

ANTILIPOXYGENÁZOVÁ AKTIVITA A OBSAH STOPOVÝCH PRVKOV ALOE VERA VO VZŤAHU K TERAPEUTICKÉMU ÚČINKU

BEZÁKOVÁ L., OBLOŽINSKÝ M., SÝKOROVÁ M.¹, PAULÍKOVÁ I., KOŠŤÁLOVÁ D.²

Katedra bunkovej a molekulárnej biológie liečiv Farmaceutickej fakulty Univerzity Komenského, Bratislava

¹ Katedra farmaceutickej analýzy a nukleárnej farmácie Farmaceutickej fakulty Univerzity Komenského, Bratislava

² Katedra farmakognózie a botaniky Farmaceutickej fakulty Univerzity Komenského, Bratislava

SÚHRN

Antilipoxygenázová aktivita a obsah stopových prvkov *Aloe vera* vo vzťahu k terapeutickému účinku

Aloe vera je zdrojom mnohých zdraviu prospešných látok. Výsledky súčasného výskumu na zvieracích modeloch ukazujú, že extrakty majú antiflogistickú aktivitu. V práci sú prezentované výsledky *in vitro* experimentov inhibičného účinku extraktu *Aloe vera* na aktivitu parciálne purifikovanej lipoxygenázy z cytozolovej frakcie pľúc potkana, ako aj výsledky stanovenia stopových prvkov prítomných v extrakte (Mn, Fe, Cu, Zn) pomocou rádionuklidovej röntgenofluorescenčnej analýzy. Získané údaje môžu prispieť k pravdepodobnému vysvetleniu inhibičného účinku (antilipoxygenázovej aktivity) extraktu *Aloe vera* na akútnu zápalovú reakciu, a to pri vonkajšom použití extraktu v liečbe rán, poranení a vredov na koži.

K l ú č o v é s l o v á: *Aloe vera* – lipoxygenáza – stopové prvky – rádionuklidová röntgenofluorescenčná analýza

Čes. slov. Farm., 2005; 54, 43–46

SUMMARY

Antilipoxygenase Activity and the Trace Elements Content of *Aloe vera* in Relation to the Therapeutical Effect

Aloe vera is a rich source of many natural-health-promoting substances. The results of contemporary research on animal models indicate that the extracts have an antiinflammatory property. In this work the results of some *in vitro* experiments are shown: determination of the inhibitory effect of the *Aloe vera* extracts on the activity of partially purified lipoxygenase from the rat lung cytosol fraction, and quantitative determination of the trace elements presented in the extract (Mn, Fe, Cu, Zn) carried out by using the x-ray fluorescence analysis. The findings could explain the inhibitory effect (antilipoxygenase activity) of the *Aloe vera* extract in the acute inflammation process, especially in the topical application for healing of minor burns and skin ulcers.

Key words: *Aloe vera* – lipoxygenase – trace elements – x-ray fluorescence analysis

Čes. slov. Farm., 2005; 54, 43–46

Má

Úvod

Proteíny a glykoproteíny izolované z extraktov listov *Aloe barbadensis* Mill. (syn. *Aloe vera*) – *aloe barbadoská*, čeľade *Liliaceae*, majú preukázanú enzýmovú, imunomodulačnú a antiflogistickú aktivitu. Participujú pri liečbe rán, poranení, zápalov, bodnutí hmyzom na koži a pri liečbe pruriginózných dermatóz rôznej etiológie ¹.

Glykoproteínová frakcia má inhibičnú aktivitu na cyklooxygenázu-2 a redukuje tromboxán-A₂-syntázu *in vit-*

ro ²). Jedným z pravdepodobných mechanizmov účinku je aj antioxidačná aktivita prítomného derivátu chromonu, feruolylaloeínu a p-kumaroylaloeínu (scavengery superoxidového radikálu), ktoré sú prítomné v niektorých extraktoch ³).

Liečba zápalu, významná z hľadiska terapeutického použitia, je komplexným procesom, na ktorom sa podieľajú mnohé obsahové látky tohto extraktu. Majú funkciu rôznych enzýmov, ktoré stimulujú aktivitu fibroblastov, proliferáciu kolagénu, angiogénu, a aktivujú proteiná-

zy, umožňujúce lepšiu penetráciu do tkanív ⁴). Na terapeutickom účinku sa okrem proteínov podieľajú aj polysacharidy (napr. aceman). Acemanan, izolovaný z niektorých extraktov, aktivuje makrofágy a má tiež preukázanú imunomodulačnú aktivitu na dendritické bunky, antibakteriálnu, antimykotickú a antivírusovú aktivitu *in vivo*. Má význam aj v iniciácii primárnej imunitnej odpovede ^{4,5}).

