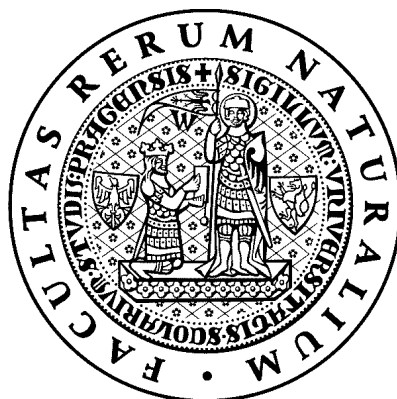


UNIVERSITA KARLOVA V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA BIOCHEMIE



**Mechanismus karcinogenity a nefrotoxicity
aristolochových kyselin**

**Mechanism of carcinogenicity and nephrotoxicity
of aristolochic acids**

Diplomová práce

František Bárta

Školitelka: prof. RNDr. Marie Stiborová, DrSc.

PRAHA 2012

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

V Praze dne

František Bárta

Na tomto místě bych rád poděkoval paní prof. RNDr. Marii Stiborové, DrSc., za vynikající a ukázkové vedení při vypracování diplomové práce, odborné rady a entusiasmus, kterým sršela po celou dobu naší spolupráce.

Velký dík patří též RNDr. Kateřině Levové, která měla tu trpělivost zodpovídat mé dotazy a naučila mne základní laboratorní techniky, bez nichž by nebylo lze tuto práci napsat. Za provedení hmotnostní analýsy děkuji doc. RNDr. Miroslavu Šulcovi, Ph.D.

V neposlední řadě, děkuji všem kolegyním a kolegům z laboratoře 221 a 219 za vytvoření velice příjemné a přátelské atmosféry.

Práce byla vypracována jako součást řešení grantů GAČR (301/09/0472) a projektu financovaného MŠMT ČR (UNCE 204025/2012).

ABSTRAKT

Aristolochové kyseliny (AA) jsou lidskými karcinogeny, které rovněž vykazují silné nefrotoxické vlastnosti. Směs AA je obsažena v rostlinách čeledi podražcovitých (*Aristolochiaceae*), které byly a nadále jsou užívány v tradiční medicíně, zejména v Asii. Aristolochové kyseliny se podílí na vzniku dvou typů nefropatií. Jedna z nich dokonce nese označení nefropatie vyvolaná aristolochovou kyselinou (*Aristolochic Acid Nephropathy, AAN*). Druhým onemocněním je balkánská endemická nefropatie (*Balkan Endemic Nephropathy, BEN*). Obě onemocnění jsou doprovázena malignacemi v urotheliální tkáni, které jsou vyvolány karcinogenním působením AA. Zvláštním znakem AAN a BEN je skutečnost, že ne všichni pacienti vystavení působení AA byli postiženi nefropatií a vývojem nádorového onemocnění. Jednou z příčin této skutečnosti mohou být rozdíly v aktivitách a expresních hladinách enzymů biotransformujících AAI, hlavní toxickou složku obsaženou v rostlinném extraktu. Detailní poznání enzymů podílejících se na metabolismu AAI může přispět k objasnění interindividuální vnímavosti vůči AAN, BEN a malignacím. Aristolochová kyselina I je v organismu buď oxidačně detoxifikována anebo redukčně aktivována. Redukční bioaktivace AAI vede ke tvorbě kovalentních aduktů AA s DNA, které resultují ve vznik unikátní transversní mutace AT→TA v tumorovém supresorovém genu *p53*. Oxidační detoxifikace vede k tvorbě 8-hydroxyaristolochové kyseliny I (AAIa), která představuje hlavní detoxifikační metabolit AAI. V předkládané diplomové práci byla studována participace cytochromů P450 (CYP) jak na bioaktivaci, tak i na detoxifikaci AAI potkaními a myšími jaterními systémy oxidas se smíšenou funkcí. K identifikaci cytochromů P450, které se podílí na metabolismu AAI, byly užity induktory a inhibitory CYP, rekombinantní potkaní cytochromy P450 a též speciální transgenní myší modely. Sledován byl také vliv cytochromu b_5 na detoxifikaci a aktivaci AAI. Tento protein je fakultativní složkou systému oxidas se smíšenou funkcí a může ovlivňovat aktivity cytochromů P450. Výsledky v předkládané diplomové práci potvrzují majoritní roli CYP1A1 a 1A2 v detoxifikaci AAI jak *in vitro*, tak i *in vivo*. Vedle oxidační detoxifikace se CYP1A1/2 za anaerobních podmínek podílí též na redukční aktivaci AAI, která vede ke vzniku reaktivního *N*-acylnitreniového iontu a následně k transversní mutaci AT→TA v genu *p53*.

ABSTRACT

Aristolochic acids (AA) are human carcinogens which have also very strong nephrotoxic properties. A mixture of AA is present in *Aristolochiaceae* plant species. These plants were and still are used in traditional medicine in some countries, particularly in Asia. Aristolochic acids participate in development of two types of nephropathies. The first disease is designated as Aristolochic Acid Nephropathy (AAN), the second one is Balkan Endemic Nephropathy (BEN). Both nephropathies are associated with urothelial malignancies, which are caused by AA. One of the common features of ANN and BEN is that not all individuals exposed to AA suffer from nephropathy and tumour development. One cause for these different responses may be individual differences in the activities and expression levels of the enzymes catalyzing the biotransformation of AAI, the major toxic component of AA contained in *Aristolochia* species. Detailed knowledge of enzymes which participate in metabolism of AAI may contribute to elucidation of inter-individual susceptibility to AAN, BEN and later urothelial malignancies. Aristolochic acid I is either oxidative detoxicated or reductive activated by biotransformation enzymes. Reductive bioactivation of AAI leads to formation of covalent AA-DNA adducts in organism which result in producing of unique AT→TA transversion in tumour suppressor gene *p53*. Oxidative detoxification of AAI leads to formation of a demethylated product, 8-hydroxyaristolochic acid I (AAIa). In this thesis, we investigated cytochromes P450 (CYP)-mediated reductive activation and oxidative detoxication of AAI in a rat and mouse model. Inducers and inhibitors of CYP enzymes, rat recombinant cytochromes P450 and special transgenic mouse models we used to identify which CYP enzymes are involved in metabolism of AAI. The effect of cytochrome b_5 on detoxication and activation of AAI was also studied. This protein is facultative component of a mixed function oxidase system and may influence activity of some CYP enzymes. Results found in this work demonstrate a major role CYP1A1 and 1A2 in detoxification of AAI *in vitro* and *in vivo*. CYP1A1/2 also contribute to reductive bioactivation of AAI which leads to formation of very reactive *N*-acylnitrenium ion and AT→TA transversion in *p53* gene.

(In Czech)

OBSAH

ABSTRAKT	- 4 -
ABSTRACT.....	- 5 -
OBSAH.....	- 6 -
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	- 8 -
1. ÚVOD.....	- 11 -
1.1 KARCINOGENESE.....	- 11 -
1.1.1 Klinické aspekty karcinogenese.....	- 12 -
1.1.2 Onkogeny a tumorové supresorové geny	- 14 -
1.1.2.1 Protoonkogeny a onkogeny	- 14 -
1.1.2.2 Tumorové supresorové geny	- 16 -
1.1.3 Příčiny vývoje nádorových onemocnění	- 17 -
1.1.3.1 Chemická karcinogenese.....	- 19 -
1.2 NITROAROMATICKÉ SLOUČENINY	- 20 -
1.2.1 Mutagenní působení nitroaromátů	- 21 -
1.3 ARISTOLOCHOVÁ KYSELINA	- 22 -
1.3.1 Rostlinná čeleď <i>Aristolochiaceae</i>	- 22 -
1.3.2 Tradiční asijská medicína.....	- 24 -
1.3.3 Aristolochové kyseliny.....	- 25 -
1.3.4 Pathogenese vyvolaná aristolochovou kyselinou.....	- 26 -
1.3.4.1 Nefropatie vyvolaná aristolochovou kyselinou.....	- 27 -
1.3.4.2 Balkánská endemická nefropatie.....	- 29 -
1.3.4.3 Urotheliální karcinom	- 31 -
1.3.5 Biotransformace aristolochových kyselin	- 35 -
1.3.5.1 Aktivace aristolochových kyselin v organismu.....	- 35 -
1.3.5.2 Oxidační detoxifikace aristolochových kyselin	- 37 -
1.4 CYTOCHROMY P450.....	- 38 -
1.4.1 Lidské cytochromy P450 1A.....	- 41 -
2. CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE.....	- 42 -
3. MATERIÁL A METODY	- 43 -
3.1 POUŽITÝ MATERIÁL A CHEMIKÁLIE.....	- 43 -
3.2 PŘÍSTROJE	- 44 -
3.3 METODY	- 45 -
3.3.1 Isolace jaterních potkaních mikrosomů.....	- 45 -
3.3.2 Isolace králičího jaterního cytochromu b ₅	- 46 -

3.3.3 Geneticky modifikované myší modely	- 46 -
3.3.4 Isolace jaterní mikrosomální frakce z transgenních myších modelů	- 46 -
3.3.5 Oxidace AAI cytochromy P450 v potkaních jaterních mikrosomech.....	- 47 -
3.3.5.1 Vysokotlaká kapalinová chromatografie (HPLC).....	- 48 -
3.3.6 Identifikace AAIA.....	- 49 -
3.3.7 Inhibice oxidace AAI v potkaních jaterních mikrosomech.....	- 49 -
3.3.8 Oxidace AAI potkaními rekombinantními cytochromy P450 v Supersomech™	- 50 -
3.3.9 Aktivace AAI za tvorby aduktů s DNA	- 50 -
3.3.10 Biotransformace AAI <i>in vivo</i>	- 50 -
3.3.10.1 Analýza AAIA v moči transgenních myších modelů.....	- 51 -
3.3.10.2 Oxidace AAI myšími jaterními mikrosomy	- 51 -
3.3.10.3 Stanovení aktivity cytochromů P450 1A	- 52 -
4. VÝSLEDKY	- 53 -
4.1 Oxidace AAI potkaním jaterním mikrosomálním systémem.....	- 53 -
4.1.1 Separace AAI a AAIA metodou RP-HPLC	- 53 -
4.1.2 Identifikace AAIA.....	- 55 -
4.2 Určení potkaních cytochromů P450 participujících na oxidaci AAI na AAIA.....	- 56 -
4.2.1 Vliv induktorů cytochromů P450 na detoxifikaci AAI na AAIA	- 56 -
4.2.2 Vliv inhibitorů cytochromů P450 na oxidaci AAI na AAIA jaterními potkaními mikrosomy	- 57 -
4.3 Oxidace AAI rekombinantními potkaními cytochromy P450	- 58 -
4.3.1 Studium oxidace AAI rekombinantními potkaními cytochromy P450.....	- 58 -
4.3.2 Vliv cytochromu b ₅ na oxidaci AAI cytochromy P450 1A1 a 1A2.....	- 59 -
4.4 Aktivace AAI potkaními rekombinantními cytochromy P450	- 60 -
4.5. Studium oxidace a aktivace AAI cytochromy P450 <i>in vivo</i>	- 62 -
4.5.1 Aktivace AAI <i>in vivo</i>	- 62 -
4.5.2 Analýza AAIA v moči myších linií.....	- 64 -
4.5.3 Oxidace AAI jaterními mikrosomy myších linií.....	- 65 -
5. DISKUSE.....	- 69 -
6. ZÁVĚR	- 75 -
Seznam použité literatury	- 76 -
Seznam příloh	- 87 -

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AA	aristolochové kyseliny
AAI	aristolochová kyselina I
AAIa	aristolochová kyselina Ia
AAII	aristolochová kyselina II
AAN	nefropatie vyvolaná aristolochovou kyselinou (<i>Aristolochic Acid Nephropathy</i>)
<i>abl</i>	onkogen
AFP	α -fetoprotein
AhR	Ah receptor (<i>Aryl Hydrocarbon Receptor</i>)
BEN	balkánská endemická nefropatie (<i>Balkan Endemic Nephropathy</i>)
CA 125	nádorový antigen 125
CA 15-3	nádorový antigen 15-3
CA 19-9	nádorový antigen 19-9
CEA	karcinoembryonální antigen
Crk	onkoprotein
CYP	cytochrom P450
dA-AAI	7-(deoxyadenosin- N^6 -yl)aristolaktam I
dA-AAII	7-(deoxyadenosin- N^6 -yl)aristolaktam II
dAMP	deoxyadenosinmonofosfát
DDTC	diethyldithiokarbamát
dG-AAI	7-(deoxyguanosin- N^2 -yl)aristolaktam I
DIA	diamantan
dTMP	deoxythymidinmonofosfát
E2F	rodina transkripčních faktorů
<i>erb-A</i>	onkogen
ErbA	onkoprotein
ErbB	onkoprotein
EROD	aktivita <i>O</i> -deethylovat 7-ethoxyresorufin
FDA	Úřad pro léky a potraviny (<i>Food and Drug Administration</i>)
FF	furafyllin

<i>fos</i>	onkogen
Fos	onkoprotein
GTP	guanosintrifosfát
<i>H-ras</i>	onkogen
CHN	nefropatie vyvolaná čínskými bylinami (<i>Chinese Herbs Nephropathy</i>)
IARC	Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny (<i>International Agency for Research on Cancer</i>)
Jun	onkoprotein
KET	ketokonazol
<i>K-ras</i>	onkogen
LDH	laktátdehydrogenasa
MALDI-TOF/TOF	ionizace laserem za přítomnosti matrice (<i>matrix assisted laser desorption/ionization</i>) v kombinaci s detektorem doby letu (<i>time-of-flight</i>)
Mas	onkoprotein
MFO	system oxidas se smíšenou funkcí (<i>mixed function oxidase system</i>)
<i>mos</i>	onkogen
Mos	onkoprotein
MROD	aktivita <i>O</i> -demethylovat 7-methoxyresorufin
MS	mikrosomy
Myb	onkoprotein
<i>myc</i>	onkogen
Myc	onkoprotein
NADP ⁺	nikotinamidadeninukleotidfosfát (oxidovaná forma)
NADPH	nikotinamidadeninukleotidfosfát (redukována forma)
NADPH-GS	NADPH generující systém
NAT	<i>N,O</i> -acetyltransferasa
NQO1	NAD(P)H:chinonoxidoreduktasa (DT-diaforasa)
<i>N-ras</i>	onkogen
OTA	ochratoxin A
<i>p53</i>	tumorový supresorový gen
PB	fenobarbital

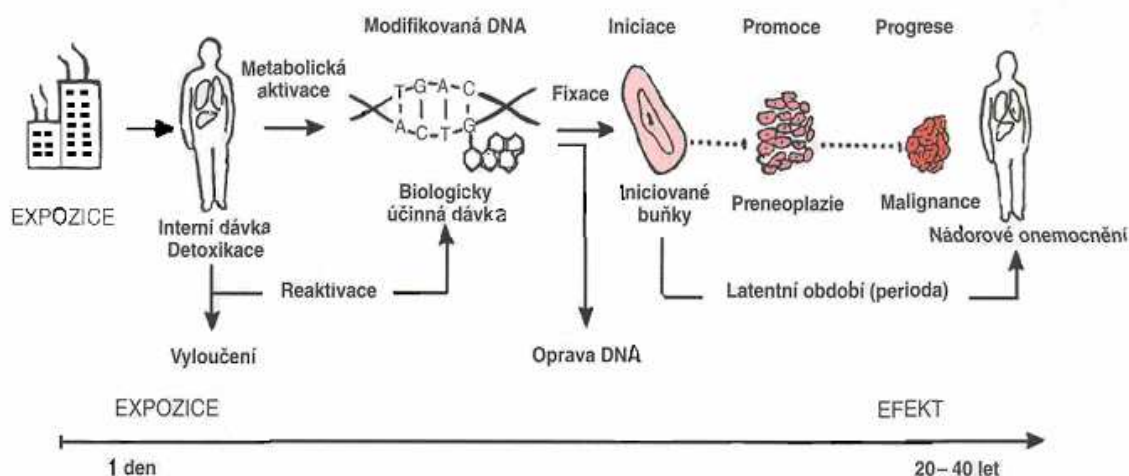
PCN	pregnenolon-16 α -karbonitril
PSA	prostatický specifický antigen
QUI	chinidin
<i>raf</i>	onkogen
Raf	onkoprotein
Ras	onkoprotein
Rb	protein kódovaný genem <i>rb</i>
<i>rb</i>	tumorový supresorový gen
RP-HPLC	vysokotlaká kapalinová chromatografie s reverzní fází
RPM	počet otáček za minutu
<i>sis</i>	onkogen
Sis	onkoprotein
<i>src</i>	onkogen
Src	onkoprotein
SULF	sulfafenazol
SULT	sulfotransferasa
TEAA	triethylaminacetát
TP53	protein kódovaný genem <i>p53</i>
UV	ultrafialové záření
UVB	ultrafialové záření v oblasti 290-320 nm
WT	divoká linie („wilde type“)
α -NF	α -naftoflavon
β -2M	β -2-mikroglobulin
β -hCG	β -lidský choriový gonadotropin

1. ÚVOD

1.1 KARCINOGENESE

Proces, který vede ke vzniku nádorových onemocnění (rakoviny), nazýváme karcinogenesí. Studium mechanismu vývoje nádoru se již několik desítek let intenzivně věnují vědecké skupiny z celého světa.¹ V současné době se jako nejpřesnější jeví model tzv. *multifázové karcinogenese*, kterou lze rozdělit minimálně na tři základní časové úseky, tj. iniciaci, promoci a progresi.¹⁻³ V rámci tohoto dlouhodobého procesu dochází k abnormálnímu buněčnému růstu, který je způsoben četnými změnami v genové expresi, následně vedoucí k nerovnováze mezi buněčnou proliferací a apoptosou. Lze tedy říci, že je negativně ovlivněn buněčný cyklus a diferenciace, resp. geny kódující signální proteiny.²⁻⁴ Tímto způsobem se taková poškozená buňka následně osvobodí od regulace a kontroly okolním prostředím a získává tak schopnost nekontrolovaně se dělit. Z iniciované buňky může po určité době vzniknout benigní nádor, který následně může podstoupit maligní transformaci.^{2,5}

Jednotlivé fáze procesu karcinogenese byly a nadále jsou detailně studovány, v současné době tedy existuje velice dobré povědomí o jejich průběhu (**Obr. 1**).



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

Pokud je organismus vystaven karcinogenu, dochází k poškození určitých genů, které kódují proteiny podílející se na regulaci buněčného cyklu, a tím ke vzniku tzv. *iniciované buňky*. Poškozené geny se zpravidla řadí do skupiny onkogenů nebo tumorových supresorových genů.^{1,2} Působení karcinogenu může být buď charakteru genotoxického, kdy vznikají kovalentní adukty s DNA, anebo charakteru epigenetického, kdy k modulaci genové exprese dochází prostřednictvím nekovalentních interakcí (např. interkalace).^{2,6} Má se zato, že *iniciace* (první fáze karcinogeneze) je proces irreversibilní.²

Mechanismus promoční fáze je komplexní a méně prozkoumaný. Jisté je, že se jedná o celoorganový proces, který je spojen s vysokým stupněm proliferace.¹ Tímto způsobem dochází k propagaci původního poškození a ke vzniku benigního tumoru (*preneoplasie*). Nicméně, *promoce* je stále částečně regulována a kontrolována buněčnými mechanismy. Tato fáze může trvat různě dlouhou dobu a může být také ovlivňována tzv. činidly podporujícími *promoci* (např. forbolestery).^{1,2}

Progresní fáze je spojena s postupným vývojem genotypově a fenotypově změněných buněk, kdy dochází k vysokému stupni zcela nekontrolované a neregulované proliferace, a vede ke vzniku klinicky detekovatelného zhoubného nádoru. Tato maligní transformace je usnadněna genovou nestabilitou a pozměněnou genovou expresí. Maligní tumor se chová agresivně, napadá a ničí přilehlé tkáně a také může (na rozdíl od *preneoplasie*) metastasovat do lymfatických uzlin a ostatních tkání.^{1,2}

1.1.1 Klinické aspekty karcinogeneze

Z klinického hlediska je proces karcinogeneze provázen přítomností určitých látek v tkáních, krvi a v ostatních tělních tekutinách. Tyto látky, tzv. *tumorové markery*, jsou povahy zejména proteinové a jejich koncentrace v tělních tekutinách se mění v čase, resp. s vývojem nádorového onemocnění.^{7,8} Dle definice formulované na 5. mezinárodní konferenci o lidských tumorových markerech ve Stockholmu v roce 1988 (*The Fifth International Conference on Human Tumour Markers, Stockholm, 1988*) jsou tumorové markery charakterisovány jako látky, které vznikají v nádorových buňkách a jsou sekretovány do tělních tekutin, kde je lze kvantifikovat neinvasivními metodami. Vzhledem ke korelaci koncentrace těchto markerů a aktivní hmotou nádoru jsou tumorové markery nápomocné při léčbě onkologických pacientů.⁸

Protože nádorová tkáň je méně diferenciovaná na rozdíl od tkáně zdravé, více histologicky připomíná embryonální tkáň. Tumorové markery jsou proto často látky, které jsou obvykle produkovány v embryonální tkáni a v diferenciované tkáni se zpravidla nevyskytují.⁷ První tumorový marker byl identifikován v roce 1846. Jednalo se o imunoglobulin, *Bence-Jonesův protein*, který je dodnes používán jako nádorový marker v případech mnohočetného myelomu.^{9,10} V následující době byly objeveny další látky, které byly spojeny s vývojem nádorů. Patřily mezi ně látky různé povahy: enzymy, isoenzymy, receptory, hormony apod. Příkladem může být kyselá fosfatasa, α -fetoprotein nebo karcinoembryonální antigen (**Tab. 1**).⁷

Nádorové markery lze v základu rozdělit na dvě skupiny: na (i) nádorové markery a (ii) markery asociované s nádory. První skupina (nádorové markery) zahrnuje specifické glykoproteiny a muciny, které jsou exprimovány pouze v nádorových buňkách. Markery asociované s nádory nejsou zpravidla specifické, nicméně jsou exprimovány více než je obvyklé (např. onkoproteiny, hormony, cytokiny, růstové faktory).⁷ Tyto skupiny lze dále rozdělit podle toho, zda se jejich expresní hladina v průběhu nádorového onemocnění mění anebo ne. Lze je tedy rozdělit na markery statické a dynamické.¹¹

Tabulka 1: Příklady tumorových markerů a příslušných nádorů (podle ⁷)

<i>Tumorový marker</i>		<i>Typ nádoru</i>
AFP	α -fetoprotein	hepatocelulární karcinom, germinální nádory
β -2M	β -2-mikroglobulin	mnohočetný myelom, lymfomy
β -hCG	β -lidský choriový gonadotropin	choriokarcinom, germinální nádory
CA 15-3	nádorový antigen 15-3	karcinom prsu, adenokarcinom
CA 19-9	nádorový antigen 19-9	karcinom pankreatu, žaludku a tlustého střeva
CA 125	nádorový antigen 125	karcinom ovarií, pokročilý adenokarcinom
CEA	karcinoembryonální antigen	karcinom prsu, plic, jater
LDH	laktátdehydrogenasa (izoenzym 5)	germinální nádory
PSA	prostatický specifický antigen	karcinom prostaty

1.1.2 Onkogeny a tumorové supresorové geny

Vzniku iniciované buňky v procesu karcinogeneze předchází genotoxické působení karcinogenů, které vede k poškození určitých, klíčových genů. Cílem tohoto poškození jsou zpravidla geny podílející se ve zdravé buňce na regulaci buněčného cyklu: protoonkogeny a tumorové supresorové geny. Protoonkogeny se při normálních podmínkách podílejí na proliferaci buňky, zatímco tumorové supresorové geny, jejichž proteinové produkty se řadí k inhibitorům kinas závislých na cyklinech, participují na inhibici buněčné proliferace.^{1,2,5,7}

1.1.2.1 Protoonkogeny a onkogeny

K hypotéze podílu onkogenů, resp. protoonkogenů na procesech karcinogeneze vedly práce Temina a Baltimora, kteří pracovali na problematice viru Rousova sarkomu. Temin¹² v rámci svého výzkumu formuloval tzv. protovirální teorii, podle které genom onkogenních virů částečně vznikl z normální buněčné DNA během evoluce. Tato teorie také nabízí vysvětlení hybridisace sekvencí nukleové kyseliny z onkogenního viru (virových onkogenů) s buněčnou DNA.^{2,12}

V normální, zdravé buňce se nachází homology výše zmíněných virových, resp. retrovirových onkogenů, které jsou označovány jako *protoonkogeny* a které jsou evolučně konservovány od kvasinky až po člověka. Tato evoluční konservace protoonkogenů poukazuje na velice významnou roli těchto genů v buněčných funkcích a jejich onkogenní působení je tedy spíše vyvoláno mimořádnou událostí (např. mutací či translokací).² Mutací protoonkogenů vznikají *onkogeny*, jejichž exprese následně vede k procesům, které mohou dále resultovat v nekontrolovatelné dělení a vznik iniciované buňky. Přestože se protoonkogeny vyznačují vysokou homologií s virovými onkogeny, nemusí to nutně znamenat, že všechny protoonkogeny mohou vést k maligní transformaci.^{2,7,13,14}

V současné době je identifikováno a charakterisováno mnoho onkogenů, z nichž některé uvádí **Tab. 2**. Další onkogenní sekvence jsou nacházeny v různých eukaryotických organismech, včetně člověka. Z výsledků současného výzkumu vyplývá, že tyto geny lze řadit do rodin nebo dokonce do superrodin, a to na základě sekvenční homologie. Významnou skupinou jsou např. onkogeny *ras*, mezi které se řadí Harveyho *ras* onkogen (*H-ras*), Kirstenův *ras* onkogen (*K-ras*) či neuroblastomový *ras* onkogen (*N-ras*). Společně s dalšími onkogeny byly zařazeny do tzv. rodiny asociované s *ras* onkogeny.^{2,15}

Tabulka 2: Vybrané virové onkogeny (podle ²)

<i>Onkogen</i>	<i>Retrovirus</i>	<i>Původ</i>
<i>abl</i>	Abelsonův virus myší leukemie	myš
<i>fos</i>	Finkelův-Biskisův-Jinkinsův virus osteosarkomu	myš
<i>mos</i>	Moloneyho virus myšího sarkomu	myš
<i>raf</i>	virus myšího sarkomu 3611	myš
<i>erb-A</i>	virus ptačí erythroblastosy	slepice
<i>myc</i>	virus myelocytomatosy MC29	slepice
<i>src</i>	virus Rousova sarkomu	slepice
<i>sis</i>	virus opičího sarkomu	chápán
<i>H-ras</i>	Harveyho virus myšího sarkomu	potkan
<i>K-ras</i>	Kirstenův virus myšího sarkomu	potkan
<i>N-ras</i>	žádný	člověk

Protoonkogeny, resp. onkogeny lze rozdělit do tříd podle funkce jejich proteinového produktu. Současná molekulární biologie rozeznává sedm základních skupin. Do první se řadí růstové faktory (Sis), které ve své mutantní podobě mohou parakrinními či autokrinními mechanismy stimulovat proliferaci nádorové buňky. Druhou třídu představují receptory mající tyrosin-kinasovou aktivitu (rodina Src, ErbB). V současné době nejsou ovšem stále známy ligandy některých těchto membránových receptorů. Ve třetí skupině lze nalézt receptory postrádající tyrosin-kinasovou aktivitu (Mas).² Čtvrtou skupinu tvoří proteiny vázající GTP, mezi které se řadí rodina Ras. Tyto onkoproteiny hrají velice významnou roli v signální transdukci a mají též GTPasovou aktivitu. Právě tato aktivita je v mutantní formě proteinu (např. onkoproteinu Ras) narušena. To znamená, že onkoprotein není schopen hydrolyzovat GTP, který je na něm stále navázán, a *onkoprotein je tedy stále v aktivním stavu*.^{2,15}

V páté třídě lze najít cytosolární proteinkinasy serinového a threoninového typu (Raf, Mos), které se významně podílí na buněčné signalisaci. V šesté skupině pak nalezneme cytosolární regulátory (Crk), které mohou ovlivňovat např. proteiny obsahující fosforylovaný tyrosin. Poslední, sedmá třída představuje velkou skupinu jaderných transkripčních faktorů (Myc, Myb, Fos, Jun, ErbA). Mutace těchto proteinů buď vede ke ztrátě negativních regulačních elementů, nebo vyvolá ztrátu jejich aktivních domén.²

1.1.2.2 Tumorové supresorové geny

Tumorové supresorové geny se ve zdravé buňce podílejí na regulaci buněčného cyklu, a to jeho inhibicí. Pokud tedy dojde k mutaci takového genu, je tento inaktivován a nemůže tedy participovat na regulaci buněčného cyklu. Proteinové produkty tumorových supresorových genů jsou zejména inhibitory cyklin-dependentních kinas, které hrají v procesu buněčné proliferace též významnou regulační úlohu.^{2,5,7}

