

ARISTOLOCHOVÉ KYSELINY A LEDVINOVÉ ONEMOCNĚNÍ „CHINESE HERBS NEPHROPATHY“

MARIE STIBOROVÁ^a, EVA FREI^b
a HEINZ H. SCHMEISER^b

^aKatedra biochemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Albertov 2030, 128 40 Praha 2, e-mail: stiborov@prfdec.natur.cuni.cz, ^bInstitut für Molekulare Toxikologie, Deutsches Krebsforschungszentrum, Im Neuenheimer Feld 280, D-69120 Heidelberg

Došlo dne 4.III.1999

Klíčová slova: aristolochové kyseliny, DNA adukty, mechanismus onemocnění „Chinese herbs nephropathy“

Obsah

1. Úvod
2. Ledvinové onemocnění „Chinese herbs nephropathy“
3. Aristolochové kyseliny, jejich metabolická aktivace a molekulární mechanismus karcinogenního působení
4. Adukty aristolochových kyselin v DNA ledvin pacientek vysvětlují příčinu onemocnění „Chinese herbs nephropathy“
5. Závěr

1. Úvod

Denně jsme z mnoha stran (např. prostřednictvím sdělovacích prostředků) „zavalováni“ plejádou reklam na řadu prostředků majících „záračné“ účinky na náš zdravotní stav, fyzickou či psychickou kondici, odolnost, výkonnost a pod. Některé svými informacemi lákají rovněž zákazníci mající potřebu snížit svou tělesnou váhu, aby zakoupili... „*zcela účinné a bezpečné prostředky způsobující ztrátu nadbytečných kilogramů bez použití drastických odtučňovacích diet a namáhavých cvičení*“... Často u takových preparátů chybí přesný popis a výčet všech ingrediencí, které jsou v nich obsaženy, většinou jsou charakterizovány pouze některé ze složek. Někde nalezneme stručný popis, že jsou v preparátu přítomny i různé složky, které jsou přírodního např. rostlinného původu, nejsou však přesně specifikovány. Distribuovány a prodávány jsou i bez lékařského předpisu. V současnosti je téměř nemožné vyjmenovat názvy všech takových „léčebných“ prostředků, neboť je často ani nenajdeme v oficiálních seznamech léčivých přípravků, či parafarmaceutik (vitaminosních prostředků, výživových doplňků a pod.) schválených k humánnímu použití. Nedojde-li k případům, že se objeví jejich vedlejší (negativní) účinky je, zdá se, vše v pořádku. Tak se situace prozatím jeví i v naší republice. Informace a zkušenosti ze zahraničí však mluví opačně. Ukazuje se, že zvláště nebezpečné je používání rozličných rostlin, bylin (buď v uvedených preparátech nebo samostatně), obsahujících látky, u nichž dosud nejsou přesně

určeny všechny jejich účinky. Jeden z takových případů byl nedávno popsán nejen ve vědeckých časopisech, ale objevil se, vzhledem k tragickým následkům, i v populárně-naučných časopisech i denním tisku. Tento případ stojí za to, aby o něm byla podrobně informována česká veřejnost jak laická, tak i odborná a dokonce i kompetentní orgány státní správy. Zároveň je tento případ zajímavý i jako problém ryze vědecký, jehož osvětlení může přispět k rozvoji nových poznatků v základním teoretickém výzkumu, zprostředkovaně i pro terapeutické využití.

Nedávno přinesly belgické listy, a poté i naše deníky^{1,2}, zprávu o nebezpečnosti některých rádobý záračných čínských bylin pro lidské zdraví. V nich se sugestivně líčí smutný osud desítek žen, které se ve snaze zhubnout nechaly lákat léčebnou kúrou založenou na čínských bylinách obsahujících „nefrotoxic“ semena rostliny druhu *Aristolochia*, zničily si ledviny a čelí hrozbě rakoviny. Lze sice kvitovat s povděkem, že o této smutné skutečnosti byla díky tomu informována jak česká veřejnost, tak i kompetentní orgány, bohužel však, vzhledem ke stručnosti zprávy poněkud nedostatečně. A to nejenom po odborné stránce. Trefnému přirovnání situace k thrilleru vyjádřením: „Jde o krutý film se všemi ingrediencemi žánru: zlými chlapy, nezodpovědným okolím a naivními oběťmi“² totiž chybělo rozpracování detailu, „špetka“ ponaučení a jiskřička pozitivita či naděje, které v podobných „dílkách“ jindy určitě nalezneme. Scénář thrilleru je tedy nutné doplnit. Za pozitivní lze považovat skutečnost, že vůbec došlo k vysvětlení příčiny uvedeného smutného příběhu, i když až za dva roky po objevení se prvních obětí, a že „léčebný“ postup byl po tomto poznání okamžitě zastaven. Osoby zodpovědné za případ jsou v soudním řízení a podobný „léčebný“ postup již stěží bude v budoucnosti použit (alespoň v Belgii).