Už z minulosti je známe použitie *Aloe vera* pri ochrane kože pred UV žiarením a pôsobením chladu, pri liečbe rán, popálenín, následkov slnečného úpalu a rádioaktívneho pôsobenia na kožu. Extrakty ochraňujú bunkovú stenu pred následkami rôznych poškodení, pred škodlivými faktormi vonkajšieho prostredia a voľnými kyslíkovými radikálmi. Suchý extrakt nachádza tiež použitie ako emolens v terapii suchej kože a v terapii symptómov rôznych foriem ekzémov a dermatóz vyvolaných UV žiarením ⁶).

Predmetom výskumu je na jednej strane izolácia obsahových látok, ale aj štúdium biologickej aktivity extraktov pripravených z čerstvých listov (získavaných z vnútorného parenchýmu listov *Aloe vera*).

Stopové prvky sú často pre rastlinu obsahovo esenciálne a majú význam pre aktivitu mnohých enzýmov v jednotlivých pletivách. Mangán, železo, meď a zinok sú stopové prvky, ktoré sa nachádzajú v aktívnych centrách enzýmov. Tieto enzýmy sa podieľajú na niektorých procesoch, ako napr. na ovplyvnenie syntézy extracelulárnych látok – kolagénu, elastínu, glykoproteínov a glykozamínoglykánov. Práve z uvedeného hľadiska je prítomnosť stopových prvkov v rastlinných pletivách významná vo vzťahu k antiflogistickému účinku ⁷). Prítomnosť zinku, vápnika, medi, horčíka, mangánu alebo fosforu v listoch, resp. extraktoch *Aloe vera* (v závislosti od spôsobu extrakcie) môže pozitívne ovplyvniť syntézu a účinky enzýmov s aktívnym centrom obsahujúcim kovové ióny, a môže zodpovedať za dobrú koreláciu vo vzťahu k terapeutickému účinku. Či tento efekt závisí od ich samotnej prítomnosti, alebo od tvorby stabilných komplexov vznikajúcich reakciou s ďalšími obsahovými látkami v extrakte, nemožno zatiaľ jednoznačne potvrdiť ^{7,8}).

Aby bolo možné definovať biologickú aktivitu suchého extraktu z listov *Aloe vera*, v práci sme sa zamerali na stanovenie inhibičného účinku extraktu na aktivitu lipoxygenázy izolovanej z cytozolovej frakcie pľúc potkana a na stanovenie obsahu vybraných prvkov v extrakte – Mn, Fe, Cu, Zn.

POKUSNÁ ČASŤ

Rastlinný materiál

V práci bol použitý suchý extrakt *Aloe vera*, ktorý pôvodom pochádzal z poloostrova Yucatan v Mexiku (dovozca Herb-Pharma, s.r.o.) z roku 2002. Ke stanoveniu inhibičnej aktivity na lipoxygenázu boli použité vždy čerstvo pripravené 1% vodné roztoky, ktoré sa následne riedili. Na stanovenie obsahu prvkov bol použitý ten istý suchý extrakt, ktorý bol zlisovaný do tablety.

Chemikálie a prístroje

Použitá chemikálie boli čistoty p.a. a roztoky boli pripravené za použitia deionizovanej vody. Na purifikáciu lipoxygenázy z cytozolovej frakcie pľúc potkana bol použitý stĺpec Sephadex G-150 (Amersham Pharmacia Biotech AB, Švédsko). Kyselina linolová (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Nemecko) bola použitá ako substrát pre spektrofotometrické stanovenie. Na prípravu tmivých roztokov bol použitý tris-hydroxymetyl-aminometán (Tris) (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Nemecko). Spektrofotometrické stanovenie bolo realizované na spektrofotometri Specord M42 (Carl-Zeiss, Nemecko). Na prípravu štandardu pre stanovenie obsahu prvkov rádionuklidovou röntgenofluorescenčnou analýzou boli použité štandardné roztoky Mn, Fe, Cu, Zn (RM pre spektrometriu, w=1000 mg.ml⁻¹) (Slovenský metrologický ústav, Bratislava) a kyselina benzoová p.a. (Lachema a.s., Česká republika). Na stanovenie obsahu prvkov rádionuklidovou röntgenofluorescenčnou analýzou bol použitý mnohokanálový analyzátor EGG ORTEC, polovodičový detektor Si/Li, primárny zdroj žiarenia bol ²³⁸Pu s A=370 MBq, T_{1/2}=86,4 rokov (Amersham Pharmacia Biotech AB, Švédsko).