Mezi první práce, které přinesly důkazy o takových genech, byly studie Alfreda Knudsona, který se zabýval retinoblastomy (vzácnými dětskými očními nádory).^{16,17} Knudson také formuloval teorii, podle které je pro vývoj tohoto nádorového onemocnění nezbytná *mutace obou alel* tumorového supresorového genu. V případě retinoblastomů jsou rozeznávány dvě formy – dědičná a nedědičná. V případě první ze jmenovaných je mutace jedné alely přenesena po germinální linii z rodiče na potomka a k vývoji nádoru dochází následkem somatické mutace druhé alely. V případě nedědičné formy, formy výrazně častější, dochází k tumorigenesi následkem somatických mutací obou alel.^{16,17}

Postiženým genem je tumorový supresorový gen *rb*, který exprimuje represor transkripce, jenž interaguje v buněčném jádře s transkripčními faktory (rodina E2F), a tím brání transkripci genů důležitých k přechodu buňky do další fáze buněčného cyklu (S fáze). Protein Rb sice není inhibitorem cyklin-dependentních kinas, nicméně s těmito enzymy velice úzce spolupracuje a je jimi regulován. Pouze v nefosforylovaném stavu je totiž Rb protein aktivní a je schopen vázat transkripční faktory rodiny E2F. Fosforylací je Rb protein inaktivován, dochází k uvolnění E2F a transkripce genů důležitých pro další fázi buněčného cyklu může pokračovat. Rb protein je klíčovým regulátorem buněčného cyklu.^{2,18,19}

Mutace genu *rb* vedou k *inaktivaci* Rb proteinu, který tak nemůže dále působit jako supresor, resp. regulátor buněčného cyklu. Tyto mutace, mezi kterými byly detekovány mj. také delece celých exonů či bodové mutace, byly nalezeny ve velkém množství různých typů nádorů. Kromě retinoblastomu to byly např. nádory močového měchýře, prostaty, prsu, dále osteosarkomy či některé druhy leukemie.^{2,18-20}

Dalším významným tumorovým supresorovým genem, který významně participuje na kontrole a regulaci buněčné proliferace, je gen *p53*. Tento gen, který se v lidském genomu nachází na pozici 17p13.1²¹ a který je exprimován ve všech buňkách, hraje klíčovou roli nejen v regulaci buněčného cyklu, ale také v indukci programované buněčné smrti (*apoptosy*), ba v angiogenesi.^{2,7} Lidský protein TP53 obsahuje 9 potenciálních

serinových zbytků, které mohou být fosforylovány cyklin-dependentními kinasami²²⁻²⁴ a poblíž těchto míst se také nachází jaderná translokační doména, která je velice důležitá pro vlastní funkci proteinu TP53. Lokalisace TP53 v buněčném jádře je signifikantní pro funkci TP53 jako negativního regulátoru buněčné proliferace. Byly popsány i případy nádorových onemocnění, která byla vyvolána defektní funkcí TP53 spojenou s chybným transportem tohoto proteinu do jádra.²

Vedle regulační a antiproliferační aktivity byla u proteinu TP53 popsána též role v indukci apoptosy po expozici buňky činidlům poškozujícím DNA (např. ionisujícím záření či protinádorovým léčivům). Dojde-li k poškození DNA, protein TP53 zastaví její replikaci a buněčné dělení, dokud DNA nepodstoupí reparaci opravnými buněčnými mechanismy. Pokud je ovšem poškození DNA natolik mohutné a jsou poškozeny i reparační mechanismy, TP53 indukuje programovanou buněčnou smrt.^{2,7,24}

Mutace genu *p53* vedoucí k *inaktivaci* proteinu TP53 obecně představují genetické alterace některých „náchylných“ míst (*hot spots*). V případě karcinomů se jedná především o substituci nukleotidů resultující v záměnu aminokyseliny (*missense mutace*), nicméně v případě sarkomů lze nalézt delece, inserce a také genetická přeskupení.²

1.1.3 Příčiny vývoje nádorových onemocnění

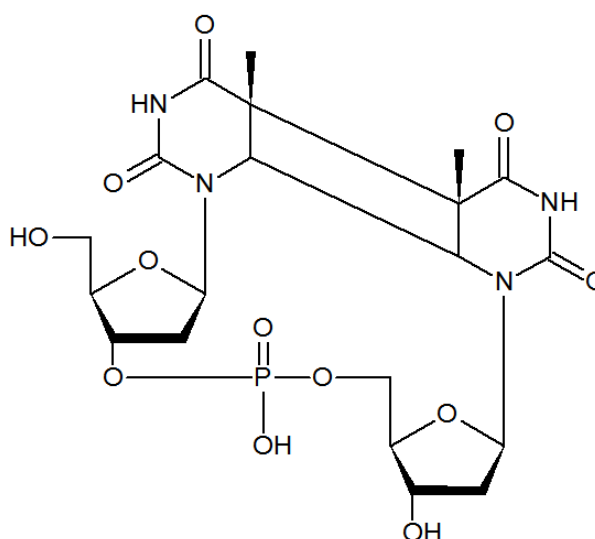
Vznik nádorového onemocnění může být vyvolán biologickými, fyzikálními a chemickými vlivy. Biologické faktory již byly nastíněny v předchozí kapitole věnující se problematice onkogenů, které byly primárně izolovány z onkovirů, a to jak z DNA virů, tak i z RNA virů. Právě onkoviry se mohou významně podílet na procesu karcinogeneze. Jak již ukázaly původní práce Temina a Baltimora, onkoviry jsou schopny zavést svou vlastní genetickou informaci do hostitelské DNA a způsobit v ní takové změny, které mohou vyústit až v iniciaci karcinogeneze.^{2,12} Problematika lidských onkovirů je v současné době intenzivně studována s cílem vyvinout účinnější vakcinaci, než máme dosud k dispozici^{25,26}

K významným fyzikálním činitelům se řadí zejména různé typy záření, které se mezi sebou liší svou pronikavostí do tkání. Z tohoto hlediska je velice nebezpečné ionisující záření, zejména pak radioaktivní záření. Působením tohoto vysokoenergetického záření vznikají jednořetězové a dvouřetězové zlomy v DNA, které mohou vyvolat taková poškození, jakými jsou delece či genetická přeskupení.^{2,7,27} Škodlivé a karcinogenní

působení ionisujícího záření a s ním spojených radionuklidů již dříve detailně popsaly jak jednotlivé vědecké práce, tak i publikace Mezinárodní agentury pro výzkum rakoviny (*International Agency for Research on Cancer, IARC*).²⁸ Z energetičtějších (pronikavějších) záření stojí za zmínku také Röntgenovo záření (*paprsky X*), kterému je člověk vystaven především ve zdravotnických zařízeních.^{7,27}

Ultrafialové záření je sice neionisující, nicméně je stále natolik energetické, takže je schopno způsobit poškození DNA, které může vést k procesu karcinogeneze. Kvůli relativně malé pronikavosti tohoto typu záření je ovšem malignacemi postižena zejména kůže. Na vývoji rakoviny kůže participuje především ultrafialové záření s vlnovou délkou mezi 290 až 320 nm (UVB). Tato složka slunečního svitu je sice z velké části odstraněna ozonovou vrstvou v atmosféře, přesto UV záření může vyvolat maligní melanomy. Vzhledem k narušování ozonové vrstvy je toto riziko čím dál tím větší. Ultrafialové záření typicky zasahuje do S fáze buněčného cyklu, způsobuje především bodové mutace a podílí se též na vzniku thymidylových dimerů (**Obr. 2**).^{2,27,29,30}

Chemickým faktorům vyvolávajícím proces karcinogeneze se detailně věnuje **kapitola 1.1.3.1**. Vedle těchto tří základních příčin vývoje nádorových onemocnění nelze také opomenout vliv dalších důležitých faktorů, kterými jsou genetické predisposice. Nicméně přítomnost takových genetických predisposic ještě neznamená, že musí nutně dojít k vývoji nádorového onemocnění. Nezanedbatelnou roli hrají též podmínky životního prostředí a životní styl.^{2,7,31}



Obr. 2: Struktura thymidylového dimeru (podle ²⁷)

1.1.3.1 Chemická karcinogenese

Velice významnou příčinou vývoje nádorových onemocnění jsou, jak ukázalo mnoho epidemiologických studií, chemické karcinogeny.³²⁻³⁴ Již v 70. letech 18. století pozoroval sir Percivall Pott vysokou incidenci skrotálního karcinomu u londýnských kominíků a předpokládal, že je spojena s působením sazí.³⁵ O 140 let později prokázali japonští vědci Yamagawa a Ichikawa, že opakovaným nanášením černouhelného dehtu do uší potkana dochází k vývoji maligních nádorů.³⁶ V následujících letech byla vlastní karcinogenní látka z černouhelného dehtu identifikována jako benzo[*a*]pyren.³⁷

Po objevení polycyklických aromatických uhlovodíků ve 30. letech minulého století následovalo velice intenzivní studium chemické karcinogenese. Tyto studie prokázaly mnoho chemických karcinogenů napříč celým spektrem organických a anorganických látek. Jednotlivé skupiny těchto látek, kam se vedle polycyklických aromatických uhlovodíků řadí i aromatické aminy, nitroaromatické sloučeniny, azobarviva, *N*-nitrosaminy, dále též soli arsenu, kadmia, niklu a chromu, jsou detailně popsány v publikacích vydávaných IARC.³⁸⁻⁴¹

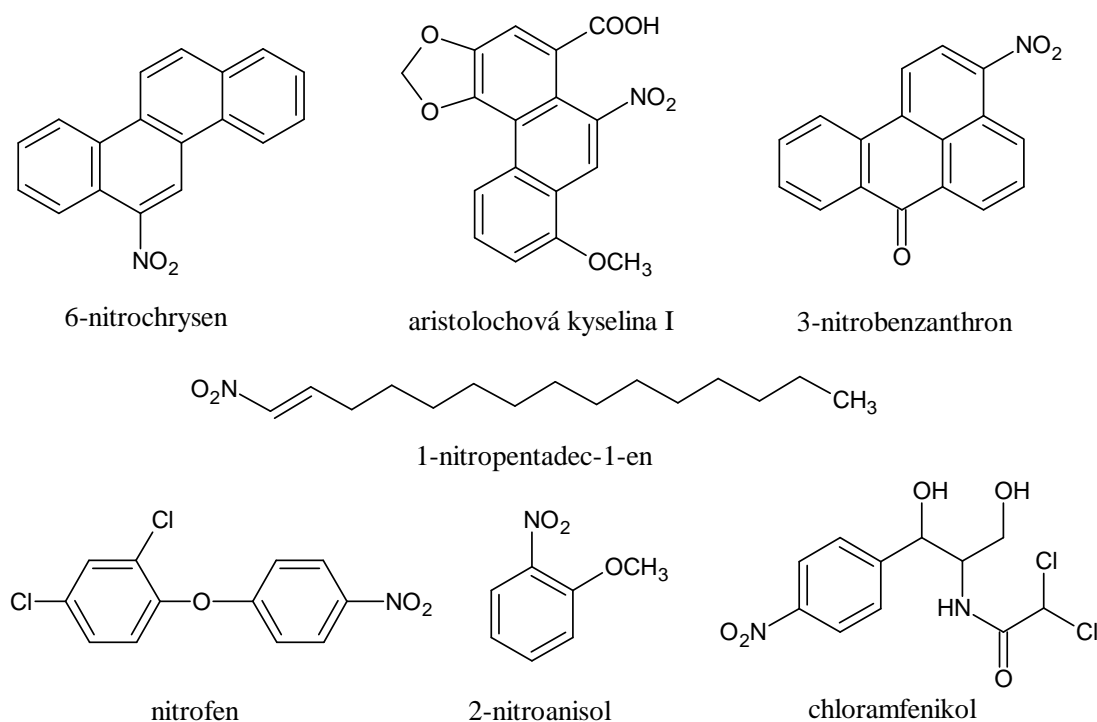
Velice zajímavým a důležitým poznatkem byla skutečnost, že většina chemických karcinogenů vyžaduje aktivaci katalysovanou enzymy, teprve pak mohou genotoxicky působit. Většina chemický karcinogenů v podstatě karcinogenní není, ale v organismu podstupují enzymovou aktivaci vedoucí ke vzniku „proximálního“ karcinogenu (*proximate carcinogen*), který je dále v rámci biotransformace enzymově přeměněn na „okamžitý“ karcinogen (*ultimate carcinogen*).^{1,42} Od 50. let minulého století se této problematice intenzivně věnovali manželé Millerovi, kteří přednesli hypotézu, podle níž okamžitým karcinogenem u většiny chemických karcinogenů je reaktivní elektrofilní agens, které interaguje s DNA. Tato interakce může resultovat ve tvorbu aduktů s DNA, které mohou způsobit mutace vedoucí až k vývoji nádoru.⁴² V současné době je znám mechanismus metabolické aktivace u většiny dosud identifikovaných chemických karcinogenů.¹

Biotransformační enzymy podílející se na této aktivaci a též na detoxifikaci hrají v procesu chemické karcinogenese velice důležitou roli. Rovnováha mezi tím, zda bude chemický karcinogen v organismu detoxifikován anebo metabolicky aktivován je také důležitým faktorem ukazujícím na interindividuální rozdíly v náchylnosti k vývoji nádorového onemocnění po vystavení určitému chemickému karcinogenu. Studium této problematiky znesnadňuje též skutečnost, že tyto enzymy jsou často vysoce geneticky polymorfní.¹

1.2 NITROAROMATICKÉ SLOUČENINY

Nitroaromatické sloučeniny představují početnou skupinu látek, které vykazují toxické a karcinogenní působení.⁴³⁻⁴⁷ Drtivá většina těchto sloučenin vzniká v důsledku lidské činnosti. Nitroaromáty jsou velice významnými kontaminanty životního prostředí a lze je najít ve výfukových plynech či v cigaretovém kouři.⁴³ Jejich vznik je spojen s vysokoteplotními procesy, jako je spalování fosilních paliv nebo zpracování kovů, kdy vznikají z oxidů dusíku a jiných vzdušných polutantů.⁴⁸ Některé nitrosloučeníny našly své využití též v humánním i veterinárním lékařství (nitrofurany, nitroimidazoly, chloramfenikol).⁴⁹

Ačkoliv většina nitroaromátů vzniká, jak je také již zmíněno výše, činností lidské společnosti, lze tyto sloučeniny nalézt též přirozeně přítomné v přírodě.⁵⁰ Příkladem může být antibiotikum chloramfenikol, které bylo izolováno z bakterie *Streptomyces venezuelae* (**Obr. 3**).^{51,52} Zajímavým představitelem je také sloučenina 1-nitropentadec-1-en, kterou používají některé druhy termitů (konkrétně vojáci) jako obrannou látku (*Prorhinotermes simplex*, *Prorhinotermes inopinatus* Silvestri).⁵³ Velice nebezpečnými nitroaromáty jsou pak aristolochové kyseliny (AA), které jsou přirozeně obsaženy v rostlinách čeledi podražcovitých (*Aristolochiaceae*) a které mají vysoce nefrotoxické účinky. Jsou také prokazatelným lidským karcinogenem (**kap. 1.3**).^{38,54-56}



Obr. 3: Struktura vybraných nitroaromátů

Z nitroaromatických sloučenin produkovaných industriální výrobou lze zmínit nitrofen, který byl dlouhou dobu používán jako herbicid^{57,58}, a dále 2-nitroanisol, který je užíván jako výchozí látky při výrobě mnoha různých azobarviv.⁴⁹ Z kontaminantů životního prostředí lze jmenovat látky obsažené ve výfukových zplodinách, např. nitropyreny, 6-nitrochrysen, 3-nitrobenzanthron a mnohé další.⁴³

1.2.1 Mutagenní působení nitroaromátů

Většina nitroaromatických sloučenin vykazuje mutagenní účinky na experimentálních modelech. Nezanedbatelné je i karcinogenní působení těchto sloučenin, které v organismu vede k tumorigenesi.⁴³⁻⁴⁷ Přestože většina nitroaromátů nebyla dosud prokázána jako karcinogenní pro člověka, jsou tyto látky zařazeny Mezinárodní agenturou pro výzkum rakoviny do skupiny 2A a 2B, tj. *látky pravděpodobně karcinogenní pro člověka*.⁴³ Výjimku představují aristolochové kyseliny, zejména aristolochová kyselina I a II, které jsou prokazatelnými karcinogeny pro člověka, a proto jsou agenturou IARC zařazeny do skupiny 1, tj. *látky karcinogenní pro člověka*.^{38,60-63}

Mezi vysoce mutagenní nitroaromáty se vedle výše zmíněných aristolochových kyselin řadí též složky výfukových plynů jako 1-nitropyren, který je spojován i s tumorigenesí v lidském organismu⁶⁴, či 3-nitrobenzanthron, který patří k nejsilnějším mutagenním nitroaromátům.^{65,66} Používání kontaktního herbicidu nitrofenu (**Obr. 3**) bylo dokonce po prokázání jeho silné karcinogenity na modelových zvířatech zakázáno.^{57,58}

Jak je zmíněno v **kapitole 1.1.3.1**, chemické karcinogeny potřebují ke svému genotoxickému působení metabolickou aktivaci, která je enzymově katalyzována.^{1,42} Nejinak tomu je i u nitroaromátů. Tyto sloučeniny jsou v organismu aktivovány prostřednictvím redukčních reakcí, jejichž cílem je nitroskupina.⁶⁷ Redukcí nitroskupiny vzniká hydroxylamin, který je „proximálním“ karcinogenem. Ten je dále přeměněn na nitreniový kation, který velice ochotně podstupuje transformaci na kation karbeniový. Obě tato agens mohou reagovat jako „okamžité“ karcinogeny s DNA za tvorby aduktů.⁶⁸⁻⁷⁰

V případě nitroaromátů byla popsána aktivace též ve druhé fázi biotransformace, která je obvykle spojena s detoxifikačními konjugáčnými reakcemi. Konjugací hydroxylaminového derivátu s aktivním acetátem či sulfátem totiž, díky vysoké nestabilitě obou tvořených konjugátů, dochází jejich rozpadem ke zvýšené tvorbě nitreniového, resp. karbeniového kationtu.⁶⁷

Ultimativní karcinogeny reagují v DNA především s purinovými basemi.^{49,67,71,72} Guaninové zbytky jsou atakovány aktivovanými nitroaromáty na uhlíku C8 a na exocyklické aminoskupině N². Exocyklická aminoskupina N⁶ je cílem zásahu nitreniových, resp. karbeniových kationtů vzniklých z nitroaromatických sloučenin u adeninových zbytků.^{49,67,72} Vedle genotoxického působení nitroaromátů jsou předpokládány též epigenetické zásahy resultující ve tvorbu hydroxylovaných derivátů basí v DNA.⁴⁹

Redukční reakce vedoucí k aktivaci nitroaromátů jsou v organismu katalysovány zejména chinonoxidoreduktasou, xanthinoxidasou, NADPH:cytochrom P450 oxidasou nebo dokonce cytochromy P450.^{67,69,73} Podíl oxidačních, popř. hydrolytických reakcí je v aktivaci nitroaromátů minoritní. Tyto reakce jsou u nitroaromatických sloučenin charakteristické spíše pro detoxifikační reakce.^{67,74,75}

1.3 ARISTOLOCHOVÁ KYSELINA

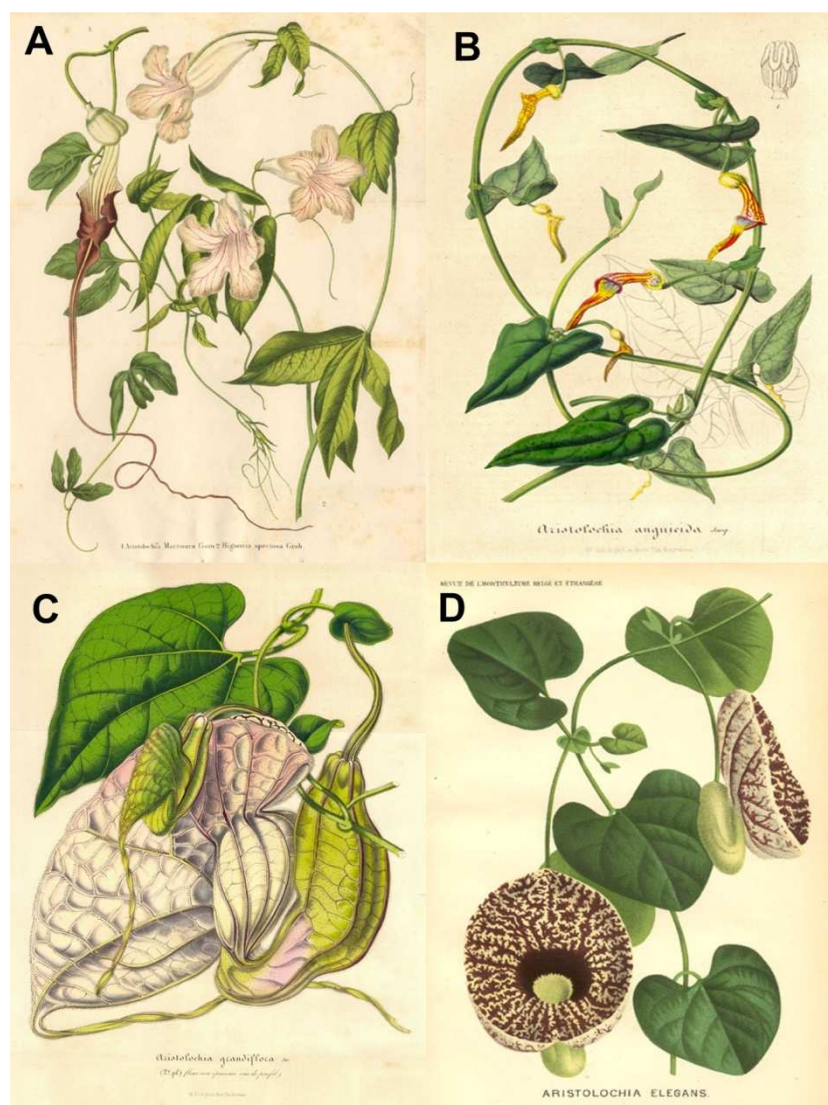
Aristolochové kyseliny představují směs nitrofenanthrenových karboxylových kyselin, která je obsažena v rostlinách čeledi podražcovitých (*Aristolochiaceae*).⁵⁴ Pro své protizánětlivé účinky byly rostliny této čeledi používány od starověku v lidovém léčitelství, a to zejména na asijském kontinentě.^{76,77} Nejvíce jsou v rostlinném extraktu zastoupeny aristolochová kyselina I (AAI) a aristolochová kyselina II (AAII) (**Obr. 5**).⁵⁴ Směs těchto aristolochových kyselin je prokazatelným lidským karcinogenem.^{38,60,63} Obě tyto sloučeniny navíc vykazují velice silné nefrotoxické vlastnosti.⁵⁶

1.3.1 Rostlinná čeleď *Aristolochiaceae*

Čeleď podražcovitých (*Aristolochiaceae*) se dělí na čtyři základní rody, nicméně mezi botaniky nepanuje v současné době všeobecná shoda, takže lze najít i dělení až na osm rodů.⁷⁸⁻⁸⁰ Čtyři základní rody jsou *Aristolochia*, *Asarum*, *Saruma* a *Thottea*.⁷⁸ Rostliny čeledi podražcovitých se vyskytují v různých biotopech. Zatímco zástupce rodu *Asarum* nalezneme spíše v severních chladnějších oblastech, rod *Aristolochia* se vyskytuje především v tropických a subtropických oblastech. Jedná se o různé popínavé byliny a liány, nicméně v této čeledi jsou zastoupeny též keře a menší stromky.⁸⁰⁻⁸²

Čeleď *Aristolochiaceae* je zastoupena více než 600 druhy.⁷⁸ Rod *Saruma* je monotypický, tj. patří do něj jeden druh (*Saruma henryi*). Ten se vyskytuje pouze v jižní Číně.⁸⁰ V rodu *Thottea* bylo popsáno asi 28 druhů, které představují keře rostoucí v Malajsii a indo-malajsijských oblastech, a v rodu *Asarum*, který se roste spíše v chladnějších podmínkách, bylo objeveno asi 85 zástupců.⁸⁰

Největším rodem čeledi *Aristolochiaceae* je rod *Aristolochia*, který čítá přes 400 druhů.^{80,82} Většina zástupců rodu *Aristolochia* se vyskytují v tropických a subtropických podmínkách, kde rostou jako popívané rostliny a liány (**Obr. 4**).⁸² Lze je ovšem nalézt též v mírných podmínkách. V Evropě se vyskytuje pouze několik zástupců, např. *Aristolochia rotunda*, *Aristolochia clematitidis* (podražec křovištní) a další.^{83,84}



Obr. 4: Vybrané druhy rodu *Aristolochia*. (A) *Aristolochia macroura*, (B) *Aristolochia anguicida*, (C) *Aristolochia grandiflora*, (D) *Aristolochia elegans* (převzato z⁸⁷⁻⁸⁹)

Všechny rostliny čeledi podražcovitých obsahují toxické *aristolochové kyseliny* (**kap. 1.3.3**).³⁸ Této skutečnosti využívají některé druhy motýlů z čeledi otakárkovitých (*Papilionidae*), které jsou vůči aristolochovým kyselinám tolerantní. Tito převážně tropičtí motýli, resp. housenky se živí listy rostlin čeledi *Aristolochiaceae* a aristolochovou kyselinu využívají jako obrannou látku proti predátorům. Aristolochová kyselina byla nalezena ve všech vývojových stádiích těchto motýlů.^{85,86} Z motýlů vyskytujících se v tropických oblastech, kteří se živí rostlinami čeledi podražcovitých, je to především *Pachliopta aristolochiae*, který se živí pouze druhem *Aristolochia cucurbitifolia*.^{85,86} Dalšími tropickými motýli, kteří využívají aristolochovou kyselinu jako obrannou látku, jsou *Parides coon*, *Battus philenor*, *Ornithoptera alexandrae*, *Troides brookiana* a mnozí další.^{85,86} Z evropských druhů to je např. motýl *Zerynthia rumina*, který se vyskytuje v jižních oblastech, a též chráněný Pestrokrídlec podražcový (*Zerynthia polyxena*) vyskytující se též na území České republiky.⁸⁵

1.3.2 Tradiční asijská medicína

Rostliny čeledi podražcovitých jsou pro své léčebné účinky hojně používány v tradičním léčení již od starověku. Své použití našly zejména na asijském kontinentě, v čínské lidové medicíně.^{77,90} Díky protizánětlivým účinkům aristolochových kyselin⁶¹ obsažených v rostlinách čeledi *Aristolochiaceae* se zdá být použití těchto rostlin na první pohled pochopitelné. Nicméně faktem zůstává, že aristolochové kyseliny jsou silně nefrotoxické⁵⁶ a jsou prokazatelným karcinogenem pro člověka i experimentální zvířata.^{38,56,60,91}

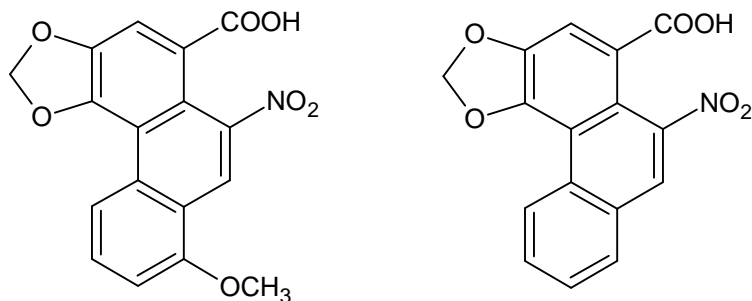
I přes tyto skutečnosti jsou podražcovité rostliny nadále používány lidovými léčiteli a herbalisty. V literatuře je popsáno 7 nejčastěji užívaných druhů v tradiční medicíně: *Aristolochia indica*, *Aristolochia bracteolata*, *Aristolochia serpentaria*, *Aristolochia debilis*, *Aristolochia acuminata*, *Aristolochia trilobata*, *Aristolochia clematitis*.⁷⁶ Vedle těchto druhů stojí za zmínku také *Aristolochia contorta*, *Aristolochia manshuriensis* a *Aristolochia fangchi*.⁷⁷ Pro léčebné účely je spotřebována zpravidla celá rostlina, tj. plody, kořen, stonek i listy.^{61,76}

Léčitelská oblast použití podražcovitých rostlin je velice rozsáhlá. *Aristolochia contorta* a *Aristolochia debilis* se používají proti hemoroidům, kašli a astmatu (sušené plody), bolestem kloubů, edémům a epigastrickým bolestem (sušené stonky). Sušený kořen

Aristolochia debilis je používán při léčbě závratí, bolesti hlavy, karbunklů, nežitů a vřidků. Své využití nalezne i při hadím uštknutí či štípnutí hmyzem.^{76,77} U druhu *Aristolochia bracteolata* (lidově nazývaný *Ukulwe*⁹⁰) bylo popsáno mj. užití při léčbě malárie a bodnutí štíra.⁷⁶ *Aristolochia manshuriensis* se často používá jako podpůrné léčivo při akutních infekcích vylučovacího systému. Tento druh podražce je také používán jako látka upravující nepravidelný menstruační cyklus (emenagogum) při amenorrhoe a jako látka stimuluje laktaci (tato neobvyklá oblast použití pramení podoby květu a ženských rodidel, kterou pozorovali starověcí herbalisté). Podražec křovištní (*Aristolochia clematitis*) je používán k posílení imunitního systému a při léčbě gastrointestinálních a žlučnickových kolik.⁷⁷ Jak napovídá název, podražec užovník neboli hadí kořen viginický (*Aristolochia serpentaria*) se i dnes používá při hadím uštknutí, podobně jako kdysi původními obyvateli Severní Ameriky.^{76,90} Jak je vidět z několika zmíněných příkladů, použití rostlin čeledi podražcovitých je neobyčejně široké a každá rostlina má využití v několika, často různých oblastech medicíny (jak naznačuje např. druh *Aristolochia debilis*).

