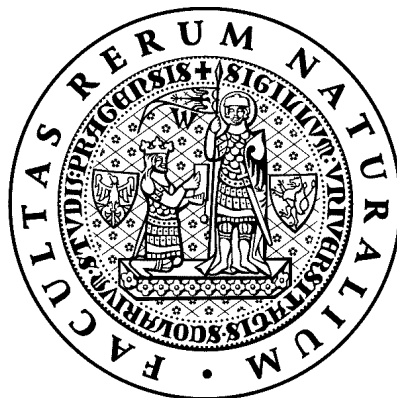


UNIVERSITA KARLOVA V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA BIOCHEMIE



**Nefropatie a nádorová onemocnění
způsobené alkaloidy
aristolochovými kyselinami**

**Nephropathy and tumour development caused by plant
alkaloids aristolochic acid**

Bakalářská práce

František Bárta

Školitelka: prof. RNDr. Marie Stiborová, DrSc.

PRAHA 2010

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

V Praze dne

.....
František Bárta

Děkuji paní prof. RNDr. Marii Stiborové, DrSc. za zadání tématu, trpělivost, cenné rady a všestrannou pomoc, bez nichž by tato práce nevznikla.

Dále bych rád poděkoval Mgr. Kateřině Levové za její významnou pomoc při zpracování dat a užitečné připomínky.

Práce byla vypracována jako součást řešení grantů GAČR (301/09/0472) a MŠMT ČR (MSM 0021620808).

ABSTRAKT

Aristolochové kyseliny (AA) jsou látky obsažené v rostlinách čeledi podražcovitých (*Aristolochiaceae*). Tyto rostliny jsou již od starověku používány v tradiční lidové medicíně k léčení mnoha rozličných chorob. Jsou sice známy protizánětlivé účinky aristolochových kyselin, nicméně tyto alkaloidy jsou prokazatelnými mutageny a karcinogeny. Navzdory tomuto faktu jsou výtažky rostlin čeledi podražcovitých nadále užívány v léčitelství.

Aristolochové kyseliny prokazatelně způsobují onemocnění nazývané nefropatie vyvolaná aristolochovými kyselinami (Aristolochic Acid Nephropathy, AAN), dříve známou jako nefropatie vyvolaná čínskými bylinami (Chinese Herbs Nephropathy, CHN), která končí úplným selháním funkce ledvin. Pozdní komplikací tohoto onemocnění je také vývoj nádorů v urotheliální tkáni pacientů. AA totiž mohou vytvářet s DNA stabilní kovalentní adukty, které se vyznačují dlouhodobou persistencí. Tvorba těchto aduktů následně vede ke vzniku unikátní mutace v tumorovém supresorovém genu *p53* (AT→TA transversní mutace) iniciující nádorové procesy.

I další onemocnění, balkánská endemická nefropatie (BEN), je spojována s působením AA. V tomto případě ovšem je brán v potaz i vliv ostatních činitelů, např. mykotoxinů (ochratoxin A). Nicméně, s vysokou pravděpodobností se na vývoji tohoto onemocnění podílejí především AA. Toto tvrzení podporuje i shoda v nálezech aduktů AA s DNA v tkáních pacientů trpících AAN a BEN a dále pak výskyt výše uvedené unikátní mutace v genu *p53*.

V organismu podléhají AA aktivační a detoxikační (oxidační) přeměně na aristolaktamy. Na aktivačních reakcích se podílejí především jaterní a renální enzymy: cytochromy P450, cyklooxygenasa, NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasa a NAD(P)H: chinon oxidoreduktasa. Na detoxikačních reakcích pak participují zejména cytochromy P450 1A1 a 1A2.

Klíčová slova: aristolochová kyselina, nefropatie vyvolaná aristolochovými kyselinami, nefropatie vyvolaná čínskými bylinami, balkánská endemická nefropatie, urotheliální rakovina, *Aristolochiaceae*

ABSTRACT

Aristolochic acids (AA) are alkaloids contained in plant species of the family *Aristolochiaceae*. These plants are used since antiquity in traditional medicine to treatment of many varied diseases. There are known anti-inflammatory effects of these compounds, however these alkaloids exhibit mutagenic and carcinogenic properties. Despite of this fact, plant extracts AA are still used in traditional medicine, e.g. in China, India, Taiwan.

Aristolochic acids are proven to be the cause of disease designated Aristolochic Acid Nephropathy (AAN, theretofore known as Chinese Herbs Nephropathy (CHN). This unusual nephropathy leads to a total renal failure. The late complication of this disease is the development of tumours in urothelial tissue of patients. AA can form persistent stable covalent DNA adducts. Formation of these DNA adducts lead to AT→TA transversion, the unique mutation in tumour suppressor gene *p53* responsible for tumour formation.

Balkan Endemic Nephropathy (BEN) is associated with AA, too. In this instance is supported also influence of another factors, e.g. mycotoxins (ochratoxin A). However, in all probability AA contribute to a development of this disease particularly. This hypothesis is supported by finding of AA-DNA adducts in tissues of patients suffering from AAN and BEN and that of a unique mutation in gene *p53*.

In organism, AA is metabolized by activation and/or detoxification reactions to aristolactams. In activation reactions participate particularly hepatic and renal enzymes: cytochromes P450, cyklooxygenase, NADPH:cytochrome P450 oxidoreductase and NAD(P)H: quinone oxidoreductase. Cytochromes P450 1A1 and 1A2 participate predominantly in detoxification reactions.

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

OBSAH

ABSTRAKT	- 4 -
ABSTRACT.....	- 5 -
OBSAH.....	- 6 -
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	- 8 -
1. ÚVOD.....	- 10 -
1.1 KARCINOGENESE.....	- 10 -
1.1.1 Faktory způsobující nádorová onemocnění.....	- 11 -
1.1.2 Faktory ovlivňující nádorová onemocnění.....	- 12 -
1.2 VZNIK NÁDOROVÉ BUŇKY	- 13 -
1.2.1 Protoonkogeny (onkogeny).....	- 13 -
1.2.2 Tumorové supresorové geny.....	- 13 -
1.3 ROSTLINY ČELEDI PODRAŽCOVITÝCH.....	- 14 -
1.3.1 Podražcovité v tradiční medicíně.....	- 15 -
1.3.2 Aristolochové kyseliny.....	- 15 -
1.4 ONEMOCNĚNÍ VYVOLANÁ ARISTOLOCHOVÝMI KYSELINAMI.....	- 17 -
1.4.1 Nefropatie vyvolaná aristolochovými kyselinami (AAN).....	- 17 -
1.4.2 Urotheliální rakovina	- 20 -
1.4.3 Balkánská endemická nefropatie (BEN).....	- 25 -
1.5 BIOTRANSFORMACE XENOBIOTIK	- 28 -
1.5.1 Biotransformace aristolochových kyselin.....	- 30 -
1.5.2 Enzymová aktivace aristolochových kyselin	- 31 -
1.5.3 Enzymová detoxikace aristolochových kyselin	- 33 -
2. CÍL BAKALÁŘSKÉ PRÁCE	- 34 -
3. MATERIÁL A METODY	- 35 -
3.1 POUŽITÝ MATERIÁL A CHEMIKÁLIE.....	- 35 -
3.2 PŘÍSTROJE.....	- 36 -
3.3 METODY	- 37 -
3.3.1 Oxidace AAI cytochromy P450 v lidských jaterních mikrosomech.....	- 37 -
3.3.1.1 Vysokotlaká kapalinová chromatografie (HPLC).....	- 38 -
3.3.2 Stanovení aktivity CYP1A1	- 38 -
3.3.2.1 Vysokotlaká kapalinová chromatografie (HPLC).....	- 39 -

4. VÝSLEDKY A DISKUSE	- 40 -
4.1 Oxidace AAI cytochromy P450 v lidských jaterních mikrosomech	- 40 -
4.1.1 Detekce AAI a AAIA metodou HPLC.....	- 40 -
4.2 Určení cytochromů P450 oxidujících aristolochovou kyselinu I na aristolochovou kyselinu Ia v lidských jaterních mikrosomech.....	- 43 -
4.2.1 Stanovení aktivity cytochromu P450 v lidských jaterních mikrosomech	- 43 -
4.2.2 Cytochromy P450 1A1 a 1A2 jsou enzymy oxidující AAI na AAIA v lidských jaterních mikrosomech.....	- 44 -
5. ZÁVĚR	- 48 -
Seznam použité literatury	- 49 -

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AA	aristolochové kyseliny
AAI	aristolochová kyselina I
AAIa	aristolochová kyselina Ia
AAII	aristolochová kyselina II
AAN	nefropatie vyvolaná aristolochovými kyselinami (Aristolochic Acid Nephropathy)
Abl	onkogen
AlacI	aristolaktam I
AlacIa	aristolaktam Ia
BEN	balkánská endemická nefropatie (Balkan Endemic Nephropathy)
CDKI	inhibitor cyklin-dependentní kinasy
COX	cyklooxygenasa (prostaglandin H-synthasa)
CYP	cytochrom P450
dA-AAI	7-(deoxyadenosin- N^6 -yl)aristolaktam I
dA-AAII	7-(deoxyadenosin- N^6 -yl)aristolaktam II
dAMP	deoxyadenosinmonofosfát
dG-AAI	7-(deoxyguanosin- N^2 -yl)aristolaktam I
dTMP	deoxythymidinmonofosfát
ErbB	onkogen
FDA	Úřad pro léky a potraviny (Food and Drug Administration)
Fes	onkogen
Fos	onkogen
HPLC	vysokotlaká kapalinová chromatografie
CHN	nefropatie vyvolaná čínskými bylinami (Chinese Herbs Nephropathy)
IARC	Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny (International Agency for Research on Cancer)
Jun	onkogen
Mos	onkogen
MS	hmotnostní spektrometrie

Myb	onkogen
Myc	onkogen
NADP ⁺	nikotinamidadenindinukleotidfosfát (oxidovaná forma)
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát (redukována forma)
NADPH-GS	NADPH generující systém
NQO1	NAD(P)H:chinon oxidoreduktasa (DT-diaforasa)
OTA	ochratoxin A
P	hladina významnosti
<i>p21</i>	tumorový supresorový gen
P21	protein kódovaný genem <i>p21</i>
<i>p53</i>	tumorový supresorový gen
P53	protein kódovaný genem <i>p53</i>
R	korelační faktor
Raf	onkogen
Ras	onkogen
Rel	onkogen
RPM	počet otáček za minutu
Src	onkogen
TEAA	triethylaminacetát
UV	ultrafialové záření

1. ÚVOD

1.1 KARCINOGENESE

Karcinogenesí se rozumí multifázový proces, ve kterém lze rozlišit minimálně tři základní etapy: fázi iniciační, promoční a progresní. V tomto procesu dochází ke kumulaci poruch (mutací) genů, které se podílejí na produkci proteinů ovlivňujících buněčný cyklus a diferenciaci buněk.¹ Pro karcinogenesi jsou významné poruchy jen poměrně malého počtu genů. Nejzávažnějšími jsou poruchy genů kódujících proteiny, které se podílejí na přenosu signálů, kontrole exprese genů, kontrole správnosti replikace DNA a chromosomů, regulaci buněčného cyklu, dělení a diferenciaci buněk, mezibuněčné komunikace a přirozeného zániku (apoptozy) poškozených nebo nesprávně diferencovaných buněk.² Takovéto poruchy mohou posléze vyvolat nekontrolované dělení, protože buňka ztratí schopnost reagovat na regulační signály buněčného dělení a získává tak schopnost nekontrolované proliferace. Ta vede k vývoji nádorových onemocnění: nejdříve ke vzniku benigního nádoru, který se dále může rozvinout až v nádor maligní.^{3,4}

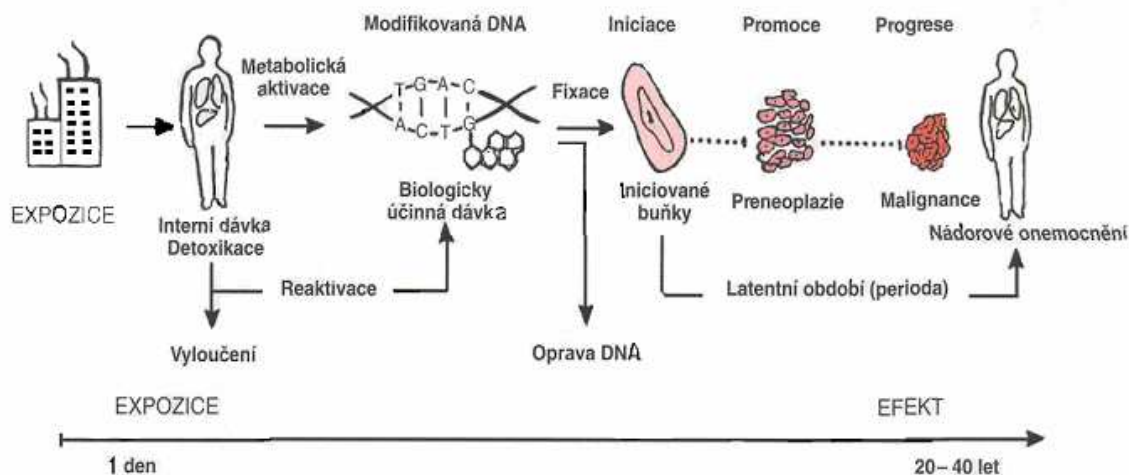
Na vývoji procesu karcinogenese se podílí faktory způsobující nádorová onemocnění a faktory, které nádorová onemocnění ovlivňují.⁴ Obě skupiny faktorů budou diskutovány v následujících odstavcích. V této bakalářské práci nejdříve bude užitečné zmínit základní informace o jednotlivých fázích karcinogenese (**Obr. 1**).

Je důležité poznamenat, že proces karcinogenese je postupný a dlouhodobý. Na začátku, v iniciační fázi, vzniká iniciovaná buňka, jejíž vznik je závislý na genetických změnách, ke kterým dochází v DNA. Vznik iniciované buňky není v organismu ničím výjimečným (iniciované buňky vznikají i spontánně) a taková buňka je ve většině případů zničena imunitním systémem.⁴

Problém samozřejmě nastává tehdy, když není iniciovaná buňka zničena a dále proliferuje. Nastává fáze promoční, která může být různě dlouhá a která může být spojena s drobnými (nekovalentními) změnami DNA. V této fázi je buněčné dělení ještě částečně regulované, nicméně proliferace spojená s promoční fází vede ke vzniku *preneoplasie* (benigního nádoru). Imunitní systém v tomto okamžiku již nemá plnou funkčnost zasáhnout.⁴

Konečným stádiem procesu karcinogenese je fáze progresní, ve které dochází již ke zcela nekontrolovanému dělení a k maligní transformaci. Progresní fáze je spojena s kovalentními modifikacemi DNA, genotoxickými změnami a tvorbou aduktů s DNA.⁴

Maligní nádor je agresivní: roste invazivním způsobem a z nádorů se mohou jeho buňky uvolňovat a metastasovat do dalších částí těla.⁵



Obr. 1: Schematické znázornění procesu karcinogenese (převzato z ⁶)

1.1.1 Faktory způsobující nádorová onemocnění

Rozeznáváme tři základní faktory, které způsobují nádorová onemocnění: faktory fyzikální, biologické a chemické. K fyzikálním vlivům se řadí působení záření (UV, kosmického, Röntgenova), které může vyvolat změny v DNA. Stejně tak submikroskopické částice, např. částice azbestu, beryllia (s nimi spojená azbestosa a berylliosa) či uhelný prach (na něm ovšem jsou též adsorbované i chemické karcinogeny), mohou vyvolat změny v DNA.⁴

Významným biologickým činitelem, při vzniku nádorových onemocnění jsou onkoviry, které jsou schopny introdukovat vlastní DNA do DNA hostitele a způsobit v ní tak změny, které mohou vyústit ve vznik iniciované buňky. Neopomenutelným biologickým faktorem je také odolnost organismu (imunita), protože imunitní systém se může podílet na likvidaci iniciovaných buněk.⁴

V případě chemických faktorů mluvíme o chemických karcinogenech, tedy látkách, které jsou schopny vyvolat vznik nádorového bujení. Zajímavé je, že většina karcinogenů ve své podstatě karcinogenní není: je tedy lépe o nich mluvit jako o prokarcinogenech. Tyto prokarcinogeny jsou v organismu aktivovány na proximální karcinogeny (*proximal carcinogens*) a ty až na okamžité karcinogeny (*ultimate carcinogens*). Karcinogeny patří

společně s teratogeny, mutageny a alergeny do skupiny látek s pozdním účinkem (s tím souvisí výše zmíněná dlouhá doba latence při procesu karcinogeneze).⁴

Chemické karcinogeny lze podle mechanismu působení rozdělit do tří základních skupin. V první skupině najdeme genotoxické karcinogeny, které tvoří kovalentní adukty s DNA. Mezi karcinogeny druhé skupiny řadíme takové sloučeniny, které působí změny struktury molekul DNA, jako jsou jedno- a dvou-řetězové zlomy (single- and double-strand break). Dále pak změny struktury DNA, které jsou vyvolány bifunkčními činidly způsobující tzv. „cross-linking“ (propojení molekul), a to „DNA-DNA cross-linking“ (intra- i intermolekulární) nebo „DNA-protein cross-linking“. Třetí skupinu reprezentují epigenetické karcinogeny, které modifikují molekuly DNA nekovalentními interakcemi. Jedná se např. o látky označované jako interkalátory, které se vmezeřují do dvoušroubovice DNA.⁶

