

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



**Inhibice xanthinoxidasové aktivity vodnými extrakty
léčivých rostlin**

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Dagmar Prokopová

**Vedoucí práce:
doc. Ing. Jaroslav Havlík, Ph.D**

© 2013 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Inhibice xanthinoxidasové aktivity vodnými extrakty léčivých rostlin" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne _____

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala školiteli práce, doc. Ing. Jaroslavu Havlíkovi, Ph.D. za vedení při experimentech, pomoc při analýze dat i sepsání práce, dále grantové agentuře GAČR, která výzkum financovala prostřednictvím grantu GP525/08/P503. Dále bych chtěla poděkovat ostatním pracovníkům katedry KMVD, celé mojí rodině a hlavně babičkám a dědečkovi za pomoc při hlídání Nikolase.

Inhibice xanthioxidasové aktivity vodnými extrakty léčivých rostlin

Xanthine oxidase inhibitory activity of medicinal plants aqueous extracts

Souhrn

Enzym xanthinoxidasa katalyzuje oxidaci hypoxanthinu na xanthin, který se poté přeměňuje na kyselinu močovou, což hraje důležitou roli při vzniku zánětlivého onemocnění dny. Tato práce shrnuje *in vitro* a *in vivo* studie, zkoumající inhibiční vliv přírodních extraktů na aktivitu xanthinoxidasy a popisuje projevy a léčbu dny a hyperurikémie.

Metody

Byly zkoumány léčivé byliny, tradičně používané v České republice a středoevropském regionu, na inhibici aktivity enzymu xanthinoxidasy. Vodné extrakty 28 druhů léčivých rostlin vybraných náhodně z produktového sortimentu firmy Primrose byly testovány *in vitro* pomocí spektrofotometrické metody.

Výsledky

Téměř u 75 % testovaných druhů byl naměřen nějaký stupeň inhibiční aktivity při koncentraci 100 µg/mL. Mezi nejméně aktivní vodné extrakty patřily *Galium odoratum* (IC₅₀ 61 µg/mL) a *Sylibum marianum* (IC₅₀ 4 µg/mL), následované chmelem (*Humulus lupulus*) a kopřivou (*Urtica dioica*) s inhibiční aktivitou 79 % a 61 % při koncentraci 100 µg/mL. Téměř žádná aktivita nebyla zjištěna u vzorků *Chamomilla recutita* a *Artemisia absinthum*.

Závěr

Výsledky ukázaly zajímavou inhibiční aktivitu xanthinoxidasy u některých extraktů. Tato screeningová studie umožňuje výběr kandidátů pro následné testy, které musí potvrdit aktivitu rostlin v buněčných kulturách nebo *in vivo*.

Vědecké studie ukazují, že některé byliny a extrakty mají uplatnění při alternativní terapii a prevenci dny nebo hyperurikémie.

Klíčová slova: inhibice enzymové aktivity, xanthinoxidasa, dna, hyperurikémie, léčivé rostliny, vodné extrakty

Summary

The enzyme xanthine oxidase catalyses the oxidation of hypoxanthine to xanthine and then, to uric acid which plays a crucial role in gout and hyperuricemia development. This thesis summarizes outcomes of *in vitro* and *in vivo* screening studies on the xanthine oxidase inhibitory activity and reviews the current knowledge on the gout and hyperuricemia.

Methods

To investigate xanthine oxidase inhibitory properties of plants aqueous extracts, that are commercially available and prepared by the Primrose Ltd. Company (CZ). Aqueous extracts of 28 medicinal plants species were screened *in vitro* xanthine oxidase inhibitory activity using the spectrophotometric method.

Results

Almost 75 % of the species exhibited a certain degree of xanthine oxidase inhibitory properties at 100 µg/mL.2% concentration. The most active were water extracts of *Galium odoratum* (IC₅₀ 61 µg/mL) and *Sylibum marianum* (IC₅₀ 4 µg/mL), which was followed immediately by hop (*Humulus lupulus*) with higher than 31% at this concentration and nettle (*Urtica dioica*) with inhibition of 71 %. Weaker inhibitory activity was shown for samples of *Chamomilla recutita* and *Artemisia absinthum*.

Conclusion

The results showed a high xanthine oxidase inhibitory action. The finding helps to select suitable lead compounds and products for further *in cellulo* or *in vivo* tests. Recently published studies suggest that medicinal plants might be used for prevention and alternative treatment of gout and hyperuricemia.

Keywords: enzyme inhibition, xanthine oxidase, gout, hyperuricemia, medicinal plants, water extracts

Seznam zkratk

XO: xanthin oxidasa

IC₅₀: inhibiční koncentrace (50% inhibice enzymové aktivity)

ATP: adenosintrifosfát

XN: hanthohumol

IXN: isoxanthohumol

RTG: rentgen

ELUAR: Evropská liga proti revmatismu

WHO: Světová zdravotnická organizace

Seznam tabulek

Tab. 1: Počty využívaných rostlinných druhů v tradiční terapii.....	16
Tab. 2: Inhibiční aktivita XO vzorky 1–14.....	31
Tab. 3: Inhibiční aktivita XO vzorky 15–28.....	32

Seznam obrázků

Obr. 1: metabolismus purinů.....	3
Obr. 2: struktura xanthinoxidasy.....	4
Obr. 3: příznaky dnové artritidy.....	11
Obr. 4: obecná struktura flavonoidních látek.....	18
Obr. 5: popis výroby extraktů dle patentu EP 1469927.....	25
Obr. 6: Grafy 1,2,3 inhibiční aktivity XO.....	31

Obsah

1 Úvod	1
2 Cíl práce.....	2
3 Literární rešerše.....	3
3.1 Metabolismus purinů v lidském organismu	3
3.1.1 Vznik a význam purinů v organismu	3
3.1.2 Xanthinoxidasa, její metabolismus a role v organismu.....	4
3.1.3 Kyselina močová.....	6
3.2 Hyperurikémie a dna	7
3.2.1 Historie diagnostiky dny.....	7
3.2.2 Výskyt, epidemiologie dny a hyperurikémie.....	7
3.2.3 Primární a sekundární hyperurikémie a dna	8
3.2.4 Diagnóza dny	9
3.3 Komplementární a bylinná farmakoterapie dny	15
3.3.1 Historie bylinné medicíny	15
3.3.2 Léčivé rostliny s využitím pro léčbu dny	17
3.3.3 Flavonoidy- účinné látky při léčbě dnové artritidy a hyperurikémie	18
3.3.4 Dosud publikované <i>in vitro</i> a <i>in vivo</i> studie	19
4 Materiál a metody	25
4.1.1 Materiál.....	25
5 Cíl práce.....	30
6 Výsledky.....	31
6.1 Výsledky stanovení inhibice XO aktivity.....	31
7 Diskuze.....	35
8 Závěr	40
9 Reference	41

1 Úvod

V dnešní moderní uspěchané době jsou civilizační choroby na denním pořádku. Civilizační onemocnění definujeme jako nemoci, jejichž vznik a rozvoj je podmíněn nebo velmi výrazně ovlivněn civilizací, způsobem života, technikou, stresem, znečištěným životním prostředím, špatnou výživou a dalšími negativními faktory. Tyto nemoci se týkají především vyspělého světa. Obyvatele zaostalých zemí ohrožují spíše nemoci infekční.

Mezi nepříjemné důsledky vyspělé civilizace můžeme zařadit také hyperurikemii. Hyperurikémie je definována jako zvýšené množství kyseliny močové v krvi (u mužů více než 420 $\mu\text{mol/L}$ a u žen více než 360 $\mu\text{mol/L}$). S tímto nárůstem je spojeno ukládání krystalů natrium urátu ve tkáních, jež vede ke vzniku dny. Manifestní dna postihuje až 1% populace a jejím typickým projevem je dna artritida, která je nejčastějším onemocněním mužů nad 40 let. V tradiční medicíně se již několik století k léčbě hyperurikémie a dny používají byliny. Mechanismem účinku klinicky ověřených léčiv je inhibice aktivity enzymu xanthinoxidasy. Cílem této práce je potvrzení či vyvrácení hypotézy, že k léčbě, prevenci, nebo zmírnění příznaků tohoto onemocnění lze použít extrakty léčivých rostlin se speciálním zřetelem na vodné extrakty. Vodné extrakty mají řadu technologických předností, jako například lepší rozpustnost, obvykle mají vyšší biologickou dostupnost a jsou méně toxické. Za biologickou aktivitou vodných extraktů často stojí flavonoidy a fenolické kyseliny.

Na toto téma bylo již vypracováno po celém světě několik *in vitro* screeningových studií, které potvrzují účinky léčivých rostlin na základě mechanismu inhibice xanthinoxidasové aktivity. Obvykle jsou předmětem těchto studií metanolové nebo etanolové extrakty, případně extrakty dichlormetanové. V rámci této práce byla testována aktivita extraktů vodných připravených ze vzorků léčivých bylin pomocí patentu EP 1469927.

2 Cíl práce

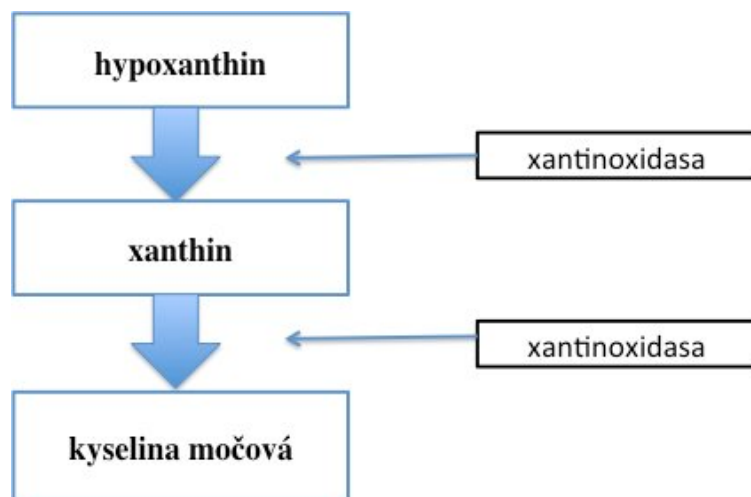
Cílem této práce je stanovení inhibiční aktivity XO *in vitro* u 28 vzorků bylinných vodných extraktů vyrobených v české firmě Primrose a.s. Tyto extrakty jsou prvotně používány jako přírodní bylinné koupele, které jsou bez přídavku parfémů, barviv a alkoholu. Tím jsou vhodné i pro osoby s citlivou pokožkou. Pomocí stanovení inhibiční aktivity xanthinoxidasy se může dokázat další využití těchto extraktů jako možné přírodní alternativy pro léčbu nebo prevenci pacientů s hyperurikémií nebo dnou, zvláště pak jejich využití u hraničních pacientů. Dnes používaným léčivem je allopurinol, ten však u některých pacientů vyvolává negativní vedlejší účinky (hepatitida, nefropatie, alergie). Proto je hledání alternativního řešení léčby nebo zmírnění příznaků dny a hyperurikémie žádoucí.

3 Literární rešerše

3.1 Metabolismus purinů v lidském organismu

3.1.1 Vznik a význam purinů v organismu

Puriny jsou dusíkaté heterocyklické látky, které člověk přijímá v potravě nebo je schopen je syntetizovat sám *de novo*. Jsou základním stavebním prvkem nukleových kyselin a jejich nukleotidů (Olinescu et al. 2002). Vzhledem k tomu, že nukleotidy jsou nejdůležitější dusíkaté látky v živých organismech, mají velký význam v přírodě a životě člověka (Stasolla et al., 2003). Puriny z chemického hlediska dělíme na báze, nukleosidy a nukleotidy. Báze jsou deriváty purinu, mezi hlavní řadíme adenin a guanin. Spojením těchto bází s cukernou složkou vznikají nukleosidy. Jejich fosforečné estery nazýváme nukleotidy. Puriny jsou zdrojem energie v citrátovém cyklu ve formě adenosintrifosfátu (ATP), dále také působí jako prekursory pro syntézu primárních produktů, jako je sacharóza, polysacharidy, fosfolipidy a další (Choi et al., 2004).

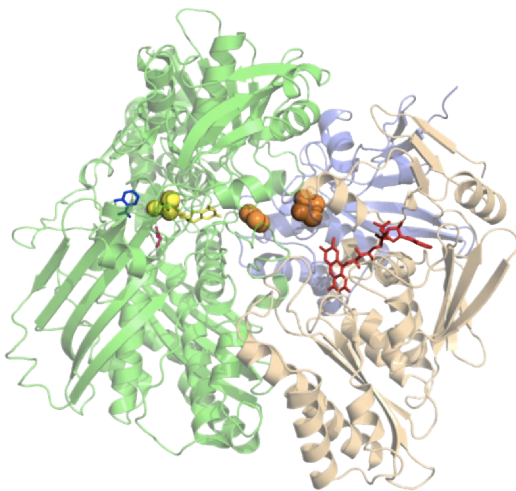


Obr.1 metabolismus purinů. Přeměna hypoxanthinu na kyselinu močovou pomocí xantinoxidasy.