1.3.3 Aristolochové kyseliny

Aristolochové kyseliny (AA) jsou nitrofenanthrenové karboxylové kyseliny, které se přirozeně vyskytují v rostlinách čeledi podražcovitých.⁵⁴ V rostlinném extraktu bylo identifikováno asi 29 aristolochových kyselin a přes dvě desítky aristolaktamů, metabolických derivátů AA, nicméně majoritní složky tvoří dvě aristolochové kyseliny, a to 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. 5**).⁵⁴



Aristolochová kyselina I

Aristolochová kyselina II

Obr. 5: Struktura aristolochové kyseliny I a II

Obsah aristolochové kyseliny I a aristolochové kyseliny II se liší v závislosti na daném rostlinném druhu. Někteří zástupci rodu *Aristolochia* obsahují více AAI než AAI (např. *Aristolochia fangchi*, *Aristolochia manshuriensis*)^{92,93} a u jiných je tomu naopak (např. *Aristolochia bracteolata*, *Aristolochia contorta*).^{94,95}

Pro své protizánětlivé vlastnosti byly aristolochové kyseliny, resp. rostliny čeledi *Aristolochiaceae* užívány nejen v lidovém léčitelství (**kap. 1.3.2**). Ve dvacátém století byl v Německu zahájen farmaceutický výzkum a vývoj léčiv obsahujících AA.⁹⁶⁻⁹⁸ Tento výzkum byl zastaven poté, co bylo zjištěno, že aristolochové kyseliny jsou silnými karcinogeny pro laboratorní potkany.^{55,99} Následující vědecké studie prokázaly silnou nefrotoxicitu AA vůči hlodavcům^{56,91} a genotoxické vlastnosti AA.¹⁰⁰⁻¹⁰² Z výše zmíněných důvodů byly všechny farmaceutické preparáty obsahující aristolochové kyseliny z trhu vyloučeny.¹⁰³

Aristolochová kyselina je prokázána jako původce nefropatie, která byla poprvé pozorována na začátku 90. let minulého století v Belgii.¹⁰⁴ Dnes toto onemocnění nese označení nefropatie vyvolaná aristolochovou kyselinou (**kap. 1.3.4.1**). Aristolochové kyseliny dále participují na vývoji další nefropatie, tzv. balkánské endemické nefropatie (**kap. 1.3.4.2**). Aristolochová kyselina je také odpovědná za pozdní komplikaci obou zmíněných nefropatií, a to za vývoj malignací (**kap. 1.3.4.3**). Proto byla agenturou IARC bylinná léčiva obsahující aristolochové kyseliny klasifikována označena jako karcinogenní pro člověka, skupina 1.⁷⁷ Do stejné skupiny byly o deset let později zařazeny též aristolochová kyselina I a aristolochová kyselina II.³⁸

Přes výše zmíněné skutečnosti a přes varování vydávaná oficiálními úřady (např. americký Úřad pro léky a potraviny, *Food and Drug Administration*, *FDA*) lze tyto rostliny stále zakoupit a využívat pro medicínální účely.¹⁰⁵

1.3.4 Pathogenese vyvolaná aristolochovou kyselinou

Aristolochová kyselina je zodpovědná za vývoj dvou typů nefropatií. První z nich, dříve známá jako nefropatie vyvolaná čínskými bylinami, dnes nese jméno po tomto rostlinném alkaloidu – nefropatie vyvolaná aristolochovou kyselinou.⁶³ Druhým onemocněním je balkánská endemická nefropatie, na jejímž vývoji též participují aristolochové kyseliny, nicméně není vyloučen vliv ani jiných látek.¹⁰⁶ Nezanedbatelnou skutečností je také fakt, že působení AA vyvolává tumorigenesi v urotheliální tkáni.¹⁰⁷

1.3.4.1 Nefropatie vyvolaná aristolochovou kyselinou

Na počátku 90. let minulého století byl v Belgii popsán zvláštní typ nefropatie, který se vyznačoval velice rychlým průběhem.¹⁰⁴ Onemocnění bylo charakterisováno jako intersticiální fibrosa bez glomerulárního poškození spojená se závažným úbytkem renálních tubulů.^{104,108} Původcem této nefropatie je aristolochová kyselina, kterou pacienti většinou přijímali v rámci alternativní medicíny. Právě příjem AA se zdá být klíčový v manifestaci tohoto onemocnění. Několikaletá studie ukázala, že v závislosti na různých dávkách medikamentů obsahujících AA se pravděpodobně mění též fenotyp nemoci. Vysoké dávky takových medikamentů u pacientů dokonce indukují irreversibilní akutní tubulární nekrosu, která není provázena oligurií a která může vést až progresivnímu chronickému renálnímu selhání.¹⁰⁴

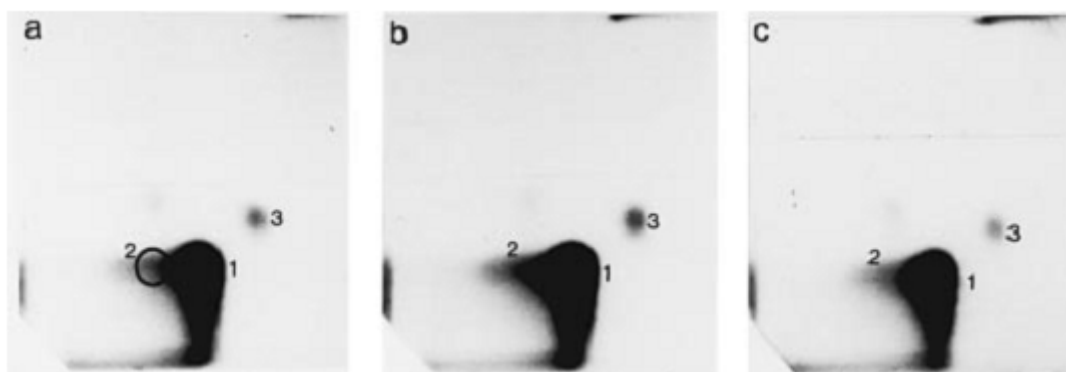
K belgickému objevu vedly případy pacientek, které onemocněly touto nefropatií a které měly společné to, že absolvovaly kúru pro redukci tělesné hmotnosti na tamní soukromé klinice. Toto lékařské zařízení se specialisovalo na terapii nadváhy více než 15 let, aniž by byly zaznamenány nějaké problémy. Kúra spočívala v nízkokalorické dietě, psychické podpoře a intradermálních injekcí artyčokového extraktu a eufilinu. Dále byly pacientům podávány malé dávky amfetaminů a preparátů obsahujících směs acetazolamidu s extrakty živočišného, popř. rostlinného původu. Na počátku 90. let byly do tohoto léčebného postupu začleněny přípravky z rostlin *Stephania tetrandra* a *Magnolia officinalis*, které jsou původní v Číně.¹⁰⁴

Jak bylo později prokázáno, došlo k záměně dvou rostlinných druhů, *Stephania tetrandra* a *Aristolochia fangchi*. Ač názvy obou rostlin v latinské terminologii zní dostatečně odlišně, není tomu tak při srovnání původních čínských názvů – *fangji* × *fangchi*.¹⁰⁴ Naneštěstí rod *Aristolochia* obsahuje vysoce toxické aristolochové kyseliny, na rozdíl od druhu *Stephania tetrandra*, obsahujícího tetrandrin (alkaloid bisbenzylisochinolinového typu),¹⁰⁴ který oproti AA vykazuje méně nefrotoxické účinky.¹⁰⁹ Záhy po zaznamenání prvních případů bylo zjištěno, že renální problémy pacientek byly způsobeny užitím čínských bylin v rámci léčebné terapie. Proto bylo onemocnění nejprve označeno jako nefropatie vyvolaná čínskými bylinami (*Chinese Herbs Nephropathy, CHN*). Prokázání záměny rostlinných druhů, tedy přítomnost AA, nebylo zprvu jednoduché. Obvyklé metody selhávaly, nicméně bylo zjištěno, že původně používané prepurifikační kroky mohly částečně znehodnotit aristolochové kyseliny a znemožnit tak jejich stanovení.¹¹⁰

Záměna čínských bylin byla tedy nakonec dokázána fytochemickou analýsou dvanácti různých vzorků dovezených do Belgie pod názvem *Stephania tetrandra*. Ke stanovení byla použita chromatografie na tenké vrstvě a prokázala, že pouze dva ze vzorků obsahovaly tetrandrin, tedy alkaloid deklarovaného druhu *Stephania tetrandra*. V ostatních preparátech byla zjištěna přítomnost aristolochových kyselin.¹¹⁰

Na konci 90. let minulého století bylo v Belgii evidováno asi 100 případů uvedeného onemocnění.¹¹¹ Současné studie ukazují, že jejich počet roste, a to nejen v Belgii, ale i v dalších zemích např. v Číně.¹¹² Více než dvě třetiny pacientů byly postiženy preterminálním nebo terminálním renálním selháním a byly léčeny dialýsou nebo transplantací ledvin.¹¹¹ Nicméně ani transplantace obou ledvin nevedla k zastavení patologického procesu, který rezultoval ve vývoj nádorů v urotheliální tkáni (**kap. 1.3.4.3**).¹⁰⁷ Nedávné studie ukázaly, že látka β -naftoflavon má protektivní účinky vůči renálnímu poškození způsobenému AAI. Tato protekce probíhá na základě indukce cytochromů P450 podrodiny 1A,¹¹³ které se podílejí na metabolické detoxifikaci AAI.^{75,114} Nicméně stejné enzymy též participují na aktivaci AAI, která rezultuje ve tvorbu kovalentních aduktů s DNA.^{75,115}

Právě přítomnost kovalentních aduktů AA s DNA (**Obr. 6**), které byly nalezeny v tkáních pacientů postižených tímto typem nefropatie, prokázala, že toto onemocnění způsobují aristolochové kyseliny. Z tohoto důvodu byla choroba přejmenována na nefropatii vyvolanou aristolochovou kyselinou (*Aristolochic Acid Nephropathy*, AAN).^{63,70}



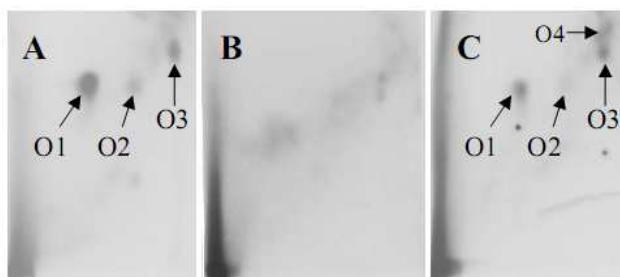
Obr. 6: Autoradiogramy aduktů AA s DNA (metoda „³²P-postlabeling“) u pacientů postižených AAN; skvrna 1 = deoxyadenosinem, 7-(deoxyadenosin-*N*⁶-yl)aristolaktam I, skvrna 2 = deoxyguanosinem, 7-(deoxyguanosin-*N*²-yl)aristolaktam I, skvrna 3 = dA-AAII deoxyadenosinem, 7-(deoxyadenosin-*N*⁶-yl)aristolaktam (převzato z ⁶²)

1.3.4.2 Balkánská endemická nefropatie

Balkánská endemická nefropatie (BEN) je další závažné onemocnění, v jehož etiologii pravděpodobně hrají aristolochové kyseliny také majoritní roli. Tato nefropatie je velice podobná AAN, nicméně existují mezi nimi drobné rozdíly. Hlavní rozdíl je především v pomalém postupu BEN.¹¹⁶ Tato endemická nefropatie je totiž charakterisována jako *pomalou postupující* intersticiální nefritida s vážným poškozením tubulárního epithelia a následnou destrukcí glomerulů, jež může vést až renální kontrakci.¹¹⁷⁻¹²⁰ Označení *endemická nefropatie* je odvozeno od skutečnosti, že BEN se vyskytuje v oblasti Bulharska, Rumunska, Srbska, Bosny a Chorvatska v povodí řeky Dunaje.^{69,121} Proces tohoto onemocnění, podobně jako AAN, je ireversibilní a léčba spočívá v dialyze a v transplantaci ledvin. Další podobnost AAN a BEN souvisí s vážnou komplikací této nefropatie, a to vývojem multifokálních, pomalu rostoucích, povrchových tumorů ledvinové pánvičky a dalších částí urogenitálního systému.¹¹⁷⁻¹²¹

Lidé postižení balkánskou endemickou nefropatií pocházeli z rurálních oblastí výše zmíněného endemického území.¹¹⁷ Etiologie BEN byla dlouhou dobu nejasná. V současnosti ještě není zcela rozřešena, nicméně bylo předneseno mnoho hypotheses, z nichž v současné době převládají názory, že na vývoji BEN se podílí ochratoxin A (*mykotoxinová teorie*)^{122,123} a aristolochové kyseliny.^{106,124}

Mykotoxinová teorie bere v úvahu působení ochratoxinu A (OTA) a citrininu.^{122,123} Oba zmíněné mykotoxiny jsou nefrotoxické^{125,126} a OTA dokonce indukuje vývoj nádorů u experimentálních zvířat.^{119,127} V tkáních pacientů s balkánskou endemickou nefropatií byly také nalezeny adukty s DNA, které byly odvozené od ochratoxinu A (**Obr. 7**).^{125,127} Nicméně některé práce tyto výsledky nepotvrdily.¹²⁸⁻¹³⁰



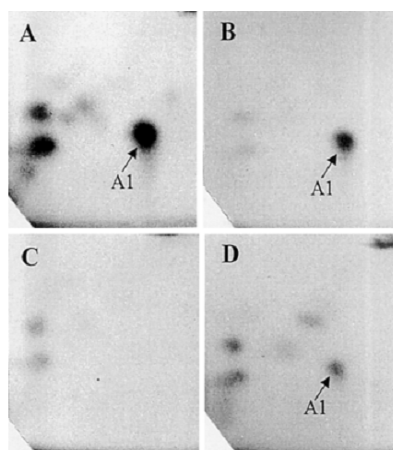
Obr. 7: Adukty derivované z ochratoxinu A v DNA ledvin pacientů žijících v oblasti BEN (převzato z¹³¹)

Nicméně nezdá se, že by ochratoxin A hrál ve vývoji BEN významnou roli. Nebylo totiž dosud prokázáno působení OTA, které by vyvolávalo renální onemocnění nebo vedlo k vývoji nádorů v lidském organismu. Neopomenutelnou skutečností též zůstává, že OTA byl nalezen v krvi celoevropské populace, aniž by bylo zaznamenáno onemocnění jako balkánská endemická nefropatie.¹³²



Obr. 8: *Aristolochia clematitis* (převzato z¹³³)

Podíl aristolochových kyselin na vývoji BEN předpokládal již na konci 60. let minulého století M. Ivić,^{123,124} který svou hypotézu zakládal na zjištění přítomnosti aristolochových kyselin v mouce z postižených oblastí. Aristolochové kyseliny se do mouky dostaly kontaminací pšenice podražcem křovištním (*Aristolochia clematitis*)¹²⁴ (**Obr. 8**), který je v těchto regionech původní a který se zde také užívá v tradičním léčitelství.⁷⁷ Současné studie potvrdily majoritní participaci AA na vývoji balkánské endemické nefropatie, neboť v tkáni pacientů postižených BEN byly nalezeny adukty AA s DNA (**Obr. 9**).^{106,131,134} Dále byla objevena unikátní mutace v tumorovém supresorovém genu *p53* (transverse AT→TA), která je zcela typická pro působení AA (**kap. 1.3.4.3, Obr. 12**).¹⁰⁶



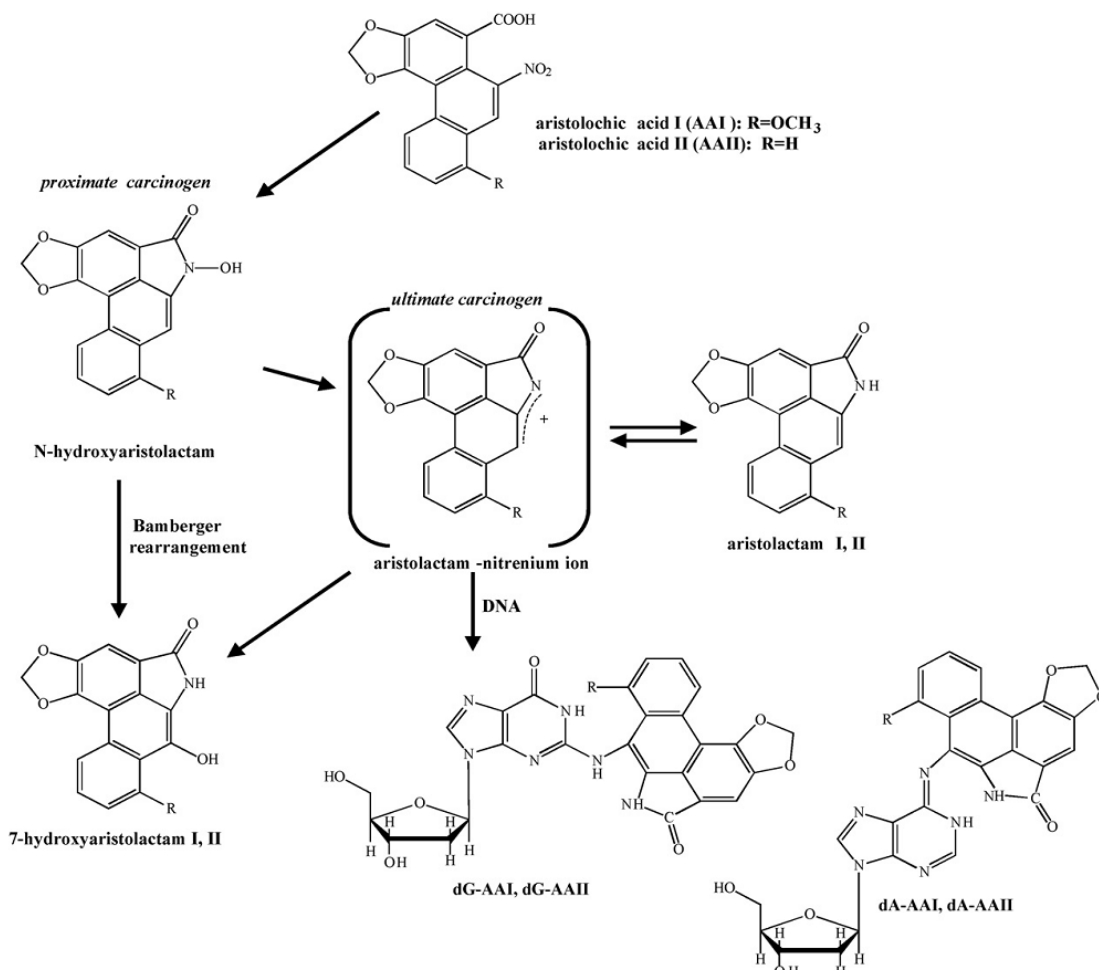
Obr. 9: Adukty aristolochových kyselin nalezené v DNA pacientů trpících AAN (A) a pacientů žijících v oblastech BEN (B-D) (převzato z¹³¹)

Nejenže zmíněné kovalentní adukty AA s DNA v tkáních pacientů postižených balkánskou endemickou nefropatií nesporně potvrzují hlavní podíl AA na vzniku BEN, ale společně se specifickou mutací (transverse AT→TA) lze též tyto adukty s DNA použít jako bioindikátory karcinogenního vlivu aristolochových kyselin v rámci epidemiologických studií.¹³⁴

1.3.4.3 Urotheliální karcinom

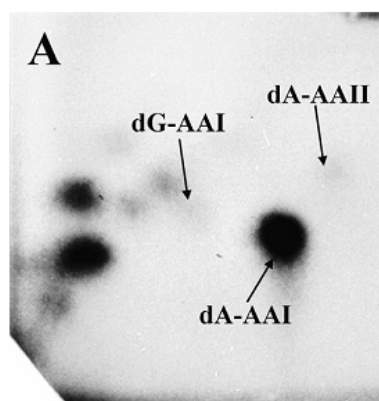
Vývoj malignací v urotheliální tkáni je velice vážnou pozdní komplikací nefropatie vyvolané AA i balkánské endemické nefropatie.⁶⁰ K vývoji nádorového onemocnění dochází i po přerušení přímého vystavení aristolochové kyselině,¹⁰⁷ dokonce i po transplantaci ledvin.¹³⁵ U belgických pacientů bylo zaznamenáno velmi vysoké zvýšení rizika vývoje nádorů.⁶¹ Podobné zvýšené riziko vývoje nádorů urogenitálního systému bylo zaznamenáno též na asijském kontinentě u tanních léčitelů, kteří rostliny rodu *Aristolochia* sami užívají.¹³⁶

Proces karcinogeneze u pacientů s AAN a BEN je spojen s genotoxickým působením aristolochových kyselin.^{69,100-102} AA jsou totiž v organismu schopny (po metabolické aktivaci) tvořit stabilní kovalentní adukty s DNA, konkrétně s deoxyadenosinem a deoxyguanosem (**Obr. 10**).^{71,72}



Obr. 10: Aktivace AA a tvorba aduktů s DNA (převzato z⁷⁰)

O metabolické aktivaci aristolochových kyselin podrobně pojednává **kapitola 1.3.5.1**. V této části diplomové práce se soustředíme na vlastní kovalentní adukty AA s DNA, jejichž tvorba byla prokázána jak u experimentálních zvířat^{71,137}, tak i v tkáních pacientů trpících AAN (**Obr. 6 a 11**)^{60,62,131} a BEN (**Obr. 9**).^{106,131,134} Byly identifikovány tři adukty AA s DNA: dva s deoxyadenosinem, 7-(deoxyadenosin-*N*⁶-yl)aristolaktam I (dA-AAI) a 7-(deoxyadenosin-*N*⁶-yl)aristolaktam II (dA-AAII), a jeden adukt s deoxyguanosinem, 7-(deoxyguanosin-*N*²-yl)aristolaktam I (dG-AAI). V procesu tumorigenese hraje významnou roli zejména 7-(deoxyadenosin-*N*⁶-yl)aristolaktam I, který v renální tkáni pacientů s AAN i BEN převládá a navíc je velice persistentní⁶² (u pacientů s AAN byl detekovatelný i po 89 měsících po přerušení podávání medikamentů obsahujících AA⁶⁰, **Obr. 6**). Již na konci devadesátých let minulého století vědecké studie prokázaly, že AAI je v tvorbě aduktů s DNA efektivnější než AAII.¹³⁸



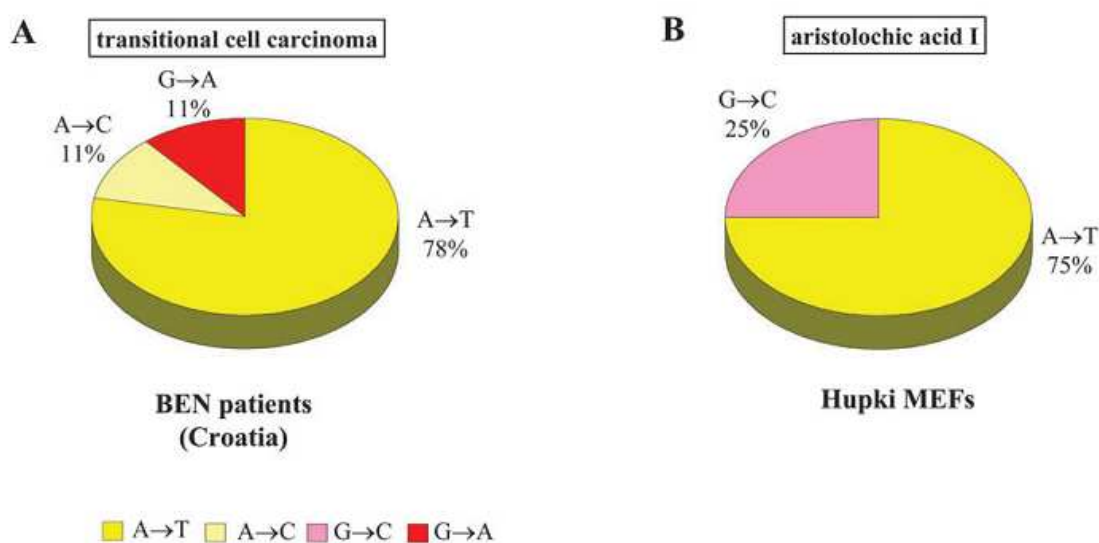
Obr. 11: Autoradiogram aduktů s DNA, které byly nalezeny v renální tkáni pacientů s AAN, určených metodou „³²P-postlabeling“ (převzato z¹³¹)

Cílovým genem karcinogenního působení aristolochových kyselin je u hlodavců zejména onkogen *H-ras*, který je mutován na kodonu 61 (CAA). Tato mutace vyvolává specifickou transversí AT→TA.^{70,139} Stejná mutace byla nalezena též v kodonu 139 na exonu 5 (AAG) lidského tumorového supresorového genu *p53*.^{61,70,140} Některé výsledky naznačují, že k mutaci může docházet sekvenčně specifickým způsobem.⁶¹ U hlodavců byla pozorována zmíněná transverse na prvním adeninu kodonu 61 onkogenu *H-ras* (CAA).¹⁴¹ V lidském organismu byla detekována též na prvním adeninu kodonu 139 genu *p53* (AAG). Zajímavou skutečností je, že oba zmíněné adeniny mají stejné sousední base, jak v onkogenu *H-ras* u hlodavců (CAA), tak i v lidském tumorovém supresorovém genu *p53* (kodon 138/139: GCCAAG).^{61,140}

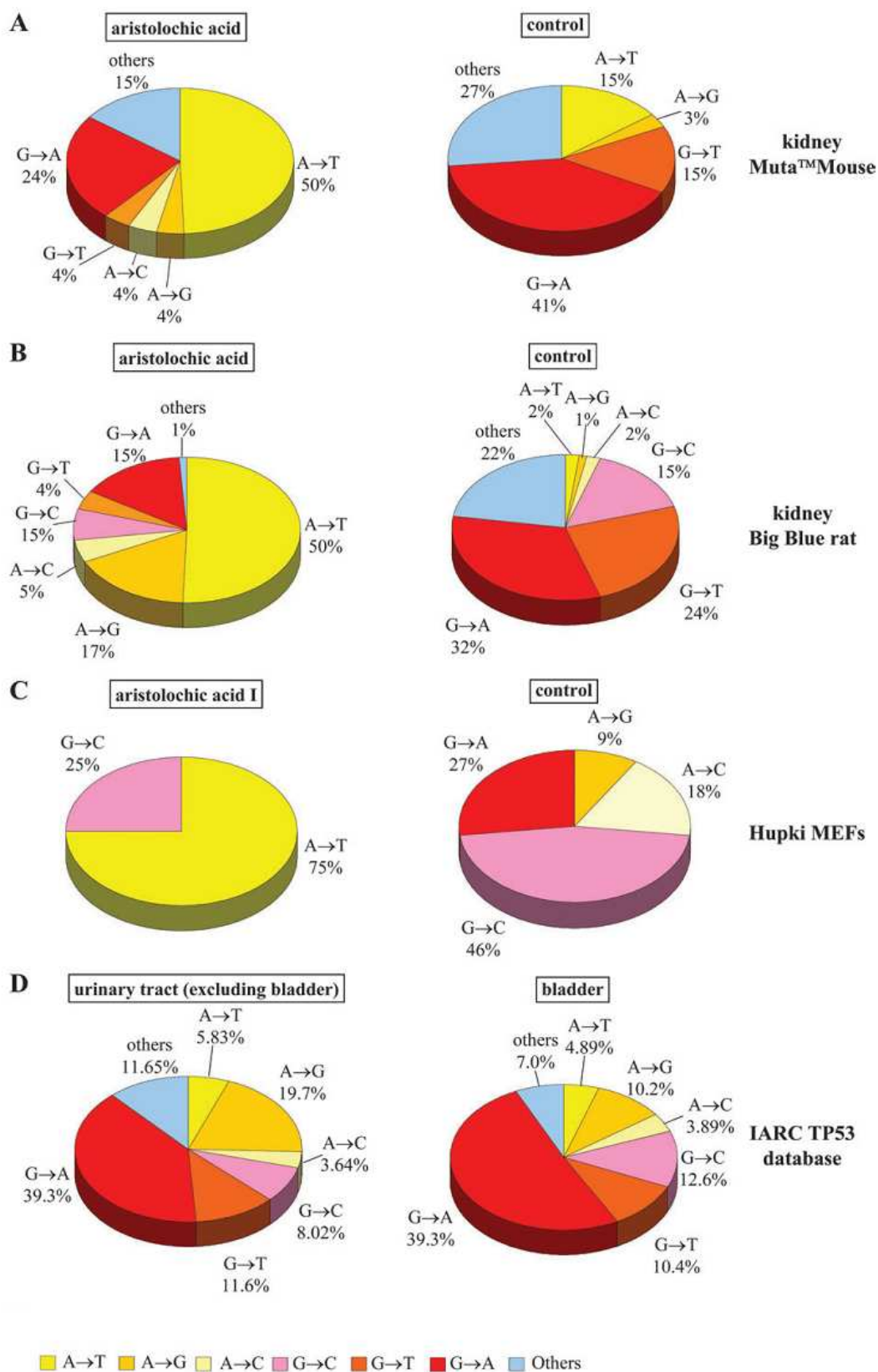
K transversi AT→TA vede skutečnost, že deoxyadenosinmonofosfát (dAMP) a deoxythymidinmonofosfát (dTMP) jsou při replikaci DNA inkorporovány proti aduktům AA s deoxyadenosinem se stejnou pravděpodobností. Naopak deoxyguanosinové adukty AA proti sobě komplementárně inkorporují deoxycytidinmonofosfát, takže nedochází k žádné mutaci. Tyto poznatky potvrzují velice silný mutagenní potenciál aduktů AA s deoxyadenosinem,^{141,142} zejména pak 7-(deoxyadenosin-*N*⁶-yl)aristolaktamu I, který navíc vykazuje dlouhou dobu persistence v tkáních pacientů s AAN.¹³⁷