Pracovné postupy

Isolácia lipoxygenázy z cytozolovej frakcie pľúc potkana

1. Príprava a spracovanie materiálu

Zo samcov potkanov kmeňa Wistar (hmotnosť 150–180 g) boli po 10-dňovej adaptácii v laboratórnych podmienkach získané z pľúcneho tkaniva postupnou frakcionáciou hrubého orgánového homogenátu jednotlivé subcelulárne frakcie. Po nastrihaní tkaniva na malé kúsky boli tieto za súčasného chladenia homogenizované v médiu, zloženého z 0,25 M roztoku sacharózy upraveného na pH 7,4 pomocou 0,15 M roztoku Tris-HCl. Požadovaná frakcia bola pripravená podľa postupu Kulkarni et al. ⁹).

2. Vysolovanie s (NH₄)₂SO₄

Získaná frakcia bola vyzrážaná síranom amónnym do 70% nasýtenia. Vypočítané množstvo (NH₄)₂SO₄ sa po častiach pridávalo k roztoku za stáleho miešania pri teplote 4 °C. Potom nasledovala centrifugácia po dobu 30 min, pri 2–4 °C a 36 000 x g.

3. Dialýza

Sediment po vysolení bol resuspendovaný v 5 ml 25 mM Tris-HCl (pH 7,5) s prísadou 0,5 mM CaCl₂ a 10% glycerolu. V priebehu noci prebehla dialýza v chlade za stáleho miešania oproti tomu istému tmivému roztoku, ktorý bol zriedený v pomere 1:9 (v/v).

Stanovenie aktivity lipoxygenázy a vyjadrenie inhibičného účinku

Aktivita lipoxygenázy bola vyjadrená ako nárast absorpcie pri 234 nm v priebehu 2 min (nárast tvorby hydroperoxidov kyseliny linolovej). Inkubačná zmes obsahovala 1,4 ml tmivého roztoku Tris-HCl pH 7,5, 700 µl substrátu (kyselina linolová pripravená v solubilizovanom stave podľa Kemal et al. ¹⁰) a vhodné množstvo testovaného roztoku (50–100 µl) (cytozolová frakcia pľúc potkana, resp. extrakt *Aloe vera*).

Nárast tvorby hydroperoxidov sa vypočítal podľa vzťahu:

$$C = \frac{A \cdot V}{\epsilon \cdot l \cdot v}$$

kde C je koncentrácia hydroperoxidov vznikajúcich pri reakcii (mol.ml⁻¹), A je nárast absorpcie: rozdiel medzi koncovou a počiatočnou absorpciou, V je konečný objem inkubačnej zmesi (ml), ϵ je molárny absorpčný koeficient kyseliny linolovej (25.10⁻³ mol⁻¹.l.cm⁻¹), l je hrúbka kvety (cm) a v značí objem pridávaného enzýmu (ml).

Špecifická aktivita [μ kat.mg⁻¹] sa vypočítala vo vzťahu k časovému priebehu reakcie a k obsahu proteínov stanovených metódou podľa Bradforda ¹¹), pričom 1 kat = 1 mol.s⁻¹.

Inhibičný účinok extraktu bol vyjadrený prostredníctvom výpočtu hodnoty IC_{50} , tj. koncentrácie inhibítora, ktorá inhibuje enzýmovú reakciu na polovicu maximálnej rýchlosti. Koncentrácie extraktu v testovaných vzorkách sa pohybovali v rozmedzí 0,100–0,375 $mg \cdot ml^{-1}$.

Stanovenie obsahu prvkov

1. Príprava vzorky k analýze

Suchý extrakt *Aloe vera* bol zhomogenizovaný a zlisovaný do tabliet hrúbky 0,1–1,0 mm, o hmotnosti asi 0,5000g, priemeru 20 mm, tlakom 10 MPa.

2. Príprava štandardu

Pri príprave štandardu sa vychádzalo z poznatkov odbornej literatúry^{12,13)} pre stanovenie prvkov v rastlinnom materiáli. Na identifikáciu a stanovenie prvkov vo vzorke bol použitý syntetický štandard, ktorý sa pripravil nanosením 50,0 μl štandardných roztokov jednotlivých prvkov na 1,0000 g matrice – kyseliny benzoovej. Kyselina benzoová s nanosenými štandardnými roztokmi prvkov po vysušení a homogenizácii bola zlisovaná do tabliet o hmotnosti 0,5000g tak ako vzorka. Rovnako lisovaním bola pripravená aj tableta matrice – kyseliny benzoovej ($m=0,5000$ g).