Hlavní metabolicky aktivní puriny jsou již zmíněné adenin, guanin, dále pak xanthin a hypoxanthin. Z těla se vylučují pomocí metabolického procesu prostřednictvím oxidace na kyselinu močovou. V této metabolické cestě jsou nejdůležitějšími sloučeninami 5-ribosyl-1-pyrofosfát, který je vstupní sloučeninou celé metabolické cesty, a pak také kyselina inosinová. Ta může být konvertována na purinové báze a začleněna do nukleových kyselin nebo může být dále degradována na hypoxanthin a xanthin za pomoci enzymu xanthinoxidasa, kdy v konečné fázi vzniká kyselina močová, viz následující obrázek (Umamaheswari et al., 2007).

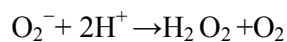
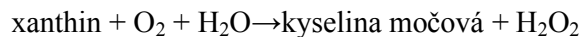
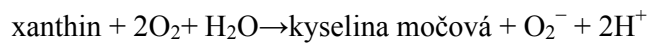
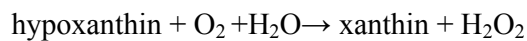
3.1.2 Xanthinoxidasa, její metabolismus a role v organismu

Xanthinoxidasa (XO) na obr. 2 je klíčovým enzymem v purinové degradaci (Offermanns a Rosenthal, 2008). Poprvé byla izolována z kravského pasterovaného podmásli a popsána v roce 1902. Je klasifikována jako jeden z nejkomplexnějších enzymů a řadíme ji do skupiny enzymů oxidoreduktas, což znamená, že může akceptovat až 14 protonů z různých substrátů.



Obr.2 Struktura xanthinoxidasy (http://en.wikipedia.org/wiki/xanthine_oxidase)

V tkáních se přirozeně vyskytuje z 90 % ve formě xanthindehydrogenasy. V této formě se objevuje především v játrech. Může však být zpětně převedena na oxidasu pomocí sulfohydrylové oxidace nebo nevratně proteolytickou modifikací (Olinescu et al., 2002). Během re-oxidace xantinoxidasy se molekulární kyslík chová jako elektronový akceptor. Vznikají superoxidy a peroxidy, jejichž reakce můžeme popsat pomocí rovnic:



Z těchto reakcí vyplývá, že XO je důležitým biologickým zdrojem volných radikálů v těle (Cos et al., 1998). Biologické a chemické pro-oxidanty jsou považovány za důležité při vzniku volných radikálů v těle. Volné radikály jsou atomy, molekuly nebo ionty schopné samostatné existence, které mají ve svém elektronovém obalu jeden nebo více nepárových elektronů. Snaží se proto toto místo vyplnit a zajistit tak stabilní konfiguraci. Z toho pramení jejich velká reaktivita a omezená doba existence (Racek a Holeček, 1999). Volné radikály zahajují řetězovou reakci lipidové a proteinové per-oxidace tím, že napadají dvojnou vazbu těchto molekul. Mohou napadat i nukleové kyseliny, sacharidy a enzymy, což může vést k těžkému poškození tkáně nebo celých orgánů. Téměř 40 nemocí je dnes považováno za choroby způsobené volnými radikály v těle. Většina z nich jsou metabolického původu, některé jsou spojeny se stářím (Behera et. al, 2003).

Hlavním úkolem XO v lidském těle je, jak již bylo uvedeno, oxidovat xanthin a hypoxanthin v metabolické přeměně purinů za vzniku kyseliny močové.

Při vysoké koncentraci urátů kyseliny močové v krvi se tvoří depozita krystalů v kloubech. Jako prevence zabránění vzniku těchto krystalů se využívá inhibice XO, kde stoupá vylučování xantinu a hypoxantinu, jež mají vyšší rozpustnost než kyselina močová (Offermanns a Rosenthal, 2008).

3.1.3 Kyselina močová

Kyselina močová vzniká v organismu ze třech zdrojů, a to z nukleotidů v potravě, z rozpadu tkáňových nukleoproteinů nebo syntézou *de novo* z glycinu a jiných organických sloučenin. V lidském organismu je koncentrace kyseliny močové dána rovnováhou mezi produkcí a eliminací urátů (Neogi , 2011). Celkové množství kyseliny močové rozpuštěné v tělních tekutinách dospělého organismu je přibližně 1000 mg. Jedna třetina je vylučována trávicím ústrojím a zbylé dvě třetiny ledvinami. V ledvinách dochází k její téměř 100% glomerulární filtraci (Růžička, 2004). Při fyziologickém pH $\leq 7,4$ můžeme kyselinu močovou najít v ionizované formě urátu. Při nižším pH frakce kyseliny močové v protonizované formě stoupá. To je velmi důležité vzhledem k tomu, že kyselina močová má menší rozpustnost než urát. Snížené pH vede k nižší rozpustnosti. Zvýšená koncentrace sodných urátů kyseliny močové v těle je označována jako hyperurikémie. Ta je spojena se zvýšeným rizikem tvorby krystalů natrium urátu ve tkáních, což vede ke vzniku zánětlivého onemocnění – dně (Seegmiller et al., 1962).

3.2 Hyperurikémie a dna

Dna (*Arthritis urica*) je chronické metabolické onemocnění způsobené ukládáním krystalů sodné soli kyseliny močové. Jedná se o poruchu metabolismu purinů v lidském těle, jejichž finálním produktem je právě kyselina močová. Toto zvýšení hladiny kyseliny močové v séru nazýváme hyperurikémií (Žurek, 2006). Hladina solí kyseliny močové v séru je u dny obvykle zvýšená a krystaly urátu sodného se ukládají v různých měkkých tkáních. Nejčastějším projevem bývá uložení krystalů u palce nohy (Smith et. al, 2011).

3.2.1 Historie diagnostiky dny

Nemoc dna byla poprvé objevena a popsána v Egyptě 2640 př. n.l. a patří mezi jednu z nejraněji klinicky ověřených nemocí vůbec. V 5. století byla Hippokratem označena jako „nechodící nemoc“ a „artritida bohatých“ hlavně proto, že byla spojována s hodováním dobrého tučného jídla a pitím nadměrného množství alkoholu. Od té doby se dna pojmenovává jako „nemoc králů“ (Smith et al., 2011). Přímá příčina nemoci, ukládání krystalů sodné soli kyseliny močové v kloubech, byla identifikována až ve 20. století, kdy ji v roce 1961 popsal McCarty (Olejárová, 2011). Od té doby se hyperurikémie a dna stává běžnou nemocí dnešního světa.

3.2.2 Výskyt, epidemiologie dny a hyperurikémie

V poslední době se výskyt dny a hyperurikémie obecně zvyšuje, a to především v zemích s vysokou životní úrovní a nadměrnou výživou (Růžička, 2004). Podle jedné britské studie se dna vyskytovala v roce 1999 třikrát více než tomu bylo v 70. letech (Mikuls et al., 2005). Jen v USA dnou trpí kolem 6,1 mil. obyvatel, což představuje 2 % populace žijící v této zemi (Smith et. al, 2011).

Manifestní dna postihuje méně než 1–2 % populace. Jejím projevem je dnavá artritida, která je nejčastějším kloubním onemocněním mužů nad 40 let (Žurek, 2006).

První atak dnave artritidy se projeví u mužů ve věku 40 až 60 let. U žen se dna vyskytuje ve většině případů až po menopauze, tedy nejdříve po šedesátém roce věku. V této době je vznik onemocnění způsoben snížením hladiny ženských pohlavních hormonů. V důsledku snížení těchto hormonů se výskyt nemoci u populace žen a mužů vyrovnává, ve věku mezi 75–84 lety se výskyt dny u mužů i žen dostává až k 8 % populace. Ve stáří nemoc také více postihuje horní polovinu těla a její klouby. Především paže a ramenní klouby (Pavelka, 2008). U mužů je tato hladina více než 420 $\mu\text{mol/L}$ a u žen více než 360 $\mu\text{mol/L}$ (Seegmiller et. al, 1962).

Výskyt dny bývá typicky spojován s obezitou a s hypertriacylglyceremií, která se zjišťuje u 75–80 % pacientů. Diabetes melitus bývá spojen s nálezem hyperurikémie u 1-5 % případů. Hypertenze je diagnostikována u 22–38 % pacientů s hyperurikémií, což souvisí s častými případy srdečních selhání a vyšší mortalitou (Žurek, 2006). Hyperurikémie je jedním z nejběžnějších onemocnění a nejrozšířenější nemocí v populaci. Mezi dospělou populací se vyskytuje od 2,3 do 41,4 %. V západních zemích a pacientů s jejím výskytem v rodinné anamnéze se vyskytuje až u 20 % pacientů dospělého věku (Pavelka, 2008).

3.2.3 Primární a sekundární hyperurikémie a dna

Hyperurikémií a dnu můžeme podle příčiny vzniku rozdělit do dvou skupin, a to na primární a sekundární. Primární hyperurikémie má z 90 % příčinu ve sníženém ledvinovém vylučování kyseliny močové. To může být způsobeno sníženou filtrací kyseliny močové, zvýšenou resorpcí nebo sníženou tubulární sekrecí. Zvýšená produkce kyseliny močové se objevuje pouze u 10 % případů primární dny (Žurek 2006). V praxi lze rozlišit příčiny hyperurikémie pomocí vyšetření odpadů kyseliny močové za 24 hodin. Normální hodnoty se pohybují mezi 1,8–3,6 mmol/24 hodin. Hodnoty pod 1,8 hodnotíme jako poruchy sekrece urátů a hladiny nad 3,6 mmol hodnotíme jako nadprodukcí urátů.

V praxi se nejčastěji objevuje dna primární. Ta je způsobena zvýšeným obsahem purinů ve stravě (Olejárová, 2011). Tuto skupinu pacientů zastupuje asi 50 procent indikované primární dny. Puriny se objevují nejčastěji u konzumentů masa, masných výrobků, vnitřností a podobně. Obsah těchto látek však není jediným původcem vzniku primární dny, často se kombinuje několik faktorů (Růžička, 2004). Primární dna v ojedinělých případech může být asociována specifickými enzymatickými defekty.

Sekundární hyperurikémie se sníženou exkrecí kyseliny močové provází ledvinná onemocnění s poklesem glomerulární filtrace (Pavelka, 2008). Snížené vylučování kyseliny močové je podstatou vzniku léky indukované hyperurikémie (Žurek, 2006). Sekundární dna vyvolává řadu onemocnění spojených se zvýšeným buněčným obratem a zvýšeným odbouráváním nukleoproteinů (Olejárová, 2011). Mezi tyto nemoci patří maligní onemocnění, generalizovaná psoriáza, hemolýza, terapie cytostatiky (Pavelka, 2010). Zároveň často vyvolává vznik nemocí v důsledku retence kyseliny močové. Hladinu kyseliny močové však mohou zvyšovat i léky (Růžička, 2004). Pokud se nemoc objeví před 25. rokem života, jedná se většinou o sekundární dnu.

3.2.4 Diagnóza dny

Typickou oblastí, kde můžeme lokalizovat dnu, je palec u nohy (obr.3). Palec nohy je postižen u 90 % nemocných. V dalších 10 % můžeme u pacientů najít postižení i jiných kloubů v lidském těle. Dnavá artritida se projevuje i na kloubech nohy, kotnících, patě, zápěstí, kloubech rukou a prstech. Dna se velmi vzácně může objevit i v páteři, kyčlích a ramenech (Neogi, 2011). Začátek dnavé artritidy je náhlý. Projevuje se intenzivní bolestí s výraznými známkami zánětu, jako je zarudnutí, otok a lokálně zvýšená teplota nad postiženým kloubem (Žurek, 2006). Nález hyperurikémie u pacienta s akutními nebo chronickými kloubními problémy ještě nelze diagnostikovat jako dnu.

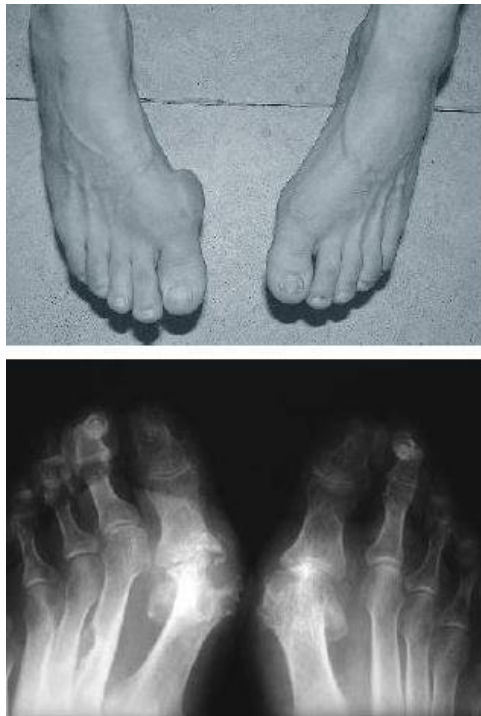
V období akutního dnavého záchvatu bývá až ve 33 % nacházena normální nebo snížená hladina kyseliny močové. Pro definitivní diagnózu má zásadní význam analýza kloubního výpotku s průkazem krystalů natrium urátu při vyšetření polarizačním mikroskopem (Olejárová, 2011). Vyšetřuje se také pomocí RTG, bakteriologického vyšetření kloubního zánětu nebo pomocí radiografického vyšetření prvních atak. Klinický obraz zůstává základem pro diagnostiku dnave artritidy klíčovým (Žurek, 2006). Existuje několik souborů různých diagnostických kritérií založených na klinických nálezech, laboratorních vyšetřeních a průkazu urátových krystalů v kloubní tekutině.