Významnou položku v chemických faktorech zauímají mykotoxiny, které se mohou vyskytovat v potravě jako sekundární metabolity obecně se vyskytujících plísní. Nejvýznamnější jsou mykotoxiny plísní rodu *Aspergillus*, *Penicillium* a *Fusarium*. V zemích tropických oblastí jsou mykotoxiny nejzávažnější potravinové karcinogeny.²

Z celosvětového hlediska je nejzávažnějších pět mykotoxinů, a to aflatoxiny, ochratoxin A, některé trichoteceny, zearalenon a fumonisiny. Tyto mykotoxiny jsou produkovány pouze několika druhy plísní (*Aspergillus*, *Penicillium* a *Fusarium*) v omezeném počtu potravinových komodit.²

1.1.2 Faktory ovlivňující nádorová onemocnění

Důležitým faktorem ovlivňujícím nádorová onemocnění je bezesporu prostředí, ve kterém žijeme a ve kterém pracujeme. Podle toho jaké prostředí (resp. jeho znečištění) na nás působí, může se latentní fáze vývoje nádorových onemocnění i významně zkracovat. Se znečištěným životním prostředím úzce souvisí i změna životního stylu lidské populace a s ním i zvýšená stresová zátěž, která má při procesu karcinogeneze velký význam. Stejně důležitou roli hrají také genetické faktory.⁴

1.2 VZNIK NÁDOROVÉ BUŇKY

Jak již bylo uvedeno výše, nádorová onemocnění vznikají poškozením DNA, resp. poškozením klíčových míst v DNA. Nejvýznamnější taková místa jsou geny podléající se na regulaci buněčného cyklu: proliferační geny a antiproliferační geny. Proliferační geny v normální situaci napomáhají buněčnému dělení a geny antiproliferační napomáhají zastavovat buněčný cyklus.^{3,4}

Dojde-li k mutaci proliferačních genů, vznikají tzv. **onkogeny**. Proto také o proliferačních genech mluvíme jako o **protoonkogenech**. Protoonkogeny produkují protoonkoproteiny, které jsou za normálních podmínek důležité pro správný chod buněčného cyklu, resp. proliferaci.⁴

Antiproliferační geny jsou často označovány jako **tumorové supresorové geny**. Mutace takových genů vede k nadměrné buněčné proliferaci. U normální diploidní buňky se vyskytují dvě kopie každého tumorového supresorového genu a aby došlo ke ztrátě kontroly nad buněčnou proliferací, musí být ztraceny nebo inaktivovány zpravidla obě kopie genu. Jedna kopie obvykle postačuje pro normální regulaci buněčného cyklu (na rozdíl od protoonkogenů, u kterých postačuje již mutace u jedné kopie).³

1.2.1 Protoonkogeny (onkogeny)

V normálních buňkách je proliferace stimulována polypeptidovými *růstovými faktory*, které se podobají hormonům.⁵ Tyto růstové faktory patří mezi onkoproteiny (např. Sis). Stejně tak i receptory pro růstové faktory patří mezi onkoproteiny (např. ErbB). Dále k onkoproteinům řadíme tyrosinkinasy (Abl, Src, Fes), malé G-proteiny (Ras), proteinkinasy serinového a tyrosinového typu (Raf, Mos) a v neposlední řadě transkripční faktory (Fos, Jun, Myc, Myb, Rel). Případný karcinogen může tyto onkogeny aktivovat a tím umožňovat proces karcinogeneze.⁴

1.2.2 Tumorové supresorové geny

Produkty tumorových supresorových genů jsou inhibitory cyklin-dependentních kinas (CDKI). Tyto proteiny inhibují proliferaci, indukují apoptosu a snižují replikaci DNA. Jejich porucha tedy vyvolá zvýšenou proliferaci, která se může vyvinout až

v nádorová onemocnění. Inhibitory cyklin-dependentních kinas společně s cyklin-dependentními kinasami a cykliny se podílejí na regulaci buněčného cyklu. Mezi významné tumorové supresorové geny patří *p21*, jenž je kontrolován genem *p53* (ten se velice často objevuje v nádorových tkáních). Jako příklad fungování genu *p21* může sloužit ovlivnění proteinu Retinoblastomu (který byl prvně pozorován při studiích případů vzácných dětských očních nádorů, retinoblastomů³). Je-li tento protein v interakci s cykliny E a D (v komplexech s příslušnými cyklin-dependentními kinasami), je v inaktivním stavu. To znamená, že proliferace není inhibována. Tento účinek je ovšem rušen proteinem P21 (který je exprimován transkripčním faktorem P53). Pokud tedy dojde k mutaci genu *p21* (*p53*), zůstane protein retinoblastomu v inaktivní formě a může se spustit až nekontrolované dělení.⁴

1.3 ROSTLINY ČELEDI PODRAŽCOVITÝCH

Rostliny čeledi podražcovitých (*Aristolochiaceae*) lze botanicky zařadit mezi krytosemenné rostliny (*Magnoliophyta*), do třídy dvouděložných (*Magnoliopsida*) a do řádu podražcotvarých (*Aristolochiales*). Rostliny čeledi podražcovitých jsou popínavé vytrvalé byliny nebo dřeviny, které se vyskytují převážně v tropických a subtropických oblastech. Nicméně její zástupce lze najít i v mírném páse a v České republice.⁷ *Aristolochiaceae* zahrnuje relativně velké množství druhů, asi 600, v 5-9 rodech (např. *Aristolochia*, *Asarum* a další).⁸ Zástupci této čeledi se vyznačují tím, že obsahují toxické aristolochové kyseliny (viz dále). Navzdory tomuto faktu, žijí na těchto rostlinách určité druhy motýlů z čeledi otakárkovitých (*Papilionidae*). Housenky těchto motýlů, které jsou tolerantní vůči aristolochové kyselině, se živí listy podražcovitých rostlin, čímž se brání proti predátorům (např. *Pachliopta aristolochiae*).^{8,9} Jedná se převážně o tropické motýly (*Parides coon*, *Battus philenor*, *Ornithoptera alexandrae*, *Troides brookiana*), ale najdeme zde i druhy evropské, např. druh *Zerynthia rumina*, který se vyskytuje v jihovýchodní Francii, Španělsku a Portugalsku.⁹

Podražce se vedle svého přirozeného výskytu v tropických oblastech často pěstují jako okrasné rostliny, např. podražec velkolistý (*Aristolochia durior*), který je původní v Severní Americe. V České republice se vyskytuje pouze jeden zástupce rodu *Aristolochia*, a to podražec křovištní (*Aristolochia clematitis*), který roste v teplých oblastech podél řek, v křovinách a také jako plevel zahrad a vinogradů.⁷

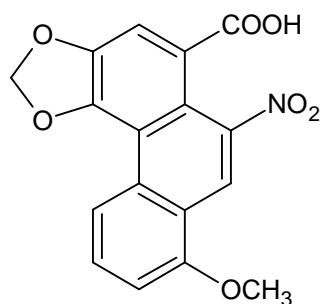
1.3.1 Podražcovité v tradiční medicíně

Rostliny čeledi *Aristolochiaceae* byly a stále jsou pro své léčebné účinky hojně používány v tradiční medicíně, a to již od starověku. Používány jsou především v Asii, v čínské lidové medicíně.^{10,11} Jsou při tom využívány mj. jejich protizánětlivé vlastnosti (resp. aristolochových kyselin).¹² V literatuře je popsáno 7 nejčastěji medicínálně užívaných druhů: *Aristolochia indica*, *Aristolochia bracteolata*, *Aristolochia serpentaria*, *Aristolochia debilis*, *Aristolochia acuminata*, *Aristolochia trilobata*, *Aristolochia clematidis*.¹³ Vedle těchto druhů stojí za zmínku také *Aristolochia contorta*, *Aristolochia manshuriensis* a *Aristolochia fangchi*.¹⁰ Často je pro léčebné účely využita celá rostlina, tj. plody, kořen, stonek i listy, přičemž aristolochové kyseliny jsou obsaženy ve všech zmíněných částech.¹²

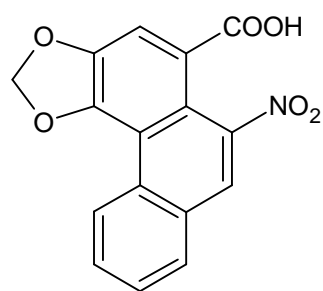
Oblast použití rostlin této čeledi je neobyčejně rozsáhlá. *Aristolochia contorta* a *Aristolochia debilis* se používají jako lék proti hemoroidům, kašli a astmatu (sušené plody), epigastrickým bolestem, arthralgii a edémům (sušené stonky). Sušený kořen *Aristolochia debilis* se používá při léčbě závratí, bolesti hlavy, karbunklů, nežitů a vřidků, používaný je také proti hadímu kousnutí a štípnutí hmyzu.^{10,13} U druhu *Aristolochia bracteolata* (lidově nazývaný *Ukulwe*¹¹) bylo popsáno mj. užití při léčbě malárie a kousnutí štíra.¹³ *Aristolochia manshuriensis* je používána jako podpůrné léčivo při akutních infekcích vylučovacího systému, dále jako emenagogum při amenorrhoe a laktogogum při nedostatečné laktaci. Podražec křovištní (*Aristolochia clematidis*) je používán ke stimulaci imunitního systému a při léčbě gastrointestinální a žlučnickové koliky.¹⁰ Proti hadímu kousnutí se používá také podražec užovník (*Aristolochia serpentaria*), lidově zvaný hadí kořen viginský.^{11,13} Obecně platí, že každý druh *Aristolochia* nemá pouze jedno využití (jak je vidět např. u *Aristolochia debilis*).

1.3.2 Aristolochové kyseliny

Aristolochové kyseliny jsou strukturně podobné nitrofenanthrenové karboxylové kyseliny. Hlavní složky rostlinného extraktu tvoří dvě aristolochové kyseliny: 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. 2**).¹⁴



Aristolochová kyselina I



Aristolochová kyselina II

Obr. 2: Struktura aristolochové kyseliny I a II

Ačkoliv se jedná o alkaloidy, jsou aristolochové kyseliny nitrosloučeninami, což není obvyklé.⁴ Jak bylo výše zmíněno, rostliny z čeledi *Aristolochiaceae* jsou pro své protizánětlivé a zdánlivě léčebné účinky používány v tradiční medicíně již od starověku. Této skutečnosti bylo využito i ve dvacátém století v Německu, kdy byl zahájen farmaceutický vývoj léčiv, jejichž součástí byly tyto rostliny.¹⁵⁻¹⁷ Tak tomu bylo do doby, než se zjistilo, že aristolochové kyseliny jsou silnými karcinogeny pro laboratorní potkany.^{18,19} V následujících letech bylo prokázáno, že aristolochové kyseliny jsou také genotoxickým mutagenem²⁰⁻²² a jsou silně nefrotoxicke pro hlodavce.^{23,24} Z výše zmíněných důvodů byly všechny farmaceutické preparáty obsahující aristolochové kyseliny staženy z trhu, a to jak v Německu, tak i v ostatních zemích.²⁵ Po několika případech pacientek postižených nefropatií vyvolanou aristolochovými kyselinami (viz dále), u kterých se po několika letech vyvinula urotheliální rakovina, byla bylinná léčiva obsahující aristolochové kyseliny klasifikována *Mezinárodní agenturou pro výzkum rakoviny (International Agency for Research on Cancer, IARC)* jako karcinogenní pro člověka (skupina 1).¹⁰ Také směsi aristolochových kyselin přirozeně se vyskytující v rostlinách jsou *IARC* označeny jako pravděpodobně karcinogenní pro člověka (skupina 2A).¹⁰ Nicméně, překvapující skutečností je fakt, že ačkoliv bylo vydáno varování americkým *Úřadem pro léky a potraviny (Food and Drug Administration, FDA)* týkající se bezpečnosti (resp. nebezpečnosti) rostlinných léčiv obsahujících aristolochové kyseliny (nebo alespoň podezřelé z jejich obsahu v nich), lze tyto rostliny stále zakoupit přes internet.²⁶

1.4 ONEMOCNĚNÍ VYVOLANÁ ARISTOLOCHOVÝMI KYSELINAMI

Jak již bylo zmíněno, aristolochové kyseliny jsou silnými karcinogeny a vykazují též účinky mutagenní a nefrotoxické. Tyto sloučeniny beze vší pochybnosti způsobují onemocnění označované jako nefropatie vyvolaná aristolochovými kyselinami(AAN), která je u většiny pacientů doprovázena vývojem urotheliálních nádorů.^{27,28}

1.4.1 Nefropatie vyvolaná aristolochovými kyselinami (AAN)

Výraz nefropatie se používá jako obecné označení onemocnění ledvin.²⁹ Nefropatie vyvolaná aristolochovými kyselinami byla původně nazývána nefropatií vyvolanou čínskými bylinami, a to do doby, než jako původce této choroby byly určeny aristolochové kyseliny.^{27,28} Jedná se o intersticiální fibrosu bez glomerulárního poškození, která má rychlý průběh. Poprvé bylo toto onemocnění popsáno v Belgii v roce 1993 u pacientek, které, jak se později zjistilo, podstoupily kúru pro redukci tělesné hmotnosti na jedné bruselské soukromé lékařské klinice, v jejímž rámci byly použity čínské byliny (odtud původní název: nefropatie vyvolaná čínskými bylinami). Dva podobné případy této netypické fibrosy vedly k rozsáhlejší studii, která potvrdila spojení choroby s nejmenovanou soukromou klinikou: Studií prošlo v období od 1.1. 1989 do 30.6. 1992 624 pacientů s preterminálním nebo terminálním selháním funkce ledvin. Mezi těmito pacienty bylo 40 žen mladších padesáti let, které trpěly intersticiální nefritidou. Sedm z těchto žen podstoupilo léčebnou kúru pro redukci tělesné hmotnosti na výše zmíněné klinice; tím se již počet pacientek zvýšil na devět. Těchto 9 pacientek podstoupilo onu léčebnou kúru v letech 1991-1992.³⁰

K roku 1998 bylo v Belgii evidováno kolem 100 případů. Více než dvě třetiny těchto pacientů (v drtivé většině se jednalo o ženy ve věku 18-65 let) bylo postiženo preterminálním nebo terminálním renálním selháním a bylo léčeno dialysou nebo transplantací ledvin.³¹

Ovšem ani transplantace obou ledvin nezastavila u těchto žen patologický proces: dochází k vývoji urotheliální rakoviny. Stav pacientek je také často zhoršován i vadou srdečních chlopní (*valvular heart disease*). Zmíněná srdeční choroba je pravděpodobně

způsobena fenfluraminem, chuť tlumící látkou, která byla podávána těmto ženám, při „léčebné“ kúře na bruselské klinice.³²⁻³⁴

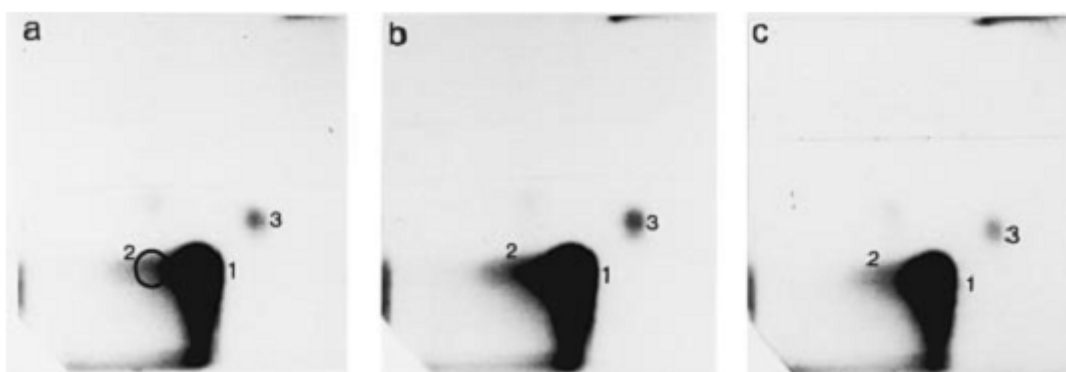
Výše zmíněná soukromá lékařská klinika v Bruselu se specializovala na kúru redukce hmotnosti více než 15 let, a to bez předchozích problémů. Obvyklá léčba se skládala z nízkokalorické diety, psychické podpory, intradermálních injekcí artyčokového extraktu a eufilinu, malých dávek amfetaminů a preparátů obsahující směs acetazolamidu a živočišných nebo rostlinných extraktů. V květnu 1990 byly preparáty změněny: byly přidány čínské byliny *Stephania tetrandra* a *Magnolia officinalis*. Po přidání právě těchto dvou složek začaly být pozorovány renální problémy.³⁰

