in vivo* byly podány laboratornímu potkanovi vybrané chemikálie, které bylo lze použít jako nástroje pro studium enzymů participujících na metabolismu AAI. V první studii byl podán dikumarol (inhibitor NQO1) a/nebo AAI, v další studii byl podán Sudan I (induktor CYP1A) a/nebo AAI a v poslední studii byl podán OTA a/nebo směs AAI a AAI.

Enzymové aktivity NQO1, NADPH:CYP reductasy (POR), CYP1A1/2 a 2C6/11 byly stanoveny dle standardních protokolů. Aktivita NQO1 jako schopnost redukovat menadion v přítomnosti NADH (Ernster, 1967), POR jako schopnost redukovat cytochrom c (Sottocassa *et al.*, 1967), CYP1A1 jako schopnost oxidovat Sudan I (Stiborová *et al.*, 2002) a aktivita CYP1A1/2 byla určena fluorimetricky (Burke *et al.*, 1994). Aktivita CYP2C6 byla určena jako schopnost specificky hydroxylovat diklofenak (Kaphalia *et al.*, 2006) a aktivity CYP2C11 jako schopnost oxidovat testosteron v poloze 16 $\alpha$  (Baltes *et al.*, 1998).

Analýza tvorby AAIa *in vitro* byla provedena metodou RP-HPLC v gradientovém uspořádání, kdy se složení mobilní fáze měnilo z 80 % elučního roztoku A (100 mM triethylaminacetát, pH = 7,4) a 20 % elučního roztoku B (80% acetonitril) na konečné složení 40 % A a 60 % B. Separace byla provedena na kololoně C18 při teplotě 35° C a průtoku mobilní fáze 0,5 ml/min. Jedna eluce probíhala 55 minut a separované látky byly analysovány při vlnové délce 250 nm.

Analýza aduktů AAI, AA či OTA s DNA byla provedena školitelkou prof. RNDr. Marií Stiborovou, DrSc., metodou „<sup>32</sup>P-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.*, 2005).



## 4. VÝSLEDKY A DISKUSE

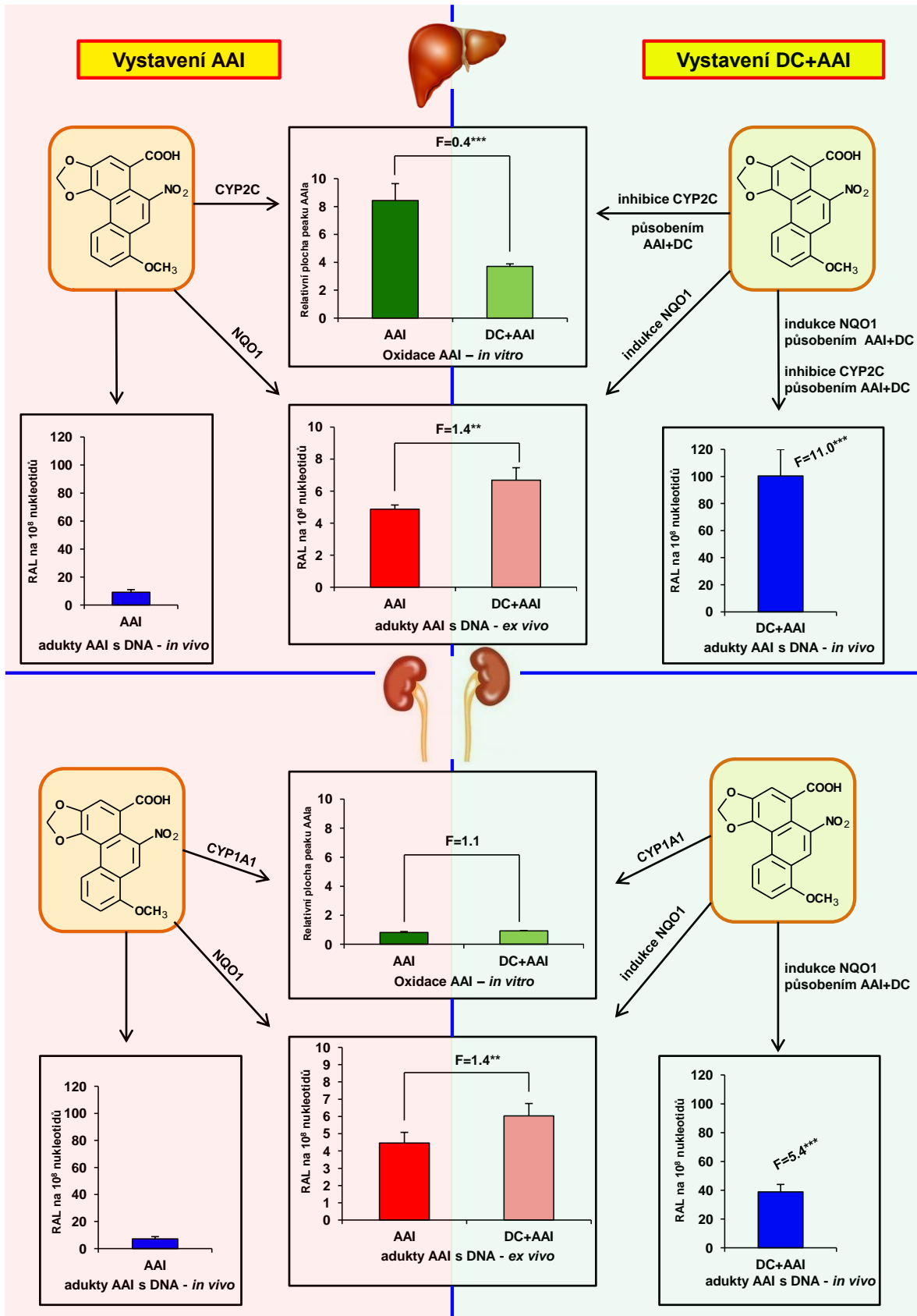
### 4.1 Studium molekulárního mechanismu vývoje nefropathie vyvolané AA

V první části předkládané disertační práce byl studován metabolismus AAI v organismu laboratorního potkana. Konkrétně 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, a efektivní induktor CYP1A1/2, Sudan I.

#### 4.1.1 NQO1 diktuje bioaktivaci AAI *in vivo*

Analýsa tvorby aduktů AAI s DNA v játrech a ledvině potkanů premedikovaných dikumarolem a/nebo AAI demonstrovala 11násobné, resp. 5násobné zvýšení tvorby množství aduktů s DNA po podání dikumarolu (**Obr. 4**). Toto zjištění bylo překvapivé, neboť dikumarol je znám jako silný inhibitor NQO1 (Ernster, 1967), která bioaktivaci AAI katalyzuje s největší účinností (Stiborová *et al.*, 2011b). Proto bylo očekáváno, že tvorba aduktů AAI s DNA bude rovněž snížena. Nicméně, následné stanovení enzymových aktivit a proteinových expresí NQO1 v obou studovaných orgánech prokázaly, že dikumarol indukoval NQO1. Tento poznatek, tedy 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. Jedním z vysvětlení tohoto unikátního zjištění může být dostupnost dikumarolu v různých tkáních a délka expozice AAI a dikumarolu a forma jejich podání. Studie rovněž prokázala, že NQO1 je majoritním enzymem, který participuje na redukční aktivaci AAI nejen *in vitro*, ale rovněž v podmínkách *in vivo*.

**Obr 4:** Schematické shrnutí ilustrující vliv podání dikumarolu (DC) na metabolismus AAI v potkanech (následující strana). Indukce NQO1 vyvolaná působením dikumarolu rezultovala ve vyšší tvorbu aduktů AAI s DNA po redukci 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.

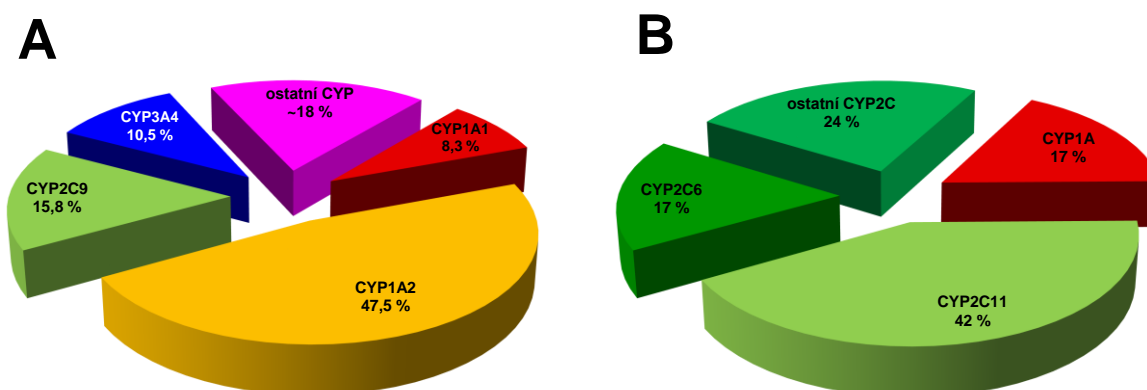


Obr. 4: Legenda k obrázku je umístěna na předchozí straně.

Analýza enzymů detoxikujících AAI na AAIa v orgánech testovaných laboratorních potkanů (CYP1A1/2 a CYP2C6/11) demonstrovala význam CYP2C, které jsou majoritně zastoupeny v potkaních játrech (Nedelcheva & Gut, 1994). Podání dikumarolu vedlo k inhibici tvorby AAIa (**Obr. 4**), a tím i k poklesu detoxikace AAI. Následné stanovení enzymových aktivit CYP1A a 2C ukázalo, že zatímco CYP1A1/2 byly indukovány, CYP2C6/11 byly působením dikumarolu inhibovány. Je tedy pravděpodobné, že zvýšená tvorba aduktů AAI s DNA v játrech tedy mohla být výsledkem nejen indukce NQO1, ale rovněž snížené míry detoxikace AAI na AAIa, která byla vyvolána inhibicí CYP2C6/11. Nadto je pravděpodobné, že CYP1A1/2 přispívají v tomto případě spíše k nitroredukci AAI vedoucí k tvorbě aduktů s DNA, než k oxidační detoxikaci na AAIa.

#### 4.1.2 Příspěvky jednotlivých lidských a potkaních cytochromů P450 k oxidační detoxikaci AAI

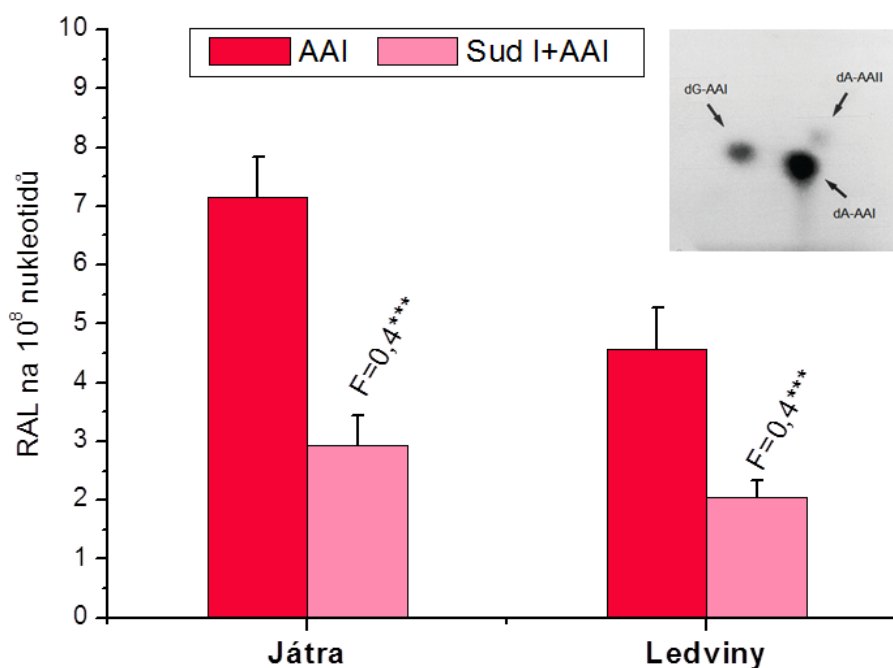
V další části studie zkoumající oxidační detoxikaci AAI na AAIa byly určeny reálné příspěvky lidských a potkaních CYP k této reakci, a to s přihlédnutím jak jejich vlastní aktivitě, tak i proteinové expresi těchto enzymů v lidských a potkaních játrech. V lidských játrech nejvíce přispívá k detoxikaci AAI CYP1A2 (~47,5 %), který je následován CYP2C9 (~15,8 %), CYP3A4 (~10,5 %) a CYP1A1 (~8,3 %) (**Obr. 5A**). Takové výsledky jsou částečně překvapivé, neboť nejvyšší aktivitu oxidovat AAI na AAIa měl právě lidský rekombinantní CYP1A1, nicméně jeho nízká exprese v játrech (<0,7 %) (Stiborová *et al.*, 2002) je důvodem tak malého reálného příspěvku k oxidační detoxikaci AAI, a to dokonce nižšího než jsou příspěvky CYP1A2, 2C9 a 3A4. V potkaních játrech nejvíce přispívají k detoxikaci AAI na AAIa CYP2C (~83 %) (**Obr. 5B**), které byly následovány CYP1A (~17 %). Ačkoliv aktivita oxidovat AAI na AAIa potkaními CYP2C je velice nízká, jejich reálný příspěvek je majoritní, neboť exprese této podrodiny v potkaních játrech je až 55% (Nedelcheva & Gut, 1994).