Zajímavou diagnostickou pomůckou používanou ve Spojených státech amerických je hodnocení příznaků dny pomocí bodového systému tzv. sedmibodového skóre. Každý z příznaků je ohodnocen určitým počtem bodů a podle konečného součtu příslušných bodů se diagnostikuje dna. Celkové maximální skóre je 13 bodů. Pokud se pacient dostane na skóre 4 a méně, téměř ve 100% případech se nejedná o dnu, pokud se dostane na skóre 8 a více, je diagnostikována dna u více než 80% případů. Pokud se pacient ocitne mezi těmito hodnotami, je diagnóza nejistá a dnu můžeme diagnostikovat přibližně u 30 % pacientů (Smith et al., 2011)

3.2.5 Terapie a farmakoterapie dny

Terapii dnave artritidy dělíme do čtyř základních stádií podle postupu nemoci v organismu. První stádium se nazývá asymptotická hyperurikémie. Toto stadium je charakterizováno laboratorním vyšetřením zvýšené hladiny urátů v séru bez manifestace dnave artritidy nebo přítomnosti urolithiasy. V průměru trvá 20 let a končí prvním akutním záchvatem dnave artritidy (Pavelka, 2008). V akutní fázi bývají krystaly přítomny především intracelulárně fagocytované leukocyty. Zvýšená koncentrace urátu v kloubní tekutině je jednou z hlavních podmínek vzniku dnave artritidy (Smith et. al, 2011). Stadium akutního dnaveho záchvatu léčíme pomocí zmírnění symptomů a zkrácení doby záchvatu na minimum.

Z hlediska nefarmakologických opatření je důležitý klid na lůžku, dieta a lokální ochlazení kloubu, který byl záchvatem zasažen. Dávka léků v průběhu dnavého ataku není upravována. Mohly by totiž vyvolat nebo zesílit jeho průběh (Žurek, 2006)



Obr. 3 Ataka dnavé artritidy u palce nohy a typické rentgenové změny tzv. tofy

Jedním z nejčastějších faktorů ovlivňujících vznik záchvatu dny je dietní chyba nebo exces v požití alkoholu. Může být však způsoben také traumatem či chirurgickým zákrokem. Neméně zanedbatelný je také vliv léků jako jsou thiazidová diuretika, intravenózně podaný heparin, allopurinol, cyklosporin a podání radio-kontrastních látek. Cílem hypourikemické terapie je snížení hladiny urátu v krvi pod $360 \mu\text{mol/L}$. Terapie se zavádí až po úplném odeznění zánětu kloubu (Olejárová, 2011). Pro léčbu akutního záchvatu se již několik století používá lék kolchicin. Jeho zdrojem je cibule ocúnu (*Colchicum autumnale*). Mechanismus účinku se vysvětluje tak, že kolchicin inhibuje fagocytózu jehlicových krystalů.

Limitujícím faktorem je však vysoký výskyt gastrointestinálních příznaků, především průjmu. Při prvním záchvatu podáváme 1 mg, pak 0,5 mg v intervalu 2 hodin až do dosažení úlevy nebo objevení průjmu. Pokud nedojde k úlevě, podáváme po 6 hodinách až do konečné dávky 5 mg (Růžička, 2004).

Asymptomatické období mezi dnavými záchvaty je tzv. Inter-kritická fáze. U neléčených pacientů se frekvence záchvatů zvyšuje, v dalším průběhu ataky dny nemají tak náhlý počátek, avšak mohou se projevit zánětem více kloubů. Nicméně v tomto období stále může dojít k úplnému vymizení potíží (Žurek, 2006). Pokud však obtíže neodejdou, nemoc postupuje do chronického stadia.

Chronická dna vede u pacientů k zánětům spojeným s bolestí, a tedy k výraznému snížení kvality života. Dokonce k subjektivně větším omezením a snížení kvality života než u pacientů trpících diabetem nebo zvýšeným krevním tlakem. Tyto problémy se týkají především mužů ve věku 54-66 let (Smith, 2011). Průběh neléčené dny může být různý. Projevuje se mírnými atakami, které mohou ustoupit do několika hodin, ale také těžkými dnavými záchvaty, které mohou trvat několik dnů až týdnů (Žurek, 2006). V chronickém stadiu nemoci často dochází k nálezům tzv. tofů.

Tofy jsou depozita krystalů natrium urátu v měkkých tkáních. Objevují se u 50 % nemocných po 10 letech od prvního dnavého záchvatu. Ve většině případů se však jedná o minimální depozita krystalů. Jejich tvorba souvisí se stupněm a délkou trvání hyperurikémie. K častější tvorbě tofů jsou náchylnější jedinci s onemocněním ledvin užívající diuretika. Tofy se mohou objevovat především v oblasti drobných kloubů nohy, ruky, v kotnících a kolenech (Olejárová, 2011). Tvorba těchto krystalů je v těle ovlivněna teplotou, změnou pH kloubní tekutiny a přítomností proteoglykanů (Žurek, 2006). Při rozhodování o zahájení farmakologické terapie je důležité přihlídnout k výšce hladiny kyseliny močové a k přítomnosti reverzibilních faktorů vedoucích k hyperurikémii.

Mezi tyto faktory řadíme více než 2-3 záchvaty za rok, hladinu kyseliny močové vyšší než 540 $\mu\text{mol/L}$, změny kloubu na RTG, nález tofů nebo utolithiasy. Při objevení těchto faktorů dochází k indikaci chronické dny a dlouhodobému podávání léků na snížení této hladiny pod koncentraci $<360 \mu\text{mol/L}$ (Becker et al., 2005). Léky používané k léčbě dny nazýváme urikostatika, jsou to strukturální inhibitory XO a jejich účinkem je její inhibice.

Nejznámějším a nejpoužívanějším lékem při indikaci dny je allopurinol, který je izomerem hypoxanthinu a po konverzi na oxypurinol snižuje koncentraci sodných urátů v krvi právě pomocí inhibice XO (Žurek, 2006). Můžeme jej označit jako inhibitor spadající do kategorie purinových inhibitorů. Jeho maximální dávka na den je v současné době stanovena na 800 mg. Avšak Evropská liga proti revmatismu (ELUAR) doporučuje snížení dávek na 100-300 mg/den. Při překročení denního limitu mohou totiž vznikat nežádoucí účinky léku. Nejběžnějšími vedlejšími účinky jsou kožní reakce, jako například hypersenzitivita, projevující se kožní vyrážkou (Ye et. al., 2013).

Mezi další nežádoucí účinky můžeme zařadit gastrointestinální intoleranci, kterou je však možné eliminovat požitím léku s jídlem (Pavelka, 2008). Allopurinol se dobře vstřebává ve stravě. Maximální účinek léku se projeví po 4-14 dnech pravidelného užívání. Po jeho vysazení může efekt přetrvávat ještě 4 dny (Žurek, 2006).

Dalším účinným lékem používaným k léčbě dny a hyperurikémie je febuxostat. Tento nepurinový XO inhibitor byl na rozdíl od allopurinolu schválen i k léčbě hyperurikémie. Febuxostat inhibuje oxidační i redukční formy XO a má i malý efekt na další purinové a pyrimidinové metabolické enzymy, což indikuje lepší efekt při léčbě dny (Ye et. al, 2013). Febuxostat se používá v mnohem menších koncentracích 80-120 mg/den. Při dávce 40 mg, má přibližně stejný účinek jako allopurinol v dávce 200-300 mg/den (Žurek, 2006). Maximální dávka pro jeden den je 300 mg. Febuxostat je také mnohem účinnější při léčbě dny u lidí s poruchou ledvin (Becker et al., 2005).

Dlouhodobé studie ukázaly vysokou účinnost febuxostatu. Výskyt dny při užívání klesá, avšak nežádoucí účinky, zejména gastrointestinální poruchy, se podobají allopurinolu (Edwards et al., 2009).

Nízkopurinová dieta a další doporučení při léčbě dny

K prevenci opakovaných dnových záchvatů a vytváření krystalů natrium urátu pomocí nefarmakologických opatření je důležité zapojit k léčbě i dietu s nízkým obsahem purinů. Při této dietě však většinou nedochází k většímu poklesu urátu než je 60 $\mu\text{mol/L}$. Redukce hmotnosti, vyloučení alkoholu a dostatečný příjem nealkoholických tekutin usnadňuje vylučování urátů z těla (Pavelka, 1995). Vzhledem k tomu, že jednou z nejčastějších příčin vyvolání dnavého záchvatu je dietní chyba, Pavelka vypracoval výživové doporučení potravin, které se hodí a nehodí ke konzumaci u pacientů s dnovou artritidou. Tyto potraviny můžeme rozdělit do tří skupin podle vhodnosti požití. Mezi nevhodně zařazené spadají červené maso, vnitřnosti, luštěniny, alkohol, špenát, chřest, ovesné produkty, čokoláda a další. Do občas požitelných potravin patří omezené množství masa, tuňák, losos.

A naopak vhodné je do stravy zařadit mléko a mléčné produkty, ovoce, rýži, brambory, mouku, rostlinné a živočišné tuky (Pavelka, 2008). Nová opatření nicméně směřují obecně ke snížení příjmu proteinů ve výživě jako takových, neboť obsah proteinů silně koreluje s obsahem nukleových kyselin a tato doporučení jsou pro pacienty snadno zapamatovatelná (Jordan et al., 2007).

3.3 Komplementární a bylinná farmakoterapie dny

3.3.1 Historie bylinné medicíny

Bylinná medicína má ve světě dlouhodobou tradici, a to především v Asii (Kong et al., 2000). V letech 3000 př. n. l. bylo v Číně používáno přes 230 léčivých rostlin k léčení všech druhů nemocí. Ajuverda, nejstarší systém zdravotní péče, je vykonáván široce v zemích jako je Indie, Srí Lanka a dalších státech po celém světě. Atharvaveda, Charak Samhita a Sushrut Samhita jsou hlavními klasiky této medicíny a popsali více než 700 bylin velmi podrobně v letech mezi 500-100 př. n. l. Na našem kontinentu jsou první zmínky o bylinném lékařství datovány v roce 78 našeho letopočtu, kdy Dioscorides napsal spis s názvem *De Materia Medica* popisující tisíce léčivých bylin. Toto pojednání zahrnuje popisy mnoha léčivých rostlin, které zůstávají důležité i v dnešní moderní medicíně hlavně proto, že slouží jako zdroj důležitých čistých chemických látek, které mají významnou roli v použití v moderní terapii (Mukhopadhyay et. al., 2012).

Moderní medicína disponuje silnými chemicky syntetizovanými léčivy, přesto však nemocnost neklesá, a bohužel narůstá počet tzv. patogenních poškození, kdy nemocný je po léčbě více nemocen z prostředků léčby než z původní choroby. Proto stále roste zájem o alternativní medicínu a její důležitost uznávají i lékaři. Odvětvím, kterým se zabývá tato práce, je fytoterapie čili léčení bylinami. Fytoterapií myslíme cílené léčivé postupy, které jsou v souladu s poznatky soudobé vědy (Zentrich, 2007).

Světová zdravotnická organizace (WHO) rovněž uznává význam tradiční medicíny a vytvořila strategii, směrnice a standardy pro botanické léky. Rovněž přiznává, že téměř 65 % světové populace začlenilo rostlinnou terapii jako součást své normální zdravotní péče.

Často se uvádí, že 25 % všech předepsaných léčiv je odvozeno z rostlin, ať už se jedná o přírodní látky nebo jejich syntetické deriváty (Mukhopadhyay et al., 2012).

Ve světě existuje 250 000 druhů vyšších rostlin, z nichž 10 000 je používáno k léčebným účelům. Přitom každá rostlina obsahuje stovky mnohdy terapeuticky využitelných chemických látek, které mohou příznivě ovlivňovat zdraví člověka (Cos et. al, 1998). Tabulka. 1 demonstruje důležitost přírodní farmakoterapie vyjádřenou počty druhů léčivých rostlin používaných v různých zemích světa. Největší druhová pestrost a využití bylin v tradiční medicíně je v Číně, Indii a Jihoafrické republice. Toto jsou také regiony, ve kterých má tradiční medicína nejdelší tradici.

Země původu	Celkový počet původních druhů rostlin	Počet léčivých druhů rostlin
Bulharsko	3567	750
Francie	4630	900
Maďarsko	2214	270
Ceská republika	610	190
Malajsie	15500	1200
Nepal	6973	900
Pákistán	4950	1500
Filipíny	8931	850
Srí Lanka	3314	550
Thajsko	11625	1800
Vietnam	10500	1800
Čile	4672	462
Čína	27100	11146
Indie	17000	7500
Mexiko	30000	2237
Spojené státy Americké	20000	2572
Jižní Afrika	22000	4000

?