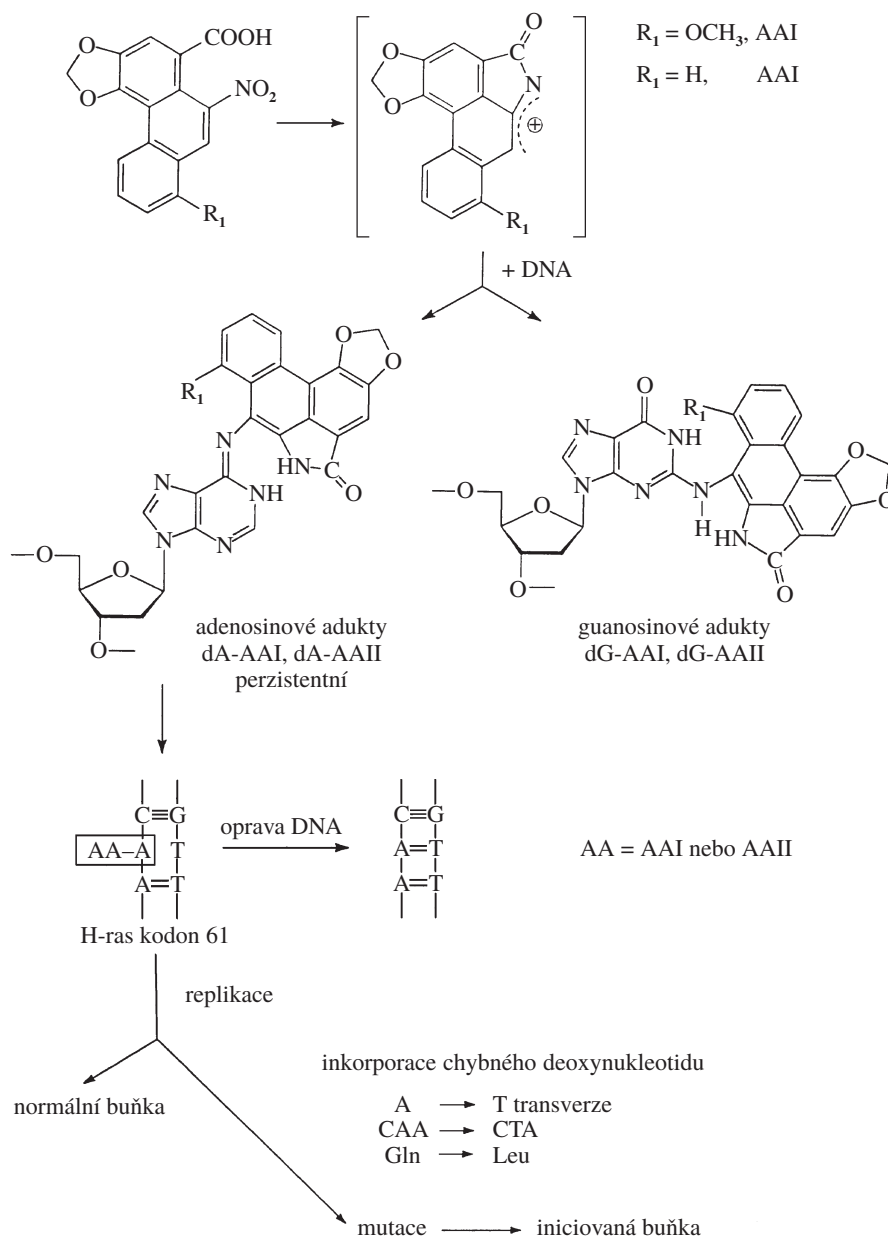
2. Ledvinové onemocnění „Chinese herbs nephropathy“