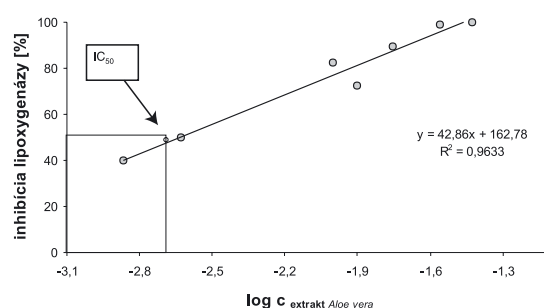
3. Podmienky meraní a energetická kalibrácia

Spektrá vzorky, štandardu, matrice – kyseliny benzoovej boli získané meraním na polovodičovom detektore spojenom s mnohokanálovým analyzátorom. Použila sa reflexná geometria merania vzorka–zdroj–detektor. Energetická kalibrácia meracieho zariadenia bola prevedená zmeraním spektier štandardov oxidov prvkov so $Z > 18$. Energetické čiary fluorescenčného žiarenia prvkov boli porovnané s literárnymi údajmi¹²⁾. Obsah prvkov Mn, Fe, Cu, Zn vo vzorke bol stanovený na základe rozdielu nameraných početností štandardu a matrice v energetických líniiach jednotlivých prvkov odpovedajúcich príslušnej koncentrácii prvkov. Intenzita fluorescenčného žiarenia prvkov vo vzorke extraktu bola korigovaná o neanalytický signál¹⁴⁾. Obsah prvkov bol prepočítaný na jeden gram vzorky suchého extraktu.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Medzi hlavné obsahové látky extraktov z listov *Aloe vera* patria proteíny a glykoproteíny (s obsahom až 58 %) ²⁾, ktorým je vlastná aktivita niektorých enzýmov s antiflogistickým účinkom. Obsah účinných látok a ich aktivita v rastlinách je ovplyvňovaná rôznorodými faktormi a prejavuje sa rozdielnou terapeutickou účinnosťou rastlinných prípravkov používaných v praxi. V predchádzajúcej práci¹⁵⁾ sme ukázali, že extrakt *Aloe vera* obsahuje proteíny, ktorých relatívne molekulové hmotnosti sa pohybujú od 14 do 70 kDa (na základe analýzy za použitia elektroforézy na polyakrylamidových géloch za denaturovaných podmienok SDS-PAGE). Zároveň bol stanovený ich obsah – metódou podľa Bradforda¹¹⁾ – a to na 65 $\mu g \cdot ml^{-1}$ pri 1% vodnom roztoku suchého extraktu. V práci sa tiež potvrdila prítomnosť peroxidázy so špecifickou aktivitou 82 $nkat \cdot mg^{-1}$ ¹⁵⁾.

V snahe o ďalšiu interpretáciu biologickej aktivity extraktu *Aloe vera* bola experimentálna práca zameraná na testovanie antioxidantnej aktivity extraktu na lipoxygénazu izolovanú z cytozolovej frakcie pľúc potkana. Nomenklatura cicavčích lipoxygénáz je založená na polohovej špecifite a odvodzuje sa od C-atómu kyseliny arachidónovej, z ktorej sa účinkom lipoxygénazy tvorí príslušný hydroperoxid. Na základe orgánovej špecifity boli popísané



Obr. 1. Inhibičný efekt extraktu *Aloe vera* na aktivitu lipoxygénazy z cytozolovej frakcie pľúc potkana ($IC_{50} = 0,023$ $mg \cdot ml^{-1}$)