Tab.1 Počty využívaných rostlinných druhů v tradiční terapii Tab.1 Počty využívaných rostlinných druhů v tradiční terapii
(Mukhopadhyay et al. , 2012)

3.3.2 Léčivé rostliny s využitím pro léčbu dny

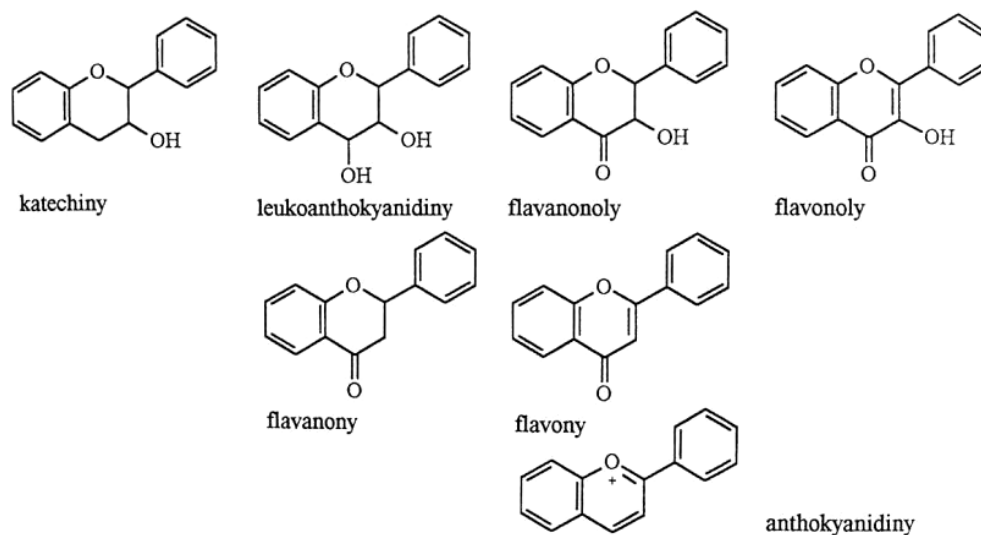
Používání allopurinolu vede sice u velké části pacientů k mírným, avšak pro 2 % populace významným, vedlejším účinkům. Proto je zcela pochopitelná snaha mnoha vědeckých týmů o hledání alternativ, které tyto vedlejší účinky nemají.

Nabízí se i možnost ovlivnit metabolismus kyseliny močové pomocí stravy bohaté např. na vybrané sekundární rostlinné metabolity s účinkem na xanthinoxidasu nebo léčivý na základě léčivých bylin a přírodních látek. Příkladem takových léčiv je v čínské medicíně používaný přírodní lék *Simiao Pills*. Ty jsou popsány v tradiční čínské medicíně, kde byly používány přes 700 let jako účinné léky proti dně a dnové artritidě. Jejich složení obsahovalo čtyři rostliny *Atractylodis macrocephala*, *Phelloden drichinensis*, *Coix lacryma-jobi* a *Achyranthes bidentatata* v poměru 10:10:15:15 g (Hua et al., 2012) Čelit složitým patologickým jevům ve fázi časně a střední fáze dny a hyperurikémie lze pomocí modifikované vylepšené *Simiao Pills*. Uvádí se, že mají vysokou účinnost, povzbuzují vitální energii, zvyšují frekvenci močení, detoxikaci a snižují záněty. Tyto přírodní léky jsou vyráběny a podávány na základě klinických zkušeností. Jedná se o klasické *Simiao*, které je obohacené o další rostliny *Dioscorea hypoglauca*, *Anemarrhena asphodeloides* (Hua et al., 2012).

Přestože data z klinických studií zatím chybí (s výjimkou klinické studie konzumace třešní a studií na podávání *Ermiao-* a *Simiao Wan*), je celá řada dat z *in vitro* a *in vivo* experimentů, které ukazují, že přírodní látky mohou mít na léčbu dny vliv. V dnešní době pociťuje část pacientů odpor k farmakoterapii, preferují přírodní léčbu a je tak vhodné ověřit, zda tyto prostředky mají potenciál v prevenci nebo léčbě.

3.3.3 Flavonoidy- účinné látky při léčbě dnové artritidy a hyperurikémie

Flavonoidy jsou široce rozšířeny v rostlinách, můžeme je najít v kořenu, listu, semenech, kůře či květu. Dodnes jich bylo identifikováno více než čtyři tisíce. Flavonoidy jsou sekundární metabolity organismu s polyfenolovou, zpravidla C₆-C₃-C₆ strukturou (Van Hoorn et al., 2002). Dělí se do šesti základních skupin (obr. 4) na anthokyany, flavanoly (katechiny), flavony, flavanony, flavonoly a isoflavonoidy (Cook a Samman, 1996).



Obr.4 obecná struktura flavonoidních látek (Velíšek, 2002)

Flavony, flavanony a flavonoly mají podobnou chemickou strukturu. Flavanony jsou obsaženy v mnoha druzích potravin především v citrusovém ovoci a džusech. Podílí se na barvě a chuti ovoce jako naringin v grapefruitu a hesperidin v pomerančích. Ve skupině flavonů se nejběžněji vyskytuje apigenin a luteolin. Apigenin a jeho glykosidy najdeme povětšinou v potravinách jako je petržel, v obilninách a zelenině (Cos et. al, 1998)

Flavonoly jsou sloučeniny obsažené ve většině rostlinných potravin. Nejznámější jsou kvercetin a kaempferol. Kvercetin se vyskytuje především v listové zelenině. Chmel obsahuje 700 mg/ kg kvercetinu.

Isoflavony jsou nejčastěji v luštěninách a sóje. Jsou to bezbarvé sloučeniny, jejichž zástupci jsou daidzein, genistein.

Anthokyany byly izolovány jako první flavonoidové sloučeniny z pigmentů rostlin. Produkují červené a fialové zbarvení ovoce. Jejich barva je závislá na pH. Poslední a nejkomplicovanější skupinou jsou flavany. Mezi ně řadíme katechiny, leucoanthokyaniny, taniny. Velké množství katechinů se vyskytuje v čaji (Heim et al., 2002).

Flavonoidy jsou také přítomny v léčivých bylinách a běžně se používají jako součást léčivých přípravků. Extrakty léčivých rostlin obsahující flavonoidy se používají ke zlepšení cévního tonu, jako antiseptika, zlepšují vidění. Druh rostlin Labiatae jsou zdrojem těchto bylin používaných v léčivých přípravcích. Zahrnuje byliny, jako je máta, bazalka, oregano, rozmarýn, šalvěj, tymián. Většina účinků prospěšných na zdraví jsou připisovány zejména antioxidační a chelatační aktivitě. Na základě těchto chemických vlastností inhibují oxidaci LDL cholesterolu a mají kardiopreventivní účinky (Cao et al., 1997).

Existují studie, které potvrzují, že flavonoidy také působí jako inhibitory některých enzymů v lidském organismu. Mezi tyto enzymy patří lipoxigenasa, cyklooxygenasa, monooxygenasa, xanthinoxidasa, NADH-oxygenasa, fosfolipasa a také enzym xanthinoxidasa, jehož inhibice se využívá právě při léčbě dny a hyperurikémie (Lin et al., 2002).

3.3.4 Dosud publikované *in vitro* a *in vivo* studie

In vitro studie

Na toto téma bylo publikováno několik širokých screeningových studií po celém světě, ve kterých se jejich autoři zaměřili na testování rostlin především v místních tradičních léčebných systémech. Tyto výsledky ukázaly, že rostlinné extrakty mohou být budoucností v léčbě dny a hyperurikémie. *In vitro* testy ukázaly, že mnoho těchto rostlin je skutečně silným inhibitorem xanthinoxidasy.

Studie byly publikovány týmy z Vietnamu, Číny, Brazílie, Austrálie, Indie, Panamy, Severní Ameriky, středomořského regionu a také v České republice (Nguyen et al., 2004; Kong et al., 2000; Filha et al., 2006; Sweeney et. al, 2001; Umamaheswari et al., 2007; Owen et al., 1999; Havlik et al., 2010; Gonzales et al., 1995; Flemming et al, 2011).

Filha a Vitolo (2006) testovali v Brazílii rostliny druhu *Lychnosporas*. Tyto rostliny byly vybrány na základě poznatku, že jsou v Brazílii dlouhodobě používány mezi lidmi jako léčivé byliny s protizánětlivými, analgetickými účinky a také při léčbě revmatu. Bylo testováno 16 extraktů. Všechny tyto extrakty vykazovaly vysokou aktivitu XO-inhibice. Nejaktivnějšími rostlinami v testech byly *L.trichocarpha*, *L.ericoides*, *L.candelabrum*, *L. Staaviodes* s inhibiční aktivitou 77,78, 66, resp. 63 % při koncentraci 100 µg/mL. IC₅₀ byla 6,16; 8,28; 33,97; resp. 37,7 µg/mL. Posledně zmiňované rostliny vykazují pozitivní výsledky a mohly by být použity jako potenciální inhibitory xanthionoxidas vyžitelné pro léčbu (Filha et.al, 2006).

Podobná screeningová studie byla publikována ve Vietnamu. Tam má tradiční medicína také velmi dlouhou tradici. Autoři studie testovali 96 vzorků rostlin používaných k léčbě dny a hyperurikémie, resp. podobné indikace vycházející z principů asijské tradiční medicíny. Celkem 126 extraktů z těchto rostlin bylo testováno na aktivitu inhibice xanthinoxidas. Všechny z nich vykazovaly nějaký stupeň inhibice XO aktivity při koncentraci 10µg/mL, pouze dvě rostliny při této koncentraci inhibovaly aktivitu z více než 50 %. Největší inhibiční aktivitu vykazovala *Chrysantenum sinense* (IC₅₀ 5,1 µg/mL). Tato rostlina dokonce vykazovala v testu silnější inhibiční aktivitu než klinicky používaný allopurinol (Nguyen et. al, 2004).

V české studii bylo vybráno 27 rostlinných druhů léčivých bylin. Téměř 50 % extraktů vykazovalo nějaký stupeň inhibiční aktivity. Nejdůležitějšími byly identifikovány *Populus nigra*, *Betula pendula*, které vykazovaly hodnoty IC₅₀ 8,3 a 25,9 µg/mL.

To také koresponduje s etnobiologickými údaji o použití těchto rostlin ve Středoevropském regionu. Všechny z nich jsou uvedeny v herbáři českých bylin autorů Jančí a Zentricha (Zentrich a Janča 1997) jako prostředky tradičně využívané proti dně (Havlik et al., 2010).

Sweeney a Wyllie prováděli studii na rostlinných druzích používaných tradičně v Austrálii. Připravili extrakty ze 17 druhů léčivých bylin tradičně používaných v tomto odvětví komplementární a bylinné medicíny. Bylo zjištěno, že extrakty z devíti rostlin měly větší inhibiční aktivitu než 25 % při koncentraci 100 µg/mL.

Největší inhibici ukazovala *Clerodendrumfloribundum*, *Eremophilamaculata* a *Stemodia grossa*. U těchto bylin byla zjištěna inhibice vyšší než 40 % při koncentraci 100µg/mL. Všechny extrakty těchto rostlin by se mohly použít jako přírodní léčba dny a hyperurikémie (Sweeney et al., 2001).

Čína je jedním z hlavních států, kde má tradiční medicína tisíciletou tradici, a proto je také příkladem pro mnoho jiných zemí ve světě. V rozsáhlém screeningovém testu bylo analyzováno 122 ethanolových extraktů z tradičních čínských medicínských rostlin, které jsou v tomto regionu často používány k léčbě dny. Nejaktivnějším methanolovým extraktem se stal *Cinnanamum cassia*, skořicovník, u kterého byla stanovena hodnota inhibice vyjádřena IC_{50} 18 µg/mL. Druhá nejvýznamnější aktivita byla naměřena u rostliny *Chrysanthemum indicum*, která ale byla zahrnuta i ve studii z Vietnamu. V čínské studii bylo pro extrakt z této byliny stanoveno IC_{50} 22 µg/mL (oproti *Chrysanthemum sinense* IC_{50} 5,1 µg/mL) testovaných ve studii Nguyen et al., což je obojí poměrně silná inhibice. Závěry této čínské studie jsou opět optimistické a uvádí možnost použití těchto rostlin v terapii dny (Kong et al., 2000).

Studie vypracovaná v Indii se zaměřila na 6 rostlin používaných v tomto regionu jako léčivé byliny. Terapeutické účinky těchto látek jsou připisovány látkám, jako jsou flavonoidy, terpeny, alkaloidy, fenoly.

Methanolové extrakty ukázaly, že rostliny *Coccinia grandis*, *Datura metel*, *Strychnos nux-vomica*, *Vitex negundo* vykazovaly inhibiční aktivitu vyšší než 50 %, avšak pouze *Strychnos nux-vomica*, *Vitex negundo* ukázaly hypourikemickou aktivitu *in vivo* na myších (Umamaheswari et al., 2007).