**Obr. 5:** Reálné příspěvky jednotlivých lidských (A) a potkaních (B) CYP k oxidační detoxikaci AAI na AAIa v játrech těchto organismů.

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

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. Podání Sudanu I vedlo nejen k silné indukci proteinové exprese CYP1A1/2 a jejich enzymových aktivit, ale také ke snížení tvorby aduktů AAI s DNA (**Obr. 6**). Indukce CYP1A1/2 Sudanem I tedy výsledně vedla ke snížení genotoxicity AAI, a to i navzdory skutečnosti, že Sudan I je rovněž induktorem NQO1, tj. enzymu který nejúčinněji redukuje AAI za tvorby aduktů s DNA. Na základě těchto výsledků a výsledků dříve publikovaných studií využívajících geneticky modifikovaných zvířat (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*.



**Obr. 6:** Tvorba aduktů AAI s DNA v játrech a ledvině potkanů premedikovaných AAI a kombinací Sudanu I (Sud I) a AAI. Stanovení byla provedena metodou „<sup>32</sup>P-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.

## **4.2 Studium aetiologie Balkánské endemické nefropathie**

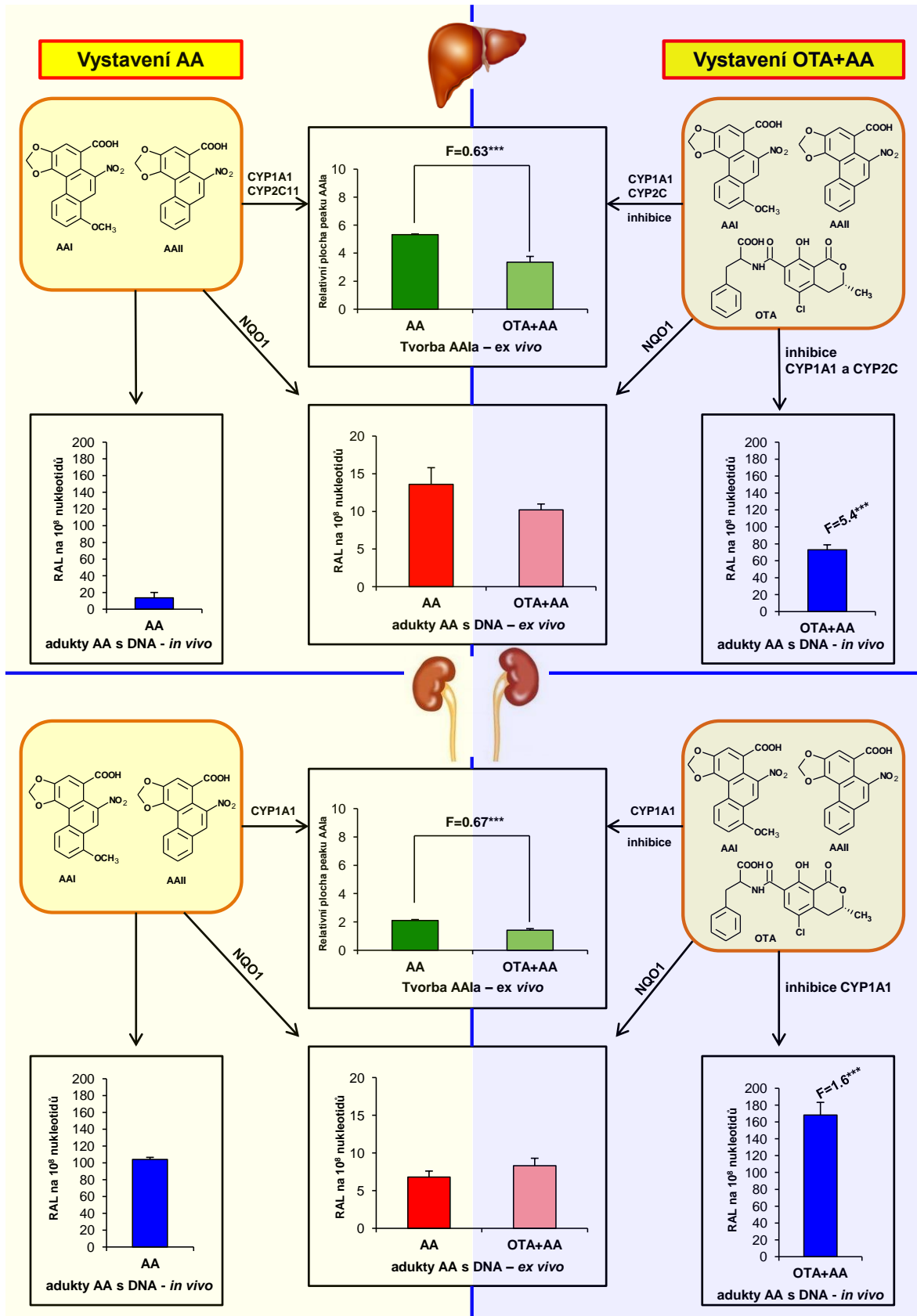
Druhá oblast studovaná v předkládané disertační práci byla zaměřena na příspěvek k dalšímu poznání aetiologie BEN. V období minulých 60 let byla aetiologie BEN detailně studována celou řadou pracovišť a mezi potenciálními původci tohoto onemocnění byly řazeny nejen AA, ale i mykotoxiny (OTA), toxické ionty těžkých kovů a organické látky uvolňované z lignitových podloží endemických oblastí. Na základě posledních komplexních studií byla jednoznačně prokázána klíčová úloha AA ve vývoji BEN/UUC a zejména v UUC. Nicméně je rovněž pravděpodobné, že k vývoji tohoto onemocnění mohou přispívat i další faktory.

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

Analýza tvorby aduktů AA a OTA s DNA demonstrovala, že zatímco adukty AA s DNA byly tvořeny jak v játrech, tak v ledvině studovaných zvířat, adukty s DNA odvozené od OTA nebyly nalezeny (**Obr. 7**). To naznačuje, že OTA nereaguje jako klasické genotoxické agens, které je schopné přímé modifikace DNA. Množství aduktů AA s DNA v ledvině bylo vyšší než v játrech a jejich množství bylo zvýšeno kombinovaným podáním. Na základě těchto výsledků lze předpokládat, že OTA ovlivňuje metabolismus AA, který pak resultuje ve vyšší tvorbu aduktů s DNA. Následně bylo zjištěno, že podání OTA resultovalo ve zvýšené proteinové exprese NQO1, které korespondovaly se zvýšenými enzymovými aktivitami tohoto enzymu.

**Obr. 7:** 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 resultovala ve snížení tvorby AAa 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.



Obr. 7: Legenda k obrázku je umístěna na předchozí straně.

Následné analýsy proteinových expresí a aktivity enzymů detoxikujících AAI odhalily, že OTA vede k inhibici aktivity jak CYP1A, tak CYP2C6/11, tzn. enzymů, které účinně detoxikují AAI na AAIA. Nadto bylo zjištěno, že podání OTA rovněž inhibovalo aktivitu POR, enzymu, který je důležitým reakčním partnerem CYP. Tyto skutečnosti signalisují, že OTA vede k inhibici aktivit základních potkaních enzymů detoxikujících AA, čímž snižuje míru oxidační detoxikace AAI, resp. AA na AAIA (**Obr. 7**).

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 inhibicí enzymů oxidačně detoxikujících AA, tj. CYP1A1, 1A2 a zejména CYP2C6 a 2C11, která byly 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), protože jejich vystavení je dlouhodobé, ba chronické.

#### **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 ( $\text{CdCl}_2$ ), olova [ $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ ], selenu ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ) 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), butylbenzylftalát (BBP) a bis(2-ethylhexyl)ftalát (DEHP).

Oxidační detoxikace AAI na AAIA *in vitro* byla částečně inhibována působením toxických iontů kadmia a selenu, dále pak BBP, nejvíce však inhiboval tuto reakci OTA.

Proto byl testován potenciál těchto látek ovlivnit aktivity enzymů, které majoritně participují na detoxikaci AAI v potkaních játrech, tj. CYP1A1/2 a CYP2C6/11 (**Tab. 1**). Získané výsledky sice demonstrovaly schopnost testovaných polutantů inhibovat enzymy detoxikující AAI na AAIA, ale pouze při vysokých koncentracích (100  $\mu$ M). Na základě těchto výsledků lze konstatovat, že snížení tvorby AAIA v přítomnosti CdCl<sub>2</sub>, Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>, 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.

**Tabulka 1:** Vliv CdCl<sub>2</sub>, Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>, BBP a OTA na enzymové aktivity CYP1A1/2 a 2C6/11 v potkaních jaterních mikrosomech.

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

Hodnoty vyjádřeny jako procento kontroly bez polutantu. Inkubační směsi obsahovaly 10  $\mu$ M AAI; 100  $\mu$ M polutant (CdCl<sub>2</sub> a Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> byly rozpuštěny v destilované vodě; OTA v 0,1 M NaHCO<sub>3</sub>, 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 \*\*\* $p < 0,001$ .

<sup>a</sup> NE, žádný efekt.

Ačkoliv byly uvedené látky detekovány ve vodách a lignitovém podloží endemických oblastí (Karmaus *et al.*, 2008; Maharaj *et al.*, 2014), nejsou dosud známé 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 tedy minimální. To je také 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 AA<sub>Ia</sub>. 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 AA<sub>I</sub> resultující v tvorbu aduktů AA<sub>I</sub> 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 inhibitorem NQO1 *in vitro* a *in vivo*, ale rovněž induktorem tohoto enzymu. Na detoxikaci AA<sub>I</sub> na AA<sub>Ia</sub> participují oxidační reakce katalysované CYP. V předkládané práci bylo zjištěno, že v lidských játrech přispívají k detoxikaci AA<sub>I</sub> zejména CYP1A2 > CYP2C9 > CYP3A4 > CYP1A1, zatímco v potkaních játrech je AA<sub>I</sub> detoxikována převážně CYP2C (83 %). Důležitým poznatkem je skutečnost, že CYP1A1/2 katalysují v podmínkách *in vivo* detoxikační reakce, tzn. jejich potenciál redukčně aktivovat AA<sub>I</sub> 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 AA<sub>I</sub> 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. Tyto publikace jsou uvedeny v seznamu publikací na konci autoreferátu (**Publikace 4-9 a 11**).

## 6. POUŽITÁ LITERATURA

- Arlt, V.M., Ferluga, D., Stiborová, M. *et al.* (2002). *Int. J. Cancer* 101(5): 500-502.
- Arlt, V.M., Stiborová, M., vom Brocke, J. *et al.* (2007). *Carcinogenesis* 28(11): 2253-2261.
- Arlt, V.M., Levová, K., Bárta, F. *et al.* (2011). *Chem. Res. Toxicol.* 24(10): 1710-1719.
- Baltes, M.R., Dubois, J.G., Hanocq, M. (1998). *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 706(2): 201-207.
- Bamias, G., Boletis, J. (2008). *Am. J. Kidney Dis.* 52(3): 606-616.
- Bárta, F., Levová, K., Hodek, P. *et al.* (2015). *Neuroendocrinol. Lett.* 36 (Suppl. 1): 13-21.
- Bieler, C.A., Stiborova, M., Wiessler, M. *et al.* (1997). *Carcinogenesis* 18(5): 1063-1067.
- Burke, M.D., Thompson, S., Weaver, R.J. *et al.* (1994). *Biochem. Pharmacol.* 48(5): 923-936.
- Chan, W., Cui, L., Xu, G. *et al.* (2006). *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* 20(11): 1755-1760.
- Chen, C-H., Dickman, K.G., Moriya, M. *et al.* (2012). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109(21): 8241-8246.
- Ernster, L. (1967). *Methods in Enzymology* 10, Academic Press, New York, 309-317.
- Grollman, A.P., Jelaković, B. (2007). *J. Am. Soc. Nephrol.* 18(11): 2817-2823.
- Grollman, A.P. (2013). *Environ. Mol. Mutagen.* 54(1): 1-7.
- 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.
- Hollstein, M., Moriya, M., Grollman, A.P. *et al.* (2013). *Mutat. Res.* 753(1): 41-49.
- Hranjec, T., Kovač, A., Kos, J. *et al.* (2005). *Croat. Med. J.* 46(1): 116-125.
- IARC, International Agency for Research on Cancer (2012). *A Review of Human Carcinogens: Pharmaceuticals. IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum.* 100A.
- Ivić, M. (1969). *Lijec. Vjesn.* 91(12): 1273-1281.
- Jelaković, B., Vuković Lela, I., Karanović, S. *et al.* (2015). *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 10(2): 215-223.
- Kaphalia, L., Kaphalia, B.S., Kumar, S. *et al.* (2006). *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 830(2): 231-237.
- Karmaus, W., Dimitrov, P., Simeonov, V. *et al.* (2008). *Environ. Health* 7: 11.