V roce 1993 popsal Vanhenwerghen se spolupracovníky výskyt několika případů atypické ledvinové nedostatečnosti (extensive interstitial fibrosis of the kidney without glomerular lesions) u žen žijících v Bruselu a jeho okolí, která vedla až k totálnímu selhání funkce ledvin³. Poškození bylo dáno do souvislosti s léčebnou procedurou, které se pacientky podrobily na jedné bruselské klinice, a jež měla vést k redukci jejich tělesné váhy postupem kontrolovaným lékařským dohledem (procedura kontrolovaného hubnutí). Rozsáhlejší studie populace žen žijících v této oblasti uvedenou souvislost potvrdila³. Ledvinové poškození bylo označeno podle jedné ze složek „léčebného“ postupu (použity byly čínské byliny, jimiž byla terapie doplněna právě počátkem 90. let) jako „Chinese herbs nephropathy“ (CHN)³. V současnosti je již onemocnění zjištěno u více než 100 pacientek^{4,5}. Všechny takto postižené ženy užívaly čínské byliny dlouhodobě^{4,5}. Prognóza vývoje choroby z hlediska vyléčení není optimistická. U řady pacientek vedlo ledvinové selhání až k transplantaci obou ledvin. Předpokládáný pozitivní výsledek tohoto postupu se však nedosta-

vil. I u těchto žen patologický proces pokračuje, dochází k vývoji nádorového onemocnění, především nádorů močových cest^{4,5}, vedle toho i srdeční poškození (valvular heart disease)^{4,6}.

Již při prvním výskytu choroby se za její příčinu začala považovat přítomnost rostliny čeledi podražcovitých (*Aristolochiaceae*) (*Aristolochia fangchi*) v léčebném přípravku užitém v terapii, k jejímuž přidání došlo pravděpodobně záměnou za rostlinný druh *Stephania tetrandra* vzhledem k podobnosti čínských názvů obou rostlin (*fangchi x fangji*)³. Rostliny čeledi *Aristolochiaceae* totiž obsahují aristolochové kyseliny, které jsou nefrotoxické a silně karcinogenní^{7,8}. Skutečný důkaz potvrzující uvedený předpoklad však chyběl. V roce 1995 byl proto zahájen interdisciplinární výzkum této problematiky

(na němž dodnes participují vědecké týmy evropských zemí Německa, Belgie a České republiky), který přinesl velmi brzy dílčí výsledky. Ty vedly k okamžitému zastavení „léčebného“ postupu. Výzkum pokračuje nadále, a to nejen z důvodů poznání skutečné příčiny choroby^{5,6,9,10}, ale i proto, že popsané ledvinové poškození vykazuje nápadnou shodu s chorobou popsanou pod názvem „Balkánská nefropatie“^{3,11}. Toto onemocnění postihuje nezanedbatelnou část balkánské populace^{3,11}. Příčina „Balkánské nefropatie“ není doposud vysvětlena. Předpokládá se, že by mohla být vyvolána konzumací potravin kontaminovaných specifickými látkami přírodního původu balkánským obyvatelstvem. Za jedny z takových látek byly rovněž uvažovány i aristolochové kyseliny, z dalších pak některé mykotoxiny³.



Obr. 1. Molekulární mechanismus karcinogeneze vyvolané aristolochovými kyselinami

3. Aristolochové kyseliny, jejich metabolická aktivace a molekulární mechanismus karcinogenního působení

Aristolochové kyseliny jsou strukturně podobné nitrofenantrenové kyselině (obr. 1). Aristolochová kyselina I a aristolochová kyselina II se liší pouze methoxyskupinou ve své molekule (obr. 1). Do roku 1982 byly používány farmaceuticky, jako součást protizánětlivých léků, po zjištění jejich toxicity a karcinogenity^{7,8} byly z farmaceutického trhu prakticky vyloučeny. Obě kyseliny jsou mutagenními sloučeninami¹². Metabolické studie prokázaly, že majoritními metabolity aristolochových kyselin tvořenými *in vitro* a *in vivo* jsou redukční produkty aristolaktam I a aristolaktam II, jež byly detegovány jak v konjugované, tak i nekonjugované formě v moči a výkalech savců včetně člověka^{13,14}.