Stephania tetrandra obsahuje alkaloidy bisbenzylisochinolinového typu (tetrandrin, fangchinolin) a *Magnolia officinalis* obsahuje alkaloidy (např. magnokurarin) a substituované bifenyly (např. magnoliol). Ihned po popsání nové nefropatie bylo předpokládáno, že došlo k záměně mezi druhem *Stephania tetrandra* a druhem jiné čínské byliny, *Aristolochia fangchi*, která obsahuje nebezpečné aristolochové kyseliny; čínská jména obou bylin jsou totiž velice podobná (*fangji* × *fangchi*).³⁰ Tato hypotéza nebyla zprvu potvrzena žádnou chemickou analytickou metodou (jako HPLC, MS analýsa), nicméně bylo zjištěno, že původně používané prepurifikační kroky mohly částečně zničit aristolochové kyseliny (jejichž přítomnost se dokazovala). Byla tedy provedena další stanovení. Dvanáct různých vzorků dovezených do Belgie pod názvem *Stephania tetrandra* (v období červenec 1990 až srpen 1992) bylo podrobeno fytochemické analýze, která měla určit přítomnost tetrandrinu nebo aristolochové kyseliny. Bylo použito chromatografie na tenké vrstvě. Dva z dvanácti vzorků obsahovaly tetrandrin, tedy alkaloid deklarovaného druhu *Stephania tetrandra*. Drtivá většina vzorků ovšem obsahovala aristolochovou kyselinu (**Tab. 1**).³⁵

Tab. 1: Výsledky fytochemické analýzy (převzato z ³⁵)

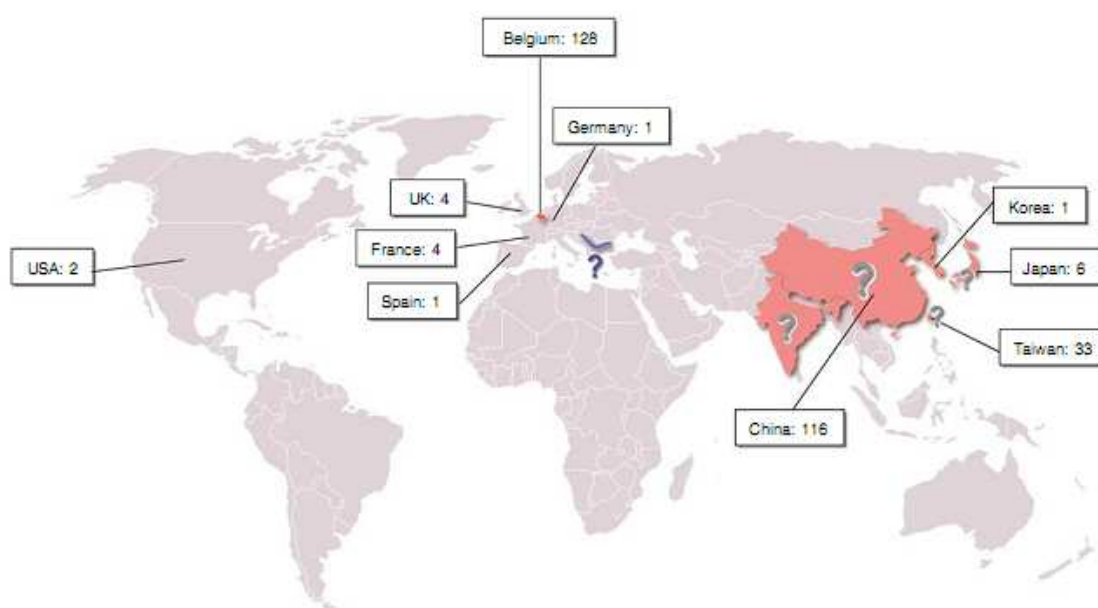
Batch	Tetrandrine	Aristolochic acid
1	-	+
2	+	-
3	-	+
4	-	+
5	-	+
6	-	+
7	-	+
8	-	+
9	-	+
10	-	+
11	-	+
12	+	+

Navíc bylo prokázáno, že aristolochové kyseliny v renální tkáni pacientů postižených AAN tvoří kovalentní adukty s DNA, adukty s deoxyadenosinem a deoxyguanosinem (**Obr. 3**).^{36,37} Těchto poznatků bylo dosaženo pomocí metody „³²P-postlabeling“. Adukty s DNA lze považovat za neklamný důkaz toho, že vlastní agens, které způsobuje tuto netypickou nefropatii, jsou aristolochové kyseliny. Na základě tohoto poznání byl původní název choroby změněn z nefropatie vyvolaná čínskými bylinami (*Chinese Herbs Nephropathy*, CHN) na nefropatii vyvolanou aristolochovými kyselinami (*Aristolochic Acid Nephropathy*, AAN).^{27,28}



Obr. 3: Autoradiogramy analýzy aduktů AA s DNA (metoda „³²P-postlabeling“) u pacientů postižených AAN; skvrna 1 = dA-AAI, skvrna 2 = dG-AAI, skvrna 3 = dA-AAII (převzato z ³⁶)

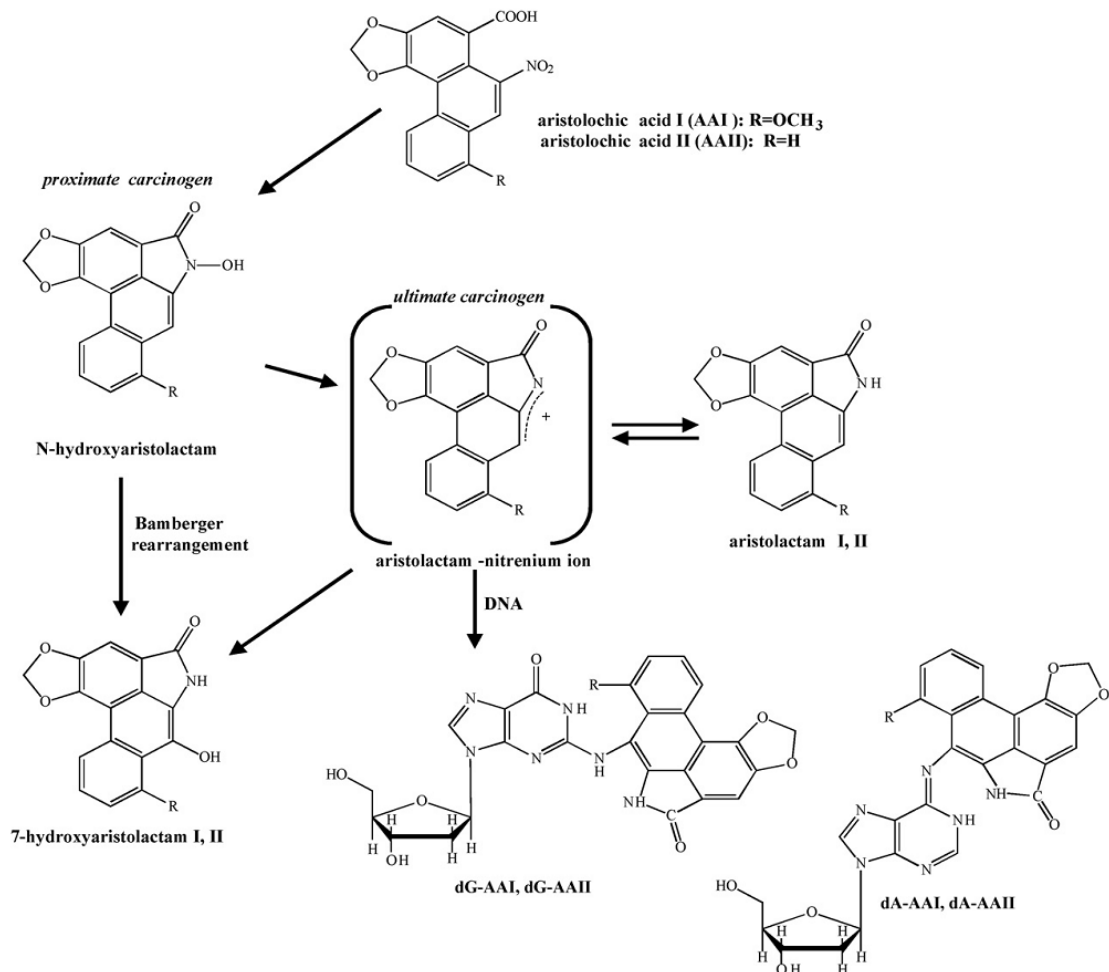
Nefropatie vyvolaná aristolochovými kyselinami není bohužel problémem pouze u pacientů kliniky v Belgii. Případy tohoto onemocnění byly později nalezeny po celém světě, nejvíce pak v Asii (**Obr.4**).^{11,27}



Obr. 4: Popsané případy AAN ve světě (převzato z ¹¹)

1.4.2 Urotheliální rakovina

Vývoj urotheliálních nádorů se zdá být pozdní komplikací nefropatie vyvolané aristolochovými kyselinami.³⁸ U pacientů postižených AAN se několik let po přerušení kúry pro redukci tělesné hmotnosti zvýšilo riziko vzniku tohoto nádorového onemocnění.³⁹ Pacienti, kteří obdrželi při kúře 200 g bylin předepsaných pro tuto léčebnou kúru (200 g bylin představovalo celkové množství, které bylo na bruselské klinice předepsáno ve dvou letech) měli o 50% vyšší riziko vývoje rakoviny.¹² Bylo také pozorováno významně zvýšené riziko vzniku rakoviny ledvin a ostatních orgánů vylučovacího systému mezi čínskými herbalisty, kteří „léčí“ různými bylinnými léčivy a toniky jak své pacienty tak i sebe.⁴⁰

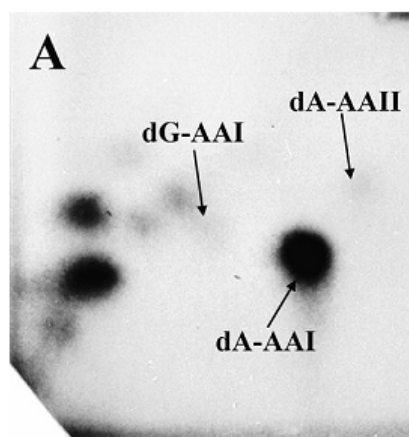


Obr. 5: Aktivace AA a tvorba aduktů s DNA (převzato z ⁴³)

Po aktivaci aristolochových kyselin v organismu biotransformačními enzymy dochází ke vzniku nejdříve *N*-hydroxyaristolaktamu (*proximální karcinogen*), který sice reprezentuje finální stav po redukci nitroskupiny, nicméně vlastní karcinogenní agens je až následně vzniknuvší „*ultimální*“ *karcinogen* – cyklický *N*-acylnitreniový ion. Právě tento nitreniový ion může interagovat s DNA a tvořit kovalentní adukty s deoxyadenosinem, 7-(deoxyadenosin-*N*⁶-yl)aristolaktam (**dA-AA**), a deoxyguanosem, 7-(deoxyguanosin-*N*²-yl)aristolaktam (**dG-AA**).²⁷

Tvorba těchto aduktů byla prokázána jak u hlodavců^{41,42}, tak i v tkáních pacientů postižených AAN (**Obr. 5**).³⁶ Díky těmto aduktům byly sice prokázány aristolochové kyseliny jako původce AAN, nicméně hrají také významnou roli v procesu karcinogeneze vyvolané aristolochovými kyselinami.¹² V renální tkáni pacientů trpících AAN byly nalezeny tři specifické adukty s DNA: jeden majoritní (dA-AAI) a dva minoritní (dA-AAII a dG-AAI).³⁶

Bylo ukázáno, že aristolochová kyselina I tvoří adukty s DNA efektivněji než aristolochová kyselina II.⁴⁴ Významnou roli zaujímá především adukt 7-(deoxyadenosin-*N*⁶-yl)aristolaktam I, který se vyznačuje velice dlouhou persistencí v tkáních³⁶ (u pacientů s AAN byl detekovatelný i po 89 měsících³⁹, **Obr. 6**).



Obr. 6: Autoradiogram aduktů s DNA vyskytujících se v renální DNA pacientů s AAN určených metodou „³²P-postlabeling“ (převzato z⁴³)

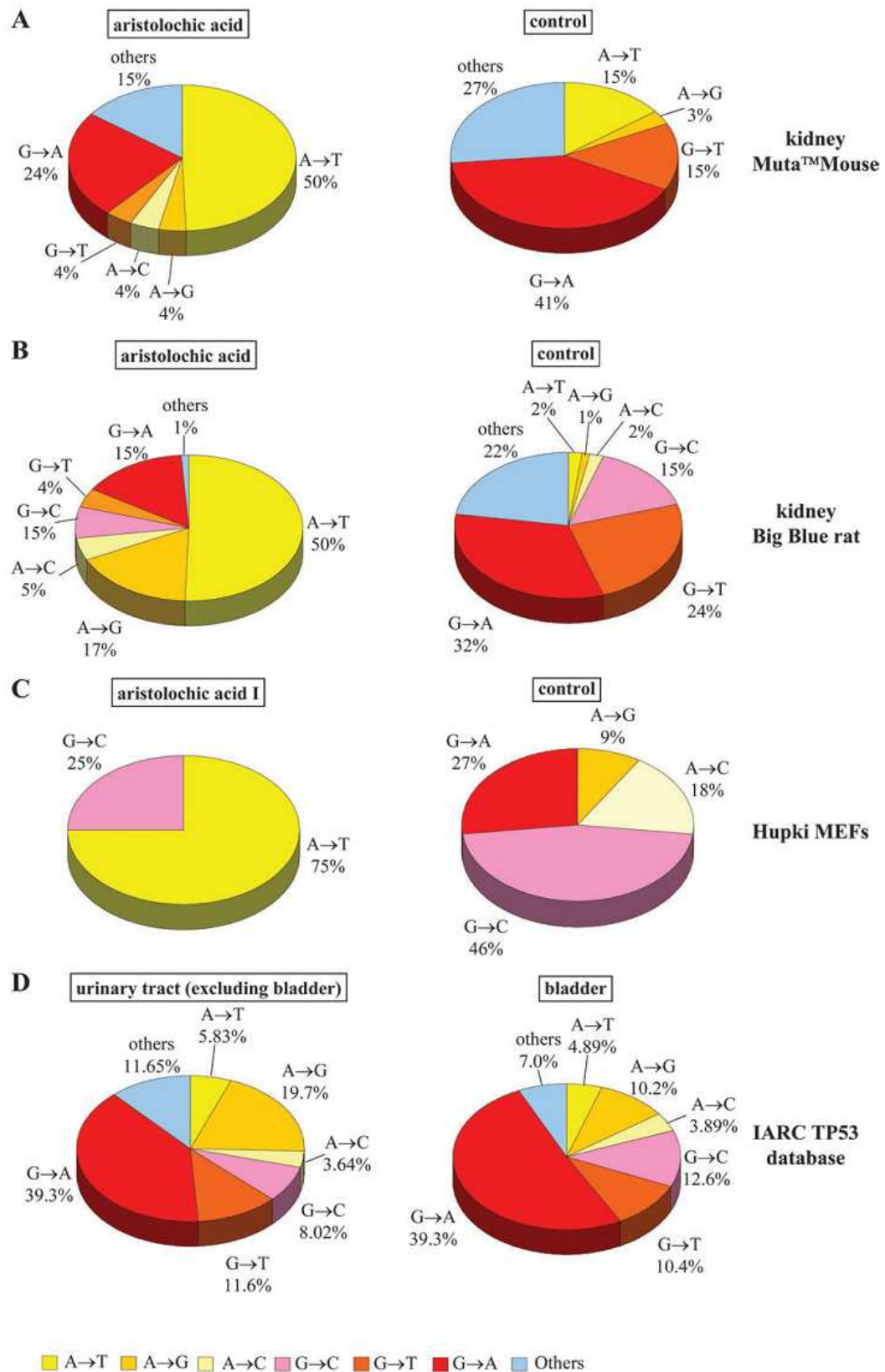
Tvorba těchto aduktů s DNA ukazuje, že *N*-acylnitreniový ion přednostně reaguje s exocyklickou aminoskupinou purinových basí. Tato vazba na exocyklickou aminoskupinu je pro nitroaromáty (kterými aristolochové kyseliny jsou) velice nezvyklá (obvykle se váží na uhlík C8 deoxyguanosinu).²⁷

Proces karcinogeneze vyvolaný aristolochovými kyselinami je u hlodavců zřetelně spojený s mutací v kodonu 61 (CAA) *H-ras* onkogenu, a to specifickou transversí AT→TA.^{27,45} Tato mutace se vyskytuje na druhé pozici kodonu 61, tj. na jeho prvním adeninu.⁴⁶ Obdobná mutace byla pozorována na kodonu 139 – exon 5 – (AAG) v lidském tumorového supresorového genu *p53*.^{27,28,47} Za zmínku jistě stojí i to, že adenin v genu *p53*, který je cílovým místem mutace, má stejné sousední base v kodonu 138/139 (GCC AAG) jako v kodonu 61 potkaního *H-ras* onkogenu (CAA). Tato podobnost podporuje hypotézu, že k mutaci dochází sekvenčně specifickým mechanismem.¹²

V dalších studiích bylo zjištěno, že deoxyadenosinmonofosfát (dAMP) a deoxythymidinmonofosfát (dTMP) se inkorporují se stejnou pravděpodobností proti deoxyadenosinovým aduktům; na rozdíl od deoxyguanosinových aduktů, které preferují inkorporaci s cytidinmonofosfátem. A právě inkorporace adenosinmonofosfátu proti dA-AA vede k transversi AT→TA. Tato skutečnost potvrzuje hypotézu, že adukty s deoxyadenosinem mají vyšší mutagenní potenciál oproti aduktům s deoxyguanosinem.²⁷ Naneštěstí je aduktem s DNA, který převládá v tkáních člověka i experimentálních živočišných modelů, právě adukt 7-(deoxyadenosin-*N*⁶-yl)aristolaktam I.^{45,46}