- Kumar, V., Poonam, Prasad, A.K. *et al.* (2003). *Nat. Prod. Rep.* 20(6): 565-583.
- Levová, K., Moserová, M., Kotrbová, V. *et al.* (2011). *Toxicol. Sci.* 121(1): 43-56.
- Long, D.T., Icopini, G., Ganev, V. *et al.* (2001). *Int. J. Occup. Med. Environ. Health* 14(2): 193-196.
- Maharaj, S.V., Orem, W.H., Tatu, C.A. *et al.* (2014). *Environ. Geochem. Health* 36(1): 1-17.
- Martinez, M-C., Nortier, J., Vereerstraeten, P. *et al.* (2002). *Nephrol Dial Transplant.* 17(11): 2033-2034.
- Miller, E.C., Lotlikar, P.D., Pitot *et al.* (1966a). *Cancer Res.* 26(11): 2239-2247.
- Miller, E.C., Miller, J.A. (1966b). *Pharmacol. Rev.* 18(1): 805-838.
- Miller, E.C., Miller, J.A. (1981). *Cancer* 47, 2327-2345.
- Mix, D.B., Guinaudeau, H., Shamma, M. (1982). *J. Nat. Prod.* 45(6): 657-666.
- Möse, J.R. (1974a). Communication. *Drug Res.* 24(1): 52-54.
- Möse, J.R. (1974b). *Drug Res.* 24(2): 151-153.
- Nedelcheva, V., Gut, I. (1994). *Xenobiotica* 24(12): 1151-1175.
- Nortier, J.L., Muniz Martinez, M-C., Schmeiser, H.H. *et al.* (2000). *N. Engl. J. Med.* 342(23), 1686-1682.
- Pfohl-Leszkowicz, A., Manderville, R.A. (2007). *Mol. Nutr. Food Res.* 51(1): 61-99.
- Pott, P. (1775). In: *CA Cancer J. Clin.* 24(2), 110-116 (1974).
- Schmeiser, H.H., Pool, B.L., Wiessler, M. (1986). *Carcinogenesis.* 7(1): 59-63.
- Schmeiser, H.H., Bieler, C.A., Wiessler, M. *et al.* (1996). *Cancer Res.* 56(9): 2025-2028.
- Sottocasa, G.L., Kuylenstierna, B., Ernster, L. *et al.* (1967). *J. Cell Biol.* 32(2): 415-438.
- Stiborová, M., Martínek, V., Rýdlová, H. *et al.* (2002). *Cancer. Res.* 62(20): 5678-5684.
- Stiborová, M., Frei, E., Hodek, P. *et al.* (2005). *Int. J. Cancer.* 113(2): 189-197.
- Stiborová, M., Mareš, J., Levová, K. *et al.* (2011a). *Neuroendocrinol. Lett.* 32 (Suppl. 1): 121-130.
- Stiborová, M., Mareš, J., Frei, E. *et al.* (2011b). *Environ. Mol. Mutagen.* 52(6): 448-459.
- Stiborová, M., Levová, K., Bárta, F *et al.* (2012). *Toxicol. Sci.* 125(2): 345-358.
- Tatu, C.A., Orem, W.H., Finkelman, R.B. *et al.* (1998). *Environ. Health Perspect.* 106(11): 689-700.
- Toncheva, D., Dimitrov, T., Stojanova, S. (1998). *Eur. J. Epidemiol.* 14(4): 389-394.
- Vanherweghem, J-L., Depierreux, M., Tielemans, C. *et al.* (1993). *Lancet* 341(8842): 387-391.
- Yordanova, P., Karmaus, W., Tsołova, S. *et al.* (2010). *Toxins (Basel).* 2(4): 780-792.

## **CURRICULUM VITAE**

### **Osobní informace**

Jméno a příjmení: **František Bárta**  
Adresa: Jungmannova 769/14, Praha 1 – Nové Město, Praha  
Národnost: česká  
Datum narození: 2. října 1987

### **Vzdělání**

od 2012 Přírodovědecká fakulta University Karlovy v Praze, katedra biochemie;  
**PGS student**

2014 Přírodovědecká fakulta UK v Praze, katedra biochemie  
**RNDr. v oboru biochemie**

2010 – 2012 Přírodovědecká fakulta UK v Praze, katedra biochemie  
**Mgr. biochemie** (absolvoval *summa cum laude*)  
Diplomová práce: *Mechanismus karcinogenity a nefrotoxicity aristolochových kyselin*

2007 – 2010 Přírodovědecká fakulta UK v Praze, katedra biochemie  
**Bc. biochemie**  
Bakalářská práce: *Nefropatie a nádorová onemocnění způsobená alkaloidy aristolochovými kyselinami*

### ***Řešené grantové projekty***

2013 – 2015 Studium etiologie Balkánské endemické nefropatie (GAUK 570513).  
*Hlavní řešitel.*

### **Osobní schopnosti a dovednosti**

Mateřský jazyk: český jazyk

#### ***Ostatní jazyky:***

Anglický jazyk: CEFR B2+ (FCE, duben 2016)

#### ***Technické dovednosti:***

výpočetní technika: MS Windows, MS Office (Word, Excel, PowerPoint), Origin 6.0 Professional

## SEZNAM PUBLIKACÍ

**Původní práce a práce publikované v časopisech s IF (souhrnný IF = 33,652):**

1. 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.: Role of P450 1A1 and 1A2 in Bioactivation versus Detoxication of the Renal Carcinogen Aristolochic Acid I: Studies in *Cyp1a1(-/-)*, *Cyp1a2(-/-)* and *Cyp1a1/1a2(-/-)* Mice. *Chem. Res. Toxicol.* **24**, 1710-1719 (2011). **IF<sub>2011</sub>=3.779**.
2. Stiborová, M., Mareš, J., Levová, K., Pavlíčková, J., **Bárta, F.**, Hodek, P., Frei, E., Schmeiser, H.H.: 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), 101-110 (2011). **IF<sub>2011</sub>=1.296**.
3. Stiborová, M., Levová, K., **Bárta, F.**, Shi, Z., Frei, E., Schmeiser, H.H., Nebert, D.W., Phillips, D.H., Arlt, V.M.: Bioactivation versus Detoxication of the Urothelial Carcinogen Aristolochic Acid I by Human Cytochrome P450 1A1 and 1A2. *Toxicol. Sci.* **125**, 345-358 (2012). **IF<sub>2012</sub>=4.652**.
4. Stiborová, M., Levová, K., **Bárta, F.**, Šulc, M., Frei, E., Arlt, V.M., Schmeiser, H.H.: The Influence of Dicoumarol on the Bioactivation of the Carcinogen Aristolochic Acid I in Rats. *Mutagenesis* **29**, 189-200 (2014). **IF<sub>2014</sub>=2.797**.
5. **Bárta, F.**, Levová, K., Frei, E., Schmeiser, H.H., Arlt, V.M., Stiborová, M.: The Effect of Aristolochic Acid I on Expression of NAD(P)H:Quinone Oxidoreductase in Mice and Rats – A Comparative Study. *Mutat. Res.* **768**, 1-7 (2014). **IF<sub>2014</sub>=2.415**.
6. Stiborová, M., Levová, K., **Bárta, F.**, Dračinská, H., Šulc, M., Hodek, P., Frei, E., Arlt, V.M., Schmeiser, H.H.: Dicoumarol Inhibits Rat NAD(P)H:quinone Oxidoreductase *in vitro* and Induces its Expression *in vivo*. *Neuroendocrinol. Lett.* **35** (Suppl. 2), 123-132 (2014). **IF<sub>2014</sub>=0.799**.
7. Stiborová, M., **Bárta, F.**, Levová, K., Hodek, P., Frei, E., Arlt, V.M., Schmeiser, H.H.: The Influence of Ochratoxin A on DNA Adduct Formation by the Carcinogen Aristolochic Acid in Rats. *Arch. Toxicol.* **89**, 2141-2158 (2015). **IF<sub>2015</sub>=6.637**.
8. Stiborová, M., **Bárta, F.**, Levová, K., Hodek, P., Schmeiser, H.H., Arlt, V.M., Martínek, V.: 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**, 27561-27575 (2015). **IF<sub>2015</sub>=3.257**.
9. **Bárta, F.**, Levová, K., Hodek, P., Schmeiser, H.H., Arlt, V.M., Stiborová, M.: 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 (2015). **IF<sub>2015</sub>=0.946**.

10. Milichovský, J., **Bárta, F.**, Schmeiser, H.H., Arlt, V.M., Frei, E., Stiborová, M., Martínek, V.: 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, 213-228 (2016). **IF<sub>2015</sub>=3.257**.
11. Dračínská, H., **Bárta, F.**, Levová, K., Hudecová, A., Moserová, M., Schmeiser, H.H., Kopke, K., Frei, E., Arlt, V.M., Stiborová, M.: 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 (2016). **IF<sub>2015</sub>=3.817**.

### **Abstrakta z konferencí a symposií uveřejněná ve sbornících a časopisech:**

#### ***a) mezinárodní konference***

1. **Bárta, F.**, Levová, K., Frei, E., Arlt, V.M., Schmeiser, H.H., Stiborová, M.: Dicoumarol inhibits NAD(P)H:quinone oxidoreductase-mediated formation of aristolochic acid-DNA adducts *in vitro* whereas increases their generation in rats *in vivo*. *50<sup>th</sup> Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX), Edinburgh, The United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland, 7<sup>th</sup> – 10<sup>th</sup> September 2014. Toxicol. Lett.* 229S., p. S146 (2014). ISSN 0378-4274. **IF<sub>2013</sub>=3.262**.
2. **Bárta, F.**, Levová, K., Hodek, P., Frei, E., Arlt, V.M., Schmeiser, H.H., Stiborová, M.: Mycotoxin ochratoxin A decreases cytochrome P450-mediated detoxication of carcinogenic aristolochic acid thereby increases its genotoxic potential in rats *in vivo*. *51<sup>st</sup> Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX), Porto, Portuguese Republic, 13<sup>th</sup> – 16<sup>th</sup> September 2015. Toxicol. Lett.* 238S., p. S237 (2015). ISSN 0378-4274. **IF<sub>2015</sub>=3.522**.

#### ***b) české a slovenské konference (výběr)***

1. **Bárta, F.**, Levová, K., Schmeiser, H.H., Stiborová M.: Identification of rat cytochromes P450 activating and detoxicating carcinogenic aristolochic acid I. *16<sup>th</sup> Interdisciplinary Toxicology Conference, Prague, Czech Republic, 17.- 20. May 2011. Interdisc. Toxicol.* 4, p. A62 (2011). ISSN 1337-6853.
2. **Bárta, F.**, Levová, K., Frei, E., Schmeiser, H.H., Schmeiser, H.H., Stiborová, M.: Rat cytochromes P450 1A1 and 1A2 activate and detoxicate carcinogenic aristolochic acid I. Sborník příspěvků. *XV. Setkání biochemiků a molekulárních biologů*. 1.-2. 11. 2011, Brno, p. 58. ISBN 978-80-210-5594-0.
3. Levová, K., **Bárta, F.**, Frei, E., Schmeiser, H.H., Arlt, V.M., Phillips, D., Nebert, D.W., Shi, Z., Stiborová, M.: Utilizing of genetically modified mouse models helps to identify enzymes metabolizing carcinogenic aristolochic acid I. Sborník přednášek a posterů, program. *XXIII. Biochemický sjezd České společnosti pro biochemii a molekulární biologii a Slovenské společnosti pre biochémiu a molekulárnu biológiu*. 26.-29.8. 2012, Brno, p.146. ISBN 978-80 86313-34-4.