Zmíněné mutace resultují v aberantní proteosynthesu. Mutace v onkogenu *H-ras* (CAA→CTA) vede k záměně glutaminu za leucin. U lidského tumorového supresorového genu *p53* je důsledek mutace (AAG→TAG) vážnější. Dochází k zastavení proteosynthesy, neboť původní kodon kódující lysin je nahrazen stop kodonem. Takové závažné narušení syntesy genu *p53*, který reguluje buněčný cyklus (**kap. 1.1.2.2**), může vyústit v iniciaci procesu karcinogeneze.^{69,143}

Následující práce prokázaly, že působení AA vede ke vzniku zmíněné specifické transversní mutaci AT→TA.¹⁴⁴ Přítomnost této mutace byla potvrzena jak v DNA laboratorních zvířat vystavených AA (např. tzv. „hupki Mouse“ – *human p53 knock-in mouse* – kmeny myší, jejichž exony 4-9 endogenní myší alely genu *p53* byly nahrazeny sekvencí lidského genu *p53*)¹⁴⁵, tak i v renální tkáni pacientů postižených AAN (**Obr. 13**) a BEN (**Obr. 12**).¹⁴⁴ Z porovnání s TP53 databází IARC vyplývá, že v tumorech vyvolaných AA je vysoká incidence právě transversní mutace AT→TA v genu *p53*.¹⁴⁴



Obr 12: Schéma mutací genu *p53* u pacientů trpících BEN (A) a u embryonálních fibroblastů získaných z kmene myší „hupki mouse“ (B) (podle¹⁴⁴)



Obr. 13: Schéma mutací tumorového supresorového genu *p53* (podle ¹⁴⁴)

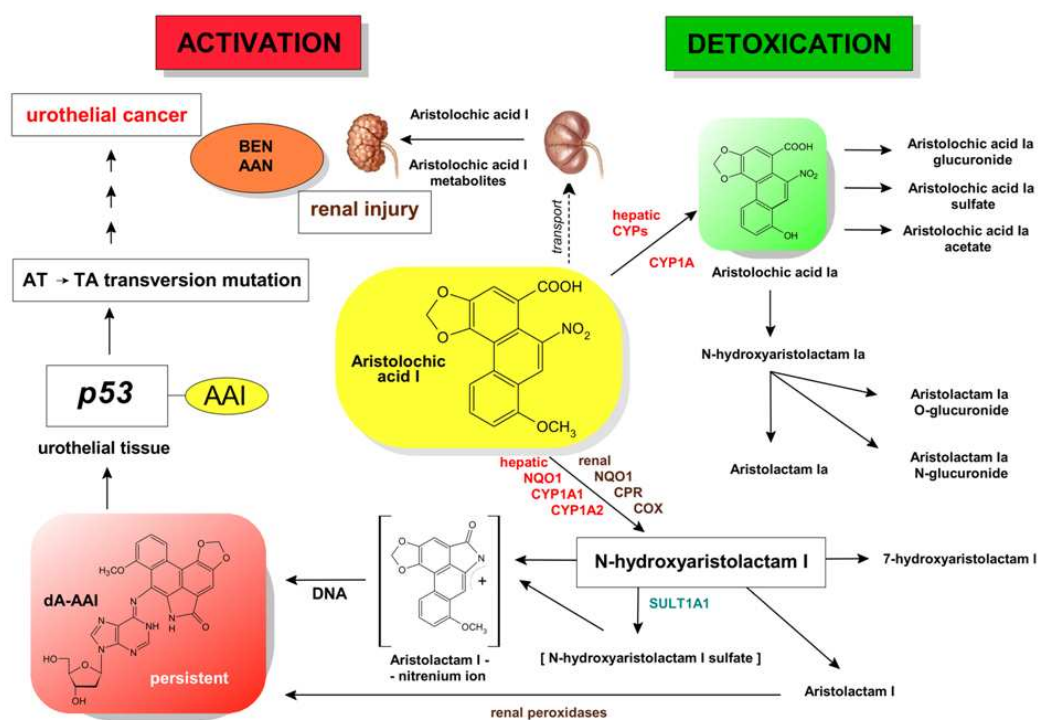
1.3.5 Biotransformace aristolochových kyselin

Xenobiotika, která vstoupí do organismu, podstupují metabolickou přeměnu, tzv. *biotransformaci*. Tato biotransformace primárně vede k detoxifikaci xenobiotika a jeho následnému vyloučení z organismu. Nicméně jsou i takové případy, kdy biotransformační reakce vedou k produktům, které jsou více toxické, než byla původní látka. Pak mluvíme o tzv. metabolické aktivaci xenobiotika. Tento jev je typický pro biotransformaci karcinogenů, resp. *prokarcinogenů*.⁴²

Obecně lze biotransformaci rozdělit do dvou základních fází: derivatisační a konjugační. V rámci obou zmíněných fází je xenobiotikum, které je zpravidla nepolárního charakteru, polarisováno.¹⁴⁶ V první (*derivatisační*) fázi se tak děje prostřednictvím enzymy katalysovaných oxidačních, redukčních, popř. hydrolytických reakcí. Xenobiotikum, které podstoupí tuto přeměnu, může být následně konjugováno s eobiotiky v druhé fázi biotransformace. Obvykle dochází ke konjugaci s kyselinou glukuronovou, aktivním sulfátem, acetátem a glutathionem, ovšem ani konjugace s aminokyselinami (glycin, cystein, taurin) není vyloučena. Reakce druhé fáze biotransformace také vyžadují přítomnost enzymů, které se řadí do třídy transferas.¹⁴⁶ V obou fázích biotransformace může docházet k aktivaci mutagenu.^{42,68-70} V druhé fázi je to spíše vzácné, ale byly popsány případy, kdy konjugace s acetátem, popř. aktivním sulfátem vedla ke vzniku reaktivních nitreniových, resp. karbeniových iontů.⁶⁷

1.3.5.1 Aktivace aristolochových kyselin v organismu

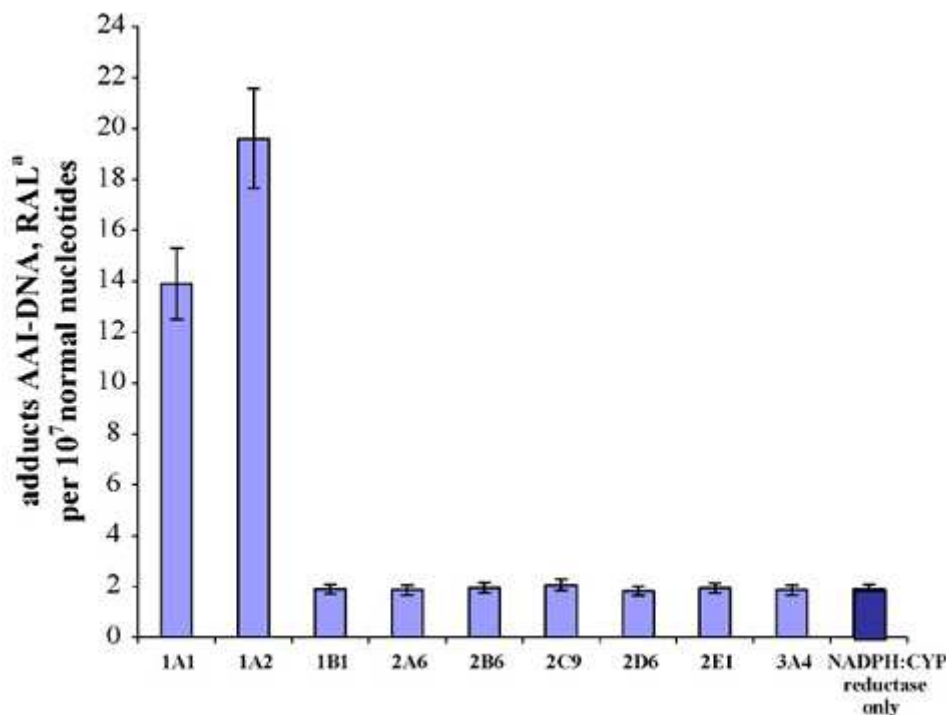
Aristolochové kyseliny podstupují v organismu biotransformaci, která může vést buď jejich detoxifikaci (**kap. 1.3.5.2**) anebo k metabolické aktivaci (**Obr. 14**). Cílovou chemickou skupinou aktivačních reakcí je nitroskupina. Ta je těmito reakcemi redukována za vzniku *N*-hydroxyaristolaktamu, který působí jako „proximální“ karcinogen.^{69,70,147,148} Aristolaktamy jsou obecně hlavními metabolity aristolochových kyselin, a to jak v dráze redukční aktivace, tak i oxidační detoxifikace AA.⁷⁰ Po vytvoření *N*-hydroxyaristolaktamu může dojít k přeměně na vysoce reaktivní *N*-acylnitreniový kation, který představuje vlastní elektrofilní agens reagující s DNA za tvorby stabilních kovalentních aduktů (**kap.1.3.4.3**). *N*-acylnitreniový ion tvoří adukty AA zejména s purinovými basemi na exocyklické aminoskupině N^2 a N^6 .⁷²



Obr. 14: Schéma biotransformace aristolochové kyseliny I (upraveno dle ¹⁴⁹)

Mezi enzymy, které se podílejí na metabolické aktivaci aristolochových kyselin, se řadí jak enzymy nacházející se v membránách endoplasmatického retikula, tak i enzymy cytosolární. Právě cytosolární enzymy, konkrétně NAD(P)H:chinonoxidoreduktasa (NQO1), jsou v redukční aktivaci AA nejefektivnější.^{150,151} Participace NQO1 na aktivaci aristolochových kyselin se zdá být klíčová, protože tento enzym vykazuje polymorfismus, který by mohl hrát významnou roli v predisposicích jednotlivců vůči BEN a AAN, resp. následnému vývoji nádorového onemocnění.^{152,153}

Na redukční aktivaci AA dále participují také cytochromy P450 (CYP), které jsou lokalizovány v membránách endoplasmatického retikula, kde jsou součástí tzv. systému oxidas se smíšenou funkcí (*mixed function oxidase system*). Efektivita cytochromů P450 v redukční aktivaci AA je sice nižší než u NQO1, nicméně není nezanedbatelná. V lidském organismu jsou aristolochové kyseliny redukovány za tvorby aduktů s DNA nejefektivněji CYP1A1 a 1A2 (**Obr. 15**).^{115,147} Cytochrom P450 1A2 je v této redukci účinnější než cytochrom P450 1A1.¹¹⁵ Tento rozdíl v efektivitě obou zmíněných enzymů je dle experimentů *in silico* dán skutečností, že CYP1A1 interaguje jak s nitroskupinou, tak i s karboxylovou skupinou AA, zatímco CYP1A2 interaguje pouze s nitroskupinou AA.¹⁵⁴



Obr. 15: Tvorba aduktů AAI s DNA po aktivaci lidskými cytochromy P450 (převzato z ⁶⁹)

V některých případech participují na metabolické aktivaci prekarcinogenu též enzymy druhé (konjugační) fáze biotransformace.⁶⁷ Právě nitrosloučeniny mohou podstoupit takové reakce, které vedou ke zvýšené tvorbě nitreniových, resp. karbeniových kationtů. Jedná se především o reakce, které jsou katalysovány sulfotransferasami (SULT) a *N,O*-acetyltransferasami (NAT). Podobný jev ovšem u aristolochových kyselin nebyl pozorován. Sulfotransferasy ani *N,O*-acetyltransferasy se na aktivaci AA nepodílejí. Dokonce bylo zjištěno, že lidské SULT1A1, 1A2 a 1A3 společně s NAT1 a NAT2 navíc inhibují aktivaci AAI, která je katalysována NQO1.^{150,155}

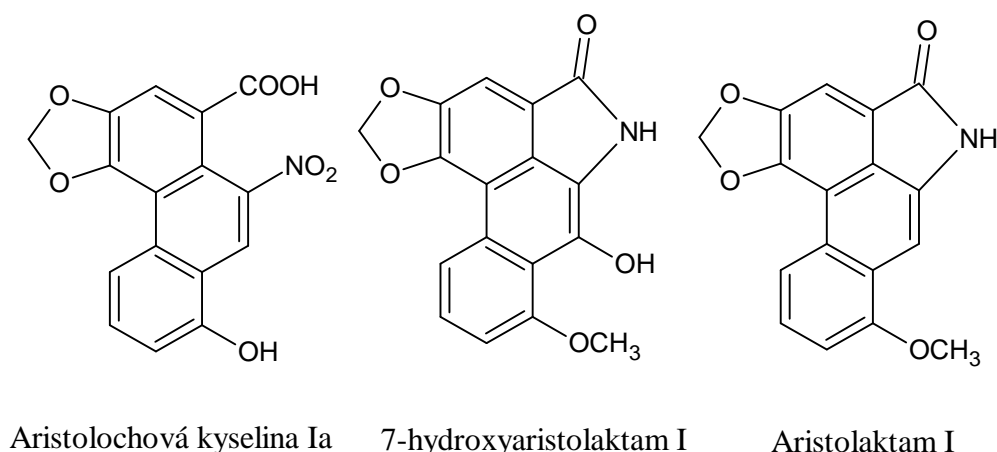
1.3.5.2 Oxidační detoxifikace aristolochových kyselin

Detoxifikace aristolochových kyselin v organismu (**Obr. 14**) je zprostředkována oxidačními reakcemi, které jsou katalysovány cytochromy P450.¹¹⁴ Některé vědecké studie, včetně předkládané diplomové práce, dokazují významnou roli cytochromů P450 podrodiny 1A v metabolické detoxifikaci aristolochových kyselin.^{114,147,156}

Hlavním detoxifikačním produktem aristolochových kyselin je aristolochová kyselina Ia (AAIa, 8-hydroxyaristolochová kyselina I, **Obr. 16**), neboť dosud nebyly nalezeny žádné adukty AAIa s DNA.⁷⁰ Aristolochová kyselina Ia a její konjugáty

s glukuronovou kyselinou a aktivním sulfátem byly také nalezeny v moči experimentálních zvířat.¹⁵⁷ Všechny tyto skutečnosti podporují tvrzení, že oxidační *O*-demethylace AAI představuje hlavní detoxifikační cestu AAI.

Další předpokládanou reakcí zahrnutou v detoxifikaci AA je konverse *N*-hydroxyaristolaktamu I.^{70,157} Ten může být buď redukován na aristolaktam I anebo může podstoupit Bambergerův přeměk resultující ve tvorbu 7-hydroxyaristolaktamu I (**Obr. 16**). Ve druhé fázi biotransformace podstupují detoxifikační metabolity konjugací reakce, zejména pak s kyselinou glukuronovou, aktivním sulfátem a acetátem.¹⁵⁷



Obr. 16: Struktura hlavních detoxifikačních metabolitů AA

1.4 CYTOCHROMY P450

Na konci 50. let 20. století byl Martinem Klingenbergem¹⁵⁸ a Davidem Garfinklem¹⁵⁹ popsán zvláštní pigment vyskytující se v jaterních mikrosomech. Tento pigment v komplexu s oxidem uhelnatým dosahoval absorpčního maxima při vlnové délce 450 nm. Navíc vykazoval také hemoproteinový charakter, jak v 60. letech prokázali japonští vědci Omura a Sato.¹⁶⁰

Na základě výše zmíněných skutečností byl tento protein označen jako cytochrom P450. Nicméně struktura cytochromů P450 zcela neodpovídá struktuře klasických cytochromů. Hlavní rozdíl mezi nimi je ve vazbě porfyrinového skeletu (ferroprotoporfyrinu IX), který je v cytochromech P450 obsažen. Na rozdíl od klasických cytochromů, kde hem, resp. ion železa koordinuje imidazolový zbytek histidinu, v cytochromech P450 je ferroprotoporfyrin IX vázán vedle hydrofobních interakcí též

prostřednictvím sulfhydrylové skupiny cysteinu, který se vyskytuje v aktivním centru enzymu.^{161,162} Z tohoto důvodu společně se skutečností, že tyto proteiny vykazují také enzymovou aktivitu, se doporučuje původní označení „cytochromy“ nahradit spíše korektnějším výrazem *hemthiolátové proteiny*.

Do současné doby bylo nalezeno více než 8500 genů kódujících cytochromy P450 v různých organismech od prokaryot po člověka.¹⁶³ V lidském organismu bylo identifikováno 57 genů a 58 pseudogenů těchto hemthiolátových proteinů.¹⁶⁴ Takové velké množství pochopitelně vyžaduje důkladný systém nomenklatury.

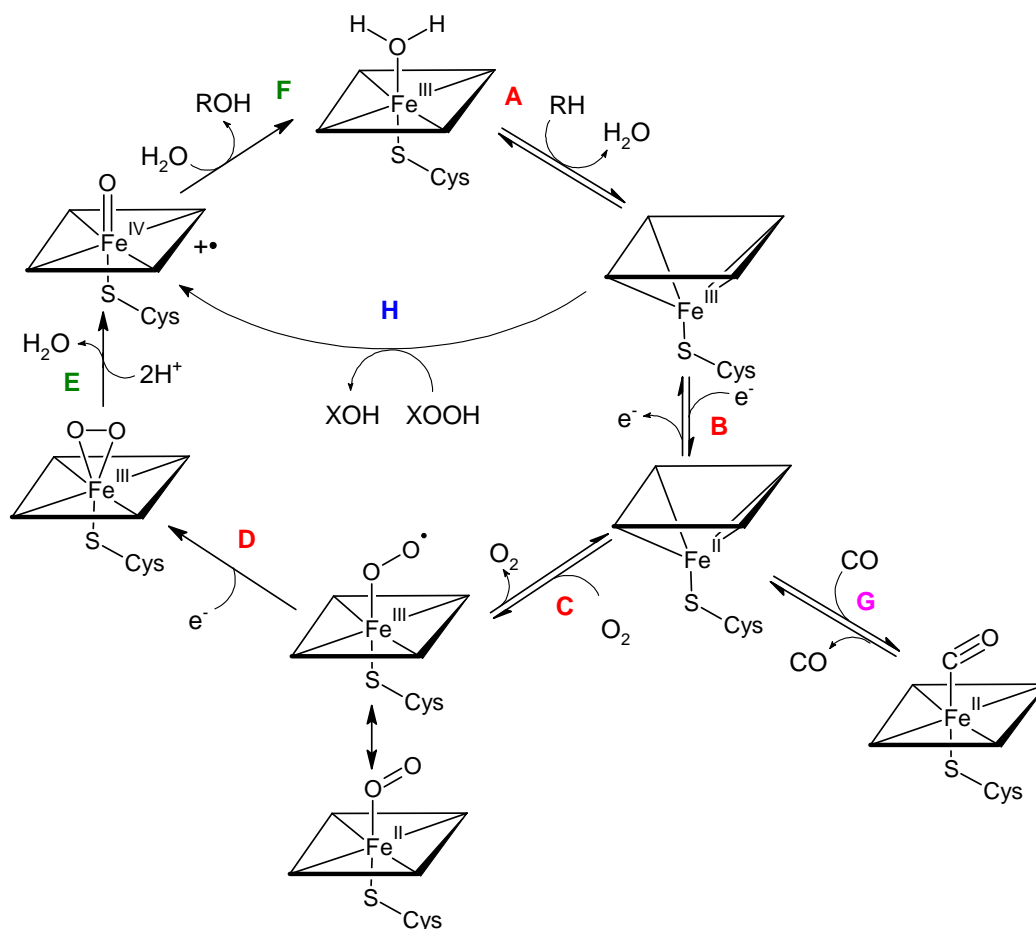
V roce 1987 navrhl Daniel W. Nebert společně se svými spolupracovníky nomenklaturu cytochromů P450, která byla založena na homologii aminokyselinové sekvence apoproteinu.^{165,166} Pokud protein vykazuje alespoň 40% sekvenční identitu s ostatními proteiny, lze jej zařadit do stejné *rodiny*, která je při použití třípísmenné zkratky „CYP“ označena první arabskou číslicí. Při sekvenční homologii 55% a více jsou cytochromy P450 klasifikovány do tzv. *podrodin* (ve zkratce podrodinu představuje velké písmeno). Poslední číslice ve zkratce pak označuje vlastní isoformu cytochromu P450.¹⁶⁵

Cytochromy P450 hrají v organismu velice důležitou roli, která spočívá v metabolismu eobiotik (jako jsou steroly a mastné kyseliny) a zejména xenobiotik.¹⁶¹ Nacházejí se především v játrech, dále také v plicích, ledvinách nadledvinkách, kůži a v mozku.¹⁶² Tyto enzymy (EC 1.14.14.1) jsou součástí systému oxidas se smíšenou funkcí (*MFO system*), který je lokalizován v membránách endoplasmatického retikula a mitochondrií. Cytochromy P450 fungují v tomto systému jako terminální oxidasy, nicméně tyto hemthiolátové proteiny vykazují dvě základní funkce, vedle oxidasové je to také oxygenasová funkce.^{161,167}

První ze jmenovaných spočívá v aktivaci molekulárního kyslíku, který může být dále využit v následujících reakcích. Oxygenasová funkce cytochromů P450 pak resultuje v zabudování atomu kyslíku do molekuly daného substrátu.^{161,167,168} Cytochromy P450 interagují v rámci MFO systému s NADPH:cytochrom P450 reduktasou a důležitou komponentou tohoto systému je také biologická membrána, která zajišťuje správné uspořádání jednotlivých složek vůči sobě.^{168,169} Fakultativně může být v systému oxidas se smíšenou funkcí přítomen cytochrom b₅ a NADH:cytochrom b₅ reduktasa.¹⁷⁰

Cytochromy P450 katalysují monooxygenasové reakce, které probíhají uspořádaným reakčním mechanismem vedoucím k aktivaci molekulárního kyslíku a následnému zabudování právě jeho jednoho atomu do molekuly substrátu.^{161,167,168} Pro

navázání substrátu je důležité, aby cytochrom P450 byl v tzv. vysokospinovém stavu.^{161,167,171} Tento stav je charakterisován absorpčním maximem Soretova pásu při 390 nm a jevem, kdy ion železa leží mimo rovinu porfyrinového skeletu a je pentakoordinován. Tato forma vzniká po přiblížení substrátu k aktivnímu místu enzymu z nízkospinového stavu CYP, ve kterém je ion železa hexakoordinován. Nízkospinová forma cytochromu P450 vykazuje absorpční maximum při vlnové délce 418 nm a ion železa je v rovině porfyrinového skeletu. Šestým ligandem iontu železa při tomto stavu může být např. molekula vody. Obě zmíněné formy jsou závislé na vazbě substrátu, resp. ligandu, čehož se prakticky využívá u měření tzv. *substrátových*, resp. *ligandových spekter*.¹⁶¹



Obr. 17: Reakční mechanismus cytochromů P450 (upraveno dle¹⁷²⁾

Reakční mechanismus působení cytochromů P450 (**Obr. 17**) lze rozdělit na dvě základní fáze.^{161,167,171,172} První fáze je charakterisována aktivací dvouatomové molekuly kyslíku (**Obr. 17 A-D**), v druhé fázi pak dochází k zabudování jednoho atomu kyslíku do molekuly substrátu (**Obr. 17 E-F**). Jak je zmíněno výše, po přiblížení substrátu k aktivnímu místu enzymu dochází k přeměně nízkospinové formy na vysokospinovou.

V průběhu aktivace kyslíku také dochází k redukci, neboť pouze dvojmocné železo je schopno koordinovat molekulu kyslíku, případně jiné ligandy (např. oxid uhelnatý, **Obr. 17 G**). Elektrony k redukcím cytochromu P450 (1. a 2. redukce, **Obr. 17 B a D**) jsou dodávány majoritně NADPH:CYP reduktasou, nicméně druhá redukce může být zprostředkována také elektrony dodávanými cytochrom b_5 reduktasou. Z takto aktivovaného kyslíku je dále jeden atom využit k hydroxylaci substrátu a druhý atom kyslíku je redukován na vodu. Cytochromy P450 též vykazují peroxidasovou aktivitu a mohou tedy využít jako substrát i organický peroxid (**Obr. 17 H**).¹⁶⁷

1.4.1 Lidské cytochromy P450 1A

Z 57 identifikovaných genů lidských cytochromů P450 je podrodina 1A zastoupena dvěma isoformami – 1A1 a 1A2. Jak CYP1A1 tak i CYP1A2 hrají významnou roli v metabolismu xenobiotik, zejména takových, které mají obecně aromatický charakter.¹⁷³⁻¹⁷⁵ Oba enzymy vykazují vysokou míru homologie v aminokyselinové sekvenci (až 70%).¹⁶⁷ Liší se především ve své lokalizaci v organismu. Cytochrom P450 1A1 je typický extrahepatální cytochrom P450, který se majoritně vyskytuje v plicích a dále také v placentě, tenkém střevě a jiných extrahepatálních tkáních. V játrech byla sice též popsána přítomnost CYP1A1, nicméně ve velice nízkých množstvích.¹⁷⁶⁻¹⁷⁸ Naopak, CYP1A2 je lokalizován především v játrech, exprese v ostatních tkáních je zanedbatelná. V plicích dokonce přítomnost CYP1A2 nebyla popsána.^{167,179}

Regulace CYP1A1/2 na transkripční úrovni je zprostředkována cytosolárním Ah receptorem (*aryl hydrocarbon receptor, AhR*), který interaguje s různými induktory vykazujícími aromatický charakter (aromatické polycyklické uhlovodíky, dioxiny a další). Následná signalizační kaskáda resultuje ve zvýšenou expresi dané rodiny cytochromů P450.¹⁸⁰ Oba cytochromy P450 jsou tedy v tkáních inducibilní.^{167,179}

Obecně platí, že cytochromy P450 jsou polymorfní enzymy. Výjimkou nejsou ani CYP1A1 a 1A2. V literatuře je popsáno 13 alel CYP1A1 a 41 alel CYP1A2.¹⁸¹ Ve srovnání s CYP2D6, u kterého bylo objeveno 128 alel, to sice není nijak zvlášť vysoká variabilita alel, nicméně u CYP1A, které významně participují na metabolismu prokarcinogenů, může hrát velice důležitou roli v interindividuální susceptibilitě vůči danému karcinogenu, resp. nádorovému onemocnění.¹⁸²⁻¹⁸⁴

2. CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE

Cílem předkládané diplomové práce byla identifikace enzymů podílejících se na metabolismu aristolochových kyselin, zejména pak aristolochové kyseliny I. Konkrétně bylo na potkaním a myším modelu studováno, které cytochromy P450 participují na oxidační detoxifikaci a redukční aktivaci AAI, a zda stejné enzymy metabolisují AAI jak v podmínkách *in vitro*, tak i *in vivo*.

Jako modely byly využity potkaní jaterní mikrosomy izolované ze zvířat, jimž byly podávány induktory cytochromů P450, a dále speciální transgenní myší modely, kterým byly „deletovány“ geny *Cyp1a1* a *Cyp1a2*; konkrétně byly použity linie *Cyp1a1(-/-)*, *Cyp1a2(-/-)* a *Cyp1a1/1a2(-/-)*.