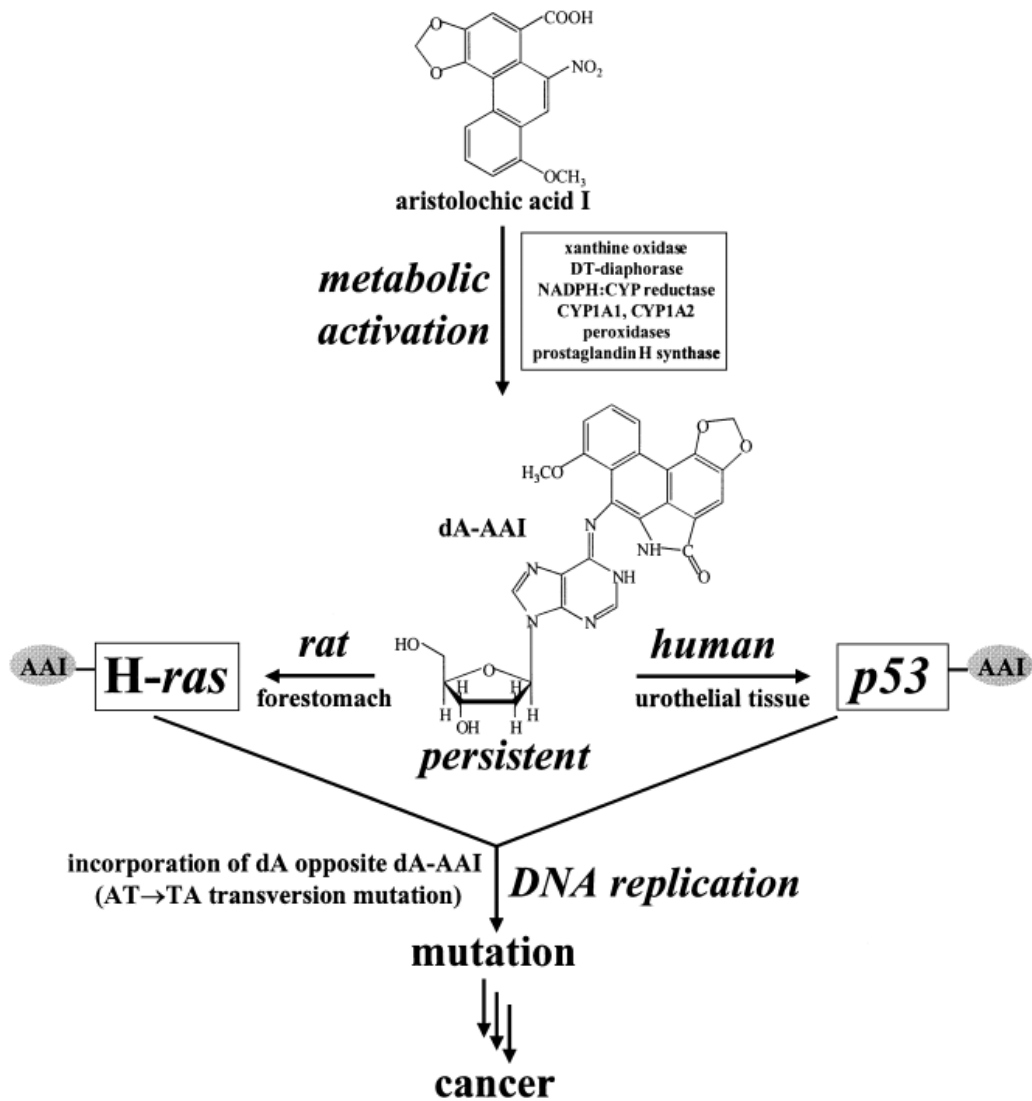
Pokud dojde k výše zmíněné tvorbě aduktů aristolochových kyselin s DNA, pak po procesu replikace dochází k mutaci a následné změně aminokyseliny: v případě *H-ras* onkogenu (CAA→CTA) dochází ke změně Gln→Leu, v případě lidského tumorového supresorového genu *p53* (AAG→TAG) se jedná o změnu Lys → Stop. Tímto způsobem může vzniknout iniciovaná buňka.^{43,48}

Experimenty na laboratorních zvířatech potvrdili, že aristolochové kyseliny vyvolávají výlučně mutace AT→TA. Byla zjištěná vysoká incidence právě této mutace u tumorů vyvolaných AA (jak u laboratorních zvířat – kmeny MutaTMMouse a Big Blue rat – tak i u pacientů trpících AAN) na rozdíl od tumorů AA neindukovaných (podle TP53 database IARC) (**Obr. 7**).⁴⁹ Pro studium mutací v lidském tumorovém supresorovém genu *p53* byly připraveny speciální kmeny myší, jejichž exony 4-9 endogenní myší alely genu *p53* byly nahrazeny genovou sekvencí normálního lidského genu *p53* (tzv. „hupki Mouse“ – human p53 knock-in mouse).⁵⁰



Obř. 7: Schéma mutací tumorového supresorového genu *p53*(podle ⁴⁹)

Výše nastíněný mechanismus karcinogeneze vyvolané aristolochovými kyselinami shrnuje **Obr. 8**.



Obr. 8: Mechanismus karcinogeneze vyvolaný aristolochovou kyselinou v tkáních hlodavců a člověka (převzato z²⁷⁾)

1.4.3 Balkánská endemická nefropatie (BEN)

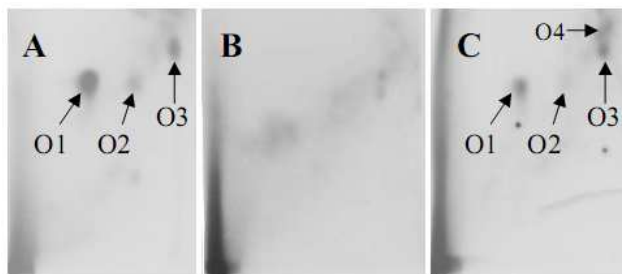
Balkánská endemická familiární nefropatie je definována jako pomalu postupující progresivní intersticiální nefritida s vážným poškozením tubulárního epithelia a následným zničením glomerulů, jež může vést až renální kontrakci.⁵¹⁻⁵³ Toto onemocnění se vyskytuje u nezanedbatelné části populace, žijící v oblasti Bulharska, Rumunska, Srbska, Bosny a Chorvatska v oblasti povodí řeky Dunaje (až do vzdálenosti 100 km od řeky).^{43,54} Proces tohoto onemocnění je ireversibilní a léčba spočívá v dialyze, popř. v transplantaci ledvin. Z klinického hlediska se tato endemická nefropatie vyvíjí bez nefrotického syndromu a často bez hypertense. Je zde také nápadná anemie, mírná proteinurie, glukosurie a zvýšený obsah kreatininu. BEN může být provázena vývojem multifokálních, pomalu rostoucích, povrchových tumorů ledvinové pánvičky a dalších částí urogenitálního systému.⁵¹⁻⁵⁴

Pacienti trpící balkánskou endemickou nefropatií byli výlučně lidé pracující v zemědělství (přičemž ženy byly postiženy více než muži).⁵¹ Stále nevyřešenou se zdá být otázka etiologie této choroby. Studie zabývající se hledání příčin BEN navrhly několik hypotes (mezi nimi vliv těžkých kovů, mykotoxinů či aristolochových kyselin), nicméně je pravděpodobné, že toto onemocnění je multifaktoriálního původu, zahrnující faktory především environmentální a genetické.⁵²

Jedním z navrhovaných původců BEN jsou polycyklické aromatické uhlovodíky a aromatické aminy, které jsou prokazatelnými karcinogeny (tzv. „*lignitová teorie*“). Vychází se ze skutečnosti, že v postižených regionech se vyskytují ložiska pliocénského lignitu a nekvalitního uhlí, jejichž zvětráním se výše zmíněné chemické sloučeniny (naftylamin, anilin, anthracen, pyren aj.) dostaly do pitné vody používané místním obyvatelstvem.^{52,55,56} Zvýšená koncentrace těchto organických sloučenin ve studních byla prokázána.⁵⁶ Protože studie role pliocénského lignitu v etiologii BEN vyžadovaly výzkum v terénu oblastí s výskytem BEN, byly v roce 1993 přerušeny vypuknutím války v Jugoslávii.⁵⁶

Další hypotéza vysvětlující, resp. hledající původ BEN předkládá jako příčinu onemocnění mykotoxiny (tzv. „*mykotoxinová teorie*“). Jedná se především o ochratoxin A (OTA) a v úvahu přichází také citrinin.^{52,55,56} Tuto teorii podporují skutečnosti, že (i) onemocnění se vyskytuje pouze ve venkovských oblastech, kde se místní obyvatelstvo stravuje především potravinami, které si samo vypěstovalo a skladovalo (a právě při skladování pšenice se působením plísní kontaminují potraviny ochratoxinem A), (ii) choroba se vyskytuje v jedné rodině ve více případech, (iii) toxiny jako OTA nebo citrinin

jsou nefrotoxické a OTA indukuje vznik tumorů u myší a (iv) v lidské tkáni tumorů ledvinové pánvičky a močového měchýře byly nalezeny adukty s DNA, které se podobají aduktům nalezeným v DNA experimentálních zvířat vystavených působení OTA (**Obr. 9**).^{53,57}

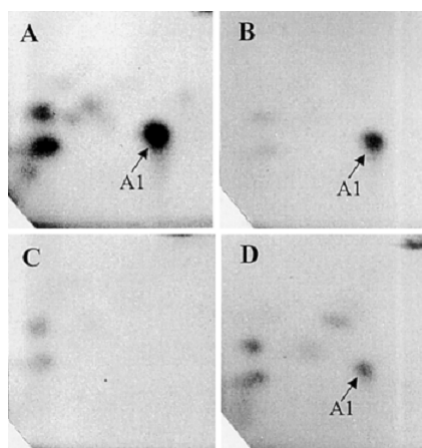


Obr. 9: Adukty derivované z ochratoxinu A v DNA ledvin pacientů žijících v oblasti BEN (převzato z ⁵²)

Nefrotoxické účinky ochratoxinu A byly demonstrovány při experimentech s živočišnými modely, jako jsou potkani, myši a prasata. Ochratoxin A je dále cytotoxický pro kultury renálních buněk a karcinogenní pro potkany.^{58,59} Ve studiích zabývajících se vznikem aduktů derivovaných z ochratoxinu A v DNA byly získány výsledky, které jsou přinejmenším kontroverzní: vedle studií potvrzujících vznik aduktů OTA s DNA^{57,58,60} se objevily také práce, které byly s tímto tvrzením v ostrém rozporu – adukty DNA s OTA nebyly detekovány.⁶¹⁻⁶³

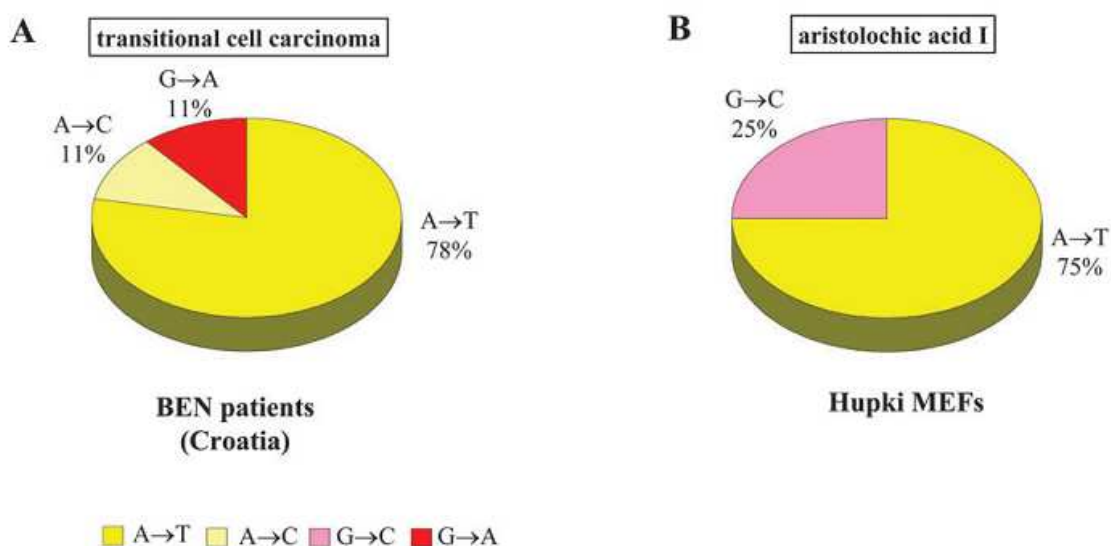
Silným argumentem proti tzv. „mykotoxinové teorii“ je skutečnost, že dosud nebyly popsány případy, kdy by OTA způsoboval ledvinné onemocnění nebo rakovinu v lidském organismu. Dále je poukazováno na to, že OTA je detekován v krvi populace po celé Evropě, kdežto BEN se vyskytuje pouze v určitých regionech. V neposlední řadě musí být bráno v úvahu i to, že adukty derivované z OTA s DNA nejsou detekovány za fyziologických podmínek v potkanech nebo buněčných kulturách, kterým byly podávány vyšší dávky OTA. Z výše zmíněných důvodů se zdá být nepravděpodobné, že by ochratoxin A byl přímým genotoxickým karcinogenem, který by hrál v balkánské endemické nefropatii nebo urotheliální rakovině spojené s BEN významnou roli.⁶⁴

Balkánská endemická nefropatie je velice podobná nefropatii vyvolané aristolochovými kyselinami. Z tohoto důvodu jedna z hypotes považuje právě aristolochové kyseliny za původce BEN.⁵² Vedle nápadné podobnosti obou nefropatií podporuje tuto teorii také nalezení aduktů aristolochových kyselin s DNA v tkáních pacientů (**Obr. 10**).⁶⁰



Obr. 10: Aduktů aristolochových kyselin nalezené v DNA pacientů trpících AAN (A) a pacientů žijících v oblastech BEN (B-D) (převzato z ⁶⁰)

Jako původce BEN byly aristolochové kyseliny navrženy již v roce 1967⁵⁶ a následně v roce 1969 našel Ivić aristolochové kyseliny v mouce připravené z pšenice kontaminované semeny podražce křovištního (*Aristolochia clematitis*) v endemických regionech.⁶⁵ *Aristolochia clematitis* se v těchto oblastech používá také v tradiční medicíně.¹⁰ Tyto poznatky soustřeďují ještě více pozornosti na aristolochové kyseliny jako původce BEN. Vedle aduktů s DNA podporuje tuto hypotézu i výskyt specifické mutace – transverse AT→TA nalezené v genu *p53* nádorových tkání pacientů (**Obr. 11**).⁶⁶



Obr 11: Schéma mutací genu *p53* u pacientů trpících BEN (A) a u embryonálních fibroblastů získaných z myši rodu „hupki mouse“ (B) (podle ⁴⁹)

Výše uvedené skutečnosti resultují v názor, že aristolochové kyseliny se na vývoji balkánské endemické nefropatie podílejí majoritně. Nicméně tato problematika si žádá ještě další zkoumání.⁶⁴

Jako další příčiny BEN byly navrženy těžké kovy a dokonce i viry, nicméně jejich vliv je pravděpodobně minimální.^{52,56}

Vedle environmentálních faktorů podílejících se na vývoji balkánské endemické nefropatie se ještě nabízejí faktory genetické. Předpokládá se, že dědičně predisponované geny pro BEN jsou umístěny v oblasti mezi geny 3q25 a 3q26. Dále se uvažuje ovlivnění růstového faktoru TGF- β a neopomenutelnou roli také pravděpodobně hraje genetický polymorfismus některých enzymů podílejících se na biotransformaci xenobiotik (především látek výše zmíněných), např. cytochromů P450.^{52,67}

1.5 BIOTRANSFORMACE XENOBIOTIK

V průběhu evoluce se u organismů vyvinuly různé metabolické cesty, kterými dochází k detoxikaci xenobiotika. Detoxikační procesy probíhají ve všech živých organismech a hrají klíčovou úlohu při zachování biologických funkcí jednotlivých jedinců, neboť vysoké koncentrace, popř. dlouhá doba působení mohou vést k poškození, ba i ke smrti organismu.⁶⁸ Biotransformací se rozumí procesy vedoucí ke snadnému vyloučení xenobiotika z organismu. Proces biotransformace nemusí být vždy detoxikačního charakteru (tj. snížení toxicity xenobiotika). Vedle detoxikační cesty existuje ještě cesta aktivační, která toxicitu xenobiotika zvyšuje (jedná se především o aktivaci promutagenů na mutageny).⁶⁹

Xenobiotikum (zpravidla hydrofobní) je v procesu biotransformace polarizováno řadou chemických reakcí, které jsou v organismu enzymově katalyzovány.^{70,71} V živočišných organismech se rozlišují dvě fáze biotransformace: první (derivatisační) a druhou (konjugační) fází.⁷¹

Derivatisační fáze je charakterisována přeměnou xenobiotik na polárnější látky prostřednictvím chemických reakcí, především reakcemi oxidačními (hydroxylace, deaminace, sulfooxidace apod.), redukčními (nitroredukce a azoredukce) a hydrolytickými (hydrolytické štěpení amidů a esterů).^{68,71} Dochází k modifikaci molekuly xenobiotika, která umožňuje jeho konjugaci s eobiotiky (kyseliny, alkoholy, aminy), jinými slovy první fáze biotransformace připravuje molekulu xenobiotika pro druhou fázi biotransformace.⁶⁸