4. **Bárta, F.**, Levová, K., Arlt, V.M., Frei, E., Schmeiser, Stiborová, M.: Role NAD(P)H:chinonoxidoreduktasy v metabolické aktivaci karcinogenní aristolochové kyseliny I *in vivo*. *XIII. Mezioborové setkání mladých biologů, biochemiků a chemiků*, 14.-17.5. 2013, Žďár nad Sázavou, *Chem. Listy 107*, 403-404 (2013).
5. **Bárta, F.**, Levová, K., Frei, E., Schmeiser, H.H., Arlt, V.M., Stiborová, M.: Carcinogenic and nephrotoxic aristolochic acid induces expression of NAD(P)H:quinone oxidoreductase. *18<sup>th</sup> Interdisciplinary Toxicology Conference, Hradec Kralove, Czech Republic*, 19.-21.6. 2013. *Mil. Med. Sci. Lett.*, (2013) 82, p. 2. ISSN 0372-7025.
6. **Bárta, F.**, Levová, K., Arlt, V.M., Frei, E., Schmeiser, H.H., Stiborová, M.: Význam ochratoxinu A ve vývoji Balkánské endemické nefropatie. *XIV. Mezioborové setkání mladých biologů, biochemiků a chemiků*, 13.-16.5. 2014, Sněžné, Milovy, *Chem. Listy 108*, 522-523 (2014).
7. **Bárta, F.**, Levová, K., Hodek, P., Frei, E., Schmeiser, H.H., Arlt, V.M., Stiborová, M.: Ochratoxin A Influences Genotoxicity of the Carcinogen Aristolochic Acid. Zborník prednášok a posterov, program. *XXIV. Biochemický zjazd Slovenskej spoločnosti pre biochémiu a molekulárnu biológiu a České spoločnosti pro biochemii a molekulární biologii*. 18.-21.9. 2014, Bratislava, p.107-108. ISBN 978-80-970164-6-3.
8. **Bárta, F.**, Levová, K., Hodek, P., Schmeiser, H.H., Arlt, V.M., Stiborová, M.: Contribution of aristolochic acid, ochratoxin A, heavy metals and phthalates on aetiology of Balkan endemic nephropathy. Sborník příspěvků. *20<sup>th</sup> Interdisciplinary Toxicology Conference, Brno, Czech Republic*, 27.-29.5. 2015. p. 27. ISBN 978-80-263-0933-8.
9. **Bárta, F.**, Levová, K., Hodek, P., Frei, E., Schmeiser, H.H., Arlt, V.M., Stiborová, M.: Contributions of cytochromes P450 in detoxication of aristolochic acid I in human and rat livers. Final Programme and Abstract Book. *44<sup>th</sup> Annual Meeting of European Environmental Mutagenesis and Genomics Society (EEMGS), Prague, Czech Republic* 23<sup>rd</sup> – 26<sup>th</sup> August 2015. p. 213.
10. Stiborová, M., Indra, R., Mrízová, I., **Bárta, F.**, Reed, L., Henderson, C., Phillips, D., Schmeiser, H.H., Arlt, V.M.: Detoxification of and DNA Adduct Formation by Anticancer Drug Ellipticine and Carcinogens Aristolochic Acid I and Benzo[a]pyrene Cytalyzed with Cytochromes P450: Studies with Animal models and Pure Enzymes. Sborník příspěvků. *XVII. setkání biochemiků a molekulárních biologů*. 10.-11.11.2015, Brno, p. 26. ISBN 978-80-210-8015-7.
11. **Bárta, F.**, Hudecová, A., Hodek, P., Balogová, M., Mráz, J., Dušková, Š., Frei, E., Schmeiser, H.H., Arlt, V.M., Stiborová, M.: Exposure rats to a mixture of aristolochic acid I a II influences genotoxicity of these plant alkaloids. *Workshop of Physical Chemists and Electrochemists (Pracovní setkání fyzikálních chemiků a elektrochemiků)*. 6.-7.6.2016. Brno, p.139-142. ISBN 978-80-210-8267-0.

**CHARLES UNIVERSITY IN PRAGUE**  
**FACULTY OF SCIENCE**  
**DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY**

PhD study program: Biochemistry

*Summary of the PhD Thesis*



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

RNDr. František Bárta

*Supervisor:* prof. RNDr. Marie Stiborová, DrSc.

Prague, 2016



**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)

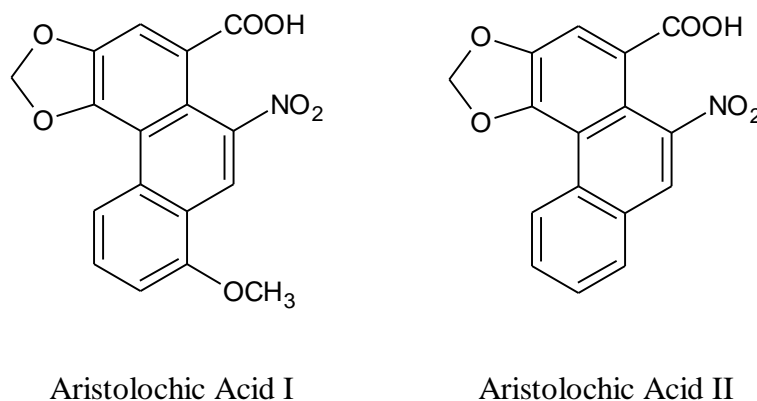
## 1. INTRODUCTION

### 1.1 Chemical Carcinogenesis

The relation between tumour development and effects of chemical compounds was observed for the first time at the end of the eighteenth century. The first clinical observations were formulated by London physicians John Hill and Percivall Pott (Hill, 1761; Pott, 1775). In following decades, a relation between the effect of chemical compounds and carcinogenesis was studied extensively. However, there were no crucial changes in this field until the half of the twentieth century. At that time, Elizabeth and James Miller postulated their hypothesis which defines that chemical carcinogens are not directly active but require enzymatic conversion to a proximate carcinogen which is, subsequently, transformed to an ultimate carcinogen. Such an ultimate carcinogen being electrophilic species can form adducts with proteins, RNA and/or DNA (Miller *et al.*, 1966a; Miller & Miller, 1966b, 1981). Besides organic compounds, there are also inorganic compounds (e.g. arsenic, chromium, beryllium and cadmium ions) and natural products belonging to chemical carcinogens. In the latter group mentioned, metabolites produced by fungi (e.g. aflatoxins) and plant secondary metabolites (safrole, aristolochic acids) can be found. All these carcinogens have been studied by the International Agency for Research on Cancer (IARC) in detail. In organisms, the chemical carcinogens are enzymatically biotransformed to metabolites that are usually detoxification products. Nevertheless, there are also activation reactions which lead to genotoxic species that are able to modify DNA. Therefore, the balance between detoxification and activation of a carcinogen is of critical importance.

### 1.2 Aristolochic Acids

Aristolochic acid (AA) is a natural plant extract present in *Aristolochiaceae spp.* consisting of a mixture of structurally related nitrophenanthrene carboxylic acids. This mixture contains several tens of the derivatives of these compounds, however, two of them prevail: aristolochic acid I (AAI) 8-methoxy-6-nitro-phenanthro-(3,4-*d*)-1,3-dioxolo-5-carboxylic acid – and aristolochic acid II (AAII) – 6-nitro-phenanthro-(3,4-*d*)-1,3-dioxolo-5-carboxylic acid (**Fig. 1**) (Mix *et al.*, 1982; Kumar *et al.*, 2003). AA show strong anti-inflammatory properties which can explain the fact that plants containing AA were and still are used in traditional medicine. Moreover, AA was investigated as potential



**Fig. 1:** Structure of aristolochic acid I and II.

pharmaceutics in Germany (Möse, 1966, 1974a, 1974b). However, the toxicity of AA (i.e. the strong nephrotoxicity and carcinogenicity) was observed among individuals utilising this plant drug. AAI and AAII are one of a few human genotoxic carcinogens which covalently modify DNA resulting in the formation of persistent adducts (Bieler et al., 1997; Stiborová et al., 2012). These AA-DNA adducts lead to mutations in several genes (*p53*, *H-ras*) that are crucial for the development of malignancies (Arlt *et al.*, 2007). Hence, these plant alkaloids were classified as *carcinogenic to humans* (Group 1) by IARC (IARC, 2012).

### **1.3 Pathologies Caused by Aristolochic Acids**

Aristolochic acids are also responsible for the development of two renal diseases. The first of them is aristolochic acid nephropathy (AAN) which was described for the first time at the beginning of the nineties of the twentieth century in a group of Belgian patients (Vanherweghem *et al.*, 1993; Nortier *et al.*, 2000). This interstitial renal fibrosis is characterised by rapid progression leading to an end-stage renal disease. Soon after the first reported cases, it was proved that this disease was caused by AA which was one of components of a slimming regimen used for treatment of the patients. AA was present in the regimen since two plant species were replaced: innocuous *Stephania tetrandra* (in Chinese *Fangji*) for toxic *Aristolochia fangchi* (in Chinese *Fangchi*). The only effective treatment of AAN is using of corticosteroid therapy (prednisolone), however, these medicaments only slow the progression of AAN before the disease reaches its end-stage (Martinet *et al.*, 2002). Besides the total renal failure, AAN is associated with the development of upper urothelial carcinoma (UUC) which is the direct consequence of carcinogenic properties of AA (Nortier *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2012).

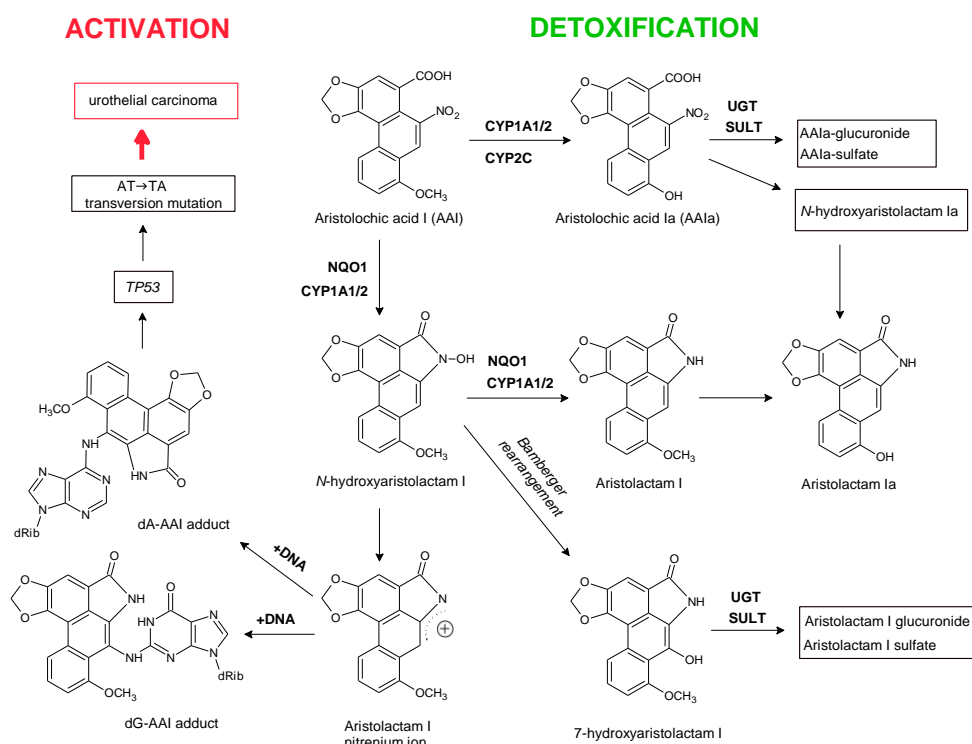
Another disease associated with AA is Balkan endemic nephropathy (BEN) which is defined as a chronic interstitial fibrosis. The specificity of this renal disease, which was described for the first time in 1956 (Bamias & Boletis, 2008), is its localisation only in specific endemic areas, particularly in villages near tributaries of the Danube River (**Fig. 2**) (Toncheva *et al.*, 1998; Hranjec *et al.*, 2005; Jelaković *et al.*, 2015). Since the first description of BEN several hypotheses of its aetiology have been discussed including the effects of AA, ochratoxin A (OTA), heavy metals and metalloids, and organic compounds being released from lignite deposits of BEN areas (Ivić, 1969; Tatu *et al.* 1998; Long *et al.*, 2001; Pfohl-Leszkowicz & Manderville, 2007; Maharaj *et al.*, 2014). Nevertheless, the aetiology of BEN is still a matter of debate. Recent studies have proved the major role of AA in development of BEN unambiguously based on the presence of covalent AA-DNA adducts and the characteristic AT→TA transversion mutations in tumour suppressor gene *p53* in BEN patients (Arlt *et al.*, 2002; Grollman *et al.*, 2007; Hollstein *et al.*, 2013). However, the question whether the other factors, to some extent, can contribute to the development of BEN/UUC still remains to be answered. There are many similar clinical features of AAN and BEN (serious anaemia, proteinuria, interstitial fibrosis, UUC); however, there is an essential difference between BEN and AAN mainly in the rate of progression of both diseases. AAN is defined as rapidly progressive fibrosis whereas BEN is characterised by an insidious onset and slow gradual progression.



**Fig. 2:** Map depicting BEN areas in Croatia, Bosna and Herzegovina, Serbia, Bulgaria and Romania (Source: Grollman, 2013).

### 1.4 Metabolism of Aristolochic Acids

Aristolochic acids are, similarly to the other xenobiotics, metabolically converted in organisms (**Fig. 3**). These reactions result in detoxification of this plant product, however, as it has been mentioned in **Chapter 1.1**, some compounds, including also AA, can be metabolically activated to form reactive species which are more toxic than parental molecules (Miller *et al.*, 1966a; Miller & Miller, 1981).



**Fig. 3:** Scheme of detoxification and bio-activation of AAI in organisms; UGT, UDP-glucuronosyl transferase; SULT, sulfotransferase (adapted from Bárta *et al.*, 2015).