V Severní Americe bylo testováno 26 čeledí rostlin vybraných ze 17 druhů rostlin. U 88 % extraktů byla zjištěna inhibice při 100 mg/ml větší než 50 %. Modřín *Larix laricina* vykazoval inhibiční aktivitu 86,3 % (Owen et. al, 1999).

Díky rozmanité flóře Jižní Ameriky byla další studie vypracována v Panamě. V této studii bylo testováno 34 vzorků z rostlin Celasraceae a Lamiaceae na inhibici XO- aktivity *in vitro*. Bylo zjištěno, že 85 % vzorků má vysoké inhibiční účinky při 50 µg/ml. Všechny vzorky z rodu Lamiaceae vykazovaly inhibiční aktivitu již při velmi malých koncentracích, vysoká aktivita ale byla zjištěna i u extraktů *Hyptis obtusiflora* a *Hyptis lantanaefolia* (Gonzalez et al., 1995).

Ve středomoří se již mnoho let používají listy stromu *Olea europea* k léčbě zánětlivých onemocnění. Na toto téma zpracoval studii Flemming (2011), zaměřil se na účinky XO inhibice a fenolických sloučenin obsažených v těchto extraktech. Bylo zjištěno, že ethanolové extrakty *Olea* sp. vykazovaly IC₅₀ 42µg/ml. Při testování fenolických látek izolovaných z těchto extraktů byl největší efekt zjištěn u apigeninu a luteolinu, a to s hodnotami 0,33 a 0,086 µM/100 mg. Těmito výsledky bylo prokázáno, že využívání listů *Olea europaea* při protizánětlivých onemocněních má racionální základy (Flemmig, 2011).

In vivo studie

Zatímco *in vitro* testů na XO inhibiční aktivitu byla publikována celá řada, *in vivo* testů je o poznání méně. V tradiční čínské medicíně se k léčbě dny a hyperurikémie již dlouho používá léčivý přípravek *Ermiao wan*.

Kong testoval toto léčivo *in vivo* na normálních myších a na laboratorně chovaných myších, kterým byl podáván oxonát draslíku k vyvolání hyperurikémie, aby potvrdil inhibiční aktivitu xanthinoxidasy, a tím účinek na snížení hladiny urátů kyseliny močové. Bylo zjištěno, že vodné extrakty připravené z obou rostlin Ermiao Wan vykazují relativní inhibiční aktivitu na xanthindehydrogenasu a xanthinoxidasu v játrech pokusných myší. Ermiao Wan a jeho složka kůry z *Phylodendron* sp. snižovaly aktivitu jaterní XO u hyperurikemických myší. U nehyperurikemických myší byla hladina urátů v séru $3,24 \pm 9,41$ mg/dl.

U hyperurikemických myší hladina stoupla na hodnotu $5,73 \pm 0,15$ mg/dl (176,9 % kontroly). Po sedmidenním podávání vodných extraktů Ermiao wan a kůry *Phelodendron* sp. se snížila hladina séra urátů v krvi hyperurikemických myší o 40,8 a 27,7 %. Avšak tento efekt inhibice jaterní XO u hyperurikemických myší byl v porovnání s alopurinolem nízký (Kong et. al, 2004)

V indické studii byla testována XO aktivita v játrech myší po podání vybraných extraktů. Zvířatům byl podáván methanolvý extrakt z *Coccina grandis* a *Vitex negundo*. U testovaných zvířat se ukázalo významné snížení hladiny sérových urátů pod $3,9 \pm 0,7$ mg/dl ($P < 0.001$) a 6.26 ± 0.06 mg/dl ($P < 0.01$). Tento efekt byl téměř shodný s hladinou séra urátů kontroly $3,56 \pm 0,6$ mg/dl. Skupina myší léčených pomocí alopurinolu ukázala výsledky $3,89 \pm 0,7$ mg/dl ($P < 0.001$). Z těchto extraktů byly také izolovány sloučeniny jako flavonoidy, terpeny, polyfenoly a další látky, které stojí za antioxidačními a protizánětlivými účinky těchto rostlin. Obsahem těchto látek bylo dokázáno, že tyto rostliny a rostlinné látky mohou být aktivní i *in vivo* (Umamaheswari et al., 2007).

Další *in vivo* studie se zaměřila na silice a extrakty ze skořicovníku *Cinnamomum* sp. Výsledky ukázaly vysokou inhibiční aktivitu s hodnotou IC_{50} 16,3 μ g/ml v *in vitro* testu u silic, ale ne u vodných a ethanolvých extraktů těchto olejů.

Hyperurikemickým myším byla perorálně podána hlavní účinná látka cinnamaldehyd, majoritní složka skořicové kůry a terpenické frakce z ní, v dávce 150 mg/kg. Podávání cinnamaldehydu vedlo ke snížení sérového urátu o 84, 5 %. Vzhledem ke zjištěné aktivitě má cinnamaldehyd potenciál využití v léčbě nebo prevenci dny (Wang et. al, 2013).

4 Materiál a metody

V této práci je zkoumána inhibice xantoxidasové aktivity bovinní mléčné xanthinoxidasy prostřednictvím vodných extraktů léčivých bylin. Cílem screeningu je zjistit, jestli inhibice aktivity XO je u těchto extraktů významná, a které rostliny by následně mohly být potenciálně kandidáty k dalšímu návaznému výzkumu vedoucímu k vývoji přírodního preparátu k léčbě nebo jako prevence dny a hyperurikémie. Vzhledem k tomu, že XO aktivita vede k produkci peroxidu vodíku, tlumení vede ke snížení významného pro-oxidačního faktoru. V práci bylo zkoumáno 28 vodných extraktů léčivých rostlin.

4.1.1 Materiál

Rostlinný materiál a příprava extraktů

Rostlinný materiál pro následnou přípravu extraktů byl získán z komerčních zdrojů v roce 2009 (nabídka fy. Byliny Mikeš).

Chemikálie a ostatní materiál

Pro stanovení XO inhibice byly použity 96 jamkové destičky Costar UV transparent. Allopurinol, xanthin, xanthinoxidasa z kravského mléka (XO roztok 16,3 mg proteinu/ml, 1,5 U/mg proteinu) byly zakoupeny u firmy Sigma Aldrich (CZ). Chemikálie NaOH, KH_2PO_4 , z kterých byl připraven pufr, byly zakoupeny u firmy Lach-Ner.(CZ)

Extrakce vzorků

Vzorky, které byly použity v experimentální části, byly vyrobeny metodou podle Evropského patentu EP 1469927 - Method and device for producing plant extracts (metodika a zařízení pro výrobu rostlinných extraktů), dále jen patent. Tento patent má zaregistrovaný společnost Primrose a.s, kde byly vzorky extraktů vyrobeny.

Popis výroby extraktů pomocí patentu Obr.5

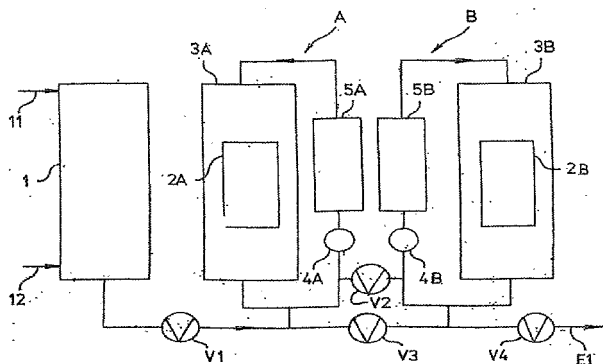


Fig. 1

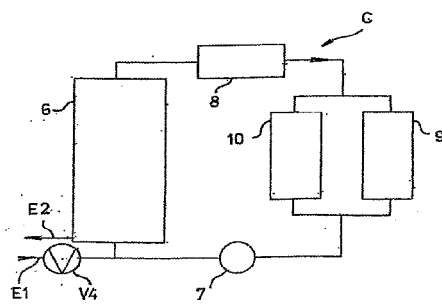


Fig. 2

Na obr.5 jsou znázorněny dvě výrobní fáze. V první fázi Fig.1 můžeme vidět extrakční zařízení a v druhé fázi Fig. 2 vidíme zařízení sloužící k pasteraci, filtraci a uchovávání.

Celková fotografie zařízení není dostupná z důvodů běžícího procesu průmyslové ochrany.

Průběh výroby extraktů

V počáteční fázi výroby se směs rostlinného materiálu uloží do filtračních vaků, které jsou umístěny v první a druhé extrakční nádobě. Výluh, ve kterém byla upravena hodnota pH na 7,5, proudí prvním rukávovým filtrem v první extrakční nádobě. Poměr rostlinného materiálu a vody je 1:20, teplota je ustálena na 52°C. První extrakce trvá 16 minut.

Po první fázi vyluhování je částečný podíl extrakčního materiálu převeden do druhého stupně extrakce a do druhé extrakční nádoby, kde je smíchán s novým rostlinným materiálem. Nový rostlinný materiál a voda jsou zde v poměru 1:20. První extrakt zde cirkuluje a reprezentuje extrakční medium. Teplota extrakčního média je opět 52 °C, avšak tato fáze trvá 18 minut. Po ukončení je produkt převeden do nádrže. Poté může začít nová extrakce.

Konečný produkt extrakce je převeden do zásobníku, kde cirkuluje pod teplotou 80 °C přes filtrační jednotky tepelným výměníkem. Cirkulace je prováděna pomocí čerpadla po dobu 15 minut. Dochází zde k pasterizaci produktu, která slouží k jeho dlouhodobé údržnosti. Poté je filtrace ukončena uzavřením filtračního obvodu a produkt je převeden do nádoby, kde dochází ke konzervaci pomocí roztoku parabenů a kyseliny sorbové.

Stanovení sušiny vzorků

Přesné stanovení sušiny bylo získáno sušením vzorků v peci. Do předsušených, vychladlých a zvážených kovových kalíšků bylo napipetováno 3 nebo 5 ml vzorku podle hustoty navážky. Navážka byla zvážena a kalíšky vloženy do sušící pece a vysušeny při 60 °C po dobu 7 hodin, poté byla teplota zvýšena na 105°C.

Metoda stanovení XO inhibiční aktivity

Inhibiční aktivita bylinných vodných extraktů byla měřena UV spektrofotometrickou metodou.

Příprava zásobních roztoků

Byly připraveny roztoky: 1 M NaOH, 1 M *ortho*-fosforečná kyselina, 100 ml 1M KH₂PO₄/K₂HPO₄ pufru o pH 7,5 získaného smícháním 80,6 ml 1M K₂HPO₄ a 19,4 ml 1M KH₂PO₄. Enzym XO o koncentraci 0,5 U/ml připravený naředěním v poměru 31,25 μl enzymu k 988,75μl 100 mM pufru. Roztok allopurinolu naředěný na koncentraci 1 mg/ml.

Příprava pracovních roztoků

Pracovní roztok 100 mM pufru o objemu 200 ml byl získán desetinasobným naředěním 1M $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ pufru. Dále byl připraven 300 μM xanthinu (5,7 mg) v pufru, který byl před přidáním pufru smíchán s malým množstvím NaOH a pH bylo dorovnáno na 7,5 pomocí kyseliny *ortho*-fosforečné. Roztok byl přenesen do 100ml volumetrické baňky, kde byl doplněn pufrům po risku. Extrakty byly naředěny na koncentrace 2%, 1%, 0,5% a 0,25 %. Pracovní roztok allopurinolu byl naředěn 100násobně na koncentraci 0,01 mg/ml a pracovní roztok XO byl připraven ředěním pufrům na koncentraci 0,0165 U/ml.

Vlastní test

Testování 28 vzorků 28 bylin probíhalo v 96-jamkových UV transparentních mikrotitračních destičkách. U každého vzorku byl měřen i slepý vzorek s ultračistou vodou, jinak byl použit stejný postup jako u vzorků extraktu. Do všech jamek mikrotitrační destičky bylo napipetováno 100 μl 100mM pufru a do jamek s nejvyšší koncentrací pufru bylo přidáno 100 μl vzorku bylinného extraktu. Pomocí multikanálové pipety byl obsah v jamkách promíchán a přenesen vždy po obsahu 100 μl do další řady na destičce. Tímto postupem bylo dosaženo čtyřnásobného ředění vzorku ve třech opakováních. Po té bylo dodáno do jamek 40 μl pufru a 30 μl xanthinoxidasy do každé jamky. Destička se vzorky byla dána inkubovat na 5 min třepačku. Blank a pozitivní kontrola s allopurinolem na každé destičce obsahovala místo vzorku pufr o objemu 30 μl . Každá jamka obsahovala látky o dané koncentraci: 0,0025 U/ml XO, 45 μM xanthin, a 50 mM pufr. K měření absorbance při vlnové délce 295 nm bylo použito zařízení TecanInfinite M200 (Tecan,AU). Reakce probíhala přibližně 10 min při teplotě 37°C a její průběh byl vyhodnocen jako AU/h v prvních pěti minutách lineárního průběhu této reakce.