Konjugační fáze zefektivňuje polarizaci xenobiotika konjugací s látkami těla vlastními. Konjugační reakce, ač v biologickém pořadí druhé, byly objeveny jako první, protože produkty vzniklé těmito reakcemi jsou přítomny v krvi, séru, moči a výkalech.^{68,71} Mezi časté reakce patří konjugace s kyselinou glukuronovou, aktivním sulfátem a glutathionem. Vedle těchto eobiotik mohou derivatisovaná xenobiotika konjugovat též s acetátem a aminokyselinami (cystein, glycin). Enzymy uplatňující se v této fázi biotransformace patří do třídy transferas (výjimečně může dojít ke spontánní reakci, např. konjugace s glutathionem).⁷¹

Mezi enzymy podílející se na oxidačních reakcích první fáze biotransformace se řadí především monooxygenasy a peroxidasy. Mluví se o tzv. mikrosomálním monooxygenasovém systému (*mixed function oxidase system*), který obsahuje vedle cytochromů P450 (**CYP**) jako terminálních oxidas, NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasu a cytochrom b₅. Mezi významné vlastnosti cytochromů P450 (z hlediska biotransformace xenobiotik) patří jejich široká substrátová specifita. Cytochromy P450 jsou hemthiolátové proteiny, které jsou v eukaryotických organismem lokalizovány především v membránách endoplasmatického retikula. V buňkách se vyskytují ve velkém množství především v játrech.⁷¹

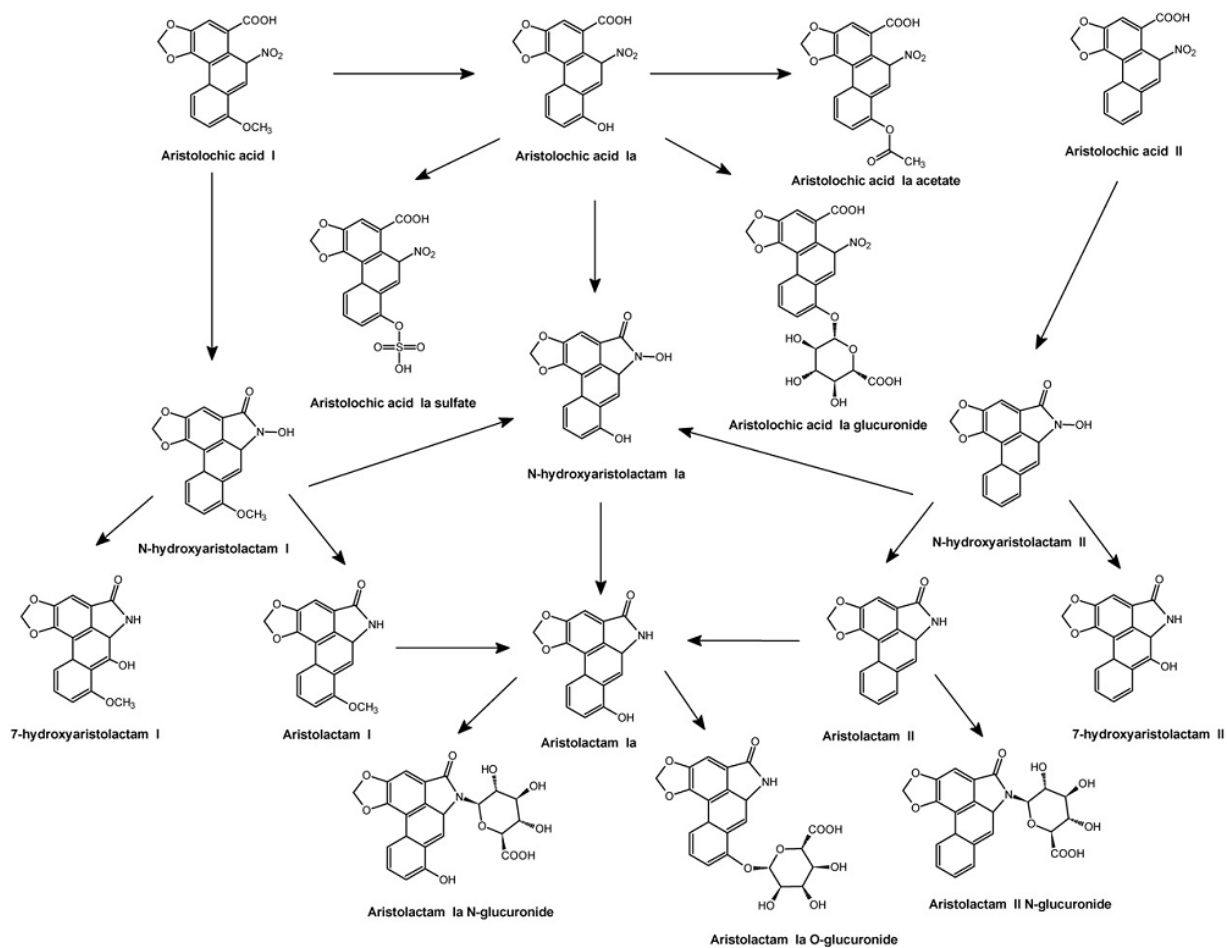
Peroxidasy, např. prostaglandin H-synthasa (cyklooxygenasa, **COX**), jsou enzymy redukující peroxid vodíku a zároveň přeměňující další sloučeniny. Jsou také lokalizovány v membráně endoplasmatického retikula. Z hlediska orgánové lokalisace jsou přítomné především v ledvinách (renální tkáni).^{69,71}

Enzymy působící v redukčních reakcích biotransformujících xenobiotika jsou především xanthinoxidasa, NAD(P)H:chinon oxidoreduktasa (DT-diaforasa, **NQO1**) a NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasa.^{70,71}

V některých případech enzymové reakce biotransformace xenobiotik místo toho, aby jejich toxicitu snižovaly a usnadňovaly jejich vyloučení z těla, jejich toxicitu zvyšují. Mluvíme o tzv. aktivační cestě biotransformace xenobiotik. Tato cesta je zprostředkována jak první tak i druhou fází biotransformace. Významnou se z tohoto hlediska zdá konjugace s acetátem a s aktivním sulfátem, jejichž reakcí vznikají nestabilní produkty, které mohou dát vzniknout velice reaktivním nitreniovým a karbeniovým iontům z karcinogenních aromatických aminů a nitroaromátů.⁷¹

1.5.1 Biotransformace aristolochových kyselin

Řada studií prokázala, že hlavními metabolity aristolochových kyselin jsou aristolaktamy (**Obr. 12**). Tyto metabolity byly nalezeny jak volné, tak konjugované v moči a výkalech.^{27,43} Hlavním metabolitem AAI se ukázal být aristololaktam I (AlacI) a aristolochová kyselina Ia (AAIa), která vzniká demethylací AAI.^{43,72} Za aerobních podmínek vzniká z AAI aristolochová kyselina Ia, nicméně metabolit odvozený od AAI nebyl pozorován.⁷³ Avšak aristolaktam Ia (AlacIa) v experimentech *in vivo* detekovaný, nebyl v experimentech *in vitro* pozorován.⁷⁴ Koncentrace kyslíku v tkáních ovlivňuje jak nitroredukcí AAI, tak i její *O*-dealkylaci (demethylaci), v případě AAIi ovšem ovlivňuje pouze její nitroredukcí.⁷⁵

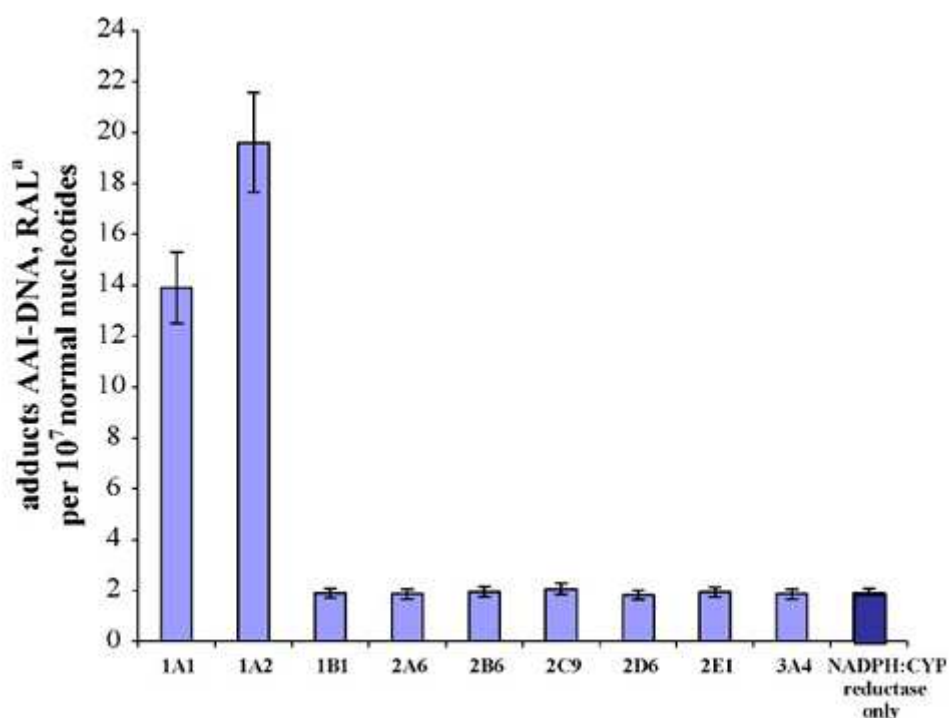


Obr. 12: Schéma metabolismu AAI a AAIi (převzato z⁴³)

Aristolochové kyseliny jsou nejdříve redukovány na své N-hydroxyaristolaktamy a redukce může pokračovat až na aristolaktamy.⁴³ Druhá fáze biotransformace AA zahrnuje konjugaci s kyselinou glukuronovou, acetátem a sulfátem, jedná se o konjugáty AAIA, jmenovitě *O*-glukosiduronát, *O*-acetát a *O*-sulfát.^{74,76} Konjugáty aristolaktamů byly také nalezeny: *N*-glukosiduronát, *O*-glukosiduronát aristolaktamu Ia a *N*-glukosiduronát aristolaktamu II.⁷⁴

1.5.2 Enzymová aktivace aristolochových kyselin

Aristolochová kyselina I je aktivována prostou nitroredukcí za vzniku *N*-hydroxyaristolaktamu I, ze kterého se tvoří cyklický *N*-acylnitreniový ion, který je okamžitým karcinogenem vázajícím se na DNA.^{27,43,77} V řadě studií zabývajících se identifikací enzymů participujících na aktivaci AA bylo zjištěno, že aktivace AAI je v jaterních mikrosomech zprostředkována především cytochromy P450 1A2, popř. 1A1. Tento nálezn byl potvrzen užitím lidských rekombinantních cytochromů P450 a NADPH:CYP oxidoreduktasy (**Obr.13**).⁴³



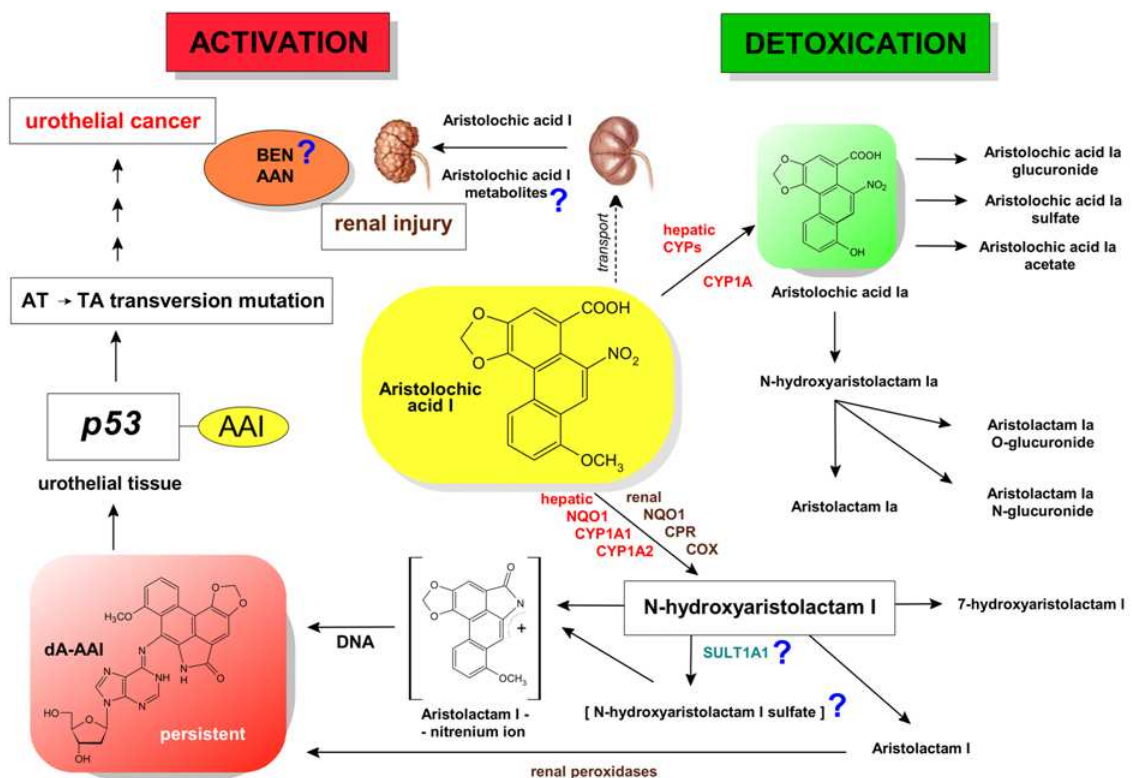
Obr. 13: Tvorba aduktů AAI s DNA po aktivaci různými cytochromy P450 (převzato z⁴³)

Experimenty *in silico* (homologní modelování) vysvětluje nižší efektivitu CYP1A1 při redukci AAI tím, že AAI s CYP1A1 interaguje oběma skupinami, jak nitroskupinou, tak i karboxylovou skupinou. Na rozdíl od CYP1A2, který s AAI interaguje pouze nitroskupinou.⁴³

Účinnost mikrosomů izolovaných z ledvin je srovnatelná s účinností mikrosomů získanými z jater. Nicméně cytochromů P450 je v renální tkáni méně. V mikrosomech ledvin se hojně vyskytuje NADPH:CYP oxidoreduktasa a COX, které také participují na aktivaci AAI.^{43,78}

Cytosolární vzorky lidských jater a ledvin také vykazovaly efektivitu AAI v aktivaci za tvorby aduktů s DNA. Jako nejefektivnější enzymy, které se na tomto procesu podílejí, byly zjištěny: NAD(P)H:chinon oxidoreduktasa (NQO1) a xanthinoxidasa.^{43,79} Po srovnání mikrosomálních a cytosolárních enzymů podílejících se na aktivaci AA je NQO1 mnohem efektivnější než CYP1A1 a CYP1A2.⁴³

Podíl *N*-acetyltransferasy a sulfotransferasy na metabolické aktivaci AA je nejasný a potřebuje další zkoumání.⁴³

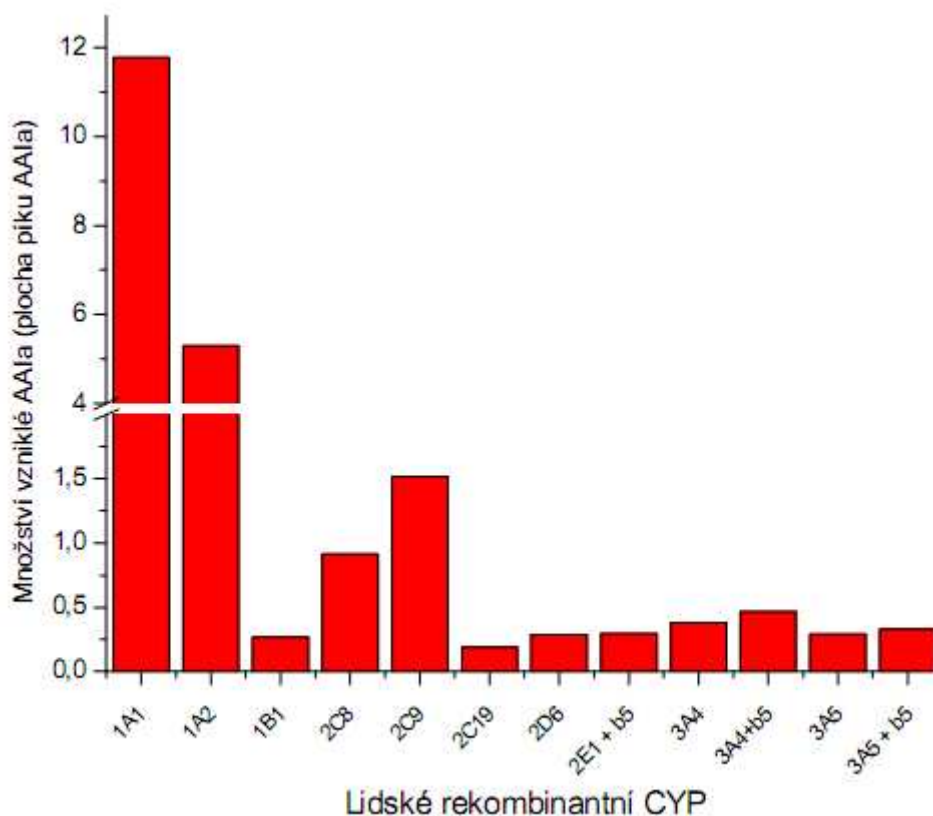


Obr. 14: Navržené schéma aktivace a detoxikace aristolochové kyseliny I (převzato z⁸⁰)

1.5.3 Enzymová detoxikace aristolochových kyselin

Vedle aktivace aristolochových kyselin byla popsána i detoxikace těchto sloučenin. Konverse *N*-hydroxyaristolaktamu I na 7-hydroxyaristolaktam I je pravděpodobně zahrnuta do detoxikační cesty (**Obr. 14**).^{77,80,81} Předpokládá se, že oxidace aristolochové kyseliny I na aristolochovou kyselinu Ia je základní detoxikační cesta této sloučeniny, neboť AAIA a její konjugáty (popř. konjugáty AlaIa) byly nalezeny v moči.⁷⁶ Vše nasvědčuje skutečnosti, že reakce vedoucí k tvorbě AAIA jsou výlučně detoxikační, neboť nebyly dosud nalezeny adukty AAIA s DNA.⁷⁷

Studium enzymů (rekombinantních cytochromů P450) podílejících se na detoxikaci AAI, prokazuje, že významnou úlohu v oxidaci AAI hrají CYP1A1 a 1A2. Efektivnější v oxidaci AAI je CYP1A1(**Obr. 15**).^{81,82}



Obr. 15: Oxidace AAI lidskými rekombinantními cytochromy P450 (převzato z ⁸²)

2. CÍL BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Cílem předkládané bakalářské práce bylo vytvořit přehled informací o rostlinných alkaloidech aristolochových kyselinách, o nefropatii vyvolané aristolochovými kyselinami a enzymech tyto látky přeměňujících.