Aktivace aristolochových kyselin na ultimální karcinogeny (ultimální toxikanty) probíhá rovněž redukční cestou¹⁴⁻¹⁶. V průběhu redukce obou kyselin dochází ke vzniku reaktivního cyklického acylnitreniového iontu, který se váže na DNA a tvoří dva majoritní adukty jak v experimentech *in vitro*, tak i u experimentálních zvířat *in vivo*¹⁴⁻¹⁷. Jde o adukty s deoxyadenosinem a deoxyguanosinem [7-(deoxyadenosin-N⁶-yl)-aristolaktam (dA-AA) a 7-(deoxyguanosin-N²-yl)aristolaktam (dG-AA)]¹⁴⁻¹⁷ (obr. 1). Aristolochová kyselina I je ve vyvolání tvorby aduktů efektivnější než aristolochová kyselina II (cit.¹⁴⁻¹⁷). K detekci a identifikaci aduktů tvořených z aristolochových kyselin byla využita vysoce senzitivní Randerathova metoda (³²P-postlabelling)¹⁸⁻²⁰. Jejím prostřednictvím byl odhalen i vztah mezi perzistencí aduktů a karcinogenním účinkem aristolochových kyselin. Na rozdíl od doby přetrvání aduktu 7-(deoxyguanosin-N²-yl)-aristolaktamu I v DNA různých orgánů experimentálních zvířat (potkanů), která nebyla delší než dva týdny, perzistence aduktů s deoxyadenosinem (dA-AAI) byla dlouhodobá^{10,22}. Uvedená skutečnost signalizuje, že dlouhodobá perzistence deoxyadenosinového aduktu může být kritickým prekarcinogenním stavem (lézí v DNA), který je zodpovědný za iniciaci karcinogeneze vyvolané aristolochovými kyselinami. Cílovým genem karcinogeneze vyvolané aristolochovou kyselinou I u laboratorních potkanů je *c-H-ras* gen^{23,24}. Studie aktivačních mutací v onkogenech nalezených v nádorech indukovaných aristolochovou kyselinou totiž prokázala vysokou incidenci (90–100 %) mutací ve druhé pozici kodonu 61 (CAA) *c-H-ras* genu (AT → TA transverse)^{23,24}. Schéma molekulárního mechanismu karcinogeneze vyvolané aristolochovými kyselinami u laboratorních potkanů je uvedené na obrázku 1.

Prokázání, že choroba „Chinese herbs nephropathy“ má přímou souvislost s aristolochovými kyselinami z čínských bylin užitých v „léčebném“ postupu, nebylo jednoduché.

4. Adukty aristolochových kyselin v DNA ledvin pacientek vysvětlují příčinu onemocnění „Chinese herbs nephropathy“

Analýza rostlinného materiálu importovaného do Belgie pod názvem *Stephania tetrandra* prokázala přítomnost obou aristolochových kyselin v testovaném rostlinném preparátu¹⁰. Tento náález silně podpořil počáteční předpoklad, že původ

onemocnění vyplývá ze záměny rostliny *S. tetrandra* za jinou čínskou bylinu *Aristolochia fangchi*, o které je známo, že obě tyto kyseliny obsahuje^{25,26}. Klíčem k důkazu iniciace choroby „Chinese herbs nephropathy“ (a následného vývoje nádorového onemocnění) byla však až analýza DNA izolované z biologického materiálu postižených pacientek.

Jak je známo, v iniciační fázi procesu chemické karcinogeneze dochází k rozličným modifikacím molekul DNA. Tvorba kovalentních aduktů s karcinogenem je z hlediska iniciace karcinogeneze považována za modifikaci nejvýznamnější²⁷⁻³⁰. Užitím metody „³²P-postlabellingu“, která se prokázala extrémně výhodnou pro monitorování tvorby aduktů vyvolaných aristolochovými kyselinami *in vitro* a *in vivo* (viz výše uvedené), byly v DNA ledvin (získaných po transplantaci) a močové trubici odebrané pacientkám, detegovány identické adukty s adukty produkovanými aristolochovými kyselinami *in vitro* a v orgánech experimentálních zvířat *in vivo* (dA-AAI, dG-AAI a dA-AAII)^{10,31,32}. Navíc, analogicky jako v experimentech s laboratorními zvířaty, majoritní adukt (dA-AAI) vykazuje extrémně dlouhou dobu perzistence i u člověka (tedy žen trpících chorobou Chinese herbs nephropathy)¹⁰. V DNA močové trubice byl nalezen také další adukt, jehož původ je v aristolochových kyselinách. Jde o adukt tvořený z „detoxikačního“ metabolitu aristolochové kyseliny I (aristolaktamu I) aktivovaného jedoelektronovou oxidací cytochromu P450 (CYP)^{33,34}. Nalezení uvedených aduktů potvrdilo přímou souvislost aristolochových kyselin s iniciací patologických procesů provázejících chorobu „Chinese herbs nephropathy“. Poskytuje rovněž vysvětlení nárůstu nádorových onemocnění močových cest, který je u pacientek (dokonce i po transplantaci poškozených ledvin) pozorován. Aristolochové kyseliny jsou totiž tím, že tvoří adukty v DNA přímo zodpovědné za produkci primárních karcinogenních lézí v postižených orgánech. Důkaz je tedy na stole. Výzkumná práce však tímto poznáním nekončí. Prokázání původu choroby je dále potvrzováno analýzami DNA dalších pacientek, u kterých poškození ledvin vyvolává nutnost transplantace ledvin. Doposud detegování aduktů rezultujících z aristolochových kyselin v analyzované DNA ledvin postižených žen neselhalo. Naopak v DNA ledvin pacientů trpících jinými ledvinovými onemocněními takové adukty nikdy nalezeny nebyly¹⁰. Souvislost aristolochových kyselin ze „zaměněných“ čínských bylin s vývojem nového ledvinového onemocnění (a tím i s nezodpovědností osob zapletených jakýmkoliv způsobem do případu) se stává jistotou...