5-, 8-, 12- a 15-lipoxygénazy, ktorých metabolity sú efektormi mnohých odpovedí bunky. Kemal et al.⁹⁾ potvrdili v cytozolovej frakcii pľúc potkana prítomnosť 12-lipoxygénazy. Na testovanie inhibičného účinku extraktu *Aloe vera* na živočíšnu lipoxygénazu z cytozolovej frakcie pľúc potkana sa využilo stanovenie hodnoty IC_{50} . Pre potreby tohto stanovenia bola izolovaná lipoxygénaza parciálne purifikovaná použitím gélovej chromatografie na stĺpci Sephadexu G-150. Jej aktivita bola stanovená za použitia kyseliny linolovej spektrofotometricky pri 234 nm – predstavovala 1273 $\mu kat \cdot mg^{-1}$. Pri tejto vlnovej dĺžke možno stanoviť konjugované diény, ktoré majú absorpčné maximum medzi 234–237 nm, zatiaľ čo leukotriény ako konečné produkty lipoxygénazovej cesty (konjugované triény) majú absorpčné maximá v rozmedzí 260–290 nm. Z rovnice regresnej priamky bola vypočítaná hodnota IC_{50} extraktu *Aloe vera*, ktorá mala hodnotu 0,023 $mg \cdot ml^{-1}$ (obr. 1). Tento biochemický parameter možno hodnotiť pozitívne z hľadiska antioxidantnej kapacity celkového extraktu. Oxygenácia kyseliny arachidónovej lipoxygénazou na jej metabolickej ceste vedie cez tvorbu voľných radikálov. Mnohé inhibítory lipoxygénazy sa tak môžu využívať ako antioxidanty, „scavengery“ voľných radikálov a inhibítory peroxidácie lipidov. Doteraz je známy najmä antilipoxygénazový účinok flavonoidných zlúčenín (napr. flavonoidy izolované z *Calendula officinalis*¹⁶⁾). S podobným účinkom sa možno stretnúť aj u aloínu (antraglykozid izolovaný z listov *Aloe vera*¹⁷⁾). Vodný extrakt z *Aloe* gélu inhibuje produkciu prostaglandínu E_2 (PGE_2), ktorý sa tvorí z kyseliny arachidónovej *in vitro*. V tomto extrakte sú podľa literatúry¹⁸⁾ prítomné antraglykozidy. Nakoľko v nami študovanom extrakte *Aloe vera* nebola pomocou TLC-chromatografie dokázaná prítomnosť antraglykozidov (aloínu), za antioxidantnú aktivitu zodpovedajú pravdepodobne ďalšie, doteraz neidentifikované obsahové látky v testovanom extrakte. Uvedené zistenie predstavuje zaujímavú informáciu o obsahových látkach extraktu, ktoré nie sú v dostupnej literatúre zatiaľ popísané.

O význame stopových prvkov možno diskutovať z niekoľkých hľadísk. Okrem iného sú zložkami a aktívatormi enzýmov, ktoré majú význam pri hojení rán, a ktoré zasahujú do rôznych procesov látkového metabolizmu. Podieľajú sa i na stavbe pojivového tkaniva, a na ochrane buniek pred pôsobením kyslíkových radikálov. Zistenie prítomnosti a stanovenie obsahu Mn, Fe, Cu, Zn

Tab. 1. Stanovenie obsahu prvkov vo vzorke suchého extraktu *Aloe vera*

Prvky	obsah prvkov ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)
Mn	52,3
Fe	18,3
Cu	12,8
Zn	38,5

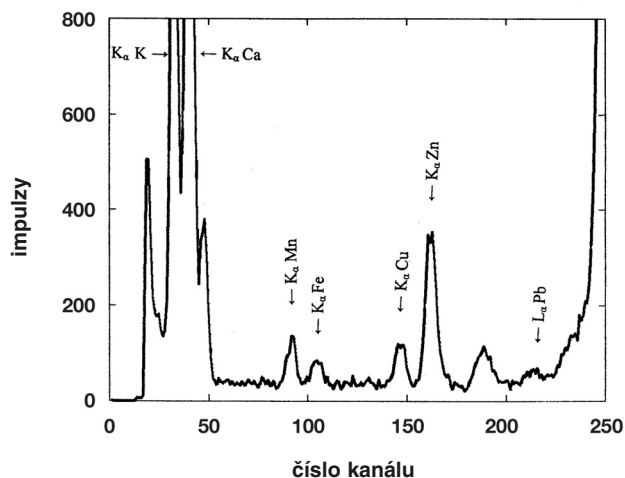
v suchom extrakte *Aloe vera* poukázalo na ich možný význam vo vzťahu k terapeutického účinku extraktu (tab. 1). Metódou rádionuklidovej röntgenofluorescenčnej analýzy boli vo vzorke identifikované i ďalšie prvky: K, Ca a Pb (obr. 2). Tento typ analýzy umožňuje rýchlu polykomponentnú, nedeštruktívnu prvkovú analýzu vzorky. Neponúka však informáciu o tom, ako je prvok v biologickom materiáli viazaný a v akom oxidačnom stupni sa vo vzorke nachádza.