In organisms, AAI can be oxidatively detoxified forming *O*-demethylated product, AAIa (8-hydroxyaristolochix acid) (Arlt *et al.*, 2011; Levová *et al.*, 2011 Stiborová *et al.*, 2012). AAIa, the other component of the natural mixture of AA, is not converted to this derivative and it seems to be only reductively activated to *N*-hydroxyaristolactam II (Schmeiser *et al.*, 1986, Chan *et al.*, 2006). The oxidative demethylation of AAI resulting in the AAIa formation is catalysed by heme enzymes, cytochromes P450 (CYP). In humans and rats, CYP1A and 2C are the most efficient enzymes detoxifying AAI.

Besides the detoxification reactions, CYP enzymes can also catalyse reductive bio-activation of AAI to *N*-hydroxyaristolactam I which decomposes to a reactive *N*-acylnitrenium ion binding to deoxyadenosine and deoxyguanosine in DNA forming AAI-derived adducts (Stiborová *et al.*, 2005, 2011a). The most efficient enzyme reductively activating AAI is cytosolic NAD(P)H:quinone oxidoreductase (NQO1) (Stiborová *et al.*, 2011b).

## **2. AIMS OF THIS STUDY**

The target of this thesis was to study the enzymes metabolising aristolochic acids (AA) which are the cause of two renal diseases, aristolochic acid nephropathy (AAN) and Balkan endemic nephropathy. Moreover, both renal diseases are associated with the development of urothelial malignancies. There are two basic areas in this study.

The first course of study was focused on knowledge of molecular mechanism of AAN aiming to find new aspects of the reductive bio-activation and oxidative detoxification of AAI and to identify the enzymes which are crucial for these metabolic reactions converting this plant alkaloid in organism. In the order to elucidate the function of cytosolic reductase NQO1 in the reductive activation of AAI to AA-DNA adducts formation *in vivo*, an inhibitor of this enzyme, dicoumarol, was utilised in this study. It was investigated whether dicoumarol can affect the genotoxicity of AAI *in vivo* and whether this compound can modulate the function of the major enzymes metabolising AAI, including NQO1 and CYP1A1/2. Rats and mice were used as experimental models since they are generally used as suitable models to study AAN in experimental animals.

Another aim of the thesis was to determine the real contributions of individual CYP enzymes to oxidative detoxification of AAI in human and rat liver, the main organ of the metabolism of xenobiotics in organism. The aim was also to understand which enzymes participate in the detoxification of AAI *in vivo*. Particularly, the function of CYP1A1 and 1A2, the enzymes that are most efficient in the detoxification of AAI *in vitro*, was investigated. Considering the fact that both mentioned enzymes catalyse also the reductive activation of AAI forming AAI-DNA adducts *in vitro*, one of the aims was to answer the question which of the metabolic pathways catalysed by CYP1A1/2 prevails *in vivo*.

Another target of the study was to investigate the participation of ochratoxin A (OTA) in aetiology of BEN. The aim of this study was to evaluate the effect of OTA on the metabolism of a natural mixture of AA metabolism, particularly, genotoxicity of this agent and its contribution to the development of BEN/UUC. The last aim of this thesis was to study the effect of other environmental factors suspected that might participate in the development of BEN/UUC, particularly, the toxic heavy metal and metalloid ions, the selected organic compounds leaching from lignite deposits in BEN areas and OTA on the detoxification of AAI to AAIA *in vitro*.

### 3. MATERIAL AND METHODS

The material and methods used in this thesis are described in detail in the publications which a reader kindly finds at the end of this summary (**Publications 4-9 and 11**). Nevertheless, to better understand the experiments shown in **Chapter 4 (Results and Discussion)**, some methods are shortly characterised here.

In our experiments, the rats were treated with selected chemicals which can be used as suitable tools for the study of the enzymes participating in AAI metabolism. In the first study, the rats were treated with dicoumarol (an inhibitor of NQO1) and/or AAI. In another study, rats were exposed to Sudan I (an inducer of CYP1A) and/or AAI and in the last *in vivo* experiment, rats were treated with OTA and/or the mixture of AAI and AAI.

The enzymatic activities of NQO1, NADPH:CYP reductase (POR), CYP1A1/2 and CYP2C6/11 were determined according to standard protocols. The enzyme activity of NQO1 was determined as the capability of reducing menadione in the presence of NADH (Ernster, 1967) and the enzymatic activity of POR was measured using cytochrome *c* as a substrate (Sottocassa *et al.*, 1967). The enzyme activity of CYP1A1 was measured as the capability of oxidising the azo dye Sudan I (Stiborová *et al.*, 2002) and CYP1A1/2 activity was determined fluorimetrically (Burke *et al.*, 1994) using 7-ethoxy- and/or 7-methoxyresorufine as substrates. The enzyme activities of CYP2C6/11 in rat hepatic microsomes were characterised as well: the activity of CYP2C6 was measured with diclofenac as a marker substrate (Kaphalia *et al.*, 2006) and the activity of CYP2C11 was determined as testosterone 16 $\alpha$ -hydroxylation (Baltes *et al.*, 1998).

AAI and its *O*-demethylated metabolite AAIa were analysed by RP-HPLC using a linear gradient of acetonitrile (20–60% acetonitrile in 55 min) in 100 mM triethylammonium acetate with a flow rate of 0.5 ml/min. HPLC was performed with a C<sub>18</sub> reversed phase column and the separated compounds were detected at wavelength of 250 nm.

The analysis of the formation of AAI-, AA- or OTA-derived DNA adducts was carried out by the supervisor prof. RNDr. Marie Stiborová, DrSc., using the <sup>32</sup>P-poslabelling method in the collaborating laboratory in German Cancer Research Centre in Heidelberg (*Deutsches Krebsforschungszentrum*) as described previously (Schmeiser *et al.*, 1996; Bieler *et al.*, 1997; Stiborová *et al.*, 2005).

## 4. RESULTS AND DISCUSSION

### 4.1 Study of Molecular Mechanism of Aristolochic Acid Nephropathy

In the first part of the thesis, AAI metabolism was investigated *in vivo* using the Wistar rats as a model. Furthermore, a role of biotransformation enzymes (NQO1, CYP1A1/2 and CYP2C6/11) in the metabolism of AAI was studied both *in vitro* and *in vivo*. The modulation of protein expression of these enzymes and their activities by inhibitors and inducers of the above mentioned enzymes was used and found to be a suitable tool for such a study. Particularly, dicoumarol, a strong inhibitor of NQO1, and Sudan In, an effective inducer of CYP1A1/2, were utilised.

#### *4.1.1 NQO1 Dictates the Bio-Activation of AAI in vivo*

The formation of AAI-DNA adducts in liver and kidney of rats treated with AAI and/or dicoumarol was 11- and 5-fold higher, respectively, after the exposure to dicoumarol prior to AAI (**Fig. 4**). This finding was initially surprising for us since dicoumarol is known to be a strong inhibitor of NQO1 (Ernster, 1967), the enzyme which is most efficient in AAI reductive bio-activation (Stiborová *et al.* 2011b). Therefore, it was expected that the formation of AAI-DNA adducts would be decreased by the treatment of rats with this NQO1 inhibitor. However, during investigations of the NQO1 protein expression and its enzymatic activities in both tested organs, it was found that dicoumarol functions as an inducer of this enzyme. This discovery, i.e. the finding that dicoumarol is not only the inhibitor of NQO1 *in vitro* and *in vivo*, but also the inducer of this enzyme, is a novel finding which has never been described before. One explanation of this unique phenomenon might be a different bioavailability of dicoumarol by individual organs tested and a length of exposure of rats to dicoumarol and AAI and the applied doses. This study has definitely proved that NQO1 is the major enzyme participating in the reductive activation of AAI not only *in vitro* but also *in vivo*.

**Fig. 4:** Schematic summary illustrating the effects of dicoumarol treatment in rats on AAI metabolism (the next page). NQO1 induction with dicoumarol prior to AAI administration led to increased AAI–DNA adduct formation catalysed by rat hepatic and renal cytosols. Inhibition of CYP2C by dicoumarol treatment led to a decrease in AAIa formation in hepatic microsomes. Both NQO1 induction and CYP2C inhibition increase AAI–DNA adduct formation in liver, whereas only NQO1 induction impacts on AAI–DNA binding in kidney. ‘F’ indicates fold increase in rats pretreated with dicoumarol compared to animals treated with AAI itself. RAL, relative adduct labelling. The comparison was performed by Student *t*-test analysis; \*\**p* < 0.01, \*\*\**p* < 0.001.



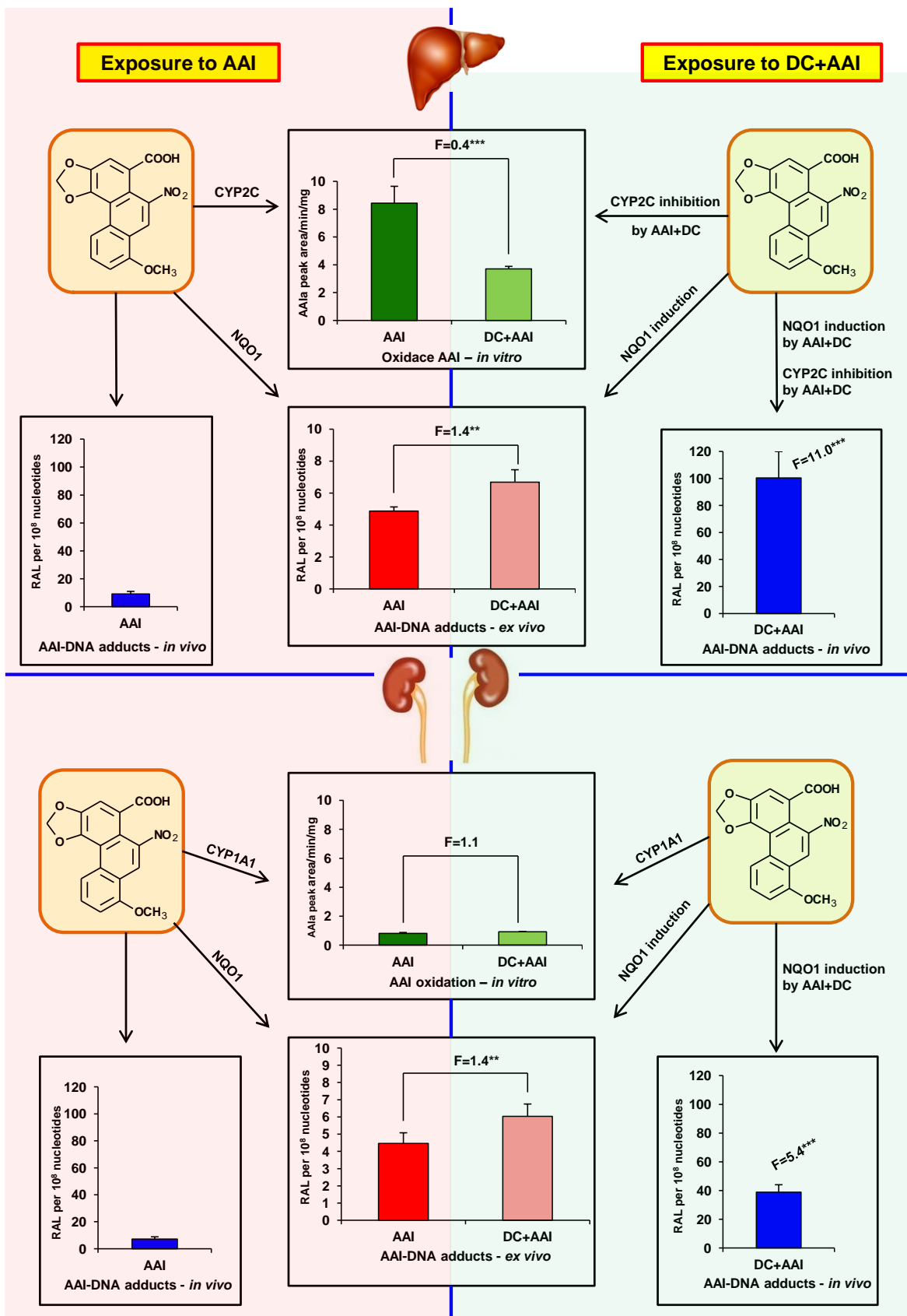
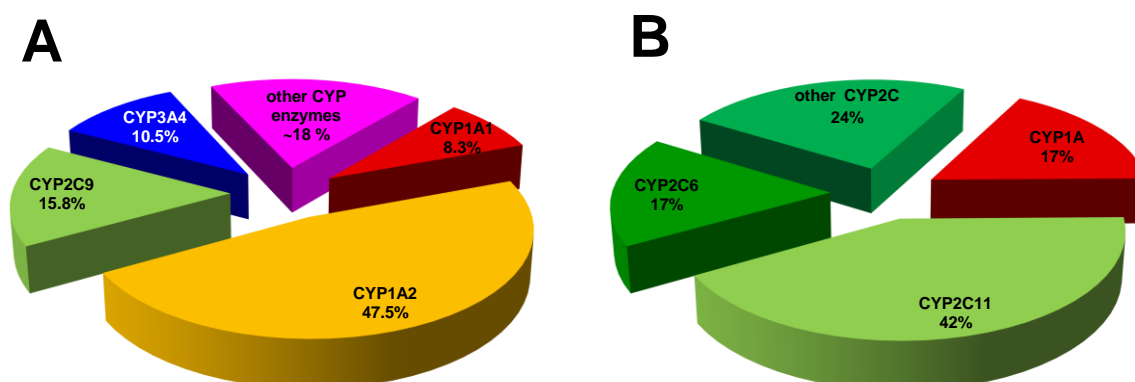


Fig. 4: The legend of the figure is placed on the previous page.