5. Závěr

I po poznání příčiny choroby „Chinese herbs nephropathy“ zůstává ještě řada otazníků, jejichž vyřešení je podmínkou ke zlepšení prognózy vývoje onemocnění, jakož i k návrhům vedoucím k prevenci podobných případů. Jednou z otázek, která je důležitá z vědeckého hlediska je skutečnost, že se choroba projevila pouze u několika procent „léčených“ žen (naštěstí). Je to dáno rozdílnou výbavou enzymovými systémy, které aktivují či detoxikují aristolochové kyseliny, nebo opravných enzymů (systémů) odstraňujících modifikované úseky v DNA, či snad ochranou specifických genů, jejichž modifikací je iniciován proces karcinogeneze vyvolaný aristolochovými kyselinami? To jsou otázky, které se nabízejí a lákají

odbornou veřejnost k podrobnému prozkoumání. Jejich vyřešení má význam i daleko širší. Praktický význam tkví v předvídání rizik pro lidskou populaci, které vyplývají z používání jak některých přírodních léčiv, tak i léčiv s dosud ne přesně známým mechanismem účinku. Teoretický význam má pro poznání působení enzymů a potenciální participace metabolického polymorfismu na iniciačních fázích chemické karcinogeneze, dále pak i pro poznání molekulárně biologických aspektů těchto procesů. Proto výzkum této unikátní problematiky pokračuje v interdisciplinárním rámci i nadále.

A zpět ke thrilleru, ke kterému byla celá katastrofa přirovnána. Ponaučení z příběhu nechybí. Příčina, proč k onemocnění došlo je totiž mementem pro laickou veřejnost; nepodléhat střídavě se objevujícím „módním“ vlnám o „zázračnosti“ určitých přírodních preparátů či postupů, které však při střízlivém pohledu (či přesném zhodnocení) zavánějí šarlatánstvím. Je navíc vykřičníkem pro orgány státní správy povolující dovoz a distribuci obdobných preparátů i v ČR. Vždyť k chybnému použití nebezpečného rostlinného druhu došlo nejen při výrobě v zemi původu, ale ...dovozce a distributor se provinili „jen“ tím, že věřili složení uvedenému na obalu a nedali látku preventivně analyzovat².

Autoři děkují za podporu Německému centru výzkumu rakoviny a grantům GA ČR (303/99/0893) a MŠMT ČR (VS 96141).

LITERATURA

1. Anonym: Mladá fronta DNES IX/109, 7 (1998).
2. Anonym: Právo 8(109), 8 (1998).
3. Vanherweghem J.-L., Depierreux M., Tielemans C., Abramowicz D., Dratwa M., Jadoul M., Richard C., Vanderelde D., Verbeelen D., Vanhaelen-Fastre R., Vanhaelen M.: Lancet 341, 387 (1993).
4. Violon C.: Pharm. Belg. 52, 7 (1997).
5. Vanherweghem J.-L.: J. Altern. Complement. Med. 4, 9 (1998).
6. Vanherweghem J.-L.: Lancet 350, 1858 (1997).
7. Mengs U., Lang W., Poch J. A.: Arch. Toxicol. 51, 107 (1982).
8. Mengs U.: Arch. Toxicol. 61, 504 (1988).
9. Vanhaelen M., Vanhaelen-Fastre R., But P., Vanherweghem J.-L.: Am. J. Kidney Dis. 343, 174 (1994).
10. Bieler C.-A., Stiborová M., Wiessler M., Cosyns J.-P. van Ypersele de Strihou C., Schmeiser H. H.: Carcinogenesis 18, 1063 (1997).
11. Stefanovic V., Polenakovic M. H.: Am. J. Nephrol. 10, 1 (1990).
12. Schmeiser H. H., Pool B. L., Wiessler M.: Cancer Lett. 23, 97 (1984).
13. Krumbiegel G., Hallensleben J., Meunicke W., Rittman N., Roth M. J.: Xenobiotica 17, 981 (1987).
14. Pfau W., Schmeiser H. H., Wiessler M.: Carcinogenesis 11, 313 (1990).
15. Pfau W., Schmeiser H. H., Wiessler M.: Chem. Res. Toxicol. 4, 581 (1991).
16. Stiborová M., Fernando R. C., Schmeiser H. H., Frei E., Pfau W., Wiessler M.: Carcinogenesis 15, 1187 (1994).
17. Schmeiser H. H., Frei E., Wiessler M., Stiborová M.: Carcinogenesis 18, 1055 (1997).
18. Randerath K., Reddy M. V., Gupta R. C.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78, 6126 (1981).
19. Gupta R. C., Early K.: Carcinogenesis 9, 1687 (1988).
20. Reddy M. V., Randerath K.: Carcinogenesis 7, 1543 (1986).
21. Stiborová M., Frei E., Bieler C. A., Schmeiser H. H.: Chem. Listy 92, 661 (1998).
22. Fernando R. C., Schmeiser H. H., Scherf H. R., Wiessler M., in: *Postlabelling Methods for Detection of DNA Adducts* (Phillips D. H., Castegnaro M., Bartsch H., ed.), IARC Scientific Publications 124, str. 167. IARC Lyon 1993.
23. Schmeiser H. H., Janssen J. W. G., Lyons J., Scherf H. R., Pfau W., Buchmann A., Bartram C. R., Wiessler M.: Cancer Res. 50, 5464 (1990).
24. Schmeiser H. H., Scherf H. R., Wiessler M.: Cancer Lett. 59, 139 (1991).
25. Priestap S. M.: Phytochemistry 24, 849 (1985).
26. Zhu M., Phillipson J. D.: Int. J. Pharmacognosy 34, 283 (1996).
27. Bishop J.: Cell 64, 235 (1991).
28. Harris C.: Cancer Res. 51, 5023 (1991).
29. Aaronson S.: Science 254, 1146 (1991).
30. Hemminki K.: J. Occup. Environ. Med. 37, 44 (1995).
31. Schmeiser H. H., Bieler C. A., Wiessler M., van Ypersele de Strihou C., Cosyns J.-P.: Cancer Res. 56, 2025 (1996).
32. Schmeiser H. H., Bieler C. A., Stiborová M., Wiessler M., van Ypersele de Strihou, Cosyns J.-P.: Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 37, 98 (1996).
33. Stiborová M., Frei E., Schmeiser H. H., Wiessler M.: Collect. Czech. Chem. Commun. 60, 2189 (1995).
34. Stiborová M., Frei E., Breuer A., Bieler C. A., Schmeiser H. H.: Exp. Toxic. Pathol. 51, 421 (1999).

M. Stiborová^a, E. Frei^b, and H. H. Schmeiser^b (^a*Department of Biochemistry, Faculty of Science, Charles University, Prague*, ^b*Division of Molecular Toxicology, German Cancer Research Centre, Heidelberg, Germany*): **Aristolochic Acids and a Renal Disease – Chinese Herbs Nephropathy**

The review describes an explanation of the molecular mechanism of a unique type of renal fibrosis, designated as Chinese herbs nephropathy (CHN). So far, over 100 patients have been identified, all of them followed a slimming regimen with the prolonged use of Chinese herbs. Using the ³²P-postlabelling method, three specific DNA adducts derived from aristolochic acids (AA) were detected in renal tissues of patients with CHN. The AA-specific adduct pattern was also found in a ureter obtained from a CHN patient after renal transplantation. The data indicate that AA are involved in CHN providing an explanation for the increasing number of urothelial carcinomas reported in patients with CHN.