Výsledky experimentálnej práce, týkajúce sa stanovenia antilipoxygénovej aktivity extraktu *Aloe vera*, ako aj stanovenia prítomnosti a obsahu určitých stopových prvkov, sú zaujímavé z hľadiska terapeutického využitia *Aloe vera*. Expozícia agresívnych faktorov vonkajšieho prostredia na kožu (napr. UV žiarenie) vedie k vzniku rôznych reaktívnych kyslíkových radikálov. Extrakt *Aloe vera* tak môže plniť úlohu pri ochrane kože, napr. aj pred starnutím. Inhibičný efekt extraktu *Aloe vera* na aktivitu lipoxygénázy môže mať význam i v prevencii a v liečbe niektorých zápalových kožných ochorení, čo už potvrdili experimenty na zvieracích modeloch a niektoré klinické štúdie^{19,20}. Stopové prvky, ktorých prítomnosť bola v extrakte preukázaná, by pritom mohli uvedené procesy podporovať. V niektorých prácach^{19, 20}) boli izolované aj ďalšie antioxidantne pôsobiace fenolické obsahové látky extraktu, ako aj látky s aktivitou vo vzťahu k peroxidácii lipidov v biologických systémoch.

Táto práca je zahrnutá do výskumných projektov grantovej agentúry MŠ SR VEGA č.1/1197/04, č.1/1196/04 a č.1/1185/04.

LITERATÚRA

1. Winters, W. D., Bouthet, C.: *Phytotherapy Res.*, 1995; 9, 395-400.
2. Yagi, A., Kabash, A., Mizuno, K. et al.: *Planta Med.*, 2003; 69, 269-271.
3. Yagi, A., Kabash, A., Okamura, N. et al.: *Planta Med.*, 2002; 68, 957-960.
4. Reynolds, T., Dweck, A. C.: *J. Ethnopharm.*, 1999; 68, 3-37.



Obr. 2. Spektrum žiarenia vzorky suchého extraktu *Aloe vera* meraného rádionuklidovou röntgenofluorescenčnou analýzou

5. Lee, J. K., Lee M. K., Yun Y. P. et al.: *Int. Immunopharmacol.*, 2001; 7, 1275-1284.
6. Kodym, A., Bujak, T.: *Pharmazie*, 2002; 57, 834-837.
7. Pereira, B., Felcman, J.: *Biol. Trace Element. Res.*, 1998; 65, 251-258.
8. Visuthikosol, V., Choucheun, B.: *J. Med. Assoc. Thai.*, 1995; 78, 403-409.
9. Kulkarni, A. P., Cai, Y., Richards, I. S.: *Int. J. Biochem.*, 1992; 24, 255-261.
10. Kemal, C., Louis-Flamberg, P., Krupinski-Olsen, R., Shorter, A. L.: *Biochemistry*, 1987; 26, 7064-7072.
11. Bradford, M. M.: *Anal. Biochem.*, 1976; 72, 248-254.
12. Tölgyessi, J. et al.: *Rádionuklidová röntgenofluorescenčná analýza*. Bratislava, Alfa, 1983, s. 208.
13. Beláková, M., Havránek, E., Bujna, J.: *Čes. a Slov. Farm.*, 1994; 43, 209-213.
14. Sýkorová, M., Havránek, E.: *Čes. slov. Farm.*, 2003; 52, 203-206.
15. Košťálová, D., Bezáková, L., Obložinský, M., Kardošová, A.: *Čes. slov. Farm.*, 2004; 248-251.
16. Bezáková, L., Mašterová, I., Paulíková, I., Pšenák, M.: *Pharmazie*, 1996; 51, 126-127.
17. Capasso, F., Mascolo, N., Autore, G., Duraccio, M. R.: *Prostaglandins*, 1983; 26, 557-562.
18. Vazquez, B., Avilla, G., Segura, D., Escalante, B.: *J. Ethnopharmacol.*, 1996; 55, 69-75.
19. Chithra, P., Sajithlal, G. B., Chandrakasa, G.: *J. Ethnopharmacol.*, 1998; 59, 195-201.
20. Lee, K. Y., Weintraub, S. T., Yu, B. P.: *Free Rad. Biol. Med.*, 2000; 28, 261-265.

Došlo 26. 1. 2004.

Přijato ke zveřejnění 25. 2. 2004.

doc. RNDr. Lýdia Bezáková, CSc.
Kalinčiakova 8, 832 32 Bratislava, SR
e-mail: bezakova@fpharm.uniba.sk