3. MATERIÁL A METODY

3.1 POUŽITÝ MATERIÁL A CHEMIKÁLIE

Použitý materiál a chemikálie pochází z následujících zdrojů:

BioSystems, Španělsko

diagnostická sada pro stanovení kreatininu v tělních tekutinách; 0,4 M NaOH, 25 mM pikrová kyselina, glukosa/močovina/kreatinin standard: 100 mg/dl glukosa/50 mg/dl močovina/2 mg/dl (177 μM) kreatinin

Fluka, Švýcarsko

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

Gentest BD Bioscience, USA

potkaní rekombinantní cytochromy P450 v Supersomech™ (uchovávány při teplotě -80 °C)

Lachema Brno, Česká republika

kyselina octová, methanol, ethanol, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$, KH_2PO_4 , $Na_2P_4O_7 \cdot 10H_2O$, KCl, glycerol, diamantan

Linde, Česká republika

kapalný dusík

Merck, Německo

acetonitril

Penta, Česká republika

ethylacetát

Sigma, USA

glukosa-6-fosfát, glukosa-6-fosfátdehydrogenasa, NADPH, NADP⁺, triethylamin, ketokonazol, α -naftoflavon, furafyllin, chinidin, sulfafenazol, diethyldithiokarbamát, dimethylsulfoxid, resorufin, 7-ethoxyresorufin, 7-methoxyresorufin

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

3.2 PŘÍSTROJE

Automatické mikropipety

Nichiryo Nichipet EX (Japonsko)

Centrifugy

K-23, Janetzki, výkyvný rotor (Německo)

K-24, Janetzki, úhlový rotor (Německo)

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

Centrifuge 5418, Eppendorf, úhlový rotor (Německo)

Inkubátory

Thermomixer Eppendorf compact Eppendorf (Německo)

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

Luminiscenční spektrofotometr

PerkinElmer LS55 (USA)

96-jamková destička pro fluorescenční analýsu

program: FL WinLab: PerkinElmer (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)

Spektrofotometr

Helios α , Thermo Spectrosonic (USA)

Systém HPLC

pumpa: Dionex pump P580

ASI-100 Automated Sample Injector

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

Degasys DG-1210 Dionex

termobox pro kolonu: COLUMN OVEN LCO 101

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

program: Chromeleon™ 6.11 build 490

Další přístroje

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

3.3 METODY

3.3.1 Isolace jaterních potkaních mikrosomů

Potkaní jaterní mikrosomy byly izolovány z kontrolních zvířat a ze zvířat, jimž byly podávány induktory cytochromů P450, v *Laboratoři molekulární karcinogenese a vývoje léčiv* katedry biochemie PřF UK, kde byla diplomová práce vypracována, postupem popsaným dříve.^{73,185-187}

Zvířata byla premedikována Sudanem I (který indukuje CYP1A), fenobarbitalem (který indukuje CYP2B a CYP2C), ethanolem (který indukuje CYP2E1) a pregnenolon-16 α -karbonitrem (který indukuje CYP3A). Všechny experimenty se zvířaty byly prováděny na pracovišti 1. Lékařské fakulty UK v Praze.

3.3.2 Isolace králičího jaterního cytochromu b₅

Králičí jaterní cytochrom b₅ použitý při studiu metabolismu AAI byl izolován RNDr. Věrou Černou, Ph.D. a RNDr. Michaelou Moserovou, Ph.D. na katedře biochemie PřF UK v Praze postupem dle *Yanga a Cederbauma*.¹⁸⁸

3.3.3 Geneticky modifikované myší modely

Pro studium biotransformace AAI *in vivo* byly využity linie geneticky modifikovaných myší vyvinuté skupinou prof. D. Neberta z *University of Cincinnati (USA)*. Byly použity linie *Cyp1a1(-/-)*,¹⁸⁹ *Cyp1a2(-/-)*¹⁹⁰ a *Cyp1a1/1a2(-/-)*.¹⁹¹ Geneticky nemodifikované kmeny myší (WT) byly zakoupeny v *The Jackson Laboratory (USA)*.

K dispozici byly jak kontrolní myši, kterým nebyla podána AAI, tak i zvířata, která byla AAI vystavena. Skupinám samic jednotlivých linií (stáří 3 měsíce, 20-30 g, n = 4) byla podána jednorázová dávka AAI (50 mg/kg tělesné hmotnosti) žaludeční sondou. AAI byla rozpuštěna ve vodě na konečnou koncentraci 5 mg/ml. Kontrolním myším byla podána pouze voda.

Myši byly usmrceny 24 hodin po podání AAI a byly jim vyjmuty játra, ledviny, močový měchýř, slezina a střevo. Orgány byly ihned zmrazeny v kapalném dusíku a uchovány při -80 °C, dokud nebyly dále analysovány. Myší moč byla „sbírána“ po dobu 24 hodin. Všechny tyto experimenty byly prováděny na spolupracujícím pracovišti *University of Cincinnati Medical Center, USA*.

3.3.4 Isolace jaterní mikrosomální frakce z transgenních myších modelů

Mikrosomální frakce z jaterních tkání geneticky modifikovaných myší byly izolovány v rámci diplomové práce následujícím postupem.

Jaterní mikrosomální frakce byla z tkáně získána metodou frakční centrifugace. Celý postup byl prováděn v chlazené místnosti o teplotě 5 °C, nástroje a roztoky byly též vychlazeny. V jednotlivých krocích izolace byly použity následující roztoky pufrů:

PI: 153 mM KCl; 50 mM TRIS; 50 μM vit. E; pH = 7,4

P2: 100 mM Na₄P₂O₇·10H₂O; pH = 7,4

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

Vyjmuté orgány, opláchnuté roztokem pufru **P1**, byly vloženy do vychlazeného roztoku pufru **P1**, který byl předem zvážen. Poté byla tkáň zvážena. Jaterní tkáň byla rozdělena na menší díly (rozstříhána) a několikrát promyta puftrem **P1**, aby bylo dosaženo dokonalého „odkrvení“. Následně byla tkáň homogenisována v homogenisátoru dle Pottera a Elvehjema v roztoku pufru **P1** o objemu v ml odpovídajícímu čtyřnásobku hmotnosti jaterní tkáně v gramech. Takto získané homogenáty byly centrifugovány (3000 RPM, 10 min., *centrifuga Janetzki K-23, výkyvný rotor 4×70 ml*) při teplotě 4 °C. Získaný supernatant byl uchován a získaná peleta byla rehomogenisována s ¼ původního objemu pufru **P1** a opět centrifugována postupem za výše uvedených podmínek.

Získané supernatanty byly spojeny a odstředěny při teplotě 4 °C (13 000 RPM, 20 min., *centrifuga Janetzki K-24, úhlový rotor 6×35 ml*). Získaná peleta představovala mitochondriální frakci. K dalšímu zpracování byl použit supernatant, který byl opatrně oddělen od této tzv. „lehce sedlé“ vrstvy.

Mikrosomální frakce byla získána vysokoobrátkovou centrifugací při chlazení na teplotu 4 °C (45 000, 65 min., *centrifuga Beckman LE-80K, úhlový rotor 45 Ti, 6×94 ml*). Získaný supernatant představoval cytosolární frakci a byl uchován při -80 °C pro další experimenty. Peleta byla „rehomogenisována“ cca v dvojnásobném objemu pufru **P2**.

Výsledná mikrosomální frakce byla připravena ultracentrifugací při teplotě 4 °C (60 000 RPM, 65 min., *centrifuga Beckman LE-80K, úhlový rotor 45 Ti, 6×94 ml*). Sediment byl „rehomogenisován“ v roztoku pufru **P3** o objemu v ml odpovídajícímu ¼ původní hmotnosti jaterní tkáně v gramech. Získaná finální mikrosomální frakce byla zmrazena v tekutém dusíku a uchována při teplotě -80 °C, dokud nebyla použita v dalších experimentech.

3.3.5 Oxidace AAI cytochromy P450 v potkaních jaterních mikrosomech

Oxidace aristolochové kyseliny I potkaními jaterními mikrosomy byla sledována pomocí HPLC. V experimentech byly použity jak jaterní mikrosomy kontrolních (nepremedikovaných) zvířat, tak zvířat premedikovaných induktory cytochromů P450. Stanovení bylo uskutečněno vždy v „tripletních“ provedeních. Celkový objem inkubační směsi byl 500 µl.

Složení inkubačních směsí:

1. fosfátový pufr (100 mM NaH₂PO₄), pH = 7,4
2. potkaní jaterní mikrosomy $c_{proteinů} = 0,5$ mg/ml
3. AAI (10 μM) rozpuštěna v destilované vodě
4. NADPH generující systém (NADPH-GS): 1 mM NADP⁺, 10 mM MgCl₂·6H₂O, 10 mM glukosa-6-fosfát, 1 U/ml glukosa-6-fosfátdehydrogenasa

Příslušné reagenty byly do inkubačních směsí přidávány v takovém množství a takovém pořadí, jak je naznačeno výše. Reakční směs byla míchána a inkubována po dobu 10 minut za stálého třepání (400 RPM) při teplotě 37 °C. Reakce byla zastavena přidáním 1 ml ethylacetátu a pro dobrou extrakci metabolitu do organického rozpouštědla byla reakční směs 2 minuty třepána (*Mikroshaker type ML-1*). Poté byla organická fáze oddělena centrifugací (13 000 RPM, 3 min., *centrifuga 5418, Eppendorf, 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 analýzou byly extrakty rozpuštěny v 30 μl methanolu. Takto připravené vzorky byly následně analysovány metodou RP-HPLC.

3.3.5.1 Vysokotlaká kapalinová chromatografie (HPLC)

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

3.3.6 Identifikace AAIA

Metabolit tvořený oxidací AAI byl izolován HPLC a zaslán k hmotnostní analýze. Analýsu provedl doc. RNDr. Miroslav Šulc, Ph.D. na hmotnostním spektrometru MALDI-TOF/TOF ultraFLEX III, Bruker-Daltonics (SRN).

3.3.7 Inhibice oxidace AAI v potkaních jaterních mikrosomech

Inhibitory cytochromů P450 použité v inhibičních studiích shrnuje **tabulka 3**. Stanovení bylo uskutečněno vždy v celkovém objemu inkubační směsi 250 μ l.

Složení inkubačních směsí:

1. fosfátový pufr (100 mM NaH₂PO₄), pH = 7,4
2. potkaní jaterní mikrosomy $c_{proteinů} = 0,5$ mg/ml
3. AAI (10 μ M) rozpuštěna v destilované vodě
4. inhibitor (1, 10 a 100 μ M) rozpuštěný v daném rozpouštědle (**Tab. 3**)
5. NADPH generující systém (NADPH-GS): 1 mM NADP⁺, 10 mM MgCl₂·6H₂O, 10 mM glukosa-6-fosfát, 1 U/ml glukosa-6-fosfátdehydrogenasa

Příslušné složky byly do inkubačních směsí přidávány v takovém množství a takovém pořadí, jak je naznačeno výše. Následující postup byl zcela analogický tomu, který je popsán v **kapitole 3.3.5 a 3.3.5.1**.

Tab. 3: Přehled užitých inhibitorů cytochromů P450

Inhibitor		Cytochrom P450	Rozpouštědlo
α -naftoflavon	(α -NF)	1A	methanol:ethylacetát (2:3)
furafyllin	(FF)	1A2	DMSO
diamantan	(DIA)	2B	methanol
sulfafenazol	(SULF)	2C	ethanol
chinidin	(QUI)	2D	ethanol
diethyldithiokarbamát	(DDTC)	2E1, 2A	voda
ketokonazol	(KET)	3A	ethanol

3.3.8 Oxidace AAI potkaními rekombinantními cytochromy P450

v Supersomech™

Stanovení bylo uskutečněno vždy v celkovém objemu inkubační směsi 250 μ l.

Složení inkubačních směsí:

1. fosfátový pufr (100 mM NaH₂PO₄), pH = 7,4
2. potkaní rekombinantní cytochromy P450 c = 50 nM
3. AAI (10 μ M) rozpuštěna v destilované vodě
4. NADPH generující systém (NADPH-GS): 1 mM NADP⁺, 10 mM MgCl₂·6H₂O, 10 mM glukosa-6-fosfát, 1 U/ml glukosa-6-fosfátdehydrogenasa

Při sledování vlivu cytochromu b₅ na oxidaci AAI rekombinantními cytochromy P450 byl tento přidán do inkubační směsi tak, aby jeho výsledná koncentrace byla 150 nM.

Příslušné složky byly do inkubačních směsí přidávány v takovém množství a takovém pořadí, jak je naznačeno výše. Pracovní postup byl dále stejný jako v **kapitole 3.3.5 a 3.3.5.1.**

3.3.9 Aktivace AAI za tvorby aduktů s DNA

Analýsa aduktů AAI s DNA po redukční aktivaci AAI rekombinantními cytochromy P450 a v tkáních geneticky upravených myších linií vystavených působení AAI byla provedena školitelkou prof. RNDr. Marií Stiborovou, DrSc., metodou „³²P-postlabeling“ v Německém centru pro výzkum rakoviny (*Deutsches Krebsforschungszentrum*) v Heidelbergu dle postupů, které jsou popsány v dřívějších pracích.^{62,115,192,193}

3.3.10 Biotransformace AAI *in vivo*

Ke studiu oxidační detoxifikace a redukční aktivace AAI byly použity geneticky modifikované myši *Cyp1a1(-/-)*,¹⁸⁹ *Cyp1a2(-/-)*¹⁹⁰ a *Cyp1a1/1a2(-/-)*,¹⁹¹ které jsou blíže popsány v **kap. 3.3.3.**

3.3.10.1 Analýza AAIa v moči transgenních myších modelů

Obsah aristolochové kyseliny Ia v moči myších transgenních modelů byl stanovován metodou RP-HPLC. Vzorek byl připraven tak, že k moči byl přidán čtyřnásobný objem methanolu. Směs byla krátce míchána (*MS 2 Minishaker*) a následně centrifugována 4 min. (10 000 RPM, *Centrifuge 5418, Eppendorf, úhlový rotor*). Získaný supernatant byl odpařen do sucha.

Analýza metodou RP-HPLC byla provedena za podmínek popsanych v kapitole 3.3.5.1. Vlastní vzorek pro HPLC analýsou byl připraven tak, že odparek byl rozpuštěn ve 100 μ l methanolu. Na kolonu bylo nanášeno 25 μ l a přítomnost AAIa byla sledována při vlnové délce 250 nm.

Stanovení kreatininu v moči myších modelů bylo provedeno za použití sady pro stanovení kreatininu v tělních tekutinách (*BioSystems*) Jaffého metodou, tj. reakcí pikrátu v alkalickém prostředí.^{194,195}

Nejdříve byl připraven roztok, který se skládal z 0,4 M NaOH a 25 mM kyseliny pikrové v poměru 1:1. Takto připravený roztok byl temperován na teplotu 37 °C (*Julabo TW8*). Vzorek byl připraven smícháním 0,1 ml moči a 1 ml roztoku. Směs byla promíchána. Vzniklý barevný komplex byl stanovován spektrofotometricky (*Helios α*) při vlnové délce 500 nm v čase 60 a 120 s. Standard byl připraven tak, že místo vzorku moči byl použit roztok standardu o koncentraci kreatininu 177 μ M. Z výsledného rozdílu absorbancí byla určena koncentrace kreatininu v moči.

3.3.10.2 Oxidace AAI myšími jaterními mikrosomy

Stanovení bylo prováděno v inkubačních směsích o celkovém objemu 250 μ l.

Složení inkubačních směsí:

1. fosfátový pufr (100 mM NaH₂PO₄), pH = 7,4
2. myší jaterní mikrosomy $c_{\text{proteinů}} = 1$ mg/ml
3. AAI (10 μ M) rozpuštěna v destilované vodě
4. NADPH (1 mM)

Příslušné složky byly do inkubačních směsí přidávány v takovém množství a takovém pořadí, jak je naznačeno výše. Pracovní postup byl dále analogický tomu, který je popsán v **kapitolách 3.3.5 a 3.3.5.1.**

3.3.10.3 Stanovení aktivity cytochromů P450 1A

Aktivita cytochromů P450 1A v jaterních mikrosomech izolovaných z transgenních myších modelů byla stanovena jako schopnost *O*-deethylovat 7-ethoxyresorufin (EROD, CYP1A), resp. *O*-demethylovat 7-methoxyresorufin (MROD, CYP1A2) metodou dle Burka a Mayera, která byla drobně modifikována.^{196,197} Vzniklá sloučenina, resorufin, je fluorescenčně aktivní a lze ji tedy určit luminiscenčními spektroskopickými metodami.

Složení reakčních směsí:

1. fosfátový pufr (100 mM KH_2PO_4), pH = 7,4
2. myší jaterní mikrosomy $c_{\text{proteinů}} = 0,444$ mg/ml
3. 7-ethoxyresorufin (7-methoxyresorufin) $c = 1,8$ μM
4. NADPH (0,51 mM)

Nejdříve byly myší jaterní mikrosomy ředěny pufrém na výslednou koncentraci proteinů 0,5 mg/ml. Byl přidán 7-ethoxyresorufin, resp. 7-methoxyresorufin tak, aby konečná koncentrace ve směsi byla 2 μM . Takto vzniklá směs byla inkubována po dobu 2 min. při laboratorní teplotě. Dále bylo pipetováno 150 μl směsi do mikrotitrační destičky a poté byl přidán roztok NADPH, který inicioval reakci.

Fluorescence byla měřena v deseti šedesátisekundových cyklech na luminiscenčním spektrofotometru (*PerkinElmer LS55*) při excitační vlnové délce 530 nm a emisní vlnové délce 585 nm.

Kalibrační roztoky byly připraveny ředěním resorufinu na výsledné koncentrace 0,4; 0,3; 0,2; 0,15; 0,1; 0,05; 0,025 a 0,0125 μM . Referentní vzorek tvořil pouze pufr.

4. VÝSLEDKY

4.1 Oxidace AAI potkaním jaterním mikrosomálním systémem

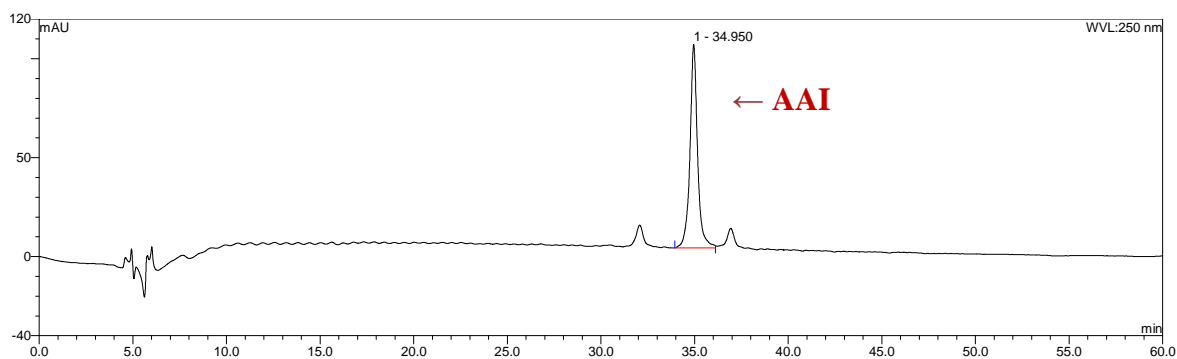
Aristolochová kyselina I je v organismu oxidačně detoxifikována na demetylovaný produkt, aristolochovou kyselinu Ia.^{70,114,149,157} V našich experimentech sledujících oxidaci AAI prováděných v rámci této diplomové práce jsme nejdříve použili jaterní mikrosomální frakce izolované z potkanů kontrolních (nepremedikovaných) a potkanů premedikovaných induktory cytochromů P450 (viz **kap. 3.3.1**).

Parentální molekula (AAI) a detoxifikační metabolit (AAIa) byly separovány pomocí RP-HPLC a detekovány při vlnové délce 250 nm.

4.1.1 Separace AAI a AAIa metodou RP-HPLC

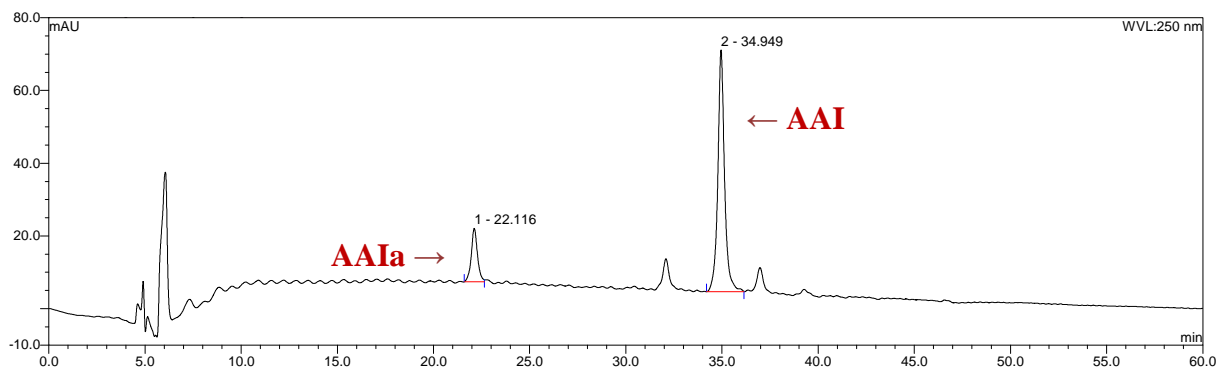
Separace AAI a AAIa metodou HPLC byla již popsána v dřívějších pracích,^{74,198} nicméně podmínky separace užívané v předchozích pracích byly drobně modifikovány. Takto modifikovaný postup uvádí **kap. 3.3.5.1**.

Ke studiu oxidace AAI na AAIa byly použity jaterní mikrosomální systémy potkanů kontrolních a potkanů, jimž byly podávány induktory cytochromů P450 (Sudan I, fenobarbital, ethanol a PCN). Aristolochová kyselina I byla do inkubací přidávána ve formě sodné soli rozpuštěné ve vodě.



Obr. 18: HPLC standardu AAI; experimentální podmínky HPLC: mobilní fáze 100 mM TEAA a 80 % acetonitril (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

Za daných podmínek byla aristolochová kyselina I eluována v retenčním čase 35 min., zatímco její demethylovaný metabolit (AAIa) byl eluován v retenčním čase 22.1 min. (**Obr. 18, 19**). Kontrolní stanovení byla provedena (i) bez mikrosomů, (ii) bez NADPH-generujícího systému a (iii) bez AAI. V kontrolních stanoveních detoxifikační metabolit nevznikal (**Obr. 18**). Ostatní detekované „peaky“ (eluované na počátku HPLC mezi 4. – 6. min.) byly přítomny i v ostatních vzorcích a jsou spojeny s provedením metody HPLC.

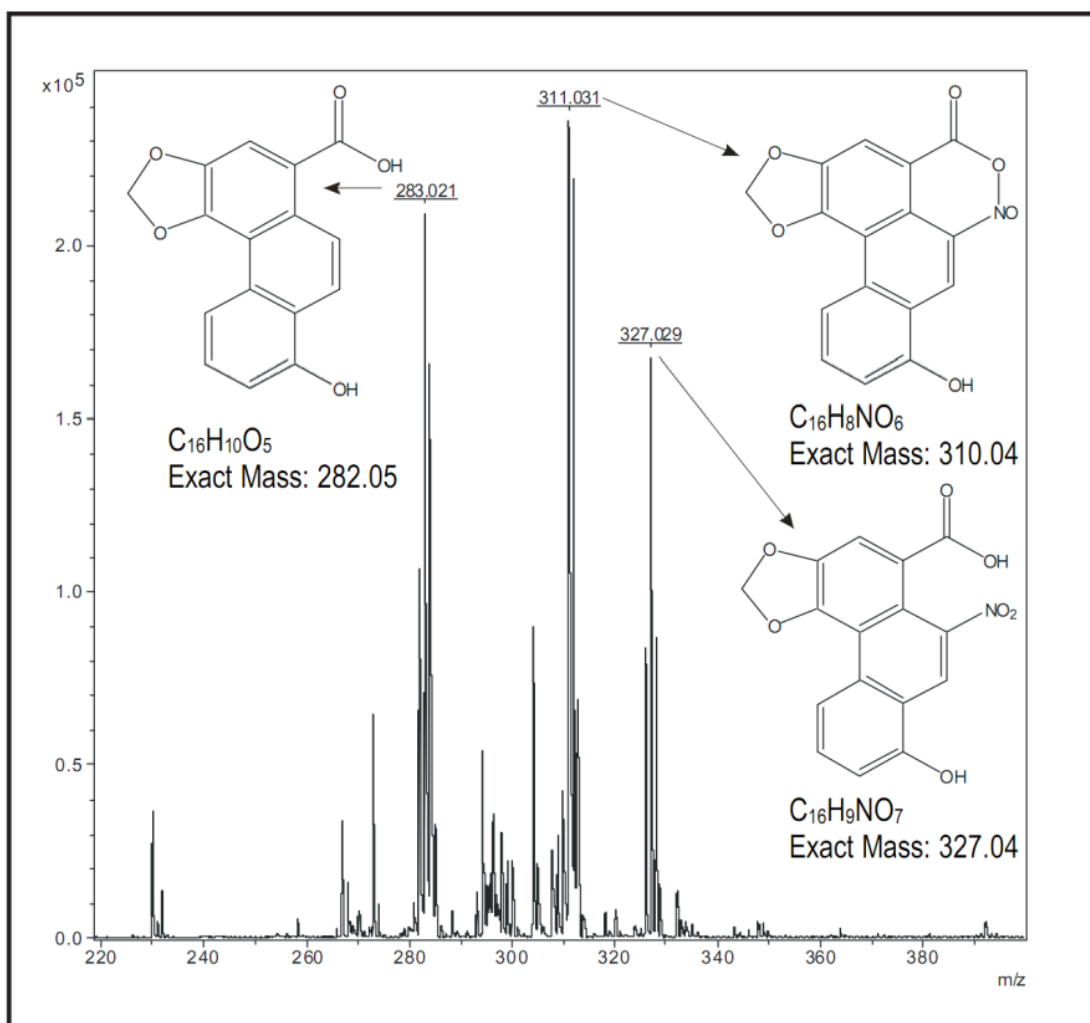


Obr. 19: HPLC reakční směsi sledující oxidaci AAI potkaním jaterním mikrosomálním systémem izolovaným z nepremedikovaných potkanů; experimentální podmínky HPLC: mobilní fáze 100 mM TEAA a 80 % acetonitril (80% A a 20% B → 40% A a 60% B), průtok 0,5 ml/min., kolona C18 Macherey-Nagel, teplota 35°C, aplikováno 20 µl vzorku, detekce při 250 nm

AAI byla oxidována na AAIa všemi potkaními mikrosomy. Jak ukazuje **Obr. 21**, množství vzniklého metabolitu se lišilo v závislosti na použitých mikrosomech, resp. v závislosti na obsahu cytochromů P450 daného premedikací potkanů induktory těchto enzymů. Nejefektivněji přeměňovaly AAI mikrosomy izolované z jaterní tkáně potkanů premedikovaných Sudanem I a fenobarbitalem. Tyto výsledky jsou detailně uvedeny v **kapitole 4.2.1**.

4.1.2 Identifikace AAIA

K identifikaci látky eluované v retenčním čase 22.1 (**Obr. 19**) byla použita hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF/TOF. Měření byla provedena doc. RNDr. Miroslavem Šulcem, Ph.D. Na základě hmotnostní analýzy byla tato látka identifikována jako aristolochová kyselina Ia (**Obr. 20**). „Peak“ na ose m/z 327,029 představuje molekulový ion $[M]^+$ AAIA. Dále byly také nalezeny molekulové ionty fragmentů AAIA (293,021 a 311,031).



Obr. 20: Identifikace AAIA metodou pozitivní MALDI-TOF/TOF

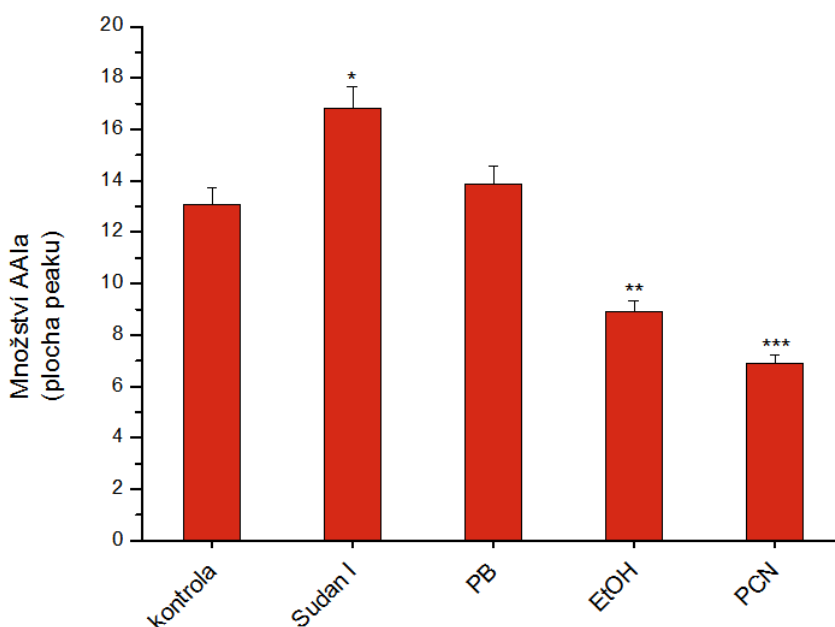
4.2 Určení potkaních cytochromů P450 participujících na oxidaci AAI na AAIa

K určení cytochromů P450, které participují na oxidační detoxifikaci AAI, byly použity selektivní induktory a inhibitory cytochromů P450. Mikrosomy kontrolních potkanů a potkanů premedikovaných Sudanem I, fenobarbitalem, ethanolem a PCN byly izolovány v naší laboratoři postupy uvedenými v kapitole 3.3.1.