Výsledná inhibice enzymu je vyjádřena vzorcem:

$$i = 100 - [(v_{vz} - v_{bl}) / (v_c - v_{bl})] \times 100 (\%)$$

i výsledná inhibice

v_{vz} rychlost reakce - vzorek

v_{bl} rychlost reakce - blank

v_c rychlost reakce - kontrola

Pro každou koncentraci vzorku byla zaznamenána inhibice enzymové aktivity (%). Hodnota byla zanesena do grafu a byla odečtena hodnota IC_{50} (obr. 6). Tato hodnota odpovídá koncentraci vzorku při 50% inhibici. Výsledky byly přes hodnotu sušiny přepočítány na původní extrakty a dále vyjádřeny v $\mu\text{g/ml}$ jako podíl odparku v roztoku. Jako pozitivní kontrola byl testován allopurinol s každou sadou vzorků v koncentraci 0,01-0,2 $\mu\text{g/ml}$.

5 Cíl práce

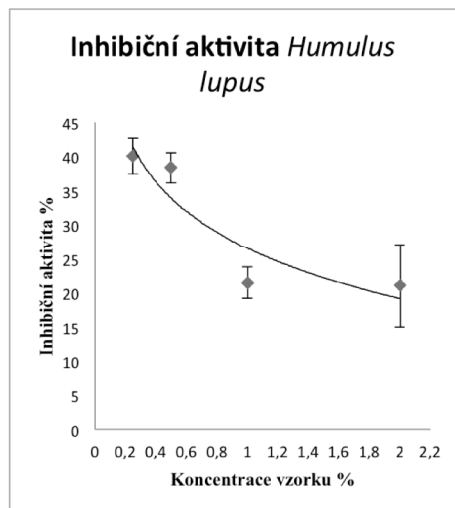
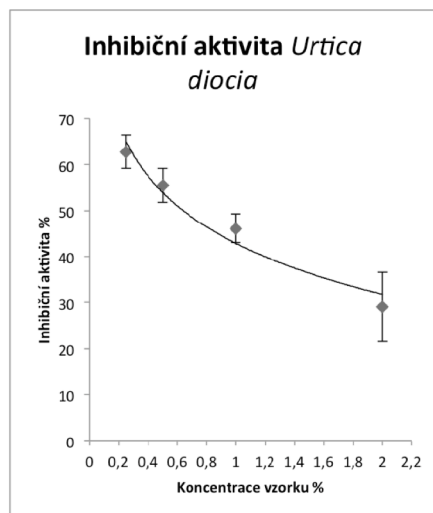
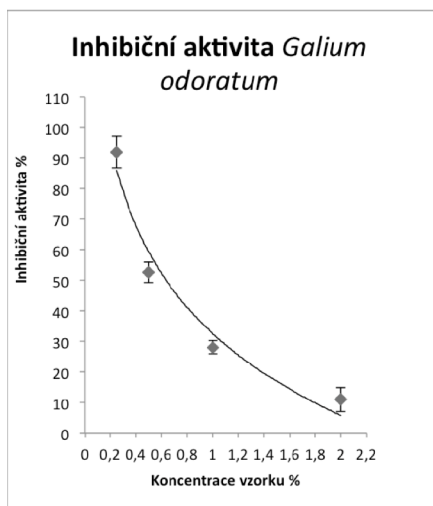
Cílem této práce je stanovení inhibice XO aktivity *in vitro* u 28 vzorků bylinných vodných extraktů vyrobených v české firmě Primrose a.s. Tyto extrakty jsou prvotně používány jako přírodní bylinné koupele, které jsou bez přídavku parfémů, barviv a alkoholu. Mimo to nacházejí uplatnění i ve výživě zvířat a firma se snaží nalézt také další možná uplatnění. Pomocí stanovení inhibiční aktivity xanthioxidasy se může prokázat další perspektiva využití těchto extraktů jako možné přírodní alternativy pro léčbu nebo prevenci pacientů s hyperurikémií nebo dnou, zvláště pak jejich využití u hraničních pacientů. Cílem je zjistit, jestli inhibice aktivity XO je průkazná, a které rostliny by následně mohly být využity k léčbě nebo jako prevence různých nemocí jako je dna. Dnes používaným léčivem je allopurinol, ten však u některých pacientů vyvolává negativní vedlejší účinky (hepatitida, nefropatie, alergie). Proto je hledání alternativního řešení léčby nebo zmírnění příznaků dny a hyperurikémie žádoucí. V experimentální části je popisována příprava vzorků, metody měření, výsledky a diskuze.

6 Výsledky

6.1 Výsledky stanovení inhibice XO aktivity

Z 28 testovaných vzorků (tab. č. 2; 3) bylinných extraktů vykazovalo významnější aktivitu inhibice enzymu xanthinoxidasy 21 (tj. 75%), tedy alespoň v nejvyšším testovaném ředění (2 %) . V nejnižším ředění 0,25% dosahovalo 20% inhibiční aktivity pouze sedm vzorků (tj. 25 % testovaných) vodných extraktů. Nejvyšší inhibiční aktivitu při všech ředěních obecně vykazoval vodný extrakt z chmele otáčivého (*Humulus lupulus*), který inhiboval enzym ze 60 %. Celkově byla zjištěna hodnota všech extraktů po přepočtu ředění na sušinu a vyjádřena jako IC_{50} vyšší než 100 $\mu\text{g/mL}$ pouze u dvou vzorků, konkrétně u ostropestřce mariánského (*Sylibum marianum*) ($IC_{50} 4 \mu\text{g/mL}$) a svízele vonného (*Galium odoratum*) ($IC_{50} 61 \mu\text{g/mL}$).

Naopak mezi vzorky s nejnižší inhibiční aktivitou patřily vzorek č. 1 pelyněk pravý (*Artemisia absinthium*.), vzorek č. 4 heřmánek pravý (*Chamomilla recutita*), vzorek č. 9 bříza (*Betula pendula*) a vzorek č. 18 světlík lékařský (*Euphrasia rostokoviana*.). U těchto bylinných extraktů byla zjištěna inhibiční aktivita XO nižší než 10% a to i při nejvyšší koncentraci vzorku 2%. Kompletní výsledky jsou shrnuty v tab. 2;3. Aktivita $IC_{50} 4 \mu\text{g/mL}$ u ostropestřce mariánského je velmi významná a ve srovnání s obdobnými testy by tento extrakt mohl být hodnocen jako silný inhibitor *in vitro*. Výsledky extraktu chmele otáčivého (*Humulus lupulus*), svízele vonného (*Galium odoratum*) a kopřivy dvoudomé (*Urtica dioica*) jsou znázorněny na fig. 1,2,3. Podle tohoto grafického znázornění byla vypočítána hodnota IC_{50} všech zkoumaných extraktů v této studii.



Obr.6 stanovení inhibiční aktivity IC_{50} u neaktivnějších vzorků (svízel vonný (*Galium odoratum*), kopřiva dvoudomá (*Urtica Diocia*), chmel otáčivý (*Humulus lupulus*))

Tab. 2 : Inhibiční aktivita XO měřená UV metodou

Číslo vzorku	Rostlinný druh	Aktivita enzymu při daném ředění (%)				sušina (g/L)	IC ₅₀
		2%	1%	0,50%	0,25%		
1	<i>Artemisia absinthium</i>	111,8 ± 6,4	111,2 ± 8,8	113,6 ± 3,3	98,6 ± 3	12,6	< 0,251
2	<i>Origanum vulgare</i>	40 ± 7,8	46,5 ± 1,3	71,2 ± 0,9	63,9 ± 2,4	16,4	0,172
3	<i>Silybum marianum</i>	44,1 ± 7,3	39,7 ± 3,6	65,5 ± 4,2	60,8 ± 2	5,6	0,004
4	<i>Chamomilla recutita</i>	113 ± 21,6	106,2 ± 26	107,5 ± 15,8	102,8 ± 1	26,6	< 0,532
5	<i>Mentha piperita</i>	40 ± 7,8	46,5 ± 1,3	71,2 ± 0,9	63,9 ± 2,4	16,0	< 0,320
6	<i>Humulus lupulus</i>	21 ± 6,1	21,5 ± 2,3	38,3 ± 2,2	40,1 ± 2,6	12,0	> 0,240
7	<i>Equisetum arvense</i>	73,3 ± 3,7	84,6 ± 5,2	86,5 ± 5,2	90,7 ± 6,6	12,5	0,249
8	<i>Urtica dioica</i>	29,1 ± 7,6	46,1 ± 3,1	55,5 ± 3,7	62,8 ± 3,6	21,5	0,225
9	<i>Betula Linné</i>	92,5 ± 7,1	84,1 ± 4,8	91,2 ± 2,2	92,7 ± 3,5	15,0	< 0,300
10	<i>Arnica Montana</i>	50,7 ± 2,3	50 ± 1,7	65,1 ± 3,2	80,6 ± 4,3	12,7	0,191
11	<i>Symphytum officinale</i>	79,1 ± 3,9	100,6 ± 1	103,5 ± 7,5	112,2 ± 2,1	10,3	< 0,205
12	<i>Malva mauritiana</i>	46,8 ± 1,1	77,4 ± 1,2	92,1 ± 0,3	101,8 ± 1,5	17,8	0,293
13	<i>Juniperus communis</i>	72,9 ± 1,1	73,5 ± 11,6	84,6 ± 1,9	79,8 ± 1,2	18,9	< 0,378
14	<i>Camelia sinensis</i>	39,1 ± 8,3	59,5 ± 8,5	67,1 ± 7	73,5 ± 6,7	15,3	0,229
Kontrola							
	ug/ml	250,0	125,0	62,5	31,3	15,6	7,8
	Allopurinol	17,3 ± 1,7	42,8 ± 2,4	68,2 ± 0,6	79,0 ± 2,8	86,8 ± 0,1	91,0 ± 1,6

Tučně, vzorky s IC₅₀<100 µg/mL

Tab. 3 : Inhibiční aktivita XO měřená UV metodou

Číslo vzorku	Rostlinný druh	Aktivita enzymu při daném ředění (%)				sušina (g/L)	IC ₅₀
		2%	1%	0,50%	0,25%		
15	<i>Lavandula angustifolia</i>	53 ± 3,9	72,6 ± 7,3	91,4 ± 2,2	92,6 ± 2	22,7	< 0,454
16	<i>Rosa macrophyla</i>	68,4 ± 1,9	77,4 ± 2,8	90,5 ± 1,5	91 ± 2,7	11,5	< 0,231
17	<i>Galium odoratum</i>	10,9 ± 3,9	28,1 ± 2,2	52,6 ± 3,4	92 ± 5,2	9,4	0,061
18	<i>Euphrasia rostokoviana</i>	95,8 ± 2,1	105,6 ± 5,7	107,6 ± 3,8	107 ± 3,5	41,9	< 0,838
19	<i>Calendula officinalis</i>	46,9 ± 0	60,9 ± 0,8	72,1 ± 0,4	79,6 ± 1,4	16,3	0,302
20	<i>Aspalathus linearis</i>	64,9 ± 0,4	81,1 ± 1,3	89,7 ± 0,9	89,8 ± 1,3	9,8	< 0,195
21	<i>Euphrasia officinalis</i>	71,7 ± 5,9	74,2 ± 0,6	84,4 ± 3,5	89,1 ± 1,6	14,8	< 0,296
22	<i>Arctium lappa</i>	89 ± 7,1	101,2 ± 2,9	92,1 ± 2,3	100,1 ± 1,7	57,7	< 1,150
23	<i>Rosmarinus officinalis</i>	50 ± 6,9	54,4 ± 1,1	61,2 ± 2,9	75,7 ± 0,9	8,8	0,176
24	<i>Thymus vulgaris</i>	62,1 ± 10,6	61,7 ± 1,3	61,4 ± 8,9	95,1 ± 17,9	14,5	< 0,290
25	<i>Hypericum perforatum</i>	77,1 ± 1,3	93,5 ± 4	93,9 ± 15,5	101,9 ± 6,5	8,9	< 0,177
26	<i>Agrimonia eupatoria</i>	63,8 ± 3,5	79,7 ± 2,2	94,8 ± 1,9	101,8 ± 3,5	11,2	< 0,224
27	<i>Cymbopogon citratus</i>	87,3 ± 0,3	102,2 ± 1,9	108,4 ± 1,2	105,7 ± 1	13,4	< 0,268
28	<i>Chelidonium majus</i>	74,3 ± 2,7	91,6 ± 7,2	104,8 ± 1,8	103 ± 3,5	21,0	< 0,419
Kontrola							
	ug/ml	250,0	125,0	62,5	31,3	15,6	7,8
	Allopurinol	17,3 ± 1,7	42,8 ± 2,4	68,2 ± 0,6	79,0 ± 2,8	86,8 ± 0,1	91,0 ± 1,6

Tučně, vzorky s IC₅₀<100 µg/mL

7 Diskuze

Dna je chronické metabolické onemocnění způsobené ukládáním krystalů sodné soli kyseliny močové většinou do palce nohy. Jedná se o poruchu přeměny metabolismů purinů v lidském těle, kdy vzniká přebytek kyseliny močové. Toto zvýšení sodných solí kyseliny močové v séru nazýváme hyperurikémií (Žurek, 2006).