The analysis of the enzymes detoxifying AAI to AAIA in organs of tested rats (CYP1A1/2 and CYP2C6/11) demonstrated the importance of not only the CYP1A1/2, but also of the 2C subfamily in AAI detoxification, enzymes whose content is up to 50% in rat liver (Nedelcheva & Gut, 1994). The exposure to dicoumarol resulted in the inhibition of AAIA formation (**Fig. 4**) thereby decreasing the detoxification of AAI. The determination of the enzymatic activity of CYP1A and 2C showed that CYP1A1/2 were induced whereas CYP2C6/11 were inhibited by dicoumarol. The results found indicate that the increased formation of AAI-DNA adducts in liver of rats treated with dicoumarol and AAI seems to be caused not only by the induction of NQO1 but also by the inhibition of CYP2C6/11 resulting in decreased AAI detoxification to AAIA (**Fig. 4**).

#### 4.1.2 The Contributions of Individual Cytochromes P450 to Oxidative Detoxification of AAI in Human and Rat Liver

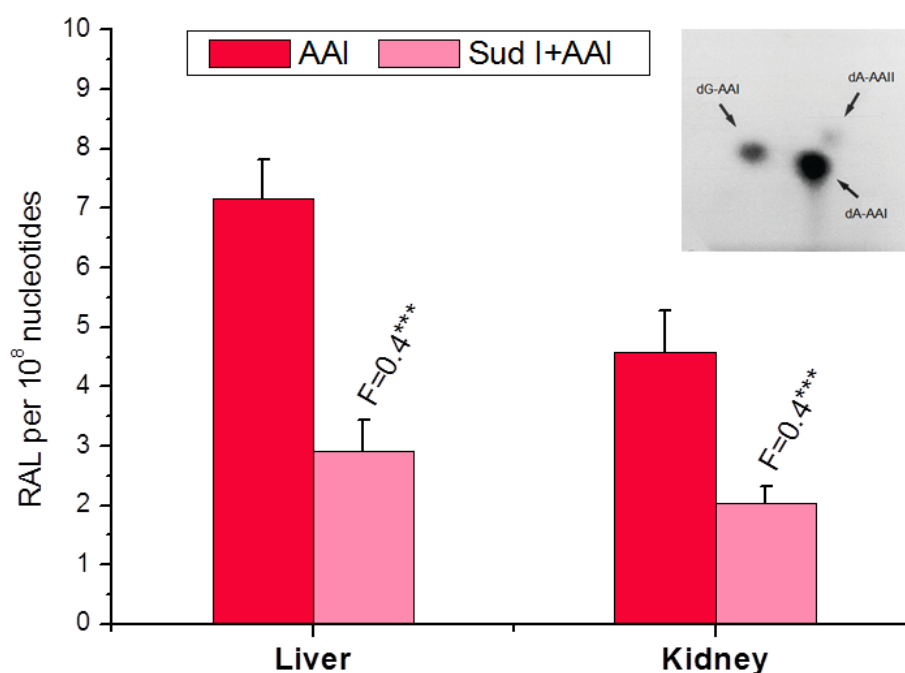
In another part of the thesis studying oxidative detoxification of AAI to AAIA, contributions of individual CYP enzymes to this reaction were evaluated in rat and human liver. Considering both efficiencies of the CYP enzymes on AAI *O*-demethylation to AAIA and their amounts expressed in human and rat liver, an impact of individual CYPs on AAIA formation was determined. The highest contribution to AAI oxidation in human liver was attributed to CYP1A2 (~47.5%), followed by CYP2C9 (~15.8%), CYP3A4 (~10.5%) and CYP1A1 (~8.3%) (**Fig. 5A**). The results found were rather unexpected for us since the activity of human recombinant CYP1A1 to oxidise AAI is highest among all tested human CYP enzymes (Stiborová *et al.* 2012). The low amounts of CYP1A1 in human livers (< 0.7%) is responsible for its lower contribution to the reaction in this human organ than the contributions of CYP1A2, 2C9 and 3A4. In rat liver, the highest contribution to AAI detoxification to AAIA was attributed to CYP2C subfamily (83%) (**Fig. 5B**), followed by CYP1A (17%). Although the activity of CYP enzymes of the 2C subfamily to oxidise AAI to AAIA was very low, their real contribution is predominant since the expression level of CYP2C is up to 50% in rat liver (Nedelcheva & Gut, 1994).



**Fig. 5:** Real contributions of CYP enzymes to oxidative detoxification of AAI to AAIA in human (A) and rat (B) liver.

#### 4.1.3 The Induction of Cytochromes P450 1A1/2 Decreases AAI-DNA Adduct Formation

The aim of the following part of the study was to evaluate which metabolic pathway of the two described in former studies catalysed by CYP1A1/2, i.e. the oxidative detoxification and reductive bio-activation of AAI, prevails *in vivo*. Therefore, the modulation of expression and activities of these CYP enzymes by their strong inducer Sudan I was used and found as an available tool for such a type of study. Rats were treated with Sudan I, AAI and with their combination. The exposure to Sudan I resulted not only in considerable induction of the expression levels of CYP1A1/2 and their enzymatic activities but also in a decrease in AAI-DNA adduct formation (**Fig. 6**). Interestingly, the induction of the protein level of CYP1A1/2 by Sudan I led to a decrease in AAI genotoxicity although Sudan I was found to be also the inducer of NQO1, the enzyme which activates AAI to AA-DNA adducts. However, Sudan I is only a moderate inducer of NQO1 as compared with its induction efficacy on CYP1A1/2enzymes. Based on the recent results and considering previous studies utilising genetic modified animals (Arlt *et al.*, 2011a; Stiborová *et al.*, 2012), it is evident that the efficiency of the CYP1A family to protectively oxidise AAI to AAIa prevails over its reductive activation forming AAI-DNA adducts *in vivo*.



**Fig. 6:** Quantitative TLC <sup>32</sup>P-postlabelling analysis of AAI-DNA adduct levels in liver and kidney isolated from rats treated with AAI and combination of AAI and Sudan I (Sud I). 'F' indicates fold changes in DNA adduct levels in rats treated with Sudan I and AAI compared to animals treated with AAI itself. RAL, relative adduct labelling. The comparison was performed by Student *t*-test analysis; \*\*\**p* < 0.001, different from animals treated with AAI itself. Insert: Autoradiographic profile of AAI-DNA adducts formed in liver of rats treated with AAI, determined by the nuclease P1 enrichment version of the <sup>32</sup>P-postlabelling assay.

## **4.2 Study on Aetiology of Balkan Endemic Nephropathy**

The second area of the thesis was aimed to investigate aetiology of BEN. In the last 60 years, the aetiology of BEN has been studied at many laboratories in detail. Among possible causes of this disease, AA, mycotoxins (OTA), toxic heavy metal ions and metalloids, and the organic compounds leaching from lignite deposits located in BEN areas were considered. Based on the recent complex studies, the crucial role of AA in the development of BEN, particularly, UUC has been unambiguously proved. Nevertheless, the statement whether the other factors might contribute to the development of AA-mediated BEN/UUC has not, unfortunately, been confirmed yet.

### ***4.2.1 A Role of Ochratoxin A in the Development of Balkan Endemic Nephropathy***

In the experiments carried out during the PhD study, we investigated the effect of OTA on AA metabolism *in vivo*. Experimental animals (*Rattus norvegicus*) were treated with the natural mixture of AAI and AAI (33% AAI + 64% AAI mixture) and/or OTA for five consecutive days. Subsequently, both reductive bio-activation (AA-DNA adduct formation) and oxidative detoxification of AA were studied.

The formation of DNA adducts derived from AA and OTA was analysed. Whereas DNA adducts derived from AA were detected both in liver and kidney of tested rats, DNA adducts derived from OTA were not found in these organs (**Fig. 7**). These results indicate that OTA is not a genotoxic species which can modify DNA directly. The levels of AA-DNA adducts formed *in vivo* were higher in kidney than in liver of studied rats and their formation was increased by combined treatment with AA and OTA. Based on the results found, we supposed that OTA is capable of affecting AA metabolism resulting in AA-DNA formation. In the following analyses, it was found that the exposure to OTA had resulted in increased expression levels of NQO1 which correlated with its enzymatic activities.

**Fig. 7:** Schematic summary illustrating the effects of OTA treatment in rats on AA metabolism (the next page). Inhibition of CYP1A1 and CYP2C6/11 in hepatic microsomes and that of CYP1A1 in renal microsomes by treatment of rats with AA combined with OTA led to a decrease in AAIa formation in microsomes of both organs. Higher levels of AAI caused by this inhibition are available for its reductive activation to form AA–DNA adducts *in vivo*. No significant changes in AA–DNA adduct formation catalysed by rat hepatic and renal cytosols *ex vivo* were found. ‘F’ indicates fold changes in rats treated with AA combined with OTA compared to those found in animals treated with AA itself. RAL, relative adduct labelling. The comparison was performed by Student *t*-test analysis; \*\*\**p* < 0.001.

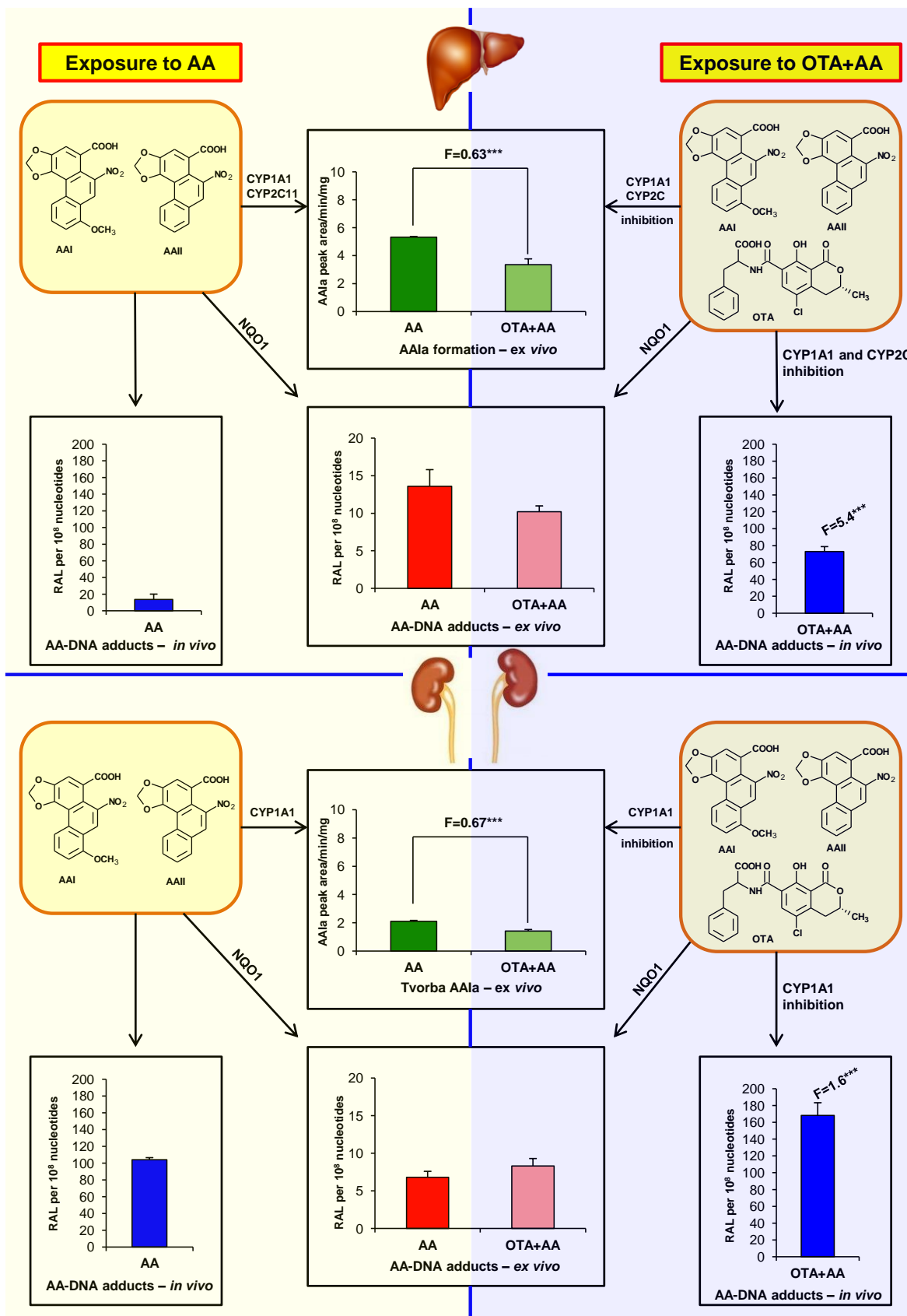


Fig. 7: The legend of the figure is placed on the previous page.