4.2.1 Vliv induktorů cytochromů P450 na detoxifikaci AAI na AAIa

K poznání cytochromů P450 participujících na oxidaci aristolochové kyseliny I byly použity induktory vybraných cytochromů P450. Experimentální potkani byli premedikováni Sudanem I (indukce cytochromů P450 podrodiny 1A), fenobarbitalem (indukce cytochromů P450 podrodiny 2B a 2C), ethanolem (indukce CYP2E1) a PCN (indukce CYP3A).

Metodou RP-HPLC bylo stanovováno množství vzniklého metabolitu, resp. plocha „peaku“ odpovídající AAIa. Výsledky shrnuje Obr. 21.



Obr. 21: Oxidace AAI potkaními jaterními mikrosomy. Sloupce udávají množství vzniklé AAIa. Hodnoty jsou průměrem ze tří stanovení; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Složení inkubační směsi: 10 μM AAI; 0,5 $\text{mg}_{\text{proteinu}}/\text{ml}$ MS; NADPH-GS; fosfátový pufr pH 7,4

Jaterní mikrosomální systém potkanů premedikovaných Sudanem I a fenobarbitalem byl v oxidaci AAI na AAIA nejefektivnější. Množství AAIA oproti kontrole bylo v těchto vzorcích 1,3 násobné, resp. 1,1 násobné. Jaterní mikrosomy potkanů premedikovaných ethanolem a PCN přeměňovaly AAI oproti kontrolním vzorkům výrazně hůře. Z uvedených výsledků lze usuzovat, že se na oxidaci AAI na AAIA nejvíce podílí cytochromy P450 podrodiny 1A (které jsou indukované Sudanem I) a dále pak enzymy podrodiny 2B, popř. 2C (které jsou indukované fenobarbitalem). Participaci cytochromů P450 2E1 a 3A4 na detoxifikaci AAI lze s vysokou pravděpodobností vyloučit.

4.2.2 Vliv inhibitorů cytochromů P450 na oxidaci AAI na AAIA jaterními potkaními mikrosomy

Výsledky získané z experimentů využívajících jaterní mikrosomy potkanů premedikovaných induktory cytochromů P450, byly doplněny inhibičními studiemi, ve kterých byly užity jaterní mikrosomy kontrolních (nepremedikovaných) potkanů a selektivní inhibitory cytochromů P450. Byly použity inhibitory cytochromů P450 1A (α -naftoflavon), 1A2 (furafyllin), 2B (diamantan), 2C (sulfafenazol), 2D (chinidin), 2A a 2E1 (DDTC) a 3A (ketokonazol). Stanovován byl procentuální úbytek množství demetylovaného metabolitu oproti kontrole, ve které inhibitor nebyl přítomen (**Tab. 4**).

Tab. 4: Vliv inhibitorů cytochromů P450 na oxidaci AAI na AAIA potkaním mikrosomálním systémem

Inhibitory	CYP	vznik AAIA [% kontroly]
α -naftoflavon	1A1/2	84,7
Furafyllin	1A2	84,1
Diamantan	2B	NI ^a
Sulfafenazol	2C	68,0
Chinidin	2D	NI
DDTC	2E1, 2A	52,2
Ketokonazol	3A	90,2

Hodnoty jsou průměrem ze tří stanovení. Složení inkubační směsi: 10 μ M AAI; 10 μ M inhibitor; 0,5 mg_{proteinu}/ml MS; NADPH-GS; fosfátový pufr pH 7,4.

^a NI, neinhibuje.

Z inhibičních studií vyplývá, že CYP2B a 2D se na oxidaci AAI nepodílejí, neboť jejich specifické inhibitory neměly na tuto oxidaci žádný vliv. Zanedbatelná inhibice byla pozorovaná též při použití ketokonazolu, který inhibuje CYP3A. Výraznější inhibice oxidace AAI se projevila za použití inhibitorů cytochromů P450 podrodiny 1A a 2C. V rozporu s výsledky získanými v experimentech využívajících induktory cytochromů P450 se zdá, vzhledem k výrazné inhibici DDTC, že na oxidaci AAI by též mohly participovat cytochromy P450 podrodiny 2A a 2E1.

Interpretace inhibičních studií bývá v některých případech komplikována dalšími skutečnostmi, které je nutno vzít v úvahu. Takovými skutečnostmi jsou např. povaha substrátu a exprese daných cytochromů P450 v tkáni.¹⁹⁹ Z těchto důvodů jsme naši studii rozšířili o experimenty využívající rekombinantní potkaní cytochromy P450, které mohou výsledky z předchozích experimentů upřesnit.

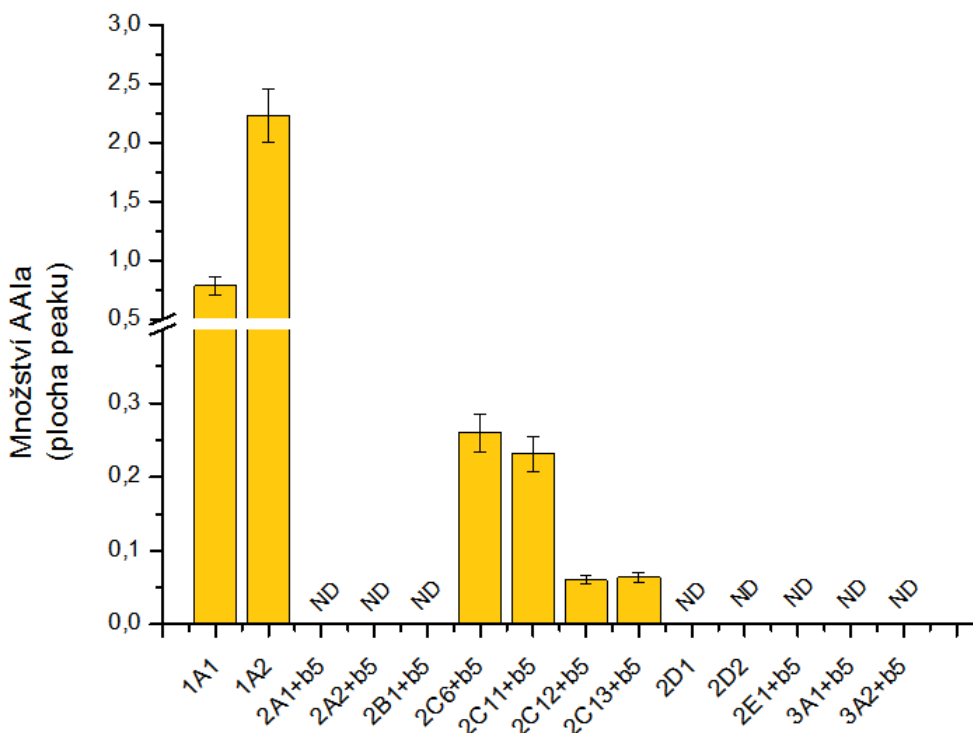
4.3 Oxidace AAI rekombinantními potkaními cytochromy P450

Pro upřesnění výsledků získaných z inhibičních studií a experimentů využívajících induktory cytochromů P450 byly v této sadě experimentů užity rekombinantní potkaní cytochromy P450 exprimované v Supersomech™.

4.3.1 Studium oxidace AAI rekombinantními potkaními cytochromy P450

Ke studiu oxidační detoxifikace AAI na AAIA byly užity následující potkaní cytochromy P450: 1A1, 1A2, 2A1, 2A2, 2B1, 2C6, 2C11, 2C12, 2C13, 2D1, 2D2, 2E1, 3A1, 3A2. Stanovená množství detoxifikačního metabolitu jsou uvedena na **Obr. 22**.

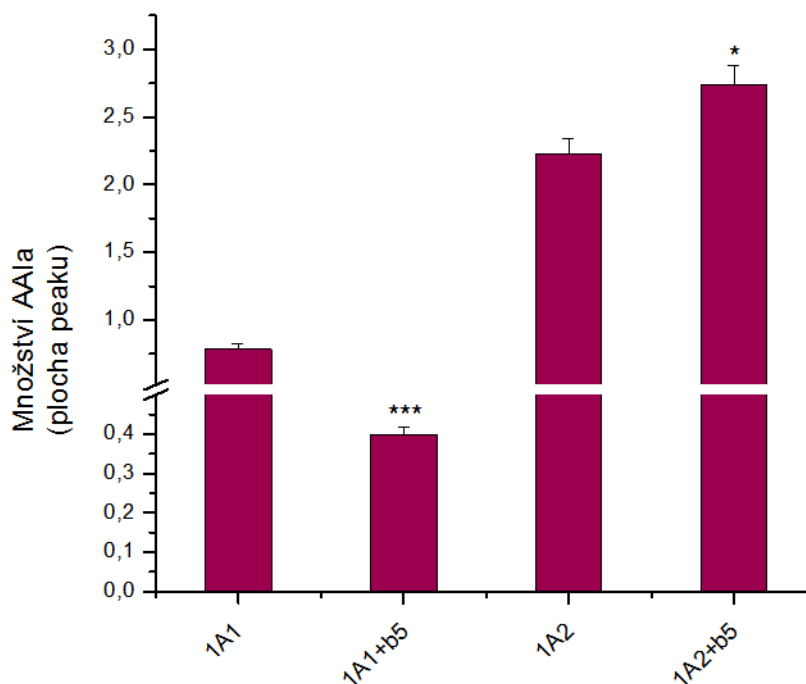
Uvedené výsledky potvrzují významnou roli cytochromů P450 1A1 a 1A2 v oxidaci AAI na AAIA. Majoritně se na oxidaci AAI podílejí zejména cytochrom P450 1A2, dále pak cytochrom P450 1A1. Vedle těchto enzymů nelze ani vyloučit participaci cytochromů P450 podrodiny 2C na oxidaci AAI. Tyto výsledky dále vyvracejí možný podíl CYP2E1 a 2A na detoxifikaci aristolochové kyseliny I.



Obr. 22: Oxidační detoxifikace AAI potkaními rekombinantními cytochromy P450; sloupce udávají množství vzniklé AAIa. Hodnoty jsou průměrem ze tří stanovení. Složení inkubační směsi: 10 μ M AAI; 50 nM CYP; NADPH-GS; fosfátový pufr pH 7,4. ND, nedetekováno.

4.3.2 Vliv cytochromu b_5 na oxidaci AAI cytochromy P450 1A1 a 1A2

V dalších experimentech byl studován vliv cytochromu b_5 na oxidaci AAI vybranými cytochromy P450. Cytochrom b_5 je protein přítomný v membránách endoplasmatického retikula a je fakultativní součástí systému oxidas se smíšenou funkcí. Navíc, cytochrom b_5 je přítomen v potkaním jaterním mikrosomálním systému použitým v našich experimentech a může tedy ovlivňovat aktivity některých cytochromů P450, včetně CYP1A1 a 1A2, v jejich efektivitě oxidovat substráty, včetně AAI.²⁰⁰⁻²⁰²

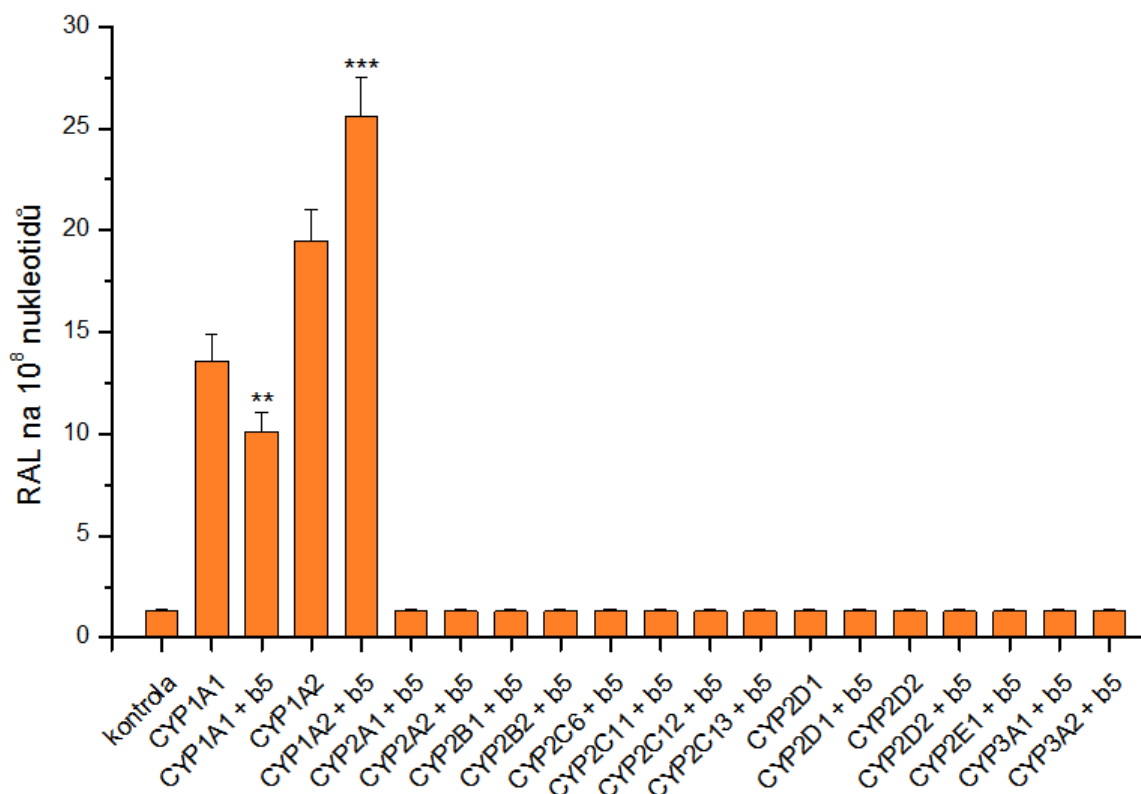


Obr. 23: Vliv cytochromu b₅ na oxidaci AAI potkaními cytochromy P450. Sloupce udávají množství vzniklé AAIa. Hodnoty jsou průměrem ze tří stanovení; *p<0,05, ***p<0,001. Složení inkubační směsi: 10 μM AAI; 50 nM CYP; 150 nM cyt b₅; NADPH-GS; fosfátový pufr pH 7,4.

Cytochrom b₅ zvýšil efektivitu CYP1A2 v oxidaci AAI na AAIa, nicméně efektivita CYP1A1 byla po přidavku stejného proteinu snížena (**Obr. 23**). Na základě těchto a předchozích výsledků lze soudit, že majoritní roli při detoxifikaci AAI potkaním mikrosomálním systémem hraje cytochrom P450 1A2.

4.4 Aktivace AAI potkaními rekombinantními cytochromy P450

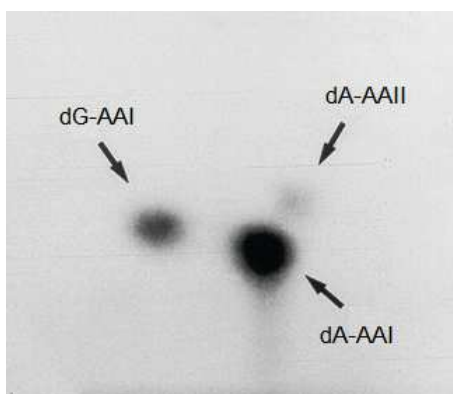
Z dřívějších prací vyplývá, že za anaerobních podmínek mohou cytochromy P450 podrodiny 1A také redukčně aktivovat AAI za vzniku reaktivních *species*, které tvoří stabilní adukty s DNA.^{62,70-72} Proto bylo v další části diplomové práce studováno, zda potkaní rekombinantní cytochromy P450 též redukuje AAI za tvorby aduktů s DNA (**Obr. 24, 25**). Zároveň byl sledován vliv cytochromu b₅ u jednotlivých cytochromů P450 na aktivaci AAI.



Obr. 24: Tvorba aduktů AAI s DNA po aktivaci potkaními rekombinantními CYP. Stanovení byla provedena metodou „³²P-postlabeling“. Hodnoty jsou průměrem ze tří stanovení. Složení inkubačních směsí: 50 pmol CYP v celkovém objemu inkubace 750 μ l; 0,5 mg DNA z telecího brzlíku; 0,5 mM AAI; 1mM NADPH; fosfátový pufr pH 7,4. Kontrolní stanovení bylo provedeno v přítomnosti samotné NADPH:CYP reductasy. RAL, relativní značení aduktů, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Všechny potkaní rekombinantní cytochromy P450 aktivovaly při anaerobních podmínkách AAI za vzniku aduktů s DNA. Jmenovitě byly detekovány adukty 7-(deoxyadenosin- N^6 -yl)aristolaktam I (dA-AAI), 7-(deoxyguanosin- N^2 -yl)aristolaktam I (dG-AAI) a 7-(deoxyadenosin- N^6 -yl)aristolaktam II (dA-AAII) (**Obr. 25**). Stejně adukty byly nalezeny též v tkáních pacientů trpících AAN.^{62,131} V kontrolním stanovení, které bylo provedené bez cytochromů P450, pouze v přítomnosti NADPH:CYP reductasy, byla detekována nízká hladina aduktů AAI s DNA daná aktivitou této reductasy. Stejně množství aduktů bylo nalezeno i za přítomnosti většiny cytochromů P450 (**Obr. 24**).

V případě cytochromů P450 podrodiny 1A však bylo tvořeno množství aduktů AAI s DNA výrazně vyšší, zejména v případě CYP1A2. Přidání cytochromu b₅ zvýšilo efektivitu CYP1A2 aktivovat AAI, v případě systému obsahujícím CYP1A1 bylo zjištěno nižší množství vzniklých aduktů AAI s DNA. Tyto výsledky potvrzují participaci cytochromů P450 1A1 a především 1A2 na redukční aktivaci AAI.



Obr 25: Autoradiogram aduktů AA s DNA („³²P-postalabeling“)

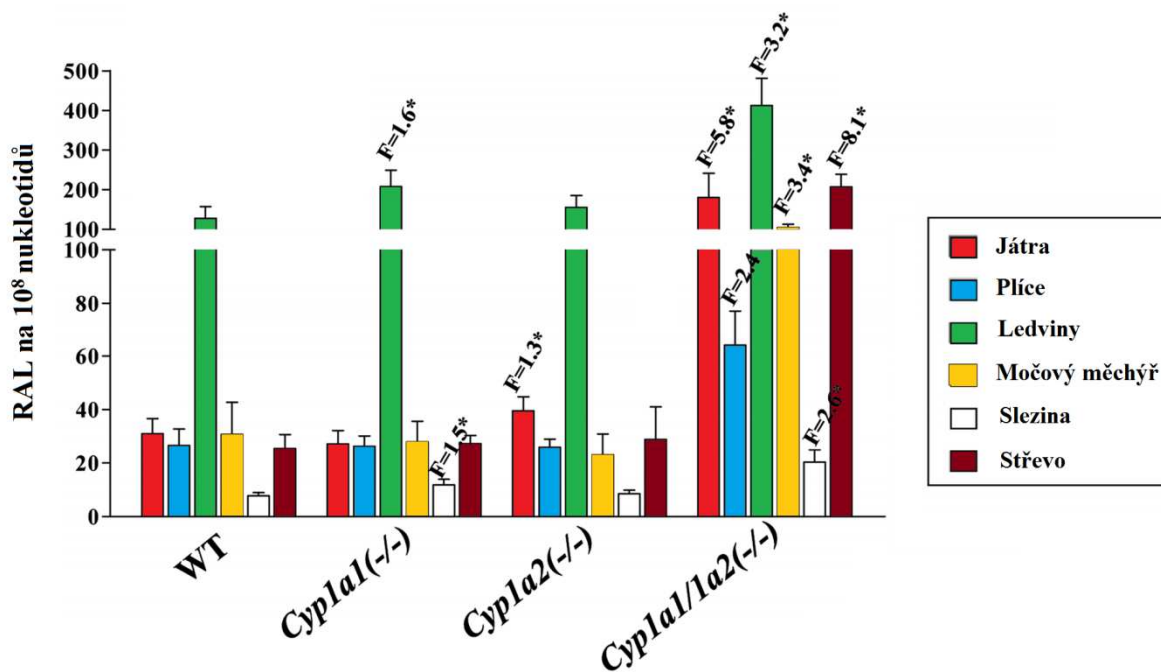
4.5. Studium oxidace a aktivace AAI cytochromy P450 *in vivo*

Ke studiu metabolismu AAI *in vivo* byly provedeny experimenty s geneticky upravenými liniemi myší, u kterých byly „deletovány“ geny pro cytochromy P450 1A1 a 1A2. Byly využity následující linie: *Cyp1a1(-/-)*,¹⁸⁹ *Cyp1a2(-/-)*¹⁹⁰ a *Cyp1a1/1a2(-/-)*.¹⁹¹ Kontrolní linie představovaly myši bez genetické úpravy, které obsahovaly jak *Cyp1a1*, tak *Cyp1a2*. K dispozici byla jak zvířata, kterým byla podávána AAI, tak myši, které AAI neobdržely (viz **kap. 3.3.3**).

4.5.1 Aktivace AAI in vivo

Nejprve byly provedeny experimenty, které sledovaly tvorbu aduktů AAI s DNA *in vivo*, a to za použití výše uvedených myších geneticky upravených modelů. Sledován byl vznik aduktů s DNA v jednotlivých tkáních izolovaných z orgánů myší, kterým byla podávána AAI. V experimentech byla provedena analýza aduktů AAI s DNA v játrech, plicích, ledvinách, močovém měchýři, slezině a ve střevě.

Ve všech orgánech byly detekovány adukty AAI s DNA, dA-AAI, dG-AAI a dA-AAII, které jsou popsány výše a které byly nalezeny též v tkáních pacientů s AAN.^{62,131} Nejvyšší tvorba aduktů AAI s DNA byla pozorována v ledvinné tkáni, v ostatních orgánech byly adukty tvořeny ve významně nižších množstvích. Nicméně, v myší linii *Cyp1a1/1a2(-/-)*, kde absentovaly cytochromy P450 1A1 a 1A2, byl vznik aduktů několikanásobně vyšší, než v orgánech kontrolních zvířat. A to ve všech orgánech. Pokud tedy chybí geny *Cyp1a1* a *Cyp1a2*, a nejsou tedy exprimovány příslušné cytochromy P450, je přítomno více AAI, která není efektivně oxidována. Tato AAI tedy může být redukčně aktivována za vzniku aduktů s DNA (Obr. 26). Naše další experimenty byly zaměřeny na ověření tohoto předpokladu.

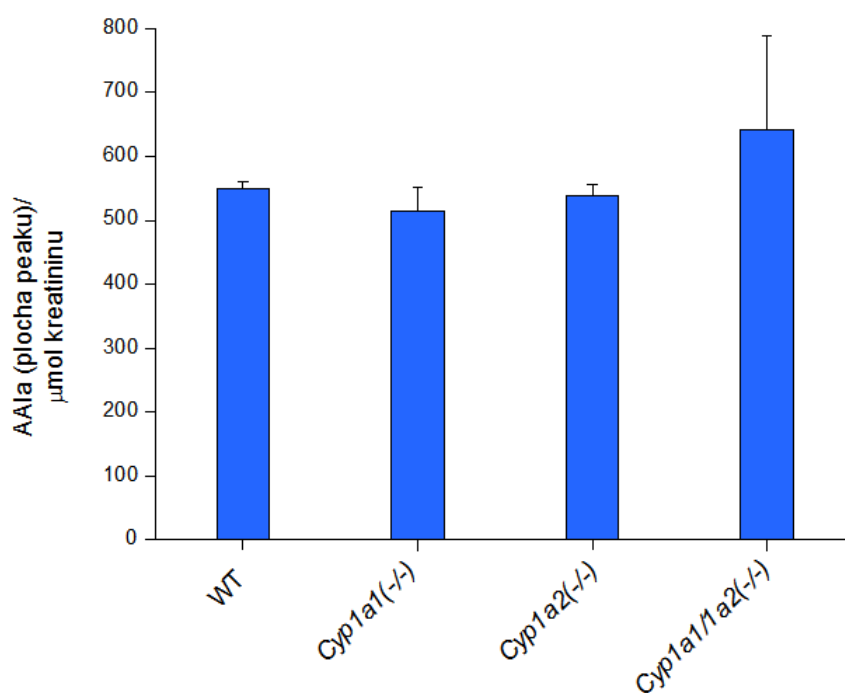


Obr. 26: Tvorba aduktů AAI s DNA v orgánech geneticky modifikovaných myší, kterým byla podávána AAI. Stanovení byla provedena metodou „³²P-postlabeling“. Hodnoty jsou průměrem ze tří stanovení; *p<0,05. RAL, relativní značení aduktů.

F, faktor představující násobek množství aduktů oproti množství aduktů u WT myší. Tvorba aduktů byla stanovena v játrech, plicích, ledvinách, močovém měchýři, slezině a ve střevě.

4.5.2 Analýza AAIA v moči myších linií

V další sadě experimentů byla analysována metodou RP-HPLC přítomnost AAIA v moči geneticky upravených myší, kterým byla podávána AAI. Postup přípravy vzorku je popsán v **kap. 3.3.10.1**. Vzorky moči byly „sbírány“ po dobu 24 hodin. Množství AAIA bylo vztaženo na koncentraci kreatininu, která byla stanovena metodou popsanou v **kap. 3.3.10.1**.



Obr. 27: Stanovení množství AAIA v moči myších modelů vystavených účinku AAI.

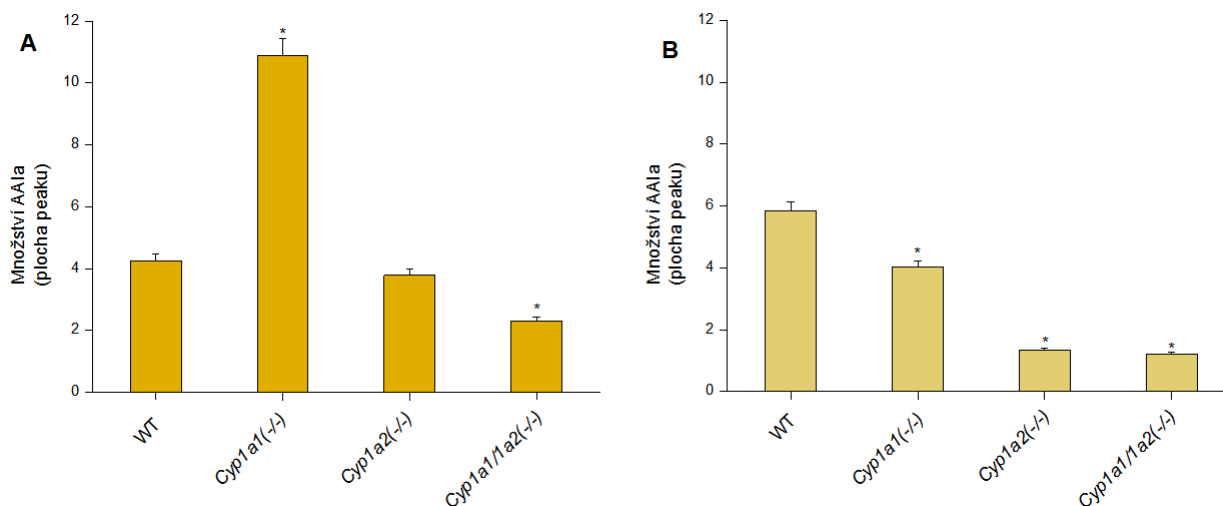
Sloupce udávají množství vzniklé AAIA. Hodnoty jsou průměrem ze čtyř stanovení. Příprava vzorku je popsána v **kap. 3.3.10.1**.

Aristolochová kyselina Ia byla nalezena ve všech stanovovaných vzorcích moči užitých experimentálních modelů. Nicméně mezi jednotlivými vzorky moči použitých myší nebyl zjištěn žádný významný rozdíl v jejím množství (**Obr. 27**).