V experimentální části bylo cílem studium detoxikace aristolochové kyseliny I zprostředkované její oxidací lidským jaterním mikrosomálním systémem. Konkrétně bylo zjišťováno, které z cytochromů P450 lidských jaterních mikrosomů oxidují aristolochovou kyselinu I na aristolochovou kyselinu Ia.

3. MATERIÁL A METODY

3.1 POUŽITÝ MATERIÁL A CHEMIKÁLIE

Použitý materiál a chemikálie pochází z následujících zdrojů:

Gentest BD Bioscience, USA

lidské jaterní mikrosomy *Single Donors* (HG93, HG03, HG74, HG06, HK27, HG42, HG112, HG56, HG43, HG89, HG32, HK31, HK23, HK34), které byly uchovávány při teplotě -80 °C

Lachema Brno, Česká republika

kyselina octová, methanol, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$, NH_4HCO_3

Merck, Německo

acetonitril

Penta, Česká republika

ethylacetát

Sigma, USA

glukosa-6-fosfát, glukosa-6-fosfát dehydrogenasa, ketokonazol, NADPH, $NADP^+$, triethylamin

British Drug Houses, Velká Británie

Sudan I (1-fenylazo-2-naftol)

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

3.2 PŘÍSTROJE

Automatické mikropipety

Nichiryo Nichipet EX (Japonsko)

Centrifugy

MLW, typ T52.2, Medizintechnik Leipzig, výkyvný rotor (Německo)

Microcentaur MSE, Sanyo, úhlový rotor (Velká Británie)

Inkubátory

Thermomixer Eppendorf compact Eppendorf (Německo)

Julabo TW8 Schoeller Instruments, s.r.o. (Česká republika)

Environmental incubator shake G24, New Brunswick Scientific. Co. Inc. (USA)

Magnetická míchačka

Variomag, Monotherm (Německo)

pH metr

ATI Orion 370 s kombinovanou elektrodou (USA) - kalibrace přístroje pomocí standardů Hamilton (Švýcarsko)

Sonikátor

ELMAsonic E 30 H, P-Lab (Česká republika)

Systém HPLC

pumpa: Dionex pump P580

ASI-100 Automated Sample Injector

UV/VIS Detector UVD 170S/340S (USA)

Degasys DG-1210 Dionex

termobox pro kolonu: COLUMN OVEN LCO 101

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

program: Chromeleon™ 6.11 build 490

Vakuová odparka

Speed wac DNA 110, Savant (USA)

Další přístroje

analytické váhy PESA 40SM-200A (Švýcarsko), Mikroshaker type ML-1, MS 2 Minishaker, Schoeller Pharma Praha (Česká republika)

3.3 METODY

3.3.1 Oxidace AAI cytochromy P450 v lidských jaterních mikrosomech

Oxidace aristolochové kyseliny I byla sledována za použití lidských jaterních mikrosomalních systémů. Stanovení bylo uskutečněno vždy v „dubletních“ provedeních, přičemž celkový objem inkubační směsi byl 500 μ l.

Složení inkubačních směsí:

1. fosfátový pufr (100 mM NaH_2PO_4), pH = 7,4
2. AAI (10 μ M) rozpuštěna v destilované vodě
3. lidské jaterní mikrosomy (*Single Donors*) $c_{\text{proteinů}} = 0,5$ mg/ml
4. NADPH generující systém (NADPH-GS): 1 mM NADP^+ , 10 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 10 mM glukosa-6-fosfát, 1 U/ml glukosa-6-fosfát dehydrogenasa

Příslušné složky inkubačních směsí byly přidávány v takovém množství a takovém pořadí, jak je naznačeno výše. Reakční směs byla míchána a inkubována na po dobu 20 minut za stálého třepání (400 RPM) při teplotě 37 °C. Reakce byla zastavena přidáním 1 ml ethylacetátu a pro dobrou extrakci metabolitu do organického rozpouštědla byla reakční směs 2 minuty třepána (*Mikroshaker type ML-1*). Následně byla organická fáze oddělena centrifugací (13 000 RPM, 3 min., *minicentrifuga MicroCentaur MSE, úhlový rotor*). Organická fáze byla posléze odebrána, k vodné fázi byl přidán 1 ml ethylacetátu a byla opět provedena extrakce dle stejného postupu. Spojené extrakty byly odpařeny v digestoři (přes noc) a následně uchovávány při teplotě -20 °C. Před analysou byly extrakty rozpuštěny v 30 μ l methanolu. Takto připravené vzorky byly analysovány metodou HPLC.

3.3.1.1 Vysokotlaká kapalinová chromatografie (HPLC)

Látky obsažené v extraktech byly separovány pomocí metody RP-HPLC. Bylo užito kolony C18 (*Macherey-Nagel*, SRN) při teplotě 35 °C. Při separaci bylo užito směsi (A) 100 mM triethylaminacetátu (pH = 7,0; úprava pH pomocí kyseliny octové) a (B) 80% acetonitrilu jako mobilní fáze. Standard AAI byl připraven tak, že k 28 µl methanolu byly přidány 2 µl AAI. Směs byla promíchána. Na kolonu bylo vždy nanášeno 20 µl vzorku. Separace probíhala v gradientovém uspořádání, kdy se měnilo složení mobilní fáze z 80% A, 20% B na konečné složení 40% A a 60% B. Mobilní fáze byla připravena před analysou a byla sonifikována (pro odstranění vzduchu). Jedna eluce trvala 55 minut při průtoku mobilní fáze 0,5 ml/min a při tlaku cca 80 bar. Látky obsažené v extraktech byly detekovány při vlnové délce 250 nm.

1.3.2 Stanovení aktivity CYP1A1

Hodnoty aktivity CYP1A1 nebyly firmou Gentest (*Gentest BD Bioscience, USA*) pro velice nízkou expresi tohoto enzymu v lidských játrech stanoveny. Z tohoto důvodu musela být jeho aktivita určena v našich experimentech.

1-fenylazo-2-naftol (Sudan I) je znám jako velice dobrý substrát lidského CYP1A1. Nicméně, Sudan I je oxidován také lidským CYP3A4, i když s desetinásobně nižší aktivitou než CYP1A1. Proto musela být aktivita CYP3A4 inhibována, a to jeho specifickým inhibitorem ketokonazolem.⁸³ Stanovení bylo prováděno vždy v „dubletních“ provedeních, přičemž celkový objem inkubační směsi byl 500 µl.

Složení inkubačních směsí:

1. fosfátový pufr (50 mM NaH₂PO₄), pH = 7,4
2. lidské jaterní mikrosomy (*Single Donors*) *c* = 0,5 mg/ml
3. roztoky Sudanu I (100 µM) a ketokonazolu (10 µM) rozpuštěné v methanolu
4. NADPH (1 mM)

Nejdříve byly do inkubačních směsí přidány fosfátový pufr, lidské mikrosomy a směs Sudanu I s ketokonazolem v takovém množství a takovém pořadí, jak je naznačeno výše. Reakční směs byla míchána a inkubována po dobu 5 minut při teplotě 37 °C. Následně byl do reakční směsi přidán NADPH a po promíchání byla směs nechána po dobu 30 minut inkubovat za stálého třepání (250 RPM) při teplotě 37 °C. Reakce byla

zastavena přidáním 1 ml ethylacetátu. Následně byla organická fáze oddělena centrifugací (4 000 RPM, 5 min., *Centrifuga MLW, typ T52.2, výkyvný rotor*). Organická fáze byla posléze odebrána, k vodné fázi byl přidán 1 ml ethylacetátu a byla opět provedena extrakce dle stejného postupu. Spojené extrakty byly odpařeny v digestoři na vakuové odparce (*Speed vac DNA 110, Savant USA*) a následně uchovávány přes noc v digestoři. Před analysou byly extrakty rozpuštěny v 30 μ l methanolu. Takto připravené vzorky byly analysovány metodou HPLC.

3.3.2.1 Vysokotlaká kapalinová chromatografie (HPLC)

Látky obsažené v extraktech byly separovány pomocí metody HPLC. Bylo užito kolony C18 (*Macherey-Nagel, SRN*) při teplotě 35 °C. Jako mobilní fáze bylo užito 100 mM NH_4HCO_3 (pH = 8,5). Standard byl připraven tak, že k 10 μ l Sudanu I bylo přidáno 20 μ l methanolu. Směs byla promíchána. Na kolonu bylo vždy nanášeno 20 μ l vzorku. Separace probíhala v isokratickém uspořádání. Mobilní fáze byla připravena před analysou a byla sonifikována (pro odstranění vzduchu). Jedna eluce trvala 14 minut při průtoku mobilní fáze 0,7 ml/min a při tlaku cca 80 bar. Látky obsažené v extraktech byly detekovány při vlnové délce 480 nm.

Stanovené hodnoty byly přiřazovány k hodnotám určených standardů metabolitů Sudanu I^{83,84} a tímto způsobem byla získána koncentrace vzniklých metabolitů v jednotkách μM .

4. VÝSLEDKY A DISKUSE

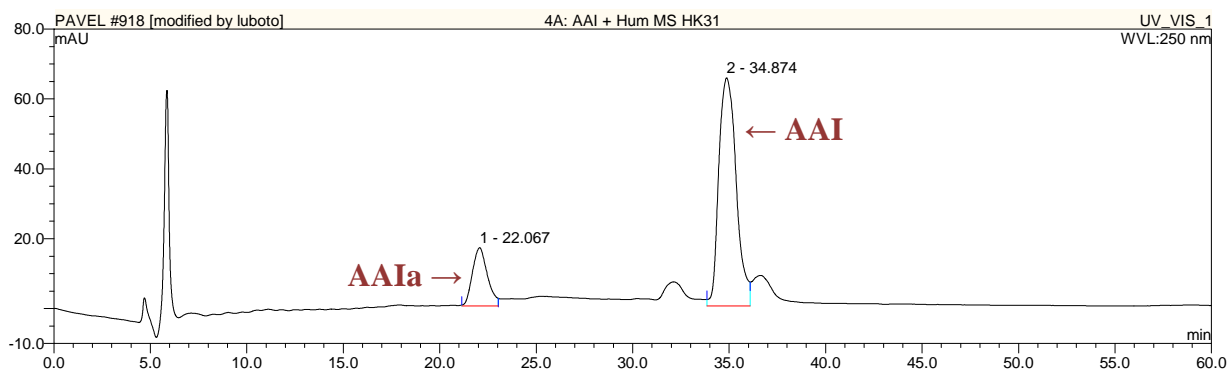
4.1 Oxidace AAI cytochromy P450 v lidských jaterních mikrosomech

Oxidace aristolochové kyseliny I je předpokládána jako detoxikační cesta při biotransformaci této sloučeniny.^{77,80,81} Produktem této oxidace je aristolochová kyselina Ia (AAIa). Uvedený metabolit byl separován od AAI pomocí metody HPLC a detekován při vlnové délce 250 nm.

4.1.1 Detekce AAI a AAIa metodou HPLC

Separace AAI a AAIa pomocí HPLC byla popsána již v dřívějších pracích.^{81,82,85} Dříve navržené optimální podmínky pro detekci AAI a AAIa⁸⁵ byly však drobně upraveny. Upravený analytický postup je uveden v kapitole 3.3.1.1.

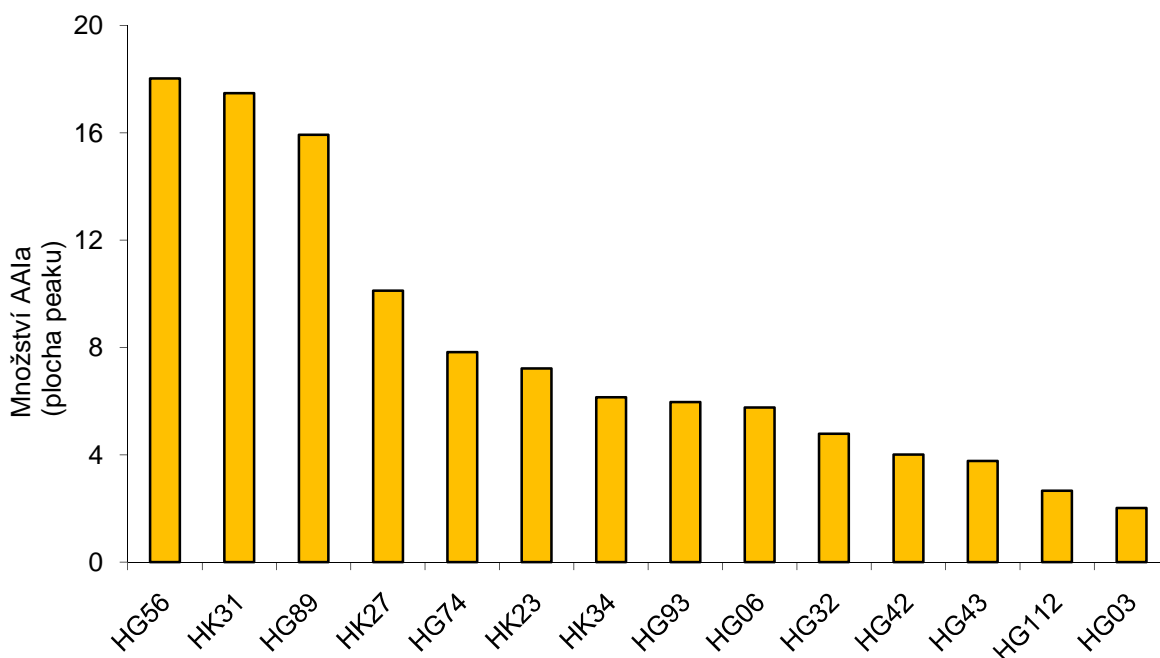
Při těchto experimentech byla použita AAI ve formě aristolochátu sodného a jaterní mikrosomy různých lidských jedinců. Získány byly z komerčního zdroje (*Gentest BD Bioscience, USA*). Kyselina aristolochová I je za daných podmínek eluována v retenčním čase 34,9 min. a její metabolit AAIa v retenčním čase 22,1 min. (**Obr. 16**).



Obr. 16: HPLC reakční směsi sledující oxidaci AAI lidskými jaterními mikrosomy (vzorek HK31); experimentální podmínky HPLC: mobilní fáze 80 % acetonitril a 100 mM TEAA (80% A a 20% B → 40% A a 60% B), průtok 0,5 ml/min, kolona C18 Macherey-Nagel, teplota 35°C, aplikováno 20 µl vzorku, detekce při 250 nm

Všechny použité lidské mikrosomy oxidovaly AAI na AAIA, avšak s rozdílnou efektivitou. Množství AAIA (plocha peaku AAIA) detekované po oxidaci jednotlivými lidskými jaterními mikrosomy je uvedeno v **Tab. 2** a **Obr. 17**.

Tabulka 2 udává celkové množství cytochromů P450 a aktivity jednotlivých cytochromů P450 v lidských jaterních mikrosomech. Většina těchto údajů byla převzata z protokolů firmy Gentest (*Gentest BD Bioscience, USA*), od které byly uvedené mikrosomy zakoupeny. Převzaty byly hodnoty aktivit enzymů CYP1A2, 2A6, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1, 3A4 a 4A.