The analysis of protein expression of enzymes detoxifying AAI and their activities demonstrated that OTA led to inhibition of both CYP1A1/2 and CYP2C6/11, i.e. the enzymes detoxifying AAI to AA Ia efficiently. Moreover, the enzymatic activity of POR, an important reaction partner of CYPs, was inhibited by OTA as well. These findings indicate that the exposure to OTA results in the inhibition of the essential detoxification enzymes in rats thereby decreases the detoxification of AAI or AA to AA Ia (**Fig. 7**).

Based on these results, it is concluded that the increased AA-DNA adduct formation in liver and kidney of rats treated with the combination of AA and OTA *in vivo* might be caused not only by the increased NQO1 protein expression in these organs, but also by the inhibition of the enzymes oxidatively detoxifying AA, i.e. CYP1A1/2 and, particularly, CYP2C6/11, which was mediated by treatment of rats with OTA. Considering the decreased detoxification of AA to AA Ia, higher amounts of AA are available for its reductive activation forming AA-DNA adducts *in vivo*. The doses to which humans are exposed in BEN areas are orders of magnitude lower than the OTA dose administered to rats in this study, and drug–drug interactions between AA and OTA at lower but chronic and lifelong doses may be different (Yordanova *et al.*, 2010). Collectively these results, however, indicate for the very first time that the exposure of OTA combined with AA may enhance the development of AA-induced UUC in BEN patients.

#### ***4.2.2 Study of Other Hypothetic Factors Affecting the Development of Balkan Endemic Nephropathy***

In another part of this study, the effect of the other suspect environmental factors, which were hypothesised as the cause of BEN/UUC, on *O*-demethylation of AAI were studied. The effect of toxic heavy metal ions and metalloids, the organic compounds leaching from lignite deposits in BEN areas and OTA on biotransformation enzymes involved in oxidative metabolism of AA (CYP1A1/2 and CYP2C6/11) was tested.

Based on the epidemiological studies, ions of heavy metals and metalloids, and organic compounds, whose concentrations are increased in BEN areas, were selected (Karmaus *et al.*, 2008; Yordanova *et al.*, 2010; Maharaj *et al.*, 2014). In the thesis, ions of cadmium ( $\text{CdCl}_2$ ), lead [ $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ ], selenium ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ) and arsenic ( $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) were investigated. For the organic compounds leaching from lignite deposits, dibutyl phthalate (DBP), butyl benzyl phthalate (BBP) and bis(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) were selected.

The oxidative detoxification of AAI to AAIA *in vitro* was partially inhibited by cadmium and selenium ions, BBP and the most efficient inhibition of this reaction was caused by OTA. Hence, the capacity of these compounds to influence activities of enzymes participating in AAI detoxification in rat liver (CYP1A1/2 and CYP2C6/11) was tested (Tab. 1). The results found demonstrated that the studied pollutants were capable of inhibiting the enzymes mentioned above, however, only under high concentrations (100  $\mu$ M). Concluding from these findings, the decreased AAIA formation in the presence of CdCl<sub>2</sub>, Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>, BBP and OTA might be explained, at least partially, by inhibition of the enzymes predominantly participating in AAI detoxification, i.e. CYP1A1/2 and CYP2C6/11.

**Table 1:** The effect of CdCl<sub>2</sub>, Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>, BBP a OTA on enzyme activities of CYP1A1/2 and 2C6/11 rat hepatic microsomes.

Pollutant	EROD activity (CYP1A)	Sudan I oxidation (CYP1A1)	Diclofenac 4'-hydroxylation (CYP2C6)	Testosteronu 16 $\alpha$ -hydroxylation (CYP2C11)
CdCl <sub>2</sub>	83 $\pm$ 0.09*	46 $\pm$ 4.27**	89 $\pm$ 0.44*	NE
Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	95 $\pm$ 0.83	NE	94 $\pm$ 5.59	82 $\pm$ 1.01**
BBP	83 $\pm$ 1.24*	25 $\pm$ 1.27***	7 $\pm$ 0.26***	68 $\pm$ 12.48**
OTA	NE <sup>a</sup>	NE	NE	18 $\pm$ 1.24***

Data are expressed as % of control without pollutants. Values in the table are averages  $\pm$  standard deviations of three experiments (n = 3). The incubation mixtures contained 0.5 mg/ml microsomal protein, 10  $\mu$ M AAI (dissolved in distilled water), the NADPH-generating system, and 100  $\mu$ M pollutant [heavy metal ions dissolved in distilled water, OTA dissolved in 0.1 M NaHCO<sub>3</sub> (pH 7) or BBP dissolved in acetonitrile]. Values significantly different from control incubations without pollutants; \* $p$  < 0.1, \*\* $p$  < 0.01, \*\*\* $p$  < 0.001 (Student's t-test).

<sup>b</sup>NE, no effect.

Even though the tested compounds were detected in waters and lignite deposits of endemic areas (Karmaus *et al.*, 2008; Maharaj *et al.*, 2014), their precise concentrations are unknown. It is not taken for granted that the concentrations found to inhibit AAI detoxification in this study are the concentration which BEN/UUC patients are exposed to. In general, the concentrations inhibiting AAI detoxification to AAIA are orders of magnitude higher than their concentrations in the environment. Therefore, their participation in BEN/UUC development is negligible. Moreover, these results are in accordance with the results published previously (Karmaus *et al.*, 2008).

## 5. CONCLUSION

In this PhD thesis, metabolism of aristolochic acids (AA) was studied. This herbal drug is a proven cause of two renal diseases: aristolochic acid nephropathy (AAN) and Balkan endemic nephropathy (BEN). The characteristic feature of both nephropathies 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. One of the reasons for these discrepancies might be interindividual differences in expression levels and activities of the enzymes metabolising AA in organisms. In this thesis, the enzymes participating in both oxidative detoxification of AA and its reductive activation leading to the formation of AA-DNA adducts were studied. The aetiology of BEN was investigated as well, particularly, a role of other environmental factors capable of affecting BEN by modulation AAI metabolism.

The results found in this study prove the crucial role of cytosolic reductase NQO1 in bio-activation of AAI forming AAI-DNA adducts not only *in vitro* but also *in vivo* whereas microsomal enzymes, cytochromes P450 (CYP), 1A1 and 1A2 play a minor role. The unique and novel discovery, which has never been described before, represents the findings that dicoumarol is not only the inhibitor of NQO1 *in vitro* and *in vivo*, but also the inducer of this enzyme. The detoxification of AAI to AAIa is catalysed by CYP enzymes. In this thesis, the real contributions of the individual CYPs in human and rat liver were determined. In human liver, CYP1A2 > CYP2C9 > CYP3A4 > CYP1A1 were most active whereas CYP2C (83%) is predominantly responsible for AAIa formation in rat liver. It was proved that CYP1A1/2 play a major role in the catalysis of AAI detoxification reactions in rats *in vivo* whereas their role in AAI nitroreduction to form AAI-DNA adducts is minimal in this animal model.

The significant result shown in the thesis is the finding that mycotoxin OTA modulates metabolism of AA in rats; particularly, OTA potentiates AA-DNA adduct formation *in vivo* and decreases the detoxification of this plant alkaloid. The effect of the other suspect environmental factors studied in this thesis, namely the ions of cadmium, lead, selenium and arsenic, and phthalates (DBP, BBP and DEHP), on AAI detoxification was negligible.

The results found in the PhD thesis are original scientific findings describing the function of enzymes metabolising a herbal drug AA and contribute significantly to the understanding of the molecular mechanism of AAN and BEN development and AA generally. Some of the results found in the thesis were published as novel findings for the very first time. The results have been published in seven original papers in scientific journals with an impact factor. These publications are listed at the end of this summary (see **publication 4-9 and 11**).



## 6. REFERENCES

- Arlt, V.M., Ferluga, D., Stiborová, M. *et al.* (2002). *Int. J. Cancer* 101(5): 500-502.
- Arlt, V.M., Stiborová, M., vom Brocke, J. *et al.* (2007). *Carcinogenesis* 28(11): 2253-2261.
- Arlt, V.M., Levová, K., Bárta, F. *et al.* (2011). *Chem. Res. Toxicol.* 24(10): 1710-1719.
- Baltes, M.R., Dubois, J.G., Hanocq, M. (1998). *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 706(2): 201-207.
- Bamias, G., Boletis, J. (2008). *Am. J. Kidney Dis.* 52(3): 606-616.
- Bárta, F., Levová, K., Hodek, P. *et al.* (2015). *Neuroendocrinol. Lett.* 36 (Suppl. 1): 13-21.
- Bieler, C.A., Stiborova, M., Wiessler, M. *et al.* (1997). *Carcinogenesis* 18(5): 1063-1067.
- Burke, M.D., Thompson, S., Weaver, R.J. *et al.* (1994). *Biochem. Pharmacol.* 48(5): 923-936.
- Chan, W., Cui, L., Xu, G. *et al.* (2006). *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* 20(11): 1755-1760.
- Chen, C-H., Dickman, K.G., Moriya, M. *et al.* (2012). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109(21): 8241-8246.
- Ernster, L. (1967). *Methods in Enzymology* 10, Academic Press, New York, 309-317.
- Grollman, A.P., Jelaković, B. (2007). *J. Am. Soc. Nephrol.* 18(11): 2817-2823.
- Grollman, A.P. (2013). *Environ. Mol. Mutagen.* 54(1): 1-7.
- 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.
- Hollstein, M., Moriya, M., Grollman, A.P. *et al.* (2013). *Mutat. Res.* 753(1): 41-49.
- Hranjec, T., Kovač, A., Kos, J. *et al.* (2005). *Croat. Med. J.* 46(1): 116-125.
- IARC, International Agency for Research on Cancer (2012). *A Review of Human Carcinogens: Pharmaceuticals. IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum.* 100A.
- Ivić, M. (1969). *Lijec. Vjesn.* 91(12): 1273-1281.
- Jelaković, B., Vuković Lela, I., Karanović, S. *et al.* (2015). *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 10(2): 215-223.
- Kaphalia, L., Kaphalia, B.S., Kumar, S. *et al.* (2006). *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 830(2): 231-237.
- Karmaus, W., Dimitrov, P., Simeonov, V. *et al.* (2008). *Environ. Health* 7: 11.

- Kumar, V., Poonam, Prasad, A.K. *et al.* (2003). *Nat. Prod. Rep.* 20(6): 565-583.
- Levová, K., Moserová, M., Kotrbová, V. *et al.* (2011). *Toxicol. Sci.* 121(1): 43-56.
- Long, D.T., Icopini, G., Ganev, V. *et al.* (2001). *Int. J. Occup. Med. Environ. Health* 14(2): 193-196.
- Maharaj, S.V., Orem, W.H., Tatu, C.A. *et al.* (2014). *Environ. Geochem. Health* 36(1): 1-17.
- Martinez, M-C., Nortier, J., Vereerstraeten, P. *et al.* (2002). *Nephrol Dial Transplant.* 17(11): 2033-2034.
- Miller, E.C., Lotlikar, P.D., Pitot *et al.* (1966a). *Cancer Res.* 26(11): 2239-2247.
- Miller, E.C., Miller, J.A. (1966b). *Pharmacol. Rev.* 18(1): 805-838.
- Miller, E.C., Miller, J.A. (1981). *Cancer* 47, 2327-2345.
- Mix, D.B., Guinaudeau, H., Shamma, M. (1982). *J. Nat. Prod.* 45(6): 657-666.
- Möse, J.R. (1974a). Communication. *Drug Res.* 24(1): 52-54.
- Möse, J.R. (1974b). *Drug Res.* 24(2): 151-153.
- Nedelcheva, V., Gut, I. (1994). *Xenobiotica* 24(12): 1151-1175.
- Nortier, J.L., Muniz Martinez, M-C., Schmeiser, H.H. *et al.* (2000). *N. Engl. J. Med.* 342(23), 1686-1682.
- Pfohl-Leszkowicz, A., Manderville, R.A. (2007). *Mol. Nutr. Food Res.* 51(1): 61-99.
- Pott, P. (1775). In: *CA Cancer J. Clin.* 24(2), 110-116 (1974).
- Schmeiser, H.H., Pool, B.L., Wiessler, M. (1986). *Carcinogenesis.* 7(1): 59-63.
- Schmeiser, H.H., Bieler, C.A., Wiessler, M. *et al.* (1996). *Cancer Res.* 56(9): 2025-2028.
- Sottocasa, G.L., Kuylenstierna, B., Ernster, L. *et al.* (1967). *J. Cell Biol.* 32(2): 415-438.
- Stiborová, M., Martínek, V., Rýdlová, H. *et al.* (2002). *Cancer. Res.* 62(20): 5678-5684.
- Stiborová, M., Frei, E., Hodek, P. *et al.* (2005). *Int. J. Cancer.* 113(2): 189-197.
- Stiborová, M., Mareš, J., Levová, K. *et al.* (2011a). *Neuroendocrinol. Lett.* 32 (Suppl. 1): 121-130.
- Stiborová, M., Mareš, J., Frei, E. *et al.* (2011b). *Environ. Mol. Mutagen.* 52(6): 448-459.
- Stiborová, M., Levová, K., Bárta, F *et al.* (2012). *Toxicol. Sci.* 125(2): 345-358.
- Tatu, C.A., Orem, W.H., Finkelman, R.B. *et al.* (1998). *Environ. Health Perspect.* 106(11): 689-700.
- Toncheva, D., Dimitrov, T., Stojanova, S. (1998). *Eur. J. Epidemiol.* 14(4): 389-394.
- Vanherweghem, J-L., Depierreux, M., Tielemans, C. *et al.* (1993). *Lancet* 341(8842): 387-391.
- Yordanova, P., Karmaus, W., Tsoleva, S. *et al.* (2010). *Toxins (Basel).* 2(4): 780-792.