V současné době se jako lék používá allopurinol, který snižuje hladinu kyseliny močové v séru prostřednictvím inhibice enzymu xanthinoxidasy vystupující v purinovém metabolismu (Becker et. al, 2005). Podle již vypracovaných *in vitro* studií dosahuje allopurinol ve srovnání s přírodními látkami a jejich rostlinnými extrakty mnohem vyšší aktivity inhibice XO. Tato aktivita se obvykle pohybuje kolem hodnoty IC_{50} 0,24 μ M. Jeho používání však u některých pacientů není bez potíží. Objevují se nežádoucí účinky léku, jako je gastrointestinální intolerance nebo kožní reakce, projevující se kožní vyrážkou (Ye, Yang et al. 2013). Proto je v současné době pozornost stále více směřována k výzkumu léčivých bylin a jejich účinkům, které příznivě ovlivňují zdraví člověka. Mezi látky, kterým se připisuje pozitivní účinek při inhibici enzymu xanthinoxidasy, patří flavonoidy.

Cílem této práce bylo zjistit, zda léčivé byliny pěstující se v naší krajině mohou mít využití jako potenciální inhibitory XO, tedy zda jsou vodné extrakty těchto rostlin použitelné při prevenci nebo farmakoterapii dny a hyperurikémie.

Flavonoidy jsou jedny z nejpočetněji zastoupených látek v přírodě. Dodnes jich bylo identifikováno kolem 4000. Vznikají jako sekundární metabolity rostlin. Flavonoidy mají silné antioxidační účinky, způsobují chelataci iontů přechodných kovů a inhibují enzymy podílející se na produkci volných radikálů v těle (Rice-Evans et. al, 1996). Tyto vlastosti připisujeme jejich chemické struktuře. Antioxidační účinky jsou připisovány přítomnosti dvou hydroxylových skupin na B kruhu, dvojná vazba mezi C2 a C3, substituce C3 a C5 hydroxylovými skupinami a jako poslední Oxo funkční skupina na C4. Pro inhibici XO je důležitá zejména C5 a C7 substituce OH skupinami a dvojná vazba mezi C2 a C3 uhlíky. Kvercin, luteolin a apigenin patří mezi nejsilnější inhibitory XO (Cos et. al, 1998, Cao et. al, 1997). Převážná část flavonoidů v přírodě je glykosylována. Mezi navázané cukry patří glukosa a rhamosa, méně častěji se pak objevují galaktoza, arabinosa, xylosa a další. Cukry mohou být dále také substituovány, a to např. malonylovou skupinou (Cook a Samman, 1996).

Nejdominantnějším flavonoidem v lidské stravě je flavonol kvercetin. V největších koncentracích ho můžeme najít v běžně přijímaných potravinách jako je cibule (300 mg/kg), jablka (21–72 mg/kg), červené víno (4-16 mg/L), černý a zelený čaj (10-25 mg/L). V těchto zdrojích ho můžeme nalézt buď ve formě volné nebo vázané např. kvercin-3-O-rhamnosid (Peterson et. al, 1998).

Dříve se předpokládalo, že flavonoidy, které jsou přijímány ve stravě převážně ve formě glykosidů, jsou prakticky neabsorbovatelné (Cos et al, 1998). Dnes víme, že hlavním místem resorbce flavonoidů je tenké a tlusté střevo. Přestože některé flavonoidy mohou být metabolizovány přímo ve formě glykosidů, je nezbytné odštěpení polární složky pro prostou difúzi většiny polyfenolických látek přes stěnu tenkého střeva. Poté tyto látky přecházejí do střeva tlustého, kde jsou metabolizovány bakteriemi střevní mikroflory. Většina prováděných *in vivo* experimentů ukázala, že koncentrace mateřského polyfenolu v krevní plasmě je mnohonásobně nižší než při jejím požití (Heim et. al , 2002).

Podle výsledků testů prováděných v rámci našeho výzkumu inhibice xanthinoxidasové aktivity vodnými extrakty vykazovaly významnou inhibici s IC_{50} pod 100 $\mu\text{g/mL}$ pouze 2 extrakty, a to svízel vonný (*Galium odoratum*) IC_{50} 61 $\mu\text{g/mL}$ a ostropestřec mariánský (*Sylibum marianum*) IC_{50} 4 $\mu\text{g/mL}$.

Filha a Vitolo, kteří testovali v Brazílii rostliny druhu *Lychnospora*, objevili, že tento druh rostlin vykazuje vysokou inhibiční aktivitu XO – inhibice. Nejlepším výsledkem byl *L. trichocarpa* s hodnotou IC_{50} 6,16 $\mu\text{g/mL}$ (Filha et. al, 2006). Podobné studie byly publikovány v Číně a Vietnamu, kde byla zjištěna významná inhibiční aktivita XO u rostliny *Chrisatnenum* sp., u které byla naměřena hodnota inhibice více než 50 % při koncentraci 10 $\mu\text{g/mL}$ (Kong, Cai et al. 2000, Nguyen et. al, 2004).

Ve studii Fleming et. byla testována tato aktivita na olivovníku a jeho esenciálních olejích. Výsledky ukázaly hodnotu IC_{50} 42 $\mu\text{g/mL}$ a byl zjištěn vysoký obsah fenolických látek, proto můžeme říci, že listy *Olea europaea* jsou správně používány při protizánětlivých onemocněních (Flemmig et. al, 2011). Tyto výsledky ukazují, že v každé části světa můžeme najít léčivé byliny, jejichž extrakty budou vykazovat inhibiční aktivitu xanthinoxidasy.

Havlík et al (2010) zase zjistil vysokou inhibiční aktivitu některých rostlin tradičně využívaných proti dně a hyperurikémii v oblasti České republiky, například dichlormetanolový extrakt z břízy bělokoré (*Betula pendula*) měl IC_{50} 25, 9 $\mu\text{g/mL}$ a topol japonský (*populus nigra*) s IC_{50} 8,3 $\mu\text{g/mL}$, ethanolový extrakt třezalky (*Hypericum perforatum*) byl druhým nejsilnějším inhibítorem v testu s IC_{50} 46,7.

U ostatních vzorků rostlin bylo naměřeno $IC_{50} > 80 \mu\text{g/mL}$ (Havlik et. al, 2010). Tyto výsledky nekorespondují s výsledky naměřenými v naší prováděné studii (viz. tab 2;3), kde u vodného extraktu břízy (*Betula pendula*) byla zjištěna maximální inhibiční aktivita při 1% koncentraci vzorku pouze 16 % a třezalka (*Hypericum perforatum*) vykazovala nejvyšší aktivitu inhibice XO 23 % a to při 2 % koncentraci vzorku. Aktivitu extraktů ale nelze srovnávat vzhledem k jejich jinému charakteru, námi testované extrakty byly polárnější a obsah účinných látek se tedy musel významně lišit.

Naopak u vodného extraktu kopřivy (*Urtica dioica*) byla v naší prováděném testu naměřena hodnota inhibice aktivity xanthinoxidasy 71 %, a tím se vzorek kopřivy zařadil mezi nejsilnější inhibitory xanthinoxidasy screeningu. Velmi výraznou inhibiční aktivitu ukázal i vzorek chmelu otáčivého (*Humulus lupulus*), u kterého byla zjištěna inhibiční aktivita při 2% koncentraci extraktu 79 %.

H. lupulus je znám svým vysokým obsahem fenolických hořkých kyselin, které vykazují nejen antioxidačními vlastnosti, ale také protirakovinotvorné, antimikrobiální a protizánětlivé účinky (Fidler a Kolářová, 2009). Samičí hlávky chmelu jsou jednou z hlavních a základních složek pro výrobu piva. Z látek, které jsou obsaženy v samičích hlávkách chmelové rostliny, se největší zájem obrací k prenylovanému chalkonu xanthohumolu (XN), jehož jediným zdrojem v potravě je právě pivo. Této látce jsou připisovány již dříve zmíněné zdraví prospěšné látky. Jeho koncentrace v jedné chmelové hlávce se pohybuje v rozmezí 0,2 až 1,1 hm % v sušině (Karabín et. al, 2012). Množství závisí na odrůdě, ročníku a agrotechnických podmínkách. Obsah dalších flavonoidů např. isoxanthohumol (IXN) je o jeden nebo dva řády nižší (Karabín et. al, 2012). K antioxidačním vlastnostem flavonoidů patří i již zmíněné vysoké inhibiční účinky na některé enzymy, v našem případě enzymu xanthinoxidasy. Vzhledem k nízkému obsahu prenylflavonoidů v lidské stravě není tomuto tématu věnována taková pozornost. Získané výsledky však ukazují jejich jednoznačně pozitivní vlastnosti na lidské zdraví a jejich obrovský potenciál při využití v oborech, které jsme zatím nečekali (Karabín et. al , 2012, Hofta et. al, 2004).

V našem testu vykazoval nejvyšší aktivitu ostropestřec mariánský (*Silybum marianum*.) a svízele vonný (*Galium odoratum*.), byla naměřena inhibiční aktivita xanthinoxidasy s hodnotou $IC_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$.

U svízele vonného (*Galium odoratum*.) byla zjištěna $IC_{50} 61 \mu\text{g/mL}$ a u ostropestřce mariánského (*Silybum marianum*) byla inhibiční aktivita $IC_{50} 4 \mu\text{g/mL}$. Hlavní polyfenolická látka obsažená v léčivé rostlině ostropestřce mariánského je silymarin.

V lidském těle silymarin a jeho aktivní složka silybin působí jako antioxidant a zároveň brání peroxidaci lipidů. Studie dokazují, že má protizánětlivé, protirakovinné účinky a zvyšuje jaterní proteosyntézu. Proto se ostropestřec ve světě využívá v boji s jaterními onemocněními nebo jejich prevenci (Flora et. al, 1998). Jako pomocník při boji s hyperurikémií a dnou pomocí inhibiční aktivity xanthinoxidasy zatím nebyl objeven, ale výsledky našeho testu ukázaly, že by mohl mít potenciál také v tomto směru. Svízele vonný patří v naší studii mezi velmi silné inhibitory. Výzkum ve spojení inhibiční aktivity enzymů a této léčivé byliny zatím nebyl proveden. Bylo pouze zjištěno, že obsahuje kumariny, monoterpeny, tanniny, iridoidy, flavonoidy a další látky. V předchozích studiích byl potvrzen jeho protizánětlivý účinek (Wardziak et al., 2008).

Mezi další léčivé byliny s významnou inhibiční aktivitou patří vzorky oregana (*Origanum vulgare*), máty (*Mentha piperita*), arniky (*Arnica montana*), slézu (*Malva mauritiana*)akamélie (*Camelia sinensis*). U extraktů těchto léčivých rostlin byla naměřena inhibiční aktivita XO mezi 40 a 60 % při 2% koncentraci extraktu. Tyto výsledky jsou také velmi slibnou budoucností pro využití léčivých bylin při léčbě a prevenci dny a hyperurikémie. Arnika byla již dříve označována jako bylina s vysokým obsahem polyfenolických sloučenin, kterým jsou zároveň připisovány antioxidační účinky. Dříve provedená studie uvádí výsledky inhibiční aktivity xanthinoxidasy od 10–15,9 mg/mL, v porovnání s našimi výsledky, kdy vodný extrakt arniky (*Arnica montana*) vykazoval inhibiční aktivitu XO 61% při 2% koncentraci extraktu. Z toho také vyplývá, že arnika má nezanedbatelnou inhibiční aktivitu XO, což může být užitečné při prevenci nebo zpomalení nemocí vzniklých pomocí volných radikálů v těle. Pelyněk černobýl (*Artemisia Absinthum*.), heřmánek pravý (*Chamomilla rucutita*.), bříza bělokorá (*Betula pendula*.), světlík lékařský (*Euphrasia officinalis*), lopuch větší (*Arctium lappa*.) a citronová tráva (*Cympogon citratus*) v našem testu významnou aktivitu nevykázaly.

Pokud porovnáme naše měření s výsledky ostatních již dříve prováděných *in vitro* studií na toto téma, vychází, že můžeme léčivé byliny a jejich inhibiční vliv na XO považovat za významné zdroje přírodních inhibitorů. Již v několika studiích bylo zmíněno, že inhibiční vlivy jsou způsobovány polyfenolickými sloučeninami, zejména flavonoidy, které nejsou v organismu primárně syntetizovány, ale mají prospěšný vliv. Zvýšený přísun těchto sekundárních metabolitů může mít potenciální příznivé účinky na zdraví člověka při léčbě nebo prevenci dny a hyperurikémie. Výsledky *in vitro* jsou však vždy předstupněm k dalšímu *in vivo* testu. V živém organismu se vyskytují obvykle hlavně ve formě metabolitů, jejichž aktivita se může lišit.