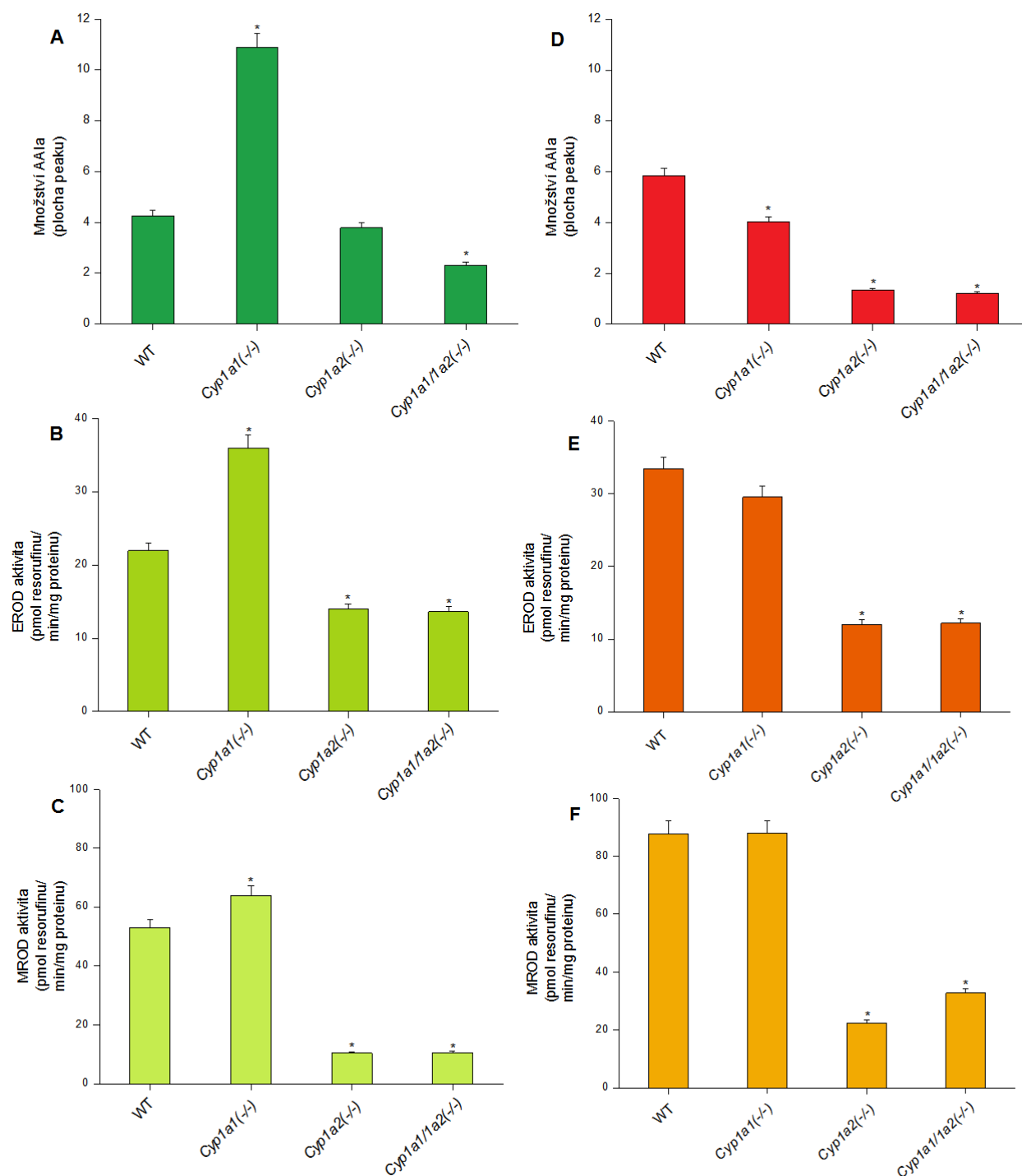
4.5.3 Oxidace AAI jaterními mikrosomy myších linií

V dalších experimentech byla sledována oxidace AAI mikrosomy izolovanými z linií myší, které byly geneticky upraveny (viz **kap. 3.3.4**). Použity byly mikrosomy jak zvířat, kterým byla podávána AAI, tak myší, které AAI nedostávaly. Množství AAIa bylo stanovováno metodou RP-HPLC, jak je popsáno výše (**kap. 3.1.5.1**).

Mikrosomy všech použitých myších modelů oxidovaly AAI na AAIa (**Obr. 28**). Nejefektivněji oxidovaly AAI jaterní mikrosomy myší linie *Cyp1a1(-/-)*, kterým nebyla podávána AAI (**Obr. 28A**). Vzhledem k tomu, že u této linie chyběl gen *Cyp1a1*, a tedy nebyl ani exprimován příslušný cytochrom P450, lze se domnívat, že v tomto případě byla absence CYP1A1 specificky kompenzována vyšší expresí cytochromu P450 1A2. Ten pak efektivně AAI oxidoval. Tento předpoklad byl potvrzen stanovením aktivit CYP1A1 a 1A2 za využití markerových substrátů těchto cytochromů P450 (viz níže). Oxidace AAI mikrosomy dalších geneticky modifikovaných linií [*Cyp1a2(-/-)* a *Cyp1a1/1a2(-/-)*] byla méně efektivní ve srovnání s jaterními mikrosomy kontrolních zvířat. Jaterní mikrosomy myší linie *Cyp1a1/1a2(-/-)*, kde byly „deletovány“ oba isoenzymy cytochromů P450 podrodiny 1A, oxidovaly AAI na AAIa s nejmenší účinností (**Obr. 28**).



Obr. 28: Oxidace AAI jaterními mikrosomy z myších modelů, kterým nebyla podávána AAI (A) a kterým AAI podávána byla (B). Sloupce udávají množství vzniklé AAIa. Hodnoty jsou průměrem ze tří stanovení; * $p < 0,01$. Složení inkubační směsi: 10 μ M AAI; 1 $\text{mg}_{\text{proteinu}}/\text{ml}$ MS; 1 mM NADPH; fosfátový pufr pH 7,4



Obr. 29: Oxidace AAI na AA1a myšimi mikrosoy a stanovení aktivity CYP1A1 a CYP1A2. A-C, myši, kterým AAI nebyla podána; D-F, myši vystavené působení AAI. Oxidace AAI na AA1a (A, D). Stanovení aktivity CYP1A1 metodou EROD (B, E) a MROD (C, F).

Výsledky získané v experimentech sledujících oxidaci AAI na AAIA jaterními mikrosomy myších linií vystavených působení AAI byly zcela rozdílné. Jaterní mikrosomy těchto transgenních myší oxidovaly AAI na AAIA jak ve srovnání s kontrolou (WT myši), tak ve srovnání se zvířaty, jimž nebyla AAI podávána, daleko méně (**Obr. 28B**). Nejméně detoxifikovaly AAI jaterní mikrosomy myších linií *Cyp1a2(-/-)* a *Cyp1a1/1a2(-/-)*, podobně jako v případě zvířat, která nebyla vystavena působení AAI. Nejméně efektivně oxidovaly AAI jaterní mikrosomy izolované z geneticky modifikované linie *Cyp1a1(-/-)*, kde chyběl CYP1A1, nicméně míra oxidace byla menší než u kontroly.

Zajímavé je, že podání AAI kontrolním zvířatům vedlo k 1,4 násobně vyšší efektivitě jaterních mikrosomů oxidovat AAI na AAIA než byla efektivita mikrosomů zvířat, kterým nebyla AAI podána. Naopak, podání AAI vedlo u jaterních mikrosomů všech geneticky upravených myších modelů ke snížení jejich efektivity oxidačně demethylovat AAI na AAIA.

Z výsledků vyplývá, že stanovené množství vzniklé AAIA v zásadě korelovalo s aktivitami CYP1A1 a CYP1A2, které byly v jednotlivých myších mikrosomech určeny za užití markerových substrátů. Jmenovitě šlo o *O*-deethylaci 7-ethoxyresorufinu (pro CYP1A1/2, EROD) a *O*-demethylaci 7-methoxyresorufinu (pro CYP1A2, MROD).

Určené aktivity CYP1A1/2 v případě EROD odpovídaly zjištěné efektivitě myších mikrosomů (isolovaných jak ze zvířat, kterým byla podána AAI, tak těm, kterým podána nebyla) oxidovat AAI na AAIA (**Obr. 29B a E**). Nejvyšší aktivita CYP1A1/2 byla zjištěna v jaterních mikrosomech myších linií *Cyp1a1(-/-)*, kterým nebyla podána AAI (**Obr. 29B**), nicméně podobně vysokou aktivitu vykazovaly též mikrosomy myších linií WT a *Cyp1a1(-/-)*, kterým AAI podávána byla (**Obr. 29E**). Vysokou efektivitu jaterních mikrosomů v oxidaci AAI na AAIA myších linií *Cyp1a1(-/-)*, které nebyly vystaveny působení AAI, ukazují také aktivity CYP1A2 v těchto mikrosomech určené MROD (**Obr. 29C**). Nejvyšší aktivita tohoto cytochromu P450 byla zjištěna právě v mikrosomech myší linie *Cyp1a1(-/-)*.

Překvapivé výsledky byly získány v případě stanovení aktivity CYP1A2 v myších jaterních mikrosomech izolovaných ze zvířat, kterým byla podána AAI. Nejvyšší aktivita CYP1A2 byla nalezena v mikrosomech „divoké“ linie WT a *Cyp1a1(-/-)*, a to i ve srovnání se zvířaty, které nebyly působení AAI vystaveny (**Obr. 29F**). Tyto výsledky signalisují, že podání AAI myším geneticky modifikovaným modelům vedlo k výrazné indukci cytochromu P450 1A2. Výsledky získané ze studií využívajících markerové substráty dále

ukazují, že podání AAI myší linii WT pravděpodobně vedlo ke zvýšené expresi cytochromů P450 1A1 a 1A2. Tomu odpovídají též výsledky získané z oxidace AAI na AAIA myšími mikrosomy.

Získané výsledky potvrzují, že AAI je oxidována na AAIA cytochromy P450 1A1 a především 1A2 nejen *in vitro*, ale též *in vivo*.

5. DISKUSE

Aristolochová kyselina (AA) je prokazatelným lidským karcinogenem³⁸, který je přítomný v rostlinách čeledi podražcovitých (*Aristolochiaceae*).^{38,54} V rostlinách je obsažena ve směsi spolu s dalšími strukturálně příbuznými kyselinami. Nejvíce je ve směsi zastoupena aristolochová kyselina I (AAI) a aristolochová kyselina II (AAII) (**obr.5**).⁵⁴ Pro své protizánětlivé účinky byly aristolochové kyseliny (resp. rostliny čeledi *Aristolochiaceae*) využívány v tradiční medicíně již od starověku.^{76,77} Vedle těchto zdravých prospěšných vlastností jsou však AA také prokazatelnými mutageny a karcinogeny^{38,100,101} s velice silnými nefrotoxickými vlastnostmi.^{56,91}

Mnoho vědeckých studií ukázalo, že AA způsobují závažné renální onemocnění známé jako nefropatie vyvolaná aristolochovou kyselinou (AAN).^{62,63,70,131} Po metabolické aktivaci v organismu jsou navíc schopny vytvářet velice stabilní kovalentní adukty s DNA, které vedou ke vzniku pozdní komplikace AAN, a to k vývoji nádorů v urotheliální tkáni. Aristolochové kyseliny jsou dále podezírány i z participace na vývoji dalšího ledvinného onemocnění, tzv. balkánské endemické nefropatie (BEN).^{106,123,124,131}

Zvláštním znakem AAN je, že zdaleka ne všichni pacienti vystaveni účinkům AA onemocněli AAN a byli postiženi pozdějšími malignacemi.⁷⁰ Příčin tohoto jevu může být více. Jednou z příčin této skutečnosti mohou být interindividuální rozdíly v aktivitách enzymů biotransformujících AA, polymorfismus těchto enzymů a jejich další ovlivnění. S velkou pravděpodobností mohou také být jednou z příčin rozdíly v expresních hladinách biotransformačních enzymů mezi jednotlivci, kteří byli vystaveni působení AA.⁶⁹

Problematika toxicity a karcinogenity AA je v naší laboratoři studována již řadu let. Předkládaná diplomová práce tedy navazuje na výsledky získané z předchozích studií.^{74,114,198}

V předkládané diplomové práci byly hledány enzymy, které se podílejí na oxidační detoxifikaci AAI za vzniku AAIIa. K odhalení těchto enzymů bylo použito několik přístupů. Vedle studií využívajících induktory a specifické inhibitory cytochromů P450 a rekombinantní potkaní cytochromy P450 byly užity i speciální transgenní myší modely.

Prvním přístupem k odhalení těchto cytochromů P450, které participují na oxidaci AAI, bylo použití potkaních mikrosomů izolovaných ze zvířat, kterým byly podávány induktory cytochromů P450. Byl sledován vliv premedikace zvířat Sudanem I (který indukuje CYP1A), fenobarbitalem (který indukuje CYP2B a CYP2C), ethanollem (který

indukuje CYP2E1) a PCN (který indukuje CYP3A). Nejefektivněji přeměňovaly AAI na AAIA jaterní mikrosomy z potkanů premedikovaných Sudanem I, následované mikrosomy z potkanů premedikovaných fenobarbitalem. Premedikace potkanů PCN podobně jako ethanolom vedla ke snížení účinnosti oxidace AAI potkaními mikrosomy oproti kontrole. Na základě těchto skutečností jsme proto nejdříve předpokládali, že na detoxifikaci AAI se podílí cytochromy P450 podrodiny 1A, případně podrodiny 2C a 2B.

K upřesnění uvedené premisy byly použity specifické inhibitory cytochromů P450. Inhibiční studie byly provedeny za použití α -naftoflavonu (který inhibuje CYP1A), furafyllinu (který inhibuje CYP1A2), diamantanu (který inhibuje CYP2B) sulfafenazolu (inhibujícího CYP2C), chinidinu (který inhibuje CYP2D), DDTC (který inhibuje CYP2E1) a ketokonazolu (inhibice CYP3A). Diamantan ani chinidin neinhibovaly oxidaci AAI na AAIA. Velice zajímavé výsledky byly získány při inhibici způsobené DDTC, který inhibuje cytochrom P450 2E1. Tato inhibice byla výrazná, a to i navzdory předchozím výsledkům, které nenaznačovaly, že by CYP2E1 v oxidaci AAI hrál významnou roli. Podle těchto výsledků by se ovšem mohl na oxidační detoxifikaci AAI podílet i cytochrom P450 2E1. Uvedená diskrepance může být způsobena nespecificitou DDTC vůči reakcím katalysovaným cytochromy P450. Méně výrazná inhibice, než bychom očekávali, byla pozorována u cytochromů P450 1A1 a 1A2 a také podrodiny 2C. Uvedené výsledky nicméně podporují předpoklad, že na oxidaci AAI na AAIA se s velkou pravděpodobností podílí CYP1A a 2C.

Naneštěstí je interpretace inhibičních studií někdy komplikovaná a musí se při ní brát v úvahu také další faktory, např. povaha substrátu či exprese cytochromů P450 v tkáni. U některých xenobiotik byl popsán právě vliv exprese cytochromů P450 na inhibiční efekt. Inhibitory cytochromů P450 zpravidla reagují s enzymem jako kompetující substráty, to je další faktor, který znesnadňuje vyhodnocování inhibičních studií.^{161,199} Jak je již také zmíněno výše, DDTC nemusí specificky působit pouze na CYP2E1.²⁰³

Následujícím krokem při zjištění, které cytochromy P450 detoxifikují AAI za vzniku AAIA, bylo využití potkaních rekombinantních cytochromů P450. Výsledky získané s těmito enzymy potvrzují participaci CYP1A1 a především 1A2 na oxidační detoxifikaci AAI. Určitou roli v tomto ději hrají též cytochromy P450 podrodiny 2C. Participace CYP2E1 ovšem byla zcela vyloučena.

Na modelu potkaních rekombinantních cytochromů P450 byl také studován vliv cytochromu b₅ na oxidaci AAI cytochromy P450 1A1 a 1A2. Důvod byl zřejmý.

Cytochrom b_5 je přítomen v membránách endoplasmatického retikula a zároveň je fakultativní složkou systému oxidace se smíšenou funkcí. Bylo tedy sledováno, zda tento protein může nějakým způsobem ovlivnit detoxifikaci AAI cytochromy P450 podrodiny 1A. V experimentech bylo zjištěno, že cytochrom b_5 zvýšil schopnost CYP1A2 oxidovat AAI na AAIA, zatímco v případě CYP1A1 byla tato schopnost snížena. Takové výsledky ukazují na majoritní participaci CYP1A2 při oxidační detoxifikaci AAI na AAIA u potkana *in vitro*. To také odpovídá výsledkům získaným z experimentů sledujících oxidaci AAI potkaními rekombinantními cytochromy P450 a potkaními mikrosomy izolovanými ze zvířat premedikovaných Sudanem I, induktorem cytochromů P450 podrodiny 1A.

Vedle oxidační detoxifikace AAI byla v předkládané diplomové práci sledována také metabolická aktivace AAI, která probíhá redukčními reakcemi. Tato redukční aktivace AAI vede ke vzniku kovalentních aduktů AAI s DNA. Jedná se zejména o adukty s deoxyadenosinem, 7-(deoxyadenosin- N^6 -yl)aristolaktam I (dA-AAI) a 7-(deoxyadenosin- N^6 -yl)aristolaktam II (dA-AAII), a s deoxyguanosinem, 7-(deoxyguanosin- N^2 -yl)aristolaktam I (dG-AAI), které byly nalezeny u pacientů trpících AAN a identifikovány již dříve.^{62,131} Metabolická aktivace AAI je sice v organismu zprostředkována především enzymem NAD(P)H:chinonoxidoreduktasou (NQO1), nicméně v jaterních mikrosomech na této aktivaci participují také cytochromy P450.^{115,147} Z tohoto důvodu bylo studium metabolismu AAI doplněno též o experimenty sledující tvorbu aduktů AAI s DNA, které ukazují, jaké cytochromy P450 se podílejí na redukční aktivaci AAI. K těmto experimentům byly rovněž použity potkaní rekombinantní cytochromy P450, ale inkubace byly provedeny za anaerobních podmínek. AAI byla aktivována všemi použitými potkaními rekombinantními cytochromy P450 a ve všech případech byly detekovány adukty AAI s DNA. Jednalo se o adukty stejné s adukty, které byly objeveny též v tkáních pacientů postižených AAN.^{62,131} Většina použitých cytochromů P450 (CYP2A1/2, CYP2B1/2, CYP2C6/11/12/13, CYP2D1/2, CYP2E1 a 3A1/2) aktivovala AAI za vzniku nízké hladiny aduktů s DNA, stejně jako v kontrolním stanovení, ve kterém nebyl přítomen žádný cytochrom P450, ale pouze NADPH:CYP reduktasa. Lze tedy soudit, že na redukční aktivaci se cytochromy P450 podrodiny 2A, 2B, 2C, 2D, 3A a cytochrom P450 2E1 nepodílí.

Naopak nejefektivněji aktivovaly AAI cytochromy P450 podrodiny 1A. Detekovaná hladina aduktů AAI s DNA byla jak v případě CYP1A1, tak i CYP1A2 výrazně vyšší než u kontrolních Supersomů™ obsahujících pouze NADPH:CYP

reduktasu. V aktivaci AAI byl účinnější cytochrom P450 1A2. V experimentech, kde byla AAI redukčně aktivována, byl také sledován vliv cytochromu b₅ na tuto aktivaci. Zatímco přidání cytochromu b₅ zvýšilo efektivitu CYP1A2 aktivovat AAI, přídavek stejného proteinu snížil efektivitu CYP1A1 redukčně aktivovat AAI za vzniku aduktů s DNA. Tyto výsledky ukazují, že potkaní cytochromy P450 1A1 a 1A2 se podílí nejen na oxidační detoxifikaci AAI za vzniku AAIA, ale také na redukční aktivaci AAI, která resultuje ve tvorbu kovalentních aduktů AAI s DNA.

Úloha cytochromů P450 1A1 a 1A2 jak v oxidační detoxifikaci, tak redukční aktivaci AAI může být vysvětlena více způsoby. Jedna hypotéza je taková, že tuto rovnováhu ovlivňuje hladina kyslíku v tkáni (*in vivo*), resp. v inkubačních směsích (*in vitro*). Několik vědeckých studií popsalo, že jednou ze základních vlastností nádorových buněk je schopnost přežít hypoxické podmínky a že hypoxie je významným faktorem regulujícím růst tumorů.^{204,205} Jedním ze znaků chronických ledvinných onemocnění, včetně AAN, je také *tubulointersticiální hypoxie* a zdá se, že právě ta vede k vývoji konečné fáze AAN, navzdory tomu, že pacient již není vystaven působení AA.⁹⁰ Zdá se tedy, že hladina, resp. koncentrace kyslíku je významným regulačním faktorem, který ovlivňuje rovnováhu mezi nitroredukcí a oxidační demethylací AAI. Tím také určuje stupeň toxicity (resp. genotoxicity) AAI v organismu. Získané výsledky vedou k hypotéze, že v případě nitroredukce AAI za anaerobních podmínek se AAI chová jako ligand hemového železa CYP1A1/2. Ovšem v případě demethylace AAI za aerobních podmínek se AAI chová jako klasický substrát těchto enzymů, které využívají právě jeden atom molekulárního kyslíku k *O*-demethylaci AAI za vzniku AAIA.

V předkládané diplomové práci jsme prokázali, že na oxidační detoxifikaci AAI se *in vitro* podílí zejména cytochromy P450 1A1 a 1A2. Ve druhé části této diplomové práce jsme se pak soustředili na zjištění, zda tyto enzymy detoxifikují AAI také *in vivo*. K těmto experimentům byly užity speciální transgenní myší modely, jimž byly „deletovány“ geny pro CYP1A1 a 1A2: *Cyp1a1(-/-)*, *Cyp1a2(-/-)* a *Cyp1a1/1a2(-/-)*. K dispozici byly dvě skupiny těchto modelů: jedné skupině byla podána AAI, zatímco druhé nikoliv.

Prvním krokem ke zjištění, zda se cytochromy P450 1A1 a 1A2 podílí na detoxifikaci AAI *in vivo*, bylo stanovení aduktů AAI s DNA metodou „³²P-postlabeling“ v tkáních různých orgánů myších modelů, kterým byla podána AAI. Ve všech orgánech (játra, plíce, ledviny, močový měchýř, slezina a střevo) byly nalezeny adukty AAI s DNA. Množství aduktů s DNA bylo v ledvinách výrazně vyšší, než ve všech ostatních orgánech u

všech transgenních modelů, včetně myší linie WT. V případě myší linie *Cyp1a1/1a2(-/-)*, ve které absentovaly oba cytochromy P450, bylo ovšem nalezeno výrazně vyšší množství aduktů AAI s DNA ve všech orgánech oproti ostatním liniím. Nejeefektivnější v aktivaci AAI byla sice opět ledvinná tkáň, nicméně množství aduktů v ostatních tkáních byla též velmi vysoká. Tyto výsledky nás vedly k následujícímu předpokladu: pokud jsou „deletovány“ geny *Cyp1a1* a *Cyp1a2*, a tedy nejsou ani exprimovány příslušné cytochromy P450, je snížena míra oxidace AAI a nepřeměněná AAI může být redukčně aktivována za vzniku aduktů s DNA.

Dalším krokem bylo ověření a potvrzení tohoto předpokladu. Prvním přístupem bylo stanovení množství AAIA v moči transgenních myších liniích, kterým byla podávána AAI. Stanovené množství demetylovaného metabolitu AAI se překvapivě mezi sebou výrazně nelišilo, nicméně je nutné si uvědomit, že volná AAIA v moči nepředstavuje veškerou detoxifikovanou AAI. Množství AAIA v moči je též ovlivněno jejím dalším osudem v organismu. Z předchozích studií vyplývá, že AAIA může dále v konjugáční fázi biotransformace tvořit konjugáty s endogenními látkami, jako jsou glukosiduronát, sulfát a acetát tohoto metabolitu.¹⁵⁷

Dalším přístupem k ověření výše zmíněného předpokladu bylo sledování oxidace AAI na AAIA myšími jaterními mikrosomy izolovanými jak ze zvířat, kterým byla podávána AAI, tak ze zvířat bez podání AAI. Získané výsledky přinesly velice zajímavé poznatky. Všechny použité mikrosomy demetylovaly AAI za vzniku AAIA, přičemž nejeefektivnější v této demethylaci byly mikrosomy izolované z myší linie *Cyp1a1(-/-)* bez podání AAI, kde byl „deletován“ gen *Cyp1a1*, a nebyl tedy exprimován CYP1A1. V případě této vysoké efektivity v oxidaci AAI mikrosomy myší linie *Cyp1a1(-/-)* se nabízí vysvětlení, že by absence CYP1A1 mohla být kompenzována vyšší expresí CYP1A2. K takovému závěru jsme došli také stanovením aktivity cytochromů P450 1A1 a 1A2 za využití markerových substrátů. Aktivity zmíněných cytochromů P450 byly stanoveny *O*-deethylací 7-ethoxyresorufinu (pro CYP1A1/2, EROD) a *O*-demethylací 7-methoxyresorufinu (CYP1A2, MROD). Právě stanovené aktivity CYP1A1 a zejména CYP1A2 ukazují, že chybějící CYP1A1 v linii *Cyp1a1(-/-)* by mohl být kompenzován vyšší expresí a aktivitou CYP1A2. Vznik AAIA v liniích *Cyp1a1/1a2(-/-)*, kde chyběly oba typy cytochromů P450, byl pravděpodobně katalyzován jinými enzymy (např. cytochromy P450 podrodiny 2C).

V jaterních mikrosomech linií, kde absentoval cytochrom P450 1A2 (u zvířat, kterým byla podávána AAI i těm, kterým nebyla podávána), byla zjištěna jejich menší efektivita v oxidaci AAI na AAIA oproti kontrolám, v případě linie *Cyp1a2(-/-)* vystavené působení AAI byl tento rozdíl oproti oxidaci kontrolními mikrosomy dokonce velice výrazný. To poukazuje na mimořádnou roli cytochromu P450 1A2 v oxidační detoxifikaci AAI na AAIA. Data ze stanovení aktivity CYP1A2 pomocí markerové reakce (MROD) navíc poukazují na to, že podání AAI zvířatům linií *Cyp1a1(-/-)* a WT pravděpodobně vede k indukci cytochromu P450 1A2, protože aktivity CYP1A2 byly u těchto linií velmi vysoké.

Dalším zajímavým zjištěným poznatkem byla skutečnost, že podání AAI myším kontrolní linie (WT) vedlo ke zvýšení efektivity jaterních mikrosomů oxidovat AAI na AAIA, kdežto v případě mikrosomů geneticky modifikovaných myších linií [*Cyp1a1(-/-)*, *Cyp1a2(-/-)* a *Cyp1a1/1a2(-/-)*] vedlo podání AAI k výraznému poklesu aktivity mikrosomů v tvorbě AAIA. Lze tedy soudit, že vystavení u kontrolních zvířat působení AAI vedlo k indukci, resp. vyšší expresi cytochromů P450 1A1 a 1A2. Tyto předpoklady jsou podpořeny aktivitami CYP1A1 a 1A2 nalezenými v jednotlivých jaterních mikrosomech (EROD a MROD).

Ze zjištěných výsledků a z výsledků získaných v experimentech využívajících potkaní jaterní mikrosomy izolované ze zvířat premedikovaných induktory cytochromů P450, z experimentů se specifickými inhibitory cytochromů P450 a ze studií využívajících potkaní rekombinantní cytochromy P450 vyplývá, že na oxidační detoxifikaci AAI za vzniku AAIA se podílí cytochromy P450 1A1/2 nejen v podmínkách *in vitro*, ale též i v podmínkách *in vivo*, zejména pak cytochrom P450 1A2.

6. ZÁVĚR

Cíle diplomové práce byly splněny:

Výsledky získané v předkládané diplomové práci ilustrují, že

- ∅ Aristolochová kyselina I je metabolisována potkaním a myším jaterním mikrosomálním systémem.
- ∅ Výsledky z experimentů využívajících induktory a inhibitory cytochromů P450 společně s rekombinantními potkaními cytochromy P450 prokazují, že v oxidační detoxifikaci AAI na AAIA hrají majoritní roli cytochromy P450 1A1 a 1A2.
- ∅ Participace cytochromů P450 podrodiny 2C na oxidaci AAI nemůže být vyloučena.
- ∅ Cytochrom b₅ zvyšuje efektivitu potkaního CYP1A2 v oxidaci AAI. Získané výsledky signalisují mimořádnou participaci CYP1A2 na oxidační demethylaci AAI na AAIA u potkana *in vitro*.
- ∅ Aristolochová kyselina je rovněž redukčně aktivována potkaními rekombinantními cytochromy P450 za tvorby aduktů s DNA. Na této aktivaci se cytochromy P450 1A1 a 1A2 rovněž podílí.
- ∅ Cytochrom b₅ také zvyšuje efektivitu CYP1A2 redukčně aktivovat AAI. Naopak efektivita CYP1A1 byla po přidavku cytochromu b₅ nižší.
- ∅ V experimentech využívajících transgenní myší modely, konkrétně linie *Cyp1a1(-/-)*, *Cyp1a2(-/-)* a *Cyp1a1/1a2(-/-)*, bylo prokázáno, že CYP1A1/2 se podílejí na oxidační detoxifikaci AAI též v podmínkách *in vivo*.

Získané výsledky přispívají k poznání enzymů, které participují na metabolismu (na oxidační detoxifikaci a redukční aktivaci) AAI. Detailní znalost těchto enzymů je esenciální pro evaluaci rizika lidské populace vůči oběma onemocněním spojeným s AA, tj. nefropatii vyvolané aristolochovou kyselinou a balkánskou endemickou nefropatií. Část výsledků byla již publikována formou časopiseckých publikací (viz **Přílohy 1-2**).