## **CURRICULUM VITAE**

### **Personal Information**

First Name: **František**  
Surname: **Bárta**  
Address: Jungmannova 769/14, Prague 1 – Nové Město, Prague  
Nationality: Czech  
Date of Birth: 2<sup>nd</sup> October 1987

### **Education and Training**

since 2012 Charles University in Prague, Faculty of Science,  
Department of Biochemistry  
**PGS student**

2014 Charles University in Prague, Faculty of Science,  
Department of Biochemistry  
**RNDr. of biochemistry**

2010 – 2012 Charles University in Prague, Faculty of Science,  
Department of Biochemistry  
**Mgr. of biochemistry** (*summa cum laude*)  
Diploma Thesis: *Mechanism of carcinogenicity and nephrotoxicity of aristolochic acids (in Czech)*

2007 – 2010 Charles University in Prague, Faculty of Science,  
Department of Biochemistry  
**Bc. of biochemistry**  
Bachelor Thesis: *Nephropathy and tumour development caused by plant alkaloids aristolochic acid (in Czech)*

### **Grants:**

2013 – 2015 Study on aetiology of Balkan Endemic nephropathy (GAUK 570513).  
*Leader.*

### **Personal Skills and Competences**

Mother tongue: Czech

### **Other Languages:**

English: CEFR B2+ (FCE, April 2016)

### **Technical skills and Competences:**

IT skills: MS Windows, MS Office (Word, Excel, PowerPoint), Origin 6.0  
Professional

## SELECTED PUBLICATIONS

### Original Papers:

*Published in journals with IF (total IF = 33.652)*

1. 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.: Role of P450 1A1 and 1A2 in Bioactivation versus Detoxication of the Renal Carcinogen Aristolochic Acid I: Studies in *Cyp1a1(-/-)*, *Cyp1a2(-/-)* and *Cyp1a1/1a2(-/-)* Mice. *Chem. Res. Toxicol.* 24, 1710-1719 (2011). **IF<sub>2011</sub>=3.779**.
2. Stiborová, M., Mareš, J., Levová, K., Pavlíčková, J., **Bárta, F.**, Hodek, P., Frei, E., Schmeiser, H.H.: 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), 101-110 (2011). **IF<sub>2011</sub>=1.296**.
3. Stiborová, M., Levová, K., **Bárta, F.**, Shi, Z., Frei, E., Schmeiser, H.H., Nebert, D.W., Phillips, D.H, Arlt, V.M.: Bioactivation versus Detoxication of the Urothelial Carcinogen Aristolochic Acid I by Human Cytochrome P450 1A1 and 1A2. *Toxicol. Sci.* 125, 345-358 (2012). **IF<sub>2012</sub>=4.652**.
4. Stiborová, M., Levová, K., **Bárta, F.**, Šulc, M., Frei, E., Arlt, V.M., Schmeiser, H.H.: The Influence of Dicoumarol on the Bioactivation of the Carcinogen Aristolochic Acid I in Rats. *Mutagenesis* 29, 189-200 (2014). **IF<sub>2014</sub>=2.797**.
5. **Bárta, F.**, Levová, K., Frei, E., Schmeiser, H.H., Arlt, V.M., Stiborová, M.: The Effect of Aristolochic Acid I on Expression of NAD(P)H:Quinone Oxidoreductase in Mice and Rats – A Comparative Study. *Mutat. Res.* 768, 1-7 (2014). **IF<sub>2014</sub>=2.415**.
6. Stiborová, M., Levová, K., **Bárta, F.**, Dračinská, H., Šulc, M., Hodek, P., Frei, E., Arlt, V.M., Schmeiser, H.H.: Dicoumarol Inhibits Rat NAD(P)H:quinone Oxidoreductase *in vitro* and Induces its Expression *in vivo*. *Neuroendocrinol. Lett.* 35 (Suppl. 2), 123-132 (2014). **IF<sub>2014</sub>=0.799**.
7. Stiborová, M., **Bárta, F.**, Levová, K., Hodek, P., Frei, E., Arlt, V.M., Schmeiser, H.H.: The Influence of Ochratoxin A on DNA Adduct Formation by the Carcinogen Aristolochic Acid in Rats. *Arch. Toxicol.* 89, 2141-2158 (2015). **IF<sub>2015</sub>=6.637**.
8. Stiborová, M., **Bárta, F.**, Levová, K., Hodek, P., Schmeiser, H.H., Arlt, V.M., Martínek, V.: 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, 27561-27575 (2015). **IF<sub>2015</sub>=3.257**.
9. **Bárta, F.**, Levová, K., Hodek, P., Schmeiser, H.H., Arlt, V.M., Stiborová, M.: 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 (2015). **IF<sub>2015</sub>=0.946**.

10. Milichovský, J., **Bárta, F.**, Schmeiser, H.H., Arlt, V.M., Frei, E., Stiborová, M., Martínek, V.: 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, 213-228 (2016). **IF<sub>2015</sub>=3.257**.
11. Dračínská, H., **Bárta, F.**, Levová, K., Hudecová, A., Moserová, M., Schmeiser, H.H., Kopke, K., Frei, E., Arlt, V.M., Stiborová, M.: 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 (2016). **IF<sub>2015</sub>=3.817**.

### **Abstracts from conferences and symposia:**

#### ***a) International Conferences***

1. **Bárta, F.**, Levová, K., Frei, E., Arlt, V.M., Schmeiser, H.H., Stiborová, M.: Dicoumarol inhibits NAD(P)H:quinone oxidoreductase-mediated formation of aristolochic acid-DNA adducts *in vitro* whereas increases their generation in rats *in vivo*. *50<sup>th</sup> Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX), Edinburgh, The United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland, 7<sup>th</sup> – 10<sup>th</sup> September 2014. Toxicol. Lett.* 229S., p. S146 (2014). ISSN 0378-4274. **IF<sub>2013</sub>=3.262**.
2. **Bárta, F.**, Levová, K., Hodek, P., Frei, E., Arlt, V.M., Schmeiser, H.H., Stiborová, M.: Mycotoxin ochratoxin A decreases cytochrome P450-mediated detoxication of carcinogenic aristolochic acid thereby increases its genotoxic potential in rats *in vivo*. *51<sup>st</sup> Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX), Porto, Portuguese Republic, 13<sup>th</sup> – 16<sup>th</sup> September 2015. Toxicol. Lett.* 238S., p. S237 (2015). ISSN 0378-4274. **IF<sub>2015</sub>=3.522**.

#### ***b) Czech and Slovak conferences (selection)***

1. **Bárta, F.**, Levová, K., Schmeiser, H.H., Stiborová M.: Identification of rat cytochromes P450 activating and detoxicating carcinogenic aristolochic acid I. *16<sup>th</sup> Interdisciplinary Toxicology Conference, Prague, Czech Republic, 17.- 20. May 2011. Interdisc. Toxicol.* 4, p. A62 (2011). ISSN 1337-6853.
2. **Bárta, F.**, Levová, K., Frei, E., Schmeiser, H.H., Schmeiser, H.H., Stiborová, M.: Rat cytochromes P450 1A1 and 1A2 activate and detoxicate carcinogenic aristolochic acid I. Sborník příspěvků. *XV. Setkání biochemiků a molekulárních biologů*. 1.-2. 11. 2011, Brno, p. 58. ISBN 978-80-210-5594-0.
3. Levová, K., **Bárta, F.**, Frei, E., Schmeiser, H.H., Arlt, V.M., Phillips, D., Nebert, D.W., Shi, Z., Stiborová, M.: Utilizing of genetically modified mouse models helps to identify enzymes metabolizing carcinogenic aristolochic acid I. Sborník přednášek a posterů, program. *XXIII. Biochemický sjezd České společnosti pro biochemii a molekulární biologii a Slovenské společnosti pre biochémiu a molekulárnu biológiu*. 26.-29.8. 2012, Brno, p.146. ISBN 978-80 86313-34-4.

4. **Bárta, F.**, Levová, K., Arlt, V.M., Frei, E., Schmeiser, Stiborová, M.: Role NAD(P)H:chinonoxidoreduktasy v metabolické aktivaci karcinogenní aristolochové kyseliny I *in vivo*. *XIII. Mezioborové setkání mladých biologů, biochemiků a chemiků*, 14.-17.5. 2013, Žďár nad Sázavou, *Chem. Listy 107*, 403-404 (2013).
5. **Bárta, F.**, Levová, K., Frei, E., Schmeiser, H.H., Arlt, V.M., Stiborová, M.: Carcinogenic and nephrotoxic aristolochic acid induces expression of NAD(P)H:quinone oxidoreductase. *18<sup>th</sup> Interdisciplinary Toxicology Conference, Hradec Kralove, Czech Republic*, 19.-21.6. 2013. *Mil. Med. Sci. Lett.*, (2013) 82, p. 2. ISSN 0372-7025.
6. **Bárta, F.**, Levová, K., Arlt, V.M., Frei, E., Schmeiser, H.H., Stiborová, M.: Význam ochratoxinu A ve vývoji Balkánské endemické nefropatie. *XIV. Mezioborové setkání mladých biologů, biochemiků a chemiků*, 13.-16.5. 2014, Sněžné, Milovy, *Chem. Listy 108*, 522-523 (2014).
7. **Bárta, F.**, Levová, K., Hodek, P., Frei, E., Schmeiser, H.H., Arlt, V.M., Stiborová, M.: Ochratoxin A Influences Genotoxicity of the Carcinogen Aristolochic Acid. Zborník prednášok a posterov, program. *XXIV. Biochemický zjazd Slovenskej spoločnosti pre biochémiu a molekulárnu biológiu a České spoločnosti pro biochemii a molekulární biologii*. 18.-21.9. 2014, Bratislava, p.107-108. ISBN 978-80-970164-6-3.
8. **Bárta, F.**, Levová, K., Hodek, P., Schmeiser, H.H., Arlt, V.M., Stiborová, M.: Contribution of aristolochic acid, ochratoxin A, heavy metals and phthalates on aetiology of Balkan endemic nephropathy. Sborník příspěvků. *20<sup>th</sup> Interdisciplinary Toxicology Conference, Brno, Czech Republic*, 27.-29.5. 2015. p. 27. ISBN 978-80-263-0933-8.
9. **Bárta, F.**, Levová, K., Hodek, P., Frei, E., Schmeiser, H.H., Arlt, V.M., Stiborová, M.: Contributions of cytochromes P450 in detoxication of aristolochic acid I in human and rat livers. Final Programme and Abstract Book. *44<sup>th</sup> Annual Meeting of European Environmental Mutagenesis and Genomics Society (EEMGS), Prague, Czech Republic* 23<sup>rd</sup> – 26<sup>th</sup> August 2015. p. 213.
10. Stiborová, M., Indra, R., Mrízová, I., **Bárta, F.**, Reed, L., Henderson, C., Phillips, D., Schmeiser, H.H., Arlt, V.M.: Detoxification of and DNA Adduct Formation by Anticancer Drug Ellipticine and Carcinogens Aristolochic Acid I and Benzo[a]pyrene Cytalyzed with Cytochromes P450: Studies with Animal models and Pure Enzymes. Sborník příspěvků. *XVII. setkání biochemiků a molekulárních biologů*. 10.-11.11.2015, Brno, p. 26. ISBN 978-80-210-8015-7.
11. **Bárta, F.**, Hudecová, A., Hodek, P., Balogová, M., Mráz, J., Dušková, Š., Frei, E., Schmeiser, H.H., Arlt, V.M., Stiborová, M.: Exposure rats to a mixture of aristolochic acid I a II influences genotoxicity of these plant alkaloids. *Workshop of Physical Chemists and Electrochemists (Pracovní setkání fyzikálních chemiků a elektrochemiků)*. 6.-7.6.2016. Brno, p.139-142. ISBN 978-80-210-8267-0.