Obr. 17: Oxidace AAI lidskými jaterními mikrosomy. Sloupce udávají množství vzniklé AAIA. Hodnoty jsou průměrem ze dvou stanovení. Složení inkubační směsi: 10 μ M AAI; 0,5 mg_{proteinu}/ml MS; NADPH-GS; fosfátový pufr pH 7,4

Tab. 2: Množství vzniklé AAIA a aktivity cytochromů P450 v lidských jaterních mikrosomech

Aktivita cytochromů P450 v lidských jaterních mikrosomech														
Lot. No.	Lidské jaterní mikrosomy	AAIA (plocha pod peakem)	Total P450 ^a (pmol/mg total protein)	1A1 ^b (oxidace Sudanu I v přítomnosti ketokonazolu)	1A2 ^a (O-deethylace phenacetinu)	2A6 ^a (7-hydroxylace kumarinu)	2B6 ^a (N-demethylace (S)-mefenytinu)	2C8 ^a (6 α -hydroxylace paclitaxelu)	2C9 ^a (4'-hydroxylace diclofenacu)	2C19 ^a (4'-hydroxylace (S)-mefenytinu)	2D6 ^a (1'-hydroxylace bufuralolu)	2E1 ^a (6-hydroxylace chloroxazonu)	3A4 ^a (6 β -hydroxylace testosteronu)	4A ^a (12-hydroxylace laurové kyseliny)
2	HG93	5,959	290	73	750	340	25	180	2100	41	56	1800	2400	1600
3	HG03	2,021	290	62	170	2000	51	200	1700	44	110	1800	6100	1600
34805	HG74	7,827	220	77	520	360	13	130	2100	55	120	1400	2700	1300
2	HG06	5,759	296	57	770	580	3,1	130	2650	36	n.d.	1200	2990	740
1	HK27	10,111	300	104	1320	1320	31	180	480	460	130	3000	4910	1110
3	HG42	4,010	670	61	700	2200	150	480	1600	7,4	95	1600	15000	1400
3	HG112	2,660	560	33	320	490	150	180	4000	380	32	2400	25000	1800
3	HG56	18,030	550	200	2400	1500	48	180	3100	480	120	1900	5300	3000
2	HG43	3,767	270	81	630	850	34	60	1400	700	20	1100	5600	2100
2	HG89	15,921	400	106	1500	650	60	160	2100	190	13	1700	12000	2200
1	HG32	4,780	170	83	730	520	0,68	20	450	4,8	46	1200	2000	680
1	HK31	17,474	580	165	1220	2160	8,1	130	1690	172	3,4	1660	8210	2010
1	HK23	7,217	380	109	960	1100	24	160	2100	110	140	2100	6800	780
1	HK34	6,148	500	109	1000	1500	39	220	1900	45	100	6000	5200	1100

Všechny presentované výsledky byly prováděny v „dubletním“ uspořádání.

^a určeno firmou Gentest

^b určena metodou popsanou v kapitole 3

4.2 Určení cytochromů P450 oxidujících aristolochovou kyselinu I na aristolochovou kyselinu Ia v lidských jaterních mikrosomech

K určení cytochromů P450, které participují na oxidaci AAI na jeho demetylační metabolit AAIA, byla užita korelační analýza. Do vztahu byly dávány aktivity (eventuelně expresní hladiny) jednotlivých cytochromů P450 ve vzorcích jaterních mikrosomů různých lidských jedinců s efektivitou těchto mikrosomů oxidovat AAI na AAIA.

4.2.1 Stanovení aktivity cytochromu P450 v lidských jaterních mikrosomech

Vzhledem k tomu, že v lidských jaterních mikrosomech nebyla v laboratořích firmy Gentest (*Gentest BD Bioscience, USA*) určena aktivita CYP1A1, provedli jsme její stanovení.

Jako vhodný „markerový“ substrát lidského CYP1A1 byl zjištěn 1-fenylazo-2-naftol (Sudan I).⁸⁴ Vedle CYP1A1 je Sudan I oxidován také CYP3A4, i když pouze s desetiprocentní účinností. Nicméně, jeho podíl na oxidaci Sudanu I vzhledem k jeho vysoké expresi v lidských játrech (cca 30% CYP3A4)⁸⁶ může být vysoký. Z tohoto důvodu byla v našich experimentech oxidace Sudanu I CYP3A4 inhibována ketokonazolem (jeho silným selektivním inhibitorem).^{83,84}

Pomocí metody HPLC (pracovní postup je u uveden v **kapitole 3.3.2.1**) byly separovány jednotlivé metabolity Sudanu I a jejich vzniklá množství: tvořeny byly 1-fenylazo-naftalen-2, 6-diol (6-OH-Sudan I), 1,1-(4'-hydroxyfenyl)azo-naftalen-2, 6-diol (4',6-di(OH)-Sudan I) a 1-(4'-hydroxyfenyl)azo-2-naftol (4'-OH-Sudan I). Sumarisací těchto hodnot pak byla určena celková aktivita lidského CYP1A1 v jednotlivých jaterních mikrosomech (**Tab. 2, 3**).

Tab. 3: Množství metabolitů Sudanu I a aktivita CYP1A1 v jednotlivých lidských jaterních mikrosomech

Lot. No.	Lidské jaterní mikrosomy	Množství metabolitů Sudanu I			aktivita CYP1A1 ^b
		4',6-di(OH) ^a	6-OH ^a	4'-OH ^a	
2	HG93	n.d.	0,3051	0,79535	73
3	HG03	n.d.	0,428	0,4865	62
34805	HG74	n.d.	0,3772	0,8276	77
2	HG06	n.d.	0,2988	0,6248	57
1	HK27	n.d.	0,49245	1,0605	104
3	HG42	n.d.	0,40865	0,5041	61
3	HG112	n.d.	0,1949	0,3065	33
3	HG56	0,13355	0,7292	2,0091	200
2	HG43	0,0507	0,3714	0,7803	81
2	HG89	0,06915	0,4098	1,1104	106
1	HG32	0,0654	0,4341	0,7293	83
1	HK31	0,11155	0,68685	1,68215	165
1	HK23	0,08105	0,3586	1,0847	109
1	HK34	0,0776	0,6496	0,8785	109

^a koncentrace metabolitů v μM

^b aktivita udána v $\text{pmol}/\text{min.}/\text{mg}_{\text{proteinu}}$

4.2.2 Cytochromy P450 1A1 a 1A2 jsou enzymy oxidující AAI na AAIA v lidských jaterních mikrosomech

Korelační koeficienty získané lineární korelací aktivit jednotlivých cytochromů P450 a množství oxidovaného produktu AAI, aristolochové kyseliny Ia, jednotlivých jaterních mikrosomů 14 lidských jedinců jsou uvedeny v **Tab. 4** a **Obr. 18-19**.

Z hodnot těchto korelačních koeficientů (s hladinou významnosti *P*, **Tab. 4**) je patrné, že v lidských jaterních mikrosomech oxidují především cytochromy P450 1A1 a 1A2. Tyto výsledky plně odpovídají výsledkům získaným v dřívějších studiích využívajících lidské rekombinantní cytochromy P450.^{43,81} CYP1A1 byl nejefektivnějším enzymem oxidujícím AAI na AAIA, CYP1A2 byl pak více než dvakrát méně efektivní než CYP1A1 (**Obr. 15**).^{43,81} Ze studií s rekombinantními cytochromy P450 vyplývá, že dalšími enzymy, které AAI oxidují, jsou rovněž CYP2C9, 2C8 a event. CYP3A4. Tyto enzymy jsou však více než desetinásobně méně aktivní než CYP1A1.^{43,81} Zdá se, že také v lidských játrech je jejich příspěvek k oxidaci AAI na AAIA minimální. Tato skutečnost vyplývá z korelačních analys provedených v předkládané bakalářské práci.

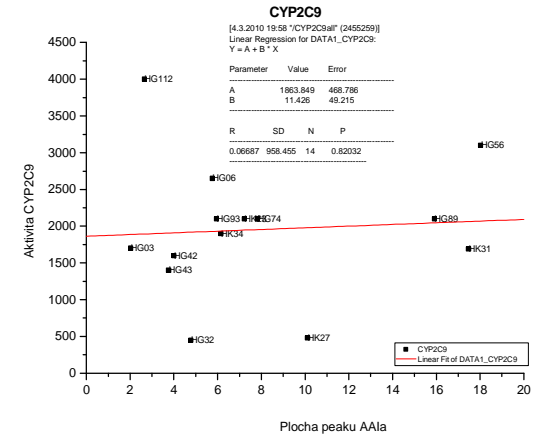
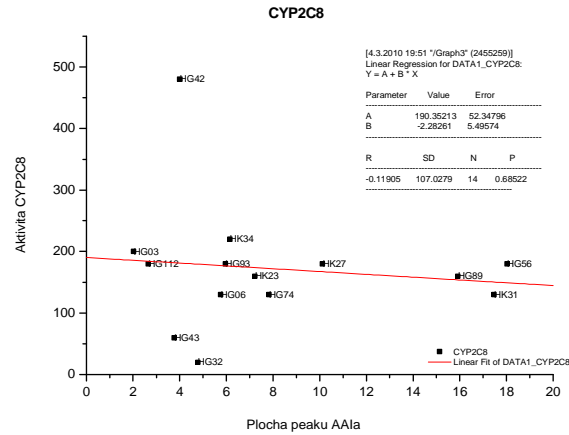
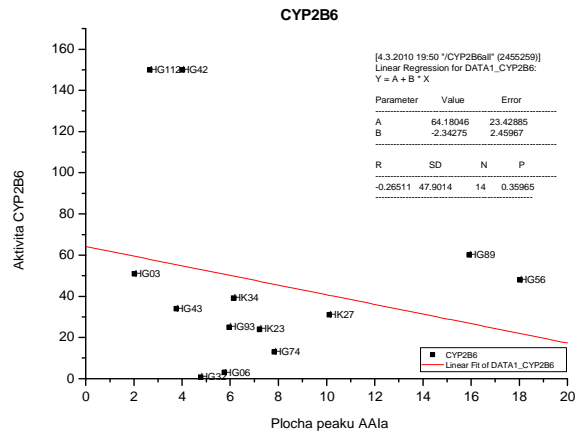
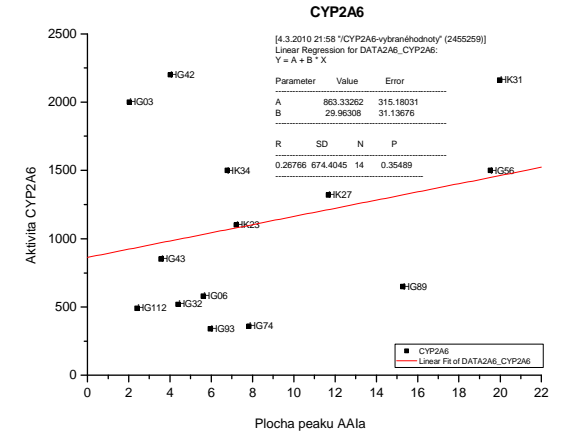
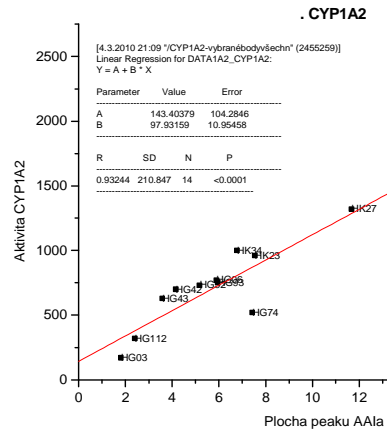
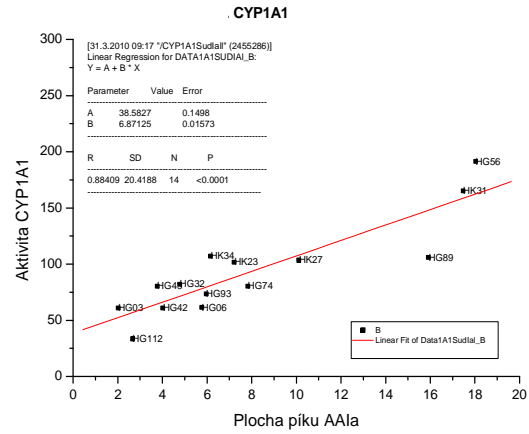
Získané výsledky však bude nutné ještě potvrdit dalšími experimenty. Využití selektivních inhibitorů cytochromů P450 je jedním z dalších plánovaných experimentů, které získané výsledky mohou dále rozšířit a potvrdit.

Tab. 4: Korelační koeficienty získané provedením korelační analýzy mezi aktivitou jednotlivých cytochromů P450 a množstvím vzniklé AAIA

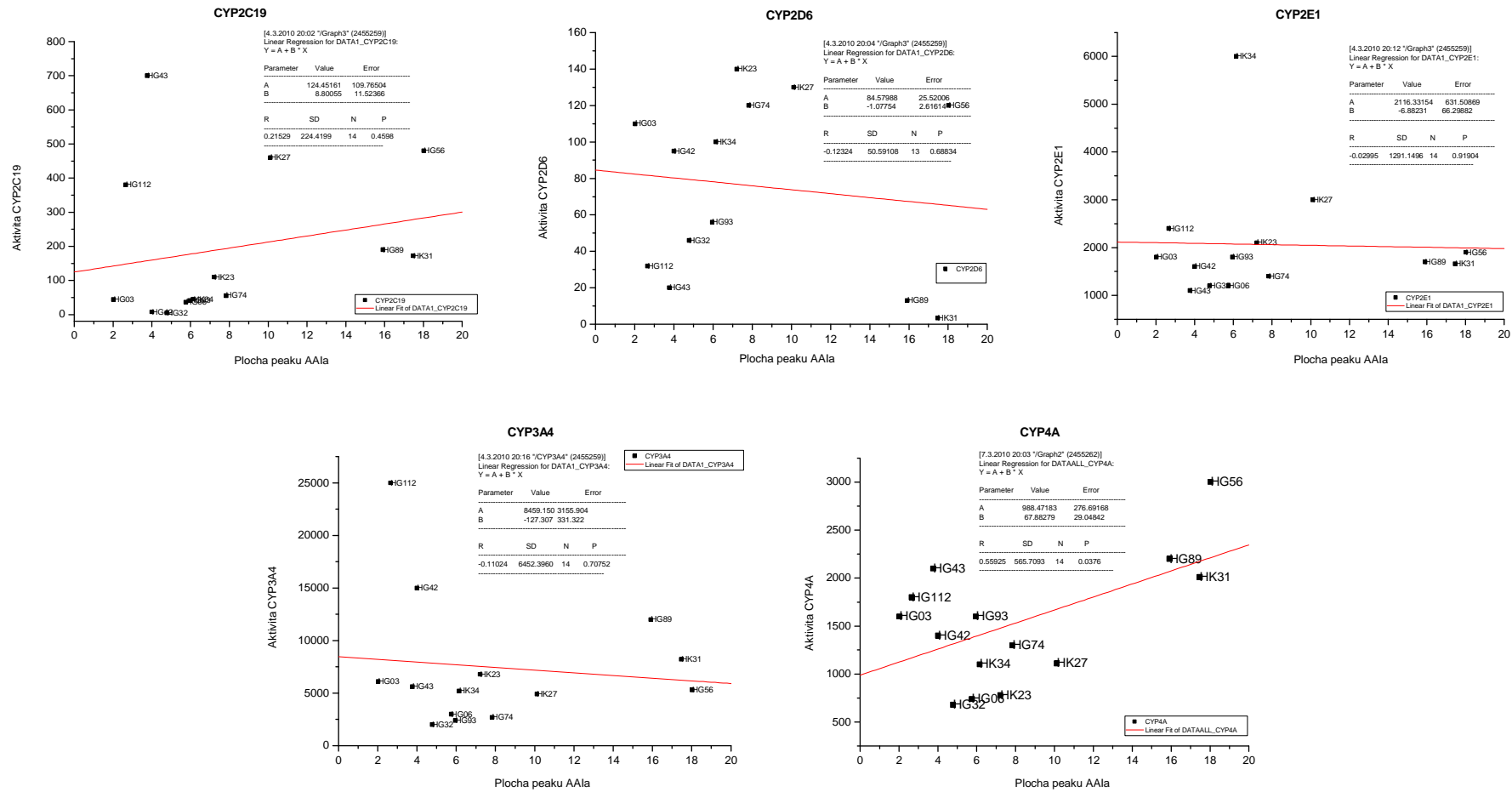
	Total P450^a (pmol/mg total protein)	1A1^b (oxidace Sudanu I v přítomnosti ketokonazolu)	1A2^a (<i>O</i> -deethylace phenacetinu)	2A6^a (7-hydroxylace kumarinu)	2B6^a (<i>N</i> -demethylace (<i>S</i>)-mefenytoinu)	2C8^a (6 α -hydroxylace paclitaxelu)	2C9^a (4'-hydroxylace diclofenacu)	2C19^a (4'-hydroxylace (<i>S</i>)-mefenytoinu)	2D6^a (1'-hydroxylace bufuralolu)	2E1^a (6-hydroxylace chloroxazonu)	3A4^a (6 β -hydroxylace testosteronu)	4A^a (12-hydroxylace laurové kyseliny)
Korelační koeficient	0,307	0,884	0,932	0,268	-0,265	-0,119	0,067	0,215	-0,123	-0,03	-0,11	0,307
Hladina významnosti	0,285	< 0,0001	< 0,0001	0,355	0,36	0,685	0,82	0,46	0,688	0,919	0,707	0,285

^a určeno firmou Gentest, aktivita v pmol/min./mg_{proteinu}

^b určena metodou popsanou v kapitole 3, aktivita udána v pmol/min./mg_{proteinu}



Obr. 18: Korelace aktivity CYP1A1, 1A2, 2A6, 2B6, 2C8 a 2C9 a množství AA1a (plochy peaku AA1a)



Obr. 19: Korelace aktivity CYP2C19, 2D6, 2E1, 3A4 a 4A a množství AAIa (plochy peaku AAIa)

5. ZÁVĚR

Cíle vytyčené v předkládané bakalářské práci byly splněny:

- ✓ Bakalářská práce je přehledem informací o rostlinných alkaloidech aristolochových kyselinách, s nimi spojené chorobě, nefropatii vyvolané aristolochovými kyselinami, a o enzimech podílející se na biotransformaci těchto látek.
- ✓ Z korelačních analys mezi aktivitou jednotlivých cytochromů P450 v lidských jaterních mikrosomech a množstvím oxidačního produktu AAI, aristolochové kyseliny Ia, bylo určeno, že s největší efektivitou se v lidských jaterních mikrosomech na detoxikaci aristolochové kyseliny I podílí cytochromy P450 1A1 a 1A2.