Seznam použité literatury

- (1) Penning, T.M.: *Chemical Carcinogenesis (1st Edition)*, Humana Press, London (2011)
- (2) Ruddon, R.W.: *Cancer Biology (4th Edition)*, Oxford University Press (2007)
- (3) Hussain, S.P., Harris C.C.: *Cancer Res.* 58, 4023 (1998)
- (4) Stratil, P., Kubáň, V.: *Chem. Listy* 98, 379-384 (2004)
- (5) 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)
- (6) Stiborová, M., Mikšanová, M.: *Živa* 4, 146 (1999)
- (7) Gabriel, J.: *The Biology of Cancer (2nd Edition)*, John Wiley & Sons, Ltd. (2007)
- (8) *The Fifth International Conference on Human Tumour Markers held in Stockholm, Sweden* (1988) dle Wild, D.: *The Immunoassay Handbook (2nd Edition)*, Nature Publishing Group, 635-663 (2001)
- (9) Kyle, R.A.: *Mayo Clin. Proc.* 50, 29-40 (1975)
- (10) Thomas, C.M., Sweep, C.G.: *Int. J. Biol. Markers* 16, 72-86 (2001)
- (11) Fertig, D.L., Hayes, D.F.: *Psycho-Oncology* 10, 370-379 (2001)
- (12) Temin, H.M.: *Science* 192, 1075-1080 (1976)
- (13) Ponder, B.A.: *Nature* 411, 336-341 (2001)
- (14) Varmus, H.E.: *Cancer* 15, 2324-2328 (1985)
- (15) Malumbres, M., Barbacid, M.: *Nat. Rev. Cancer* 3, 459-465 (2003)
- (16) Knudson, A.G.: *Nat. Rev. Cancer* 1, 157-162 (2001)
- (17) Knudson, A.G.: *Cancer Res.* 45, 1437-1443 (1985)
- (18) Weinberg, R.A.: *Cell* 81, 323-330 (1995)
- (19) Hanahan, D., Weinberg, R.A.: *Cell* 100, 57-70 (2000)
- (20) Templeton, D.J., Park, S.H., Lanier, L., Weinberg, R.A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 3033-3037 (1991)
- (21) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7157> (přístup 24.3. 2012)
- (22) Levine, A.J.: *Annu. Rev. Biochem.* 62, 623-651 (1993)
- (23) Thomson, T., Tovar, C., Yang, H., Carvajal, D., Vu, B.T., Xu, Q., Wahl, G.M., Heimbrook, D.C., Vassilev, L.T.: *J. Biol. Chem.* 279, 53015-53022 (2004)

- (24) Schmid, G., Strosznajder, J.B., Węsierska-Gądek, J.: *Mol. Neurobiol.* 34, 27-49 (2006)
- (25) McLaughlin-Drubin, M.E., Munger, K.: *Biochim. Biophys. Acta* 1782, 127-150 (2008)
- (26) Liao, J.B.: *Yale J. Biol. Med.* 79, 115-122 (2006)
- (27) King, R.J.B., Robins, M.W.: *Cancer Biology (3rd Edition)*, Pearson Education Limited (2006)
- (28) International Agency for Research on Cancer, *Ionizing Radiation, Part 2: Some Internally Deposited Radionuclides, IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum.* 78 (2001)
- (29) Kotova, N., Hemminki, K., Segerbäck, D.: *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 14, 2868-2872 (2005)
- (30) Le Curieux, F., Hemminki, K.: *J. Invest. Dermatol.* 117, 263-268 (2001)
- (31) Yabro, C.H., Wujcik, D., Gobel, B.H.: *Cancer Nursing*, Jones and Bartlett Publishers (2011)
- (32) Peto, J.: *Nature* 411, 390-395 (2001)
- (33) Boffetta, P.: *G. Ital. Med. Lav Erg.* 33, 290-293 (2011)
- (34) Bracci, P.M.: *Mol. Carcinog.* 51, 53-63 (2012)
- (35) Pott, P.: *Chirurgical observations relative to the cancer of the scrotum (1775)* v *CA Cancer J. Clin.* 24, 110-116 (1974)
- (36) Yamagawa, K., Ichikawa, K.: *Mitt. Med. Fak. Kaiserl. Univ. Tokyo* 15, 295-344 (1915)
- (37) Cook, J.W., Hewett, C.L., Hieger, I.: *J. Chem. Soc.*, 395-405 (1933)
- (38) International Agency for Research on Cancer, *A Review of Human Carcinogens: Pharmaceuticals, IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum.* 100A (2012)
- (39) International Agency for Research on Cancer, *A Review of Human Carcinogens: Arsenic, Metals, Fibres, and Dusts, IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum.* 100C (2012)
- (40) International Agency for Research on Cancer, *A Review of Human Carcinogens: Chemical Agents and Related Occupations, IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum.* 100F (2012)
- (41) International Agency for Research on Cancer, *Some Industrial Chemicals, IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum.* 77 (2000)

- (42) Miller, E.C., Miller, J.A.: *Cancer* 47, 2327-2345 (1981)
- (43) International Agency for Research on Cancer, *Diesel and Gasoline Engine Exhausts and Some Nitroarenes*, IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum. 46 (1989)
- (44) Chiu, C.W., Lee, L.H., Wang, C.Y., Bryan, G.T.: *Mutat. Res.* 58, 11-22 (1978)
- (45) Minicucci, E.M., Ribeiro, D.A., da Silva, G.N., Pardini, M.I.M.C., Montovani, J.C., Salvadori, D.M.F.: *Exp. Toxicol. Pathol.* 63, 483-489 (2011)
- (46) Malejka-Giganti, D., Parkin, D.R., Decker, R.W., Niehans, G.A., Bliss, R.L., Churchwell, M.I., Beland, F.A.: *Int. J. Cancer* 122, 1958-1965 (2008)
- (47) Alves de Lima, R.O., Bazo, A.P., Salvadori, D.M.F., Rech, C.M., de Palma Oliveira, D., de Aragão Umbuzeiro, G.: *Mutat. Res.* 626, 53-60 (2007)
- (48) Stiborová, M.: *Chem. Listy* 96, 784-791 (2002)
- (49) Purohit, V., Basu, A.K.: *Chem. Res. Toxicol.* 13, 673-692 (2000)
- (50) Winkler, R., Hertweck, C.: *ChemBioChem* 8, 973-977 (2007)
- (51) Smith, R.M., Joslyn, D.A., Gruhrit, O.M., McLean, I.W., Penner, M.A., Ehrlich, J.: *J. Bacteriol.* 55, 425-448 (1948)
- (52) Acharya, K.R., Gowda, D.S.S., Post, M.: *Acta Cryst. B* 35, 1360-1363 (1979)
- (53) Piskorski, R., Hanus, R., Vašíčková, S., Cvačka, J., Šobotník, J., Svatoš, A., Valterová, I.: *J. Chem. Ecol.* 33, 1787-1794 (2007)
- (54) Kumar, V., Ponam, D., Prasad, A.K., Parmar, V.S.: *Nat. Prod. Rep.* 20, 565-583 (2003)
- (55) Mengs, U., Lang, W., Poch, J.A.: *Arch. Toxicol.* 107, 107-119 (1982)
- (56) Mengs, U.: *Arch. Toxicol.* 61, 504-505 (1988)
- (57) Costlow, R.D., Manson, J.M.: *Toxicology* 26, 11-23 (1983)
- (58) Manson, J.M.: *Environ. Health Perspect.* 70, 137-347 (1986)
- (59) Arlt, V.M.: *Mutagenesis* 20, 399-410 (2005)
- (60) 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)
- (61) Schmeiser, H.H., Stiborová, M., Arlt, V.M.: *Curr. Opin. Drug Discov. Dev.* 12, 141-148 (2009)
- (62) Bieler, C.A., Stiborová, M., Wiessler, M., Cosyns, J-P., van Ypersele de Strihou, C., Schmeiser, H.H.: *Carcinogenesis* 18, 1063-1067 (1997)
- (63) Cosyns J-P.: *Drug Safety* 26, 33-48 (2003)

- (64) Tokiwa, H., Sera, N., Horikawa, K., Nakanishi, Y., Shigematu, N.: *Carcinogenesis* 14, 1933-1938 (1993)
- (65) Enya, T., Suzuki, T., Watanabe, T., Hirayama, T., Hisamatsu, Y.: *Environ. Sci. Technol.* 31, 2772-2776 (1997)
- (66) Bieler, C.A., Wiessler, M., Erdinger, L., Suzuki, H., Enya, T., Schmeiser, H.H.: *Mutat. Res.* 439, 307-311 (1999)
- (67) Fu, P.P.: *Drug Metab. Rev.* 22, 209-268 (1990)
- (68) Stiborová, M., Naiman, K., Martínková, M., Martínek, V., Svobodová, B., Schmeiser, H.H., Frei, E.: *Interdisc. Toxicol.* 2, 24-27 (2009)
- (69) Stiborová, M., Frei, E., Arlt, V.M., Schmeiser, H.H.: *Mutat. Res.* 658, 55-67 (2008)
- (70) Arlt, V.M., Stiborová, M., Schmeiser, H.H.: *Mutagenesis* 17, 265-277, (2002)
- (71) Stiborová, M., Fernando, R.C., Schmeiser, H.H., Frei, E., Pfau, W., Wiessler, M.: *Carcinogenesis* 15, 1187-1192 (1994)
- (72) Pfau, W., Schmeiser, H.H., Wiessler, M.: *Carcinogenesis* 11, 1627-1633 (1990)
- (73) Stiborová, M., Frei, E., Sopko, B., Wiessler, M., Schmeiser, H.H.: *Carcinogenesis* 23, 617-625 (2002)
- (74) Levová, K.: *Diplomová práce*, PřF UK Praha, katedra biochemie (2009)
- (75) Stiborová, M., Mareš, J., Levová, K., Pavlíčková, J., Bárta, F., Hodek, P., Frei, E., Schmeiser, H.H.: *Neuroendocrinol. Lett.* 32, 101-110 (2011).
- (76) Heinrich, M., Chan, J., Wanke, S., Neinhuis, C., Simmonds, M.S.J.: *J. Ethnopharmacol.* 125, 108-144 (2009)
- (77) International Agency for Research on Cancer, *Sometraditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene*, IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum. 82 (2002)
- (78) Gonzáles, F., Rudall, P.J.: *Plant Sys. Evol.* 241, 223-244 (2003)
- (79) Gonzáles, F., Rudall, P.J., Furness, C.A.: *Bot. J. Linn. Soc.* 137, 221-242 (2001)
- (80) Kelly, L.M., Gonzáles, F.: *Syst. Bot.* 28, 236-249 (2003)
- (81) Neinhuis, C., Wanke, S., Hilu, K.W., Müller, K., Borsch, T.: *Plant Sys. Evol.* 250, 7-26 (2005)
- (82) Ohi-Toma, T., Sugawara, T., Murata, H., Wanke, S., Neinhuis, C., Murata, J.: *Syst. Bot.* 31, 481-492 (2006)
- (83) Novák, J., Skalický, M.: *Botanika: Cytologie, histologie, organologie a systematika*, Powerprint, Praha (2009)

- (84) Mulder, C.: *Rev. Palaeobot. Palynol.* 123, 47-55 (2003)
- (85) Carter, D.: *Motýli* (překlad z angl. originálu *Butterflies and Moths*), Osveta, Martin (1998)
- (86) Wu, T-S., Leu, Y-L., Chan, Y-Y.: *J. Chin. Chem. Soc.* 47, 221-226 (2000)
- (87) Morren, C.J.É.: *La Belgique horticole, journal des jardins et des vergers* 17 (1867)
- (88) van Houtte, L.: *Flore des serres et des jardins de l'Europe* 4, Gand (1848)
- (89) Burvenich, F., de Kerchove de Denterchem, O., Pynaert, É., Rodigas, É., van Geert, A., van Hulle, H.J.: *Revue de l'horticulture belge et étrangère* 15 (1889)
- (90) Debelle, F.D., Vanherweghem, J-L., Nortier, J.L.: *Kidney Int.* 74, 158-169 (2008)
- (91) Mengs, U.: *Arch. Toxicol.* 59, 328-331 (1987)
- (92) Yuan, J., Liu, Q., Wei, G., Tang, F., Ding, L., Yao, S.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 21, 2332-2342 (2007)
- (93) Hashimoto, K., Higuchi, M., Makino, B., Sakakibara, I., Kubo, M., Komatsu, Y., Maruno, M., Okada, M.: *J. Ethnopharmacol.* 64, 185-189 (1999)
- (94) Abdelgadir, A.A., Ahmed, E.M., Eltohami, M.S.: *Environ. Health Insights.* 5, 1-8 (2011)
- (95) Lee, T-Y., Wu, M-L., Deng, J-F., Hwang, D-F.: *J. Chromatogr. B* 766, 169-174 (2001)
- (96) Möse, J.R.: *Drug Res.* 16, 118-122 (1966)
- (97) Möse, J.R.: *Drug Res.* 24, 151-153 (1974)
- (98) Kluthe, R., Vogt, A., Batsford, S.: *Drug Res.* 32, 443-445 (1982)
- (99) Mengs, U.: *Arch. Toxicol.* 52, 209-220. (1983)
- (100) Robisch, G., Schimmer, O., Göggelmann, W.: *Mutat. Res.* 105, 201-204 (1982)
- (101) Abel, G., Schimmer, O.: *Hum. Genet.* 64, 131-133 (1983)
- (102) Pezutto, J.M., Swanson, S.M., Woongchon, M., Che, C., Cordell, G.A. Fong, H.H.S.: *Mutat. Res.* 206, 447-454 (1988)
- (103) Reynolds, K.F.F.: *Martindale, The Extra Pharmacopeia*, Pharmaceutical Press, London (1986)
- (104) 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)
- (105) Gold, L.S., Slone, T.H.: *N. Engl. J. Med.* 349, 1576-1577 (2003)

- (106) Grollman, A.P., Shibusaki, 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)
- (107) 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)
- (108) Yang, L., Su, T., Li, X-M., Cai, S-Q., Meng, L-Q., Zou, W-Z., Wang, H-Y.: *Nephrol. Dial. Transplant.* 27, 292-298 (2012)
- (109) Yuan, S-Y., Yang, C-R., Cheng, C-L., Hsu, S-L., Liao, J-W., Lin, C-C., Chou, Y-Y., Cheng, Y-W.: *Int. J. Toxicol.* 30, 35-46 (2011)
- (110) Vanhaelen, M., Vanhaelen-Fastre, R., But, P., Vanherweghem, J-L.: *Lancet* 343, 174 (1994)
- (111) Vanherweghem, J-L.: *J. Altern. Complement. Med.* 4, 9-13 (1998)
- (112) Li, X., Wang, H.: *Nephrology* 9, 109-111 (2004)
- (113) Xiao, Y., Xue, X., Wu, Y-F., Xin, G-Z., Qian, Y., Xie, T-P., Gong, L-K., Ren, J.: *Acta Pharmacol. Sin.* 30, 1559-1565 (2009)
- (114) Šístková, J., Hudeček, J., Hodek, P., Frei, E., Schmeiser, H.H., Stiborová, M.: *Neuroendocrinol. Lett.* 29, 733-731 (2008)
- (115) Stiborová, M., Frei, E., Hodek, P., Wiessler, M., Schmeiser, H.H.: *Int. J. Cancer* 113, 189-197 (2005)
- (116) De Broe, M.E.: *Kidney Int.* 81, 513-515 (2012)
- (117) World Health Organisation: Memorandum: *The Endemic Nephropathy of South-Eastern Europe*, Geneva, 431-448 (1965)
- (118) Stiborová, M., Patočka, J., Frei, E., Schmeiser, H.H.: *Chem. Listy* 99, 782-788 (2005)
- (119) Pfohl-Leszkwicz, A., Petkova-Bocharova, T., Chernozemsky, I. N., Castegnaro, M.: *Food Additiv. Contamin.* 19, 282-302 (2002)
- (120) Ležaić, V., Marić, I., Jovanović, D., Radović, M., Kovačević, Z., Bukvić, D., Pavlović, S., Matić, M., Ajdačić, M., Djukanović, L.: *Kidney Blood Press. Res.* 31, 307-312 (2008)
- (121) Ikonov, V., Melzer, H., Neonov, V., Stoicheva, A., Stiller, S., Mann, H.: *Artif. Organs* 23, 75-80 (1999).
- (122) Stefanović, V., Polenaković, M.: *Nephron. Clin. Pract.* 112, c51-c56 (2009)

- (123) Bamias, G., Boletis, J.: *Am. J. Kidney Dis.* 52, 606-616 (2008)
- (124) Ivić, M.: *Lijec Vjes* 91, 1278-1281 (1969)
- (125) Pfohl-Leszkowicz, A., Manderville R.A.: *Mol. Nutr. Food Res.* 51, 61-99 (2007)
- (126) Clark, H.A., Snedeker, S.M.: *J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.* 9, 265-296 (2006)
- (127) Grosse, Y., Baudrimont, I., Castegnaro, M., Betbeder, A-M., Ekué Creppy, E., Dirheimer, G., Pfohl-Leszkowicz, A.: *Chem-Biol. Interact.* 95, 175-187 (1995)
- (128) Mally, A., Zepnik, H., Wanek, P., Eder, E., Dingley, K., Ihmels, H., Volkel, W., Dekant, W.: *Chem. Res. Toxicol.* 17, 234-242 (2004)
- (129) 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)
- (130) Turesky, R.J.: *Chem. Res. Toxicol.* 18, 1082-1090 (2005)
- (131) 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)
- (132) Grollman, A.P., Jelaković, B.: *J. Am. Soc. Nephrol.* 18, 2817-2823 (2007)
- (133) Lindman, C.A.M.: *Bilder ur Nordens Flora*, Wahlström & Widstrand, Stockholm (1917-1926)
- (134) Jelaković, B., Karanović, S., Vuković-Lela, I., Miller, F., Edwards, K.L., Nikolić, J., Tomić, K., Slade, N., Brdar, B., Turesky, R.J., Stipančić, Ž., Dittrich, D., Grollman, A.P., Dickman, K.G.: *Kidney Int.* 81, 559-567 (2012)
- (135) Yuan, M., Shi, B-Y., Li, H-Z., Xia, M., Han, Y., Xu, X-G., Zhang, Y-S.: *Urol. Int.* 83, 200-205 (2008)
- (136) Yang, H-Y., Wang, J-D., Lo, T-C., Chen, P-C.: *J. Epidemiol* 19, 17-23 (2009)
- (137) Schmeiser, H.H., Schoepke, K-B., Wiessler, M.: *Carcinogenesis* 9, 297-303 (1988)
- (138) Schmeiser, H.H., Frei, E., Wiessler, M., Stiborová, M.: *Carcinogenesis* 18, 1055-1062 (1997)
- (139) Arlt, V.M., Wiessler, M., Schmeiser, H.H.: *Carcinogenesis* 21, 235-242 (2000)
- (140) Arlt, V.M., Schmeiser, H.H., Pfeifer, G.P.: *Carcinogenesis* 22, 133-140 (2001)
- (141) 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)
- (142) Schmeiser, H.H., Scherf, H.R., Wiessler, M.: *Cancer Lett.* 59, 139-143 (1991)
- (143) Stiborová, M., Frei, E., Schmeiser, H.H.: *Chem. Listy* 94, 186-189 (2000)

- (144) 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)
- (145) Luo, J-L., Yang, Q., Tong, W-M., Hergenbahn, M., Wang, Z-Q., Hollstein, M.: *Oncogene* 20, 320-328 (2001)
- (146) Klaassen, C.D.: *Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons* (7th Edition), The McGraw-Hill Companies, Inc. (2008)
- (147) Stiborová, M., Levová, K., Bárta, F., Shi, Z., Frei, E., Schmeiser, H.H., Nebert, D.W., Phillips, D. H., Arlt, V.M.: *Toxicol. Sci.* 125, 345-358 (2012)
- (148) Stiborová, M., Frei, E., Wiessler, M., Schmeiser, H.H.: *Chem. Res. Toxicol.* 14, 1128-1137 (2001)
- (149) Stiborová, M., Frei, E., Schmeiser, H.H.: *Kidney Int.* 73, 1209-1211 (2008)
- (150) Martínek, V., Kubíčková, B., Arlt, V.M., Frei, E., Schmeiser, H.H., Hudeček, J., Stiborová, M.: *Neuroendocrinol. Lett.* 32, 57-70 (2011)
- (151) Stiborová, M., Frei, E., Sopko, B., Sopková, K., Marková, V., Laňková, M., Kumštýřová, T., Wiessler, M., Schmeiser, H.H.: *Carcinogenesis* 24, 1695-1703 (2003)
- (152) Schulz, W.A., Krummeck, A., Rösinger, I., Eickelmann, P., Neuhaus, C., Ebert, T., Schmitz-Dräger, B.J., Sies, H.: *Pharmacogenetics* 7, 235-239 (1997)
- (153) Toncheva, D.I., von Ahsen, N., Atanasova, S.Y., Dimitrov, T.G., Armstrong, V.W., Oellerich, M.: *J. Nephrol* 17, 384-389 (2004)
- (154) Stiborová, M., Sopko, B., Hodek, P., Frei, E., Schmeiser, H.H., Hudeček, J.: *Cancer Lett.* 229, 193-204 (2005)
- (155) Stiborová, M., Mareš, J., Frei, E., Arlt, V.M., Martínek, V., Schmeiser, H.H.: *Environ. Mol. Mutagen.* 52, 448-459 (2011)
- (156) Levová, K., Moserová, M., Kotrbová, V., Šulc, M., Henderson, C.J., Wolf, C.R., Phillips, D.H, Frei, E., Schmeiser, H.H., Mareš, J., Arlt, V.M., Stiborová, M.: *Toxicol. Sci.* 121, 43-56 (2011)
- (157) Chan, W., Luo, H-B., Zheng, Y., Cheng, Y-K., Cai, Z.: *Drug Metab. Dispos.* 35, 866-874 (2007)
- (158) Klingenberg, M.: *Arch. Biochem. Biophys.* 75, 376-386 (1958)
- (159) Garfinkel, D.: *Arch. Biochem. Biophys.* 77, 493-509 (1958)
- (160) Omura, T., Sato, R.: *J. Biol. Chem.* 239, 2370-2378 (1964)

- (161) Lewis, D.F.V.: *Guide to Cytochrome P450, Structure and Function* (2nd Edition), Taylor & Francis (2001)
- (162) Stiborová, M., Hudeček, J., Hodek, P., Frei, E.: *Chem. Listy* 93, 229-237 (1999)
- (163) Isin, E.M., Guengerich, F.P.: *Anal. Bioanal. Chem.* 392, 1019-1030 (2008)
- (164) Nelson, D.R.: *Hum. Genomics* 4, 59-65 (2009)
- (165) Nebert, D.W., Adesnik, M., Coon, M.J., Estabrook, R.W., Gonzalez, F.J., Guengerich, F.P., Gunsalus, I.C., Johnson, E.F., Kemper, B., Levin, W., Phillips, I.R., Sato, R., Waterman, M.R.: *DNA* 6, 1-11 (1987)
- (166) Nebert, D.W., Nelson, D.R., Adesnik, M., Coon, M.J., Estabrook, R.W., Gonzalez, F.J., Guengerich, F.P., Gunsalus, I.C., Johnson, E.F., Kemper, B., Levin, W., Phillips, I.R., Sato, R., Waterman, M.R.: *DNA* 8, 1-13 (1989)
- (167) de Montellano, P.R.O.: *Cytochrome P450, Structure, Mechanism and Biochemistry* (3rd Edition), Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York (2005)
- (168) Bernhardt, R.: *J. Biotechnol.* 124, 128-145 (2006)
- (169) Edwards, R.J., Murray, B.P., Singleton, A.M., Boobis, A.R.: *Biochemistry* 30, 71-76 (1991)
- (170) Hildebrandt, A., Estabrook, R.W.: *Arch. Biochem. Biophys.* 134, 66-79 (1971)
- (171) Isin, E.M. Guengerich, F.P.: *Biochim. Biophys. Acta* 1770, 314-329 (2007)
- (172) Kadkhodayan, S., Coulter, E.D., Maryniak, D.M., Bryson, T.A., Dawson, J.H.: *J. Biol. Chem.* 270, 28042-28048 (1995)
- (173) Butler, M.A., Iwasaki, M., Guengerich, F.P., Kadlubar, F.F.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 7696-7700 (1989)
- (174) Harvey, R.G.: *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Chemistry and Carcinogenicity* (1st Edition), Cambridge University Press, Cambridge (1991)
- (175) McManus, M.E., Burgess, W.M., Veronese, M.E., Huggett, A., Quattrochi, L.C., Tukey, R.H.: *Cancer Res.* 50, 3367-3376 (1990)
- (176) Drahashuk, A.T., McGarrigle, B.P., Larsen, K.E., Stegeman, J.J., Olson, J.R.: *Carcinogenesis* 19, 1361-1368 (1998)
- (177) Stiborová, M., Martínek, V., Rýdlová, H., Hodek, P., Frei, E.: *Cancer Res.* 62, 5678-5684 (2002)
- (178) Stiborová, M., Martínek, V., Rýdlová, H., Koblas, T., Hodek, P.: *Cancer Lett.* 220, 145-154 (2005)

- (179) Ioannides, C.: *Cytochromes P450: Role in the Metabolism and Toxicity of Drugs and other Xenobiotics*, Royal Society of Chemistry (2008)
- (180) Delescluse, C., Lemaire, G., de Sousa, G., Rahmani, R.: *Toxicology* 153, 73-82 (2000)
- (181) <http://www.cypalleles.ki.se/> (přístup 29.4. 2012)
- (182) Sergentanis, T.N., Economopoulos, K.P.: *Breast Cancer Res. Treat.* 122, 459-469 (2010)
- (183) Bull, L.M., White, D.L., Bray, M., Nurgalieva, Z., El-Serag, H.B.: *Dis. Esophagus* 22, 571-587 (2009)
- (184) Smits, K.M., Schouten, L.J., van Dijk, B.A.C., van Houwelingen, K., Hulsbergen-van de Kaa, C.A., Kiemeney, A.L.M., Goldbohm, R.A., Oosterwijk, E., van den Brandt, P.A.: *World J. Urol.* 26, 103-110 (2008)
- (185) Svobodová, B., Martínková, M., Dračínská, H., Frei, E., Stiborová, M.: *Neuroendocrinol. Lett.* 30, 46-51 (2009)
- (186) Naiman, K., Frei, E., Stiborová, M.: *Neuroendocrinol. Lett.* 31, 36-45 (2010)
- (187) Mizerovská, J., Dračínská, H., Arlt, V.M., Schmeiser, H.H., Frei, E., Stiborová, M.: *Neuroendocrinol. Lett.* 30, 52-59 (2009)
- (188) Yang, M.X., Cederbaum, A.I.: *Arch. Biochem. Biophys.* 315, 438-444 (1994)
- (189) Dalton, T.P., Dieter, M.Z., Matlib, R.S., Childs, N.L., Shertzer, H.G., Genter, M.B., Nebert, D.W.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 267, 184-189 (2000)
- (190) Liang, H.C., Li, H., McKinnon, R.A., Duffy, J.J., Potter, S.S., Puga, A., Nebert, D.W.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 1671-1676 (1996)
- (191) Dragin, N., Uno, S., Wang, B., Dalton, T.P., Nebert, D.W.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 359, 635-642 (2007)
- (192) Phillips, D.H., Arlt, V.M.: *Nature Prot.* 2, 2772-2781 (2007)
- (193) Schmeiser, H.H., Bieler, C.A., Wiessler, M.; Ypersele de Strihou, C., Cosyns, J-P.: *Cancer Res.* 56, 2025-2028 (1996)
- (194) Jaffé, M.: *Z. Physiol. Chem.* 10, 391-400 (1886)
- (195) Owen, J.A., Iggo, B., Scandrett, F.J., Stewart, C.P.: *Biochem. J.* 58, 426-437 (1954)
- (196) Burke, M.D., Mayer, R.T.: *Drug Metab. Dispos.* 2, 583-588 (1974)
- (197) Burke, M.D., Thompson, S., Weaver, R.J., Wolf, C.R., Mayer, R.T.: *Biochem. Pharmacol.* 48, 923-936 (1994)
- (198) Burda, P.: *Diplomová práce*, PŘF UK Praha, katedra biochemie (2006)

- (199) Lewis, D.F.V.: *Curr. Med. Chem.* 10, 1955-1972 (2003)
- (200) Schenkman, J.B., Jansson, I.: *Pharmacol. Ther.* 9, 139-152 (2003)
- (201) Duarte, M.P., Palma, B.B., Gilep, A.A., Laires, A., Oliveira, J.S., Usanov, S.A.,
Rueff, J., Kranendonk, M.: *Mutagenesis* 20, 93-100 (2005)
- (202) Stiborová, M., Martínek, V., Schmeiser, H.H., Frei, E.: *Neuroendocrinol. Lett.* 27,
35-39 (2006)
- (203) Rendić, S., Di Carlo, F.J.: *Drug Metab. Rev.* 29, 413-580 (1997)
- (204) Mimura, I., Nangaku, M.: *Nat. Rev. Nephrol.* 6, 667-678 (2010)
- (205) Harris, L.A.: *Nat. Rev* 2, 38-47 (2002)

Seznam příloh

Příloha 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).

IF₂₀₁₀=4,148

Příloha 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).

IF₂₀₁₀=1,621

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