8 Závěr

Bylo testováno 28 vodných extraktů léčivých bylin připravených dle postupu popsaného v patentu EP 1469927. Tyto byliny, které jsou běžně pěstovány a využívány k tradiční medicíně v České republice a dalších středoevropských zemích, byly vybrány na základě požadavku firmy Primrose, a.s. Naše studie se zaměřila na zkoumání těchto druhů léčivých rostlin a jejich vliv na aktivitu inhibice enzymu xanthinoxidasy pomocí spektrofotometrické metody, již dříve k podobným testům používané. Nejvýznamnější aktivitu inhibice dosáhly ostropestřec mariánský (*Sylibum marianum*) a svízel vonný (*Galium odoratum*) s IC_{50} 4 a 61 $\mu\text{g/mL}$. Aktivita inhibice XO v léčivých bylinách, je zřejmě podmíněna obsahem polyfenolických látek, zejména flavonoidů, sekundárních metabolitů rostlin. Vodné extrakty jsou málokdy předmětem screeningových studií. Aktiva *S. marianum* v tomto testu je zajímavým zjištěním a bude v budoucnu námi ověřena v *in vivo* studii.

9 Reference

Becker, M. A., H. R. Schumacher Jr, R. L. Wortmann, P. A. MacDonald, D. Eustace, W. A. Palo, J. Streit and N. Joseph-Ridge (2005). "Febuxostat compared with allopurinol in patients with hyperuricemia and gout." *New England Journal of Medicine* 353 (23): 2450-2461.

Behera, B., B. Adawadkar and U. Makhija (2003). "Inhibitory activity of xanthine oxidase and superoxide-scavenging activity in some taxa of the lichen family "Graphidaceae." *Phytomedicine* 10 (6): 536-543.

Cao, G., E. Sofic and R. L. Prior (1997). "Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships." *Free radical biology and medicine* 22 (5): 749-760.

Chang, W. S., Y. J. Lee, F. Lu and H. C. Chiang (1993). "Inhibitory effects of flavonoids on xanthine oxidase." *Anticancer research* 13 (6A): 2165.

Choi, H. K., K. Atkinson, E. W. Karlson, W. Willett and G. Curhan (2004). "Purine-rich foods, dairy and protein intake, and the risk of gout in men." *New England Journal of Medicine* 350 (11): 1093-1103.

Cook, N. and S. Samman (1996). "Flavonoids, chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources." *The Journal of nutritional biochemistry* 7 (2): 66-76.

Cos, P., L. Ying, M. Calomme, J. P. Hu, K. Cimanga, B. Van Poel, L. Pieters, A. J. Vlietinck and D. V. Berghe (1998). "Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers." *Journal of Natural Products* 61 (1): 71-76.

Edwards, N. L. (2009). "Febuxostat: a new treatment for hyperuricemia in gout." *Rheumatology* 48 (suppl 2): ii15-ii19.

- Enroth, C., B. T. Eger, K. Okamoto, T. Nishino, T. Nishino and E. F. Pai (2000). "Crystal structures of bovine milk xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase: structure-based mechanism of conversion." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97 (20): 10723-10728.
- Fidler, M. and Kolářová L. (2009). "Analýza antioxidantů v chmelu a pivu." *Chemické listy* (103): 232-235.
- Filha, Z., I. Vitolo, L. Fietto, J. Lombardi and D. Saude-Guimaraes (2006). "Xanthine oxidase inhibitory activity of *Lychnophora* species from Brazil ("Arnica")." *J Ethnopharmacol* 107 (1): 79-82.
- Flemmig, J., K. Kuchta, J. Arnhold and H. Rauwald (2011). "Olea europaea leaf (Ph. Eur.) extract as well as several of its isolated phenolics inhibit the gout-related enzyme xanthine oxidase." *Phytomedicine* 18 (7): 561-566.
- Flora, K., M. Hahn, H. Rosen and K. Benner (1998). "Milk thistle (*Silybum marianum*) for the therapy of liver disease." *The American journal of gastroenterology* 93 (2): 139-143.
- Gawlik-Dziki, U., M. Swieca, D. Sugier and J. Cichocka (2011). "Comparison of in vitro lipoyxygenase, xanthine oxidase inhibitory and antioxidant activity of *Arnica montana* and *Arnica chamissonis* tinctures." *Acta Scientiarum Polonorum-Hortorum Cultus* 10 (3): 15-27.
- Gonzalez, A. G., I. L. Bazzocchi, L. Moujir, A. G. Ravelo, M. D. Correa and M. P. Gupta (1995). "Xanthine oxidase inhibitory activity of some Panamanian plants from Celastraceae and Lamiaceae." *Journal of ethnopharmacology* 46 (1): 25-29.
- Havlik, J., R. Gonzalez de la Huebra, K. Hejtmankova, J. Fernandez, J. Simonova, M. Melich and V. Rada (2010). "Xanthine oxidase inhibitory properties of Czech medicinal plants." *J Ethnopharmacol* 132 (2): 461-465.
- Heim, K. E., A. R. Tagliaferro and D. J. Bobilya (2002). "Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships." *The Journal of*

nutritional biochemistry 13 (10): 572-584.

Hille, R. and V. Massey (1981). "Tight binding inhibitors of xanthine oxidase." *Pharmacol Ther* 14 (2): 249-263.

Hofta, P., P. Dostálek and G. Basařová (2004). "Xanthohumol- chmelová pryskyřice nebo polyfenol?" *Chemické listy* (98): 825-830.

Hua, J., P. Huang, C. Zhu, X. Yuan and C. H. Yu (2012). "Anti-hyperuricemic and nephroprotective effects of Modified simiao Decoction in hyperuricemic mice." *Journal of Ethnopharmacology*.

Jordan, K. M., J. S. Cameron, M. Snaith, W. Zhang, M. Doherty, J. Seckl, A. Hingorani, R. Jaques and G. Nuki (2007). "British Society for Rheumatology and British Health Professionals in Rheumatology guideline for the management of gout." *Rheumatology* 46 (8): 1372-1374.

Karabín, M., T. Hudcová, P. Dostálek and L. Jalínek (2012). "Význam chmelových prenylflavonoidů pro lidské zdraví." *Chemické listy* 106: 1095-1103.

Kong, L., Y. Cai, W. Huang, C. H. K. Cheng and R. Tan (2000). "Inhibition of xanthine oxidase by some Chinese medicinal plants used to treat gout." *Journal of ethnopharmacology* 73 (1): 199-207.

Kong, L. D., C. Yang, F. Ge, H. D. Wang and Y. S. Guo (2004). "A Chinese herbal medicine Ermiao wan reduces serum uric acid level and inhibits liver xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase in mice." *Journal of ethnopharmacology* 93 (2): 325-330.

Krishnan, E., C. N. Lessov-Schlaggar, R. E. Krasnow and G. E. Swan (2012). "Nature versus nurture in Gout: a twin study." *The American journal of medicine*.

Lin, C. M., C. S. Chen, C. T. Chen, Y. C. Liang and J. K. Lin (2002). "Molecular modeling of flavonoids that inhibits xanthine oxidase." *Biochemical and biophysical research communications* 294 (1): 167-172.

Massey, V., P. E. Brumby, H. Komai and G. Palmer (1969). "Studies on milk xanthine oxidase." *Journal of Biological Chemistry* 244 (7): 1682-1691.

Mikuls, T. R., J. T. Farrar, W. B. Bilker, S. Fernandes, H. R. Schumacher and K. G. Saag (2005). "Gout epidemiology: results from the UK general practice research database, 1990–1999." *Annals of the Rheumatic Diseases* 64 (2): 267-272.

Mo, S.-F., F. Zhou, Y.-Z. Lv, Q.-H. Hu, D.-M. Zhang and L.-D. Kong (2007). "Hypouricemic action of selected flavonoids in mice: structure-activity relationships." *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 30 (8): 1551-1556.

Mukhopadhyay, M. K., Banerjee, P., & Nath, D. (2012). Phytochemicals–biomolecules for prevention and treatment of human diseases-a review. *International Journal of Scientific and Engineering Research* 3 (7): 1-32.

Nagao, A., M. Seki and H. Kobayashi (1999). "Inhibition of xanthine oxidase by flavonoids." *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 63 (10): 1787-1790.

Neogi, T. (2011). "Gout." *New England Journal of Medicine* 364 (5): 443-452.

Nguyen, M. T. T., S. Awale, Y. Tezuka, Q. L. Tran, H. Watanabe and S. Kadota (2004). "Xanthine oxidase inhibitory activity of Vietnamese medicinal plants." *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 27 (9): 1414-1421.

Offermanns, S., & Rosenthal, W. (2008). *Encyclopedia of molecular pharmacology* (Vol. 1). Springer Verlag

Olejárová, M. (2011). "Dnavá artritida." *Medicína pro praxi* 8 (11): 452-454.

Olinescu, R., & Smith, T. L. (2002). *Free radicals in medicine*. Nova Publishers 180

Owen, P. L. and T. Johns (1999). "Xanthine oxidase inhibitory activity of northeastern North American plant remedies used for gout." *Journal of ethnopharmacology* 64 (2): 149-160.

Pacher, P., A. Nivorozhkin and C. Szabó (2006). "Therapeutic effects of xanthine oxidase inhibitors: renaissance half a century after the discovery of allopurinol."

Pharmacological reviews 58(1): 87-114.

Pavelka, et. al (2010). *Revmatologie*. Praha, Univerzita Karlova v Praze, Nakladatelství Karolinum.

Pavelka, K. (1995). *Dna recepty, rady lékaře*. Praha 4, Sdružení Mac, s.r.o.

Pavelka, K. (2008). "Dnavá artritida- podceňovaný problém gerontologie." *Česká geriatrická revue* 2(6): 62-72.

Peterson, J. and J. Dwyer (1998). "Flavonoids: dietary occurrence and biochemical activity." *Nutrition Research* 18(12): 1995-2018.

Racek, J. and V. Holeček (1999). "Enzymy a volné radikály." *Chem Listy* 93: 774-780.

Rice-Evans, C. A., N. J. Miller and G. Paganga (1996). "Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids." *Free radical biology and medicine* 20(7): 933-956.

Růžička, V. (2004). "Dna." *Interní medicína pro praxi* 4: 173-177.

Seegmiller, J., A. I. Grayzel, R. R. Howell and C. Plato (1962). "The renal excretion of uric acid in gout." *Journal of Clinical Investigation* 41 (5): 1094.

Smith, H. S., D. Bracken and J. M. Smith (2011). "Gout: current insights and future perspectives." *The Journal of Pain* 12 (11): 1113-1129.

Stasolla, C., R. Katahira, T. A. Thorpe and H. Ashihara (2003). "Purine and pyrimidine nucleotide metabolism in higher plants." *Journal of plant physiology* 160 (11): 1271-1295.

Sweeney, A. P., S. G. Wyllie, R. A. Shalliker and J. L. Markham (2001). "Xanthine oxidase inhibitory activity of selected Australian native plants." *J Ethnopharmacol* 75 (2-3): 273-277.

Umamaheswari, M., K. AsokKumar, A. Somasundaram, T. Sivashanmugam, V. Subhadradevi and T. K. Ravi (2007). "Xanthine oxidase inhibitory activity of some Indian medical plants." *Journal of ethnopharmacology* 109 (3): 547-551.

Van Hoorn, D. E., R. J. Nijveldt, P. A. Van Leeuwen, Z. Hofman, L. M'Rabet, D. De Bont and K. Van Norren (2002). "Accurate prediction of xanthine oxidase inhibition based on the structure of flavonoids." *European journal of pharmacology* 451(2): 111-118.

Velišek, J. (2002). *Chemie potravin 3*. Tábor, Nakladatelství OSSIS.

Vuletić, M., K. Radotić and Vučini. (2002). "Free radical involvement in the generation of trans-root potential." *Physiologia Plantarum* 104 (4): 777-782.

Wang, S., C. Yang, J. Liao, W. Zhen, F. Chu and S. Chang (2013) "Essential oil from leaves of *Cinnamomum osmophloeum* acts as a xanthine oxidase inhibitor and reduces the serum uric acid levels in oxonate-induced mice."

Wardziak, O., A. PawełCzak and E. W. A. Osińska "Micropropagation of *Galium odoratum* (L.) Scop."

Yashio, K., Y. Katayama, T. Takashima, N. Ishiguro, H. Doi, M. Suzuki, Y. Wada, I. Tamai and Y. Watanabe (2011). "Synthesis of] uric acid, using phosgene, as a possible biomarker in PET imaging for diagnosis of gout." *Bioorganic & medicinal chemistry letters*.

Ye, P., S. Yang, W. Zhang, Q. Lv, Q. Cheng, M. Mei, T. Luo, L. Liu, S. Chen and Q. Li (2013). "Efficacy and Tolerability of Febuxostat in Hyperuricemic Patients With or Without Gout: A Systematic Review and Meta-Analysis." *Clinical therapeutics*.

Zentrich, J., A. a J. Janča (1997), *Herbář léčivých rostlin*, Eminent.

Zentrich, J. A. (2007). Zentrichova fytoterapie 1. Olomouc, Fontána.

Žurek, M. (2006). "Dnavá artritida a hyperurikémie." Interní medicína pro praxi 11: 485-488.

Žurek, M. (2006). "Patogeneze, diagnostika a léčba dny." Vnitřní lékařství 52 (7,8): 736-741.