Získané výsledky přispívají k poznání detoxikace rostlinných alkaloidů aristolochových kyselin a s nimi spojených onemocnění AAN a BEN. Budou využity při dalším studiu funkcí enzymů metabolisujících aristolochové kyseliny ve vývoji těchto chorob.

Seznam použité literatury

- (1) Hussain, S.P., Harris C.C.: *Cancer Res.* 58, 4023 (1998) dle Stratil, P., Kubáň, V.: *Chem. Listy* 98, 379-384 (2004)
- (2) Stratil, P., Kubáň, V.: *Chem. Listy* 98, 379-384 (2004)
- (3) Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walther, P.: *Základy buněčné biologie* (překlad z angl. originálu *Essential Cell Biology*), Espero Publishing, Ústí nad Labem (1998)
- (4) Stiborová, M.: *Biochemie jako teoretický základ biomedicíny*, přednáška na PĚF UK, katedra biochemie, Praha (2010)
- (5) Voet, D., Voet, J.G.: *Biochemistry* (3th Edition), John Wiley & Sons, Inc. (2004)
- (6) Stiborová, M., Mikšanová, M.: *Živa* 4, 146 (1999)
- (7) Novák, J., Skalický, M.: *Botanika: Cytologie, histologie, organologie a systematika*, Powerprint, Praha (2009)
- (8) <http://en.wikipedia.org/wiki/Aristolochia> (přístup 27.3. 2010)
- (9) Carter, D.: *Motýli* (překlad z angl. originálu *Butterflies and Moths*), Osveta, Martin (1998)
- (10) International Agency for Research on Cancer, *Sometraditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene, IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum.* 82 (2002)
- (11) Debelle, F.D., Vanherweghem, J-L., Nortier, J.L.: *Kidney Int.* 74, 158-169 (2008)
- (12) Schmeiser, H.H., Stiborová, M., Arlt, V.M.: *Curr. Opin. Drug Discov. Dev.* 12, 141-148 (2009)
- (13) Heinrich, M., Chan, J., Wanke, S., Neinhuis, C., Simmonds, M.S.J.: *J. Ethnopharm.* 125, 108-144 (2009)
- (14) Kumar, V., Ponam, D., Prasad, A.K., Parmar, V.S.: *Nat. Prod. Rep.* 20, 565-583 (2003)
- (15) Möse, J.R.: *Drug Res.* 16, 118-122 (1966) dle Stiborová, M., Frei, E., Arlt, V.M., Schmeiser, H.H.: *Mutat. Res.* 658, 55-67 (2008)
- (16) Möse, J.R.: *Drug Res.* 24, 151-153 (1974) dle Stiborová, M., Frei, E., Arlt, V.M., Schmeiser, H.H.: *Mutat. Res.* 658, 55-67 (2008)

- (17) Kluthe, R., Vogt, A., Batsford, S.: *Drug Res.* 32, 443–445 (1982) dle Stiborová, M., Frei, E., Arlt, V.M., Schmeiser, H.H.: *Mutat. Res.* 658, 55-67 (2008)
- (18) Mengs, U., Lang, W., Poch, J.A.: *Arch. Toxicol.* 107, 107–119 (1982) dle Stiborová, M., Frei, E., Arlt, V.M., Schmeiser, H.H.: *Mutat. Res.* 658, 55-67 (2008)
- (19) Mengs, U.: *Arch. Toxicol.* 52, 209–220.(1983) dle Stiborová, M., Frei, E., Arlt, V.M., Schmeiser, H.H.: *Mutat. Res.* 658, 55-67 (2008)
- (20) Robisch, G., Schimmer, O., Göggelmann, W.: *Mutat. Res.* 105, 201–204 (1982) dle Stiborová, M., Frei, E., Arlt, V.M., Schmeiser, H.H.: *Mutat. Res.* 658, 55-67 (2008)
- (21) Abel, G., Schimmer, O.: *Hum. Genet.* 64, 131–133 (1983) dle Stiborová, M., Frei, E., Arlt, V.M., Schmeiser, H.H.: *Mutat. Res.* 658, 55-67 (2008)
- (22) Pezutto, J.M., Swanson, S.M., Woongchon, M., Che, C., Cordell, G.A. Fong, H.H.S.: *Mutat. Res.* 206, 447–454 (1988) dle Stiborová, M., Frei, E., Arlt, V.M., Schmeiser, H.H.: *Mutat. Res.* 658, 55-67 (2008)
- (23) Mengs, U.: *Arch. Toxicol.* 59, 328–331 (1987) dle Stiborová, M., Frei, E., Arlt, V.M., Schmeiser, H.H.: *Mutat. Res.* 658, 55-67 (2008)
- (24) Mengs, U.: *Arch. Toxicol.* 61, 504–505 (1988) dle Stiborová, M., Frei, E., Arlt, V.M., Schmeiser, H.H.: *Mutat. Res.* 658, 55-67 (2008)
- (25) Reynolds, K.F.F. (Ed.): *Martindale, The Extra Pharmacopeia*, Pharmaceutical Press, London, p.130 (1986) dle Stiborová, M., Frei, E., Arlt, V.M., Schmeiser, H.H.: *Mutat. Res.* 658, 55-67 (2008)
- (26) Gold L.S., Slone, T.H.: *N. Engl. J. Med.* 349, 1576-1577 (2003) dle Debelle, F.D., Vanherweghem, J-L., Nortier, J.L.: *Kidney Int.* 74, 158-169 (2008)
- (27) Arlt, V.M., Stiborová, M., Schmeiser, H.H.: *Mutagenesis* 17, 265-277, (2002)
- (28) Cosyns J-P.: *Drug Safety* 26, 33-48 (2003)
- (29) Vokurka, M., Hugo, J. a kolektiv: *Praktický slovník medicíny*, Maxdorf: Praha, (2007)
- (30) Vanherweghem, J-L., Depierreux, M., Tielemans, C., Abramowicz, D., Dratwa, M., Jadoul, M., Richard, C., Vandervelde, D., Verbeelen, D., Vanhaelen-Fastre, R., Vanhaelen, M.: *Lancet* 341, 387-391 (1993)
- (31) Vanherweghem, J-L.: *J. Altern. Complement. Med.* 4, 9-13 (1998)
- (32) Vanherweghem, J-L., Cuykens, J.J., Vandenberg, P.H., Bouman, K.P., Hagers, Y.: *Lancet* 351, 991 (1998)
- (33) Vanherweghem, J-L.: *Lancet* 350, 1858 (1997)

- (34) Unger, P., Nortier, J., Muniz Martinez, M.C., Plein, D., Vandenbossche, J-L., Vereerstraetenand, P. Vanherweghem, J-L.: *Nephrol. Dial. Transplant.* 18, 906-910 (2003)
- (35) Vanhaelen, M., Vanhaelen-Fastre, R., But,P., Vanherweghem, J-L.: *Lancet* 343,174 (1994)
- (36) Bieler, C.A., Stiborová, M., Wiessler, M., Cosyns, J-P., van Ypersele de Strihou, C., Schmeiser, H.H.: *Carcinogenesis* 18, 1063-1067 (1997)
- (37) Schmeiser, H.H., Bieler, C.A., Wiessler, M.; Ypersele de Strihou, C., Cosyns, J-P.: *Cancer Res.* 56, 2025-2028 (1996)
- (38) Nortier, J.L., Schmeiser, H.H., Muniz Martinez, M-C.,Arlt, V.M., Varvaet,.C., Garbar, C.H., Daelemans, P., Vanherweghem, J-L.: *Nephrol. Dial. Transplant.* 18, 426-428 (2003)
- (39) Nortier, J.L., Muniz Martinez, M-C., Schmeiser, H.H., Arlt, V.M., Bieler, C.A., Petein, M., Depierreux, M.F., De Pauw, L., Abramowicz, D., Vereerstraeten, P., Vanherweghem, J-L.: *N. Engl. J. Med.* 342, 1686-1682 (2000)
- (40) Yang, H-Y., Wang, J-D., Lo, T-C., Chen, P-C.: *J. Epidemiol* 19, 17-23 (2009)
- (41) Schmeiser, H.H., Schoepke, K-B., Wiessler, M.: *Carcinogenesis* 9, 297-303 (1988) dle Arlt, V.M., Stiborová, M., Schmeiser, H.H.: *Mutagenesis* 17, 265-277, (2002)
- (42) Stiborová, M., Fernando, R.C., Schmeiser, H.H., Frei, E., Pfau, W., Wiessler, M.: *Carcinogenesis* 15, 1187-1192 (1994) dle Arlt, V.M., Stiborová, M., Schmeiser, H.H.: *Mutagenesis* 17, 265-277, (2002)
- (43) Stiborová, M., Frei, E., Arlt, V.M., Schmeiser, H.H.: *Mutat. Res.* 658, 55-67 (2008)
- (44) Schmeiser, H.H., Frei, E., Wiessler, M., Stiborová, M.: *Carcinogenesis* 18, 1055-1062 (1997)
- (45) Arlt, V.M., Wiessler, M., Schmeiser, H.H.: *Carcinogenesis* 21, 235-242 (2000)
- (46) Schmeiser, H.H., Janssen, J.W.G, Lyons, J., Scherf, H.R., Pfau, W., Buchmann, A., Bartram, C.R., Wiessler, W.: *Cancer Res.* 50, 5464-5469 (1990)
- (47) Arlt, V.M., Schmeiser, H.H., Pfeifer, G.P.: *Carcinogenesis* 22, 133-140 (2001)
- (48) Stiborová, M., Frei, E., Schmeiser,H.H.: *Chem. Listy* 94, 186-189 (2000)
- (49) Arlt, V.M., Stiborová, M., vom Brocke, J., Simoões, M.L., Lord, G.M.,Nortier, J.L., Hollstein, M., Phillips, D.H., Schmeiser, H.H.: *Carcinogenesis* 28, 2253-2261 (2007)

- (50) Luo, J-L., Yang, Q., Tong, W-M., Hergenahn, M., Wang, Z-Q., Hollstein, M.: *Oncogene* 20, 320-328 (2001)
- (51) World Health Organisation: Memorandum: *The Endemic Nephropathy of South-Eastern Europe*, Geneva, 431-448 (1965)
- (52) Stiborová, M., Patočka, J., Frei, E., Schmeiser, H.H.: *Chem. Listy* 99, 782-788 (2005)
- (53) Pfohl-Leszkowicz, A., Petkova-Bocharova, T., Chernozemsky, I. N., Castegnaro, M.: *Food Additiv. Contamin.* 19, 282-302 (2002)
- (54) Ikononov, V., Melzer, H., Neonov, V., Stoicheva A., Stiller, S., Mann, H.: *Artif. Organs* 23, 75-80 (1999).
- (55) Stefanović, V., Polenaković, M.: *Nephron. Clin. Pract.* 112, c51-c56 (2009)
- (56) Bamias, G., Boletis, J.: *Am. J. Kidney Dis.* 52, 606-616 (2008)
- (57) Grosse, Y., Baudrimont, I., Castegnaro, M., Betbeder, A-M., Ekué Creppy, E., Dirheimer, G., Pfohl-Leszkowicz, A.: *Chem-Biol. Interact.* 95, 175-187 (1995)
- (58) Pfohl-Leszkowicz, A., Manderville R.A.: *Mol. Nutr. Food Res.* 51, 61-99 (2007) dle Grollman, A.P., Jelaković, B.: *J. Am. Soc. Nephrol.* 18, 2817-2823 (2007)
- (59) Clark, H.A., Snedeker, S.M.: *J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.* 9, 265-296 (2006)
- (60) Arlt, V., Ferluga D., Stiborová, M., Pfohl-Leszkowicz, A., Vukelic, M., Ceovic, S., Schmeiser, H.H., Cosyns, J-P.: *Int. J. Cancer* 101, 500-502 (2002)
- (61) Mally, A., Zepnik, H., Wanek, P., Eder, E., Dingley, K., Ihmels, H., Volkel, W., Dekant, W.: *Chem. Res. Toxicol.* 17, 234-242 (2004) dle Grollman, A.P., Jelaković, B.: *J. Am. Soc. Nephrol.* 18, 2817-2823 (2007)
- (62) Gautier, J-C., Richoz, J., Welti, D.H., Marković, J., Gremaud, E., Guengerich, F.P., Turesky, R.J.: *Chem. Res. Toxicol.* 14, 34-45 (2001) dle Grollman, A.P., Jelaković, B.: *J. Am. Soc. Nephrol.* 18, 2817-2823 (2007)
- (63) Turesky, R.J.: *Chem. Res. Toxicol.* 18, 1082-1090 (2005) dle Grollman, A.P., Jelaković, B.: *J. Am. Soc. Nephrol.* 18, 2817-2823 (2007)
- (64) Grollman, A.P., Jelaković, B.: *J. Am. Soc. Nephrol.* 18, 2817-2823 (2007)
- (65) Ivić, M.: *Lijec Vjes* 91, 1278-1281 (1969) dle Stefanović, V., Polenaković, M.: *Nephron. Clin. Pract.* 112, c51-c56 (2009)
- (66) Grollman, A.P., Shibutani, S., Moriya, M., Miller, F., Wu, L., Moll, U., Suzuki, N., Fernandes, A., Rosenquist, T., Medverec, Z., Jakovina, K., Brdar, B., Slade, N.,

- Turesky, R., Goodenough, A.K., Vukelić, M., Jelaković, B.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 12129-12134 (2007)
- (67) Toncheva, D., Dimitrov, T., Stoyanova, S.: *Eur. J. Epidemiol.* 14, 389-394 (1998)
- (68) Knejzlík, Z., Káš, J., Ruml, T.: *Chem. Listy* 94, 913-918 (2000)
- (69) Chromá, L., Macková, M., Macek, T., Martínek, V., Stiborová, M.: *Chem. Listy* 95, 212-222 (2001)
- (70) Stiborová, M., *Chem. Listy* 96, 784-791 (2002)
- (71) Stiborová, M.: *Xenobiochemie*, přednáška na PřF UK, katedra biochemie, Praha (2010)
- (72) Krumbiegel, G., Hallensleben, J., Mennicke, W.H., Rittmann, N.: *Xenobiotica* 17, 981-991 (1987) dle Arlt, V.M., Stiborová, M., Schmeiser, H.H.: *Mutagenesis* 17, 265-277, (2002)
- (73) Schmeiser, H.H., Pool, B.L., Wiessler, M.: *Carcinogenesis* 7, 59-63 (1986) dle Stiborová, M., Frei, E., Arlt, V.M., Schmeiser, H.H.: *Mutat. Res.* 658, 55-67 (2008)
- (74) Chan, W., Cu, L., Xu, G., Cai, Z.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 20, 171-177 (2006)
- (75) Maier, P., Schawalder, H., Weibel, B.: *Environ. Mol. Mutagen.* 10, 275-284 (1987) dle Stiborová, M., Frei, E., Arlt, V.M., Schmeiser, H.H.: *Mutat. Res.* 658, 55-67 (2008)
- (76) Chan, W., Luo, H-B., Zheng, Y., Cheng, Y-K., Cai, Z.: *Drug Metab. Dispos.* 35, 866-874 (2007)
- (77) Stiborová, M., Frei, E., Arlt, V.M., Schmeiser, H.H.: *Biomed Pap* 153, 5-12, (2009)
- (78) Stiborová, M., Frei, E., Hodek, P., Wiessler, M., Schmeiser, H.H.: *Int. J. Cancer* 113, 189-197 (2005)
- (79) Stiborová, M., Frei, E., Sopko, B., Sopková, K., Marková, V., Laňková, M., Kumstýřová, T., Wiessler, M., Schmeiser, H.H.: *Carcinogenesis* 24, 1695-1703 (2003)
- (80) Stiborová, M., Frei, E., Schmeiser, H.H.: *Kidney Int.* 73, 1209-1211 (2008)
- (81) Šístková, J., Hudeček, J., Hodek, P., Frei, E., Schmeiser, H.H., Stiborová, M.: *Neuroendocrinol. Lett.* 29, 733-731 (2008)
- (82) Levová, K.: *Diplomová práce*, PřF UK Praha, katedra biochemie (2009)
- (83) Stiborová, M., Martínek, V., Rýdlová, H., Koblas, T., Hodek, P.: *Cancer Lett.* 220, 145-154 (2005)

- (84) Stiborová, M., Martínek, V., Rýdlová, H., Hodek, P., Frei, E.: *Cancer Res.* 62, 5678-5684 (2002)
- (85) Burda, P.: *Diplomová práce* (2006), PřF UK Praha, katedra biochemie dle Levová, K.: *Diplomová práce*, PřF UK, katedra biochemie, Praha (2009)
- (86) Rendić, S., Di Carlo, F.J.: *Drug Metab. Rev.* 29, 413-580 (1997)

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovateli.

Jméno a příjmení s adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka