

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA UNIVERZITY KARLOVY V PRAZE

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

**Metabolismus kyseliny močové v rámci evoluce savců**

**Andrea Mančíková**

**Školitel: RNDr. Ing. Vladimír Krylov, Ph.D.**

Praha 2011

Děkuji svému školiteli RNDr. Ing. Vladimíru Krylovi, Ph.D. za odborné konzultace a trpělivost. Zároveň bych chtěla poděkovat svému manželovi Petru Mančíkovi za podporu při studiu a svým dětem Valérii a Matouškovi za pochopení.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala sama z uvedené literatury a na základě konzultací se svým školitelem.

Praha, 29.4. 2011

## **Abstrakt**

Kyselina močová je konečným produktem v metabolické dráze purinů u člověka a některých vyšších primátů. V průběhu evoluce došlo u těchto druhů k mutacím v genu pro urát oxidasu a následně ke snížení nebo ztrátě aktivity tohoto enzymu, který u ostatních savců metabolizuje kyselinu močovou dále na allantoin.

Jaký byl prvotní impuls k využití kyseliny močové v organismu a jaké biochemické vlastnosti kyseliny močové vedly k tendenci udržet si velkou část tohoto metabolitu v krevním oběhu?

Kyselina močová má antioxidační schopnosti a podílí se na likvidaci volných radikálů.

Zvýšená hladina kyseliny močové v krvi má vliv na akutní i chronické zvýšení krevního tlaku. Je pravděpodobné, že v období miocénu, kdy primáti v potravě přijímali minimální množství soli, se díky kyselině močové podařilo stabilizovat krevní tlak při zachování vzpřímené postavy.

Kyselina močová přispívá k ochraně nervového systému. Inhibuje propustnost hematoencefalické bariéry v mozku, omezuje pronikání nežádoucích látek k neuronům a brání tak vzniku zánětlivých onemocnění centrálního nervového systému. Snížená hladina kyseliny močové v séru je typická pro výskyt některých neurodegenerativních chorob.

V neposlední řadě kyselina močová chrání tkáň před poškozením peroxynitrem při zánětlivé reakci.

## **Klíčová slova**

kyselina močová, metabolismus, evoluce, savci, urát oxidasa, Uox

## **Abstract**

Uric acid is the end product of purine metabolism of humans and some higher primates. In other mammals enzyme urate oxidase is capable to further convert uric acid to allantoin. During evolution of primates several mutations in urate oxidase gene had occurred, led the enzyme to decrease its activity or to complete loss of function.

What was the initial impetus for the utilization of uric acid and what biochemical traits of uric acid led to a tendency to retain a major of this metabolite production in the bloodstream?

Uric acid has antioxidant capabilities and it is scavenger of free radicals.

Increased levels of uric acid in blood has an effect on acute and chronic elevations of blood pressure. It is possible that hyperuricemia helped to maintain blood pressure under low-salt dietary conditions of primates during the Miocene. This mechanism probably have allowed to stabilize bipedalism our ancestors.

Uric acid has an important role as a neuroprotector. As inhibitor the permeability blood-brain barrier, uric acid limits the infiltration of undesirable substances to the neurons and prevents central nervous system against the formation of inflammatory diseases. Such as neurodegenerative diseases may be caused by reduced serum uric acid levels.

Uric acid protects against peroxynitrite damage tissues in the inflammatory response.

## **Keywords**

uric acid, metabolism, evolution, mammals, urate oxidase, Uox

## Seznam zkratek:

A,T,C,G – deoxyadenylát, deoxythymidylát, deoxycytidylát, deoxyguanylát, (symboly nukleotidů v DNA)

CNS – centrální nervový systém

COX2 – cyklooxygenasa 2

EAAT – glutamátové transportéry astroglíí

EAE - experimentální alergická encefalomyelitida, experimentální autoimunitní onemocnění u myši

eNOS – endoteliální nitric oxid syntasa (syntasa produkující oxid dusnatý)

iNOS - inducibilní nitric oxid syntasa (syntasa produkující oxid dusnatý)

MAP kinasy Erk1/2 – mitogeny aktivované proteinové kinasy, extracelulárními signály regulované kinasy

MBP – myelinový bazický protein

NADPH oxidasa - nikotinamid adenin dinukleotid fosfát oxidasa

NO syntasa – nitric oxid syntasa (syntasa produkující oxid dusnatý)

ONOO<sup>-</sup> - peroxyinitrit

PDGF - platelet derived growth factor, růstový faktor hladkého svalstva

Uox – gen pro urát oxidasu

ψ-Uox - pseudogen nefunkční urát oxidasy

Xor – gen pro xanthin oxidoreduktasu

# Obsah

1	Úvod .....	6
2	Kyselina močová, metabolit degradace purinů .....	6
3	Ztráta uricasy v evoluci hominoidů .....	7
4	Zajištění fyziologické rovnováhy kyseliny močové v organismu .....	11
5	Patologické stavy .....	13
5.1	Patologické stavy spojené s vysokými hladinami kyseliny močové v séru .....	13
5.2	Onemocnění spojená s nízkými hladinami kyseliny močové v séru .....	14
6	Hypotézy pro evoluční tlak k využití kyseliny močové .....	15
6.1	Kyselina močová a inteligence .....	15
6.2	Stabilizace krevního tlaku v období miocénu .....	16
6.3	Vyšší antioxidační schopnost a delší průměrná délka života .....	18
6.4	Kyselina močová jako ochrana nervového systému .....	20
6.4.1	Kyselina močová a EAE .....	21
6.4.2	Kyselina močová a roztroušená skleróza .....	22
6.4.3	Role kyseliny močové v hematoencefalické bariéře .....	22
6.4.4	Prevence glutamátové excitotoxicity v mozku .....	23
6.5	Role kyseliny močové při ochraně tkání před škodami způsobenými aktivovanými monocyty .....	24
7	Závěr .....	25
8	Seznam použité literatury: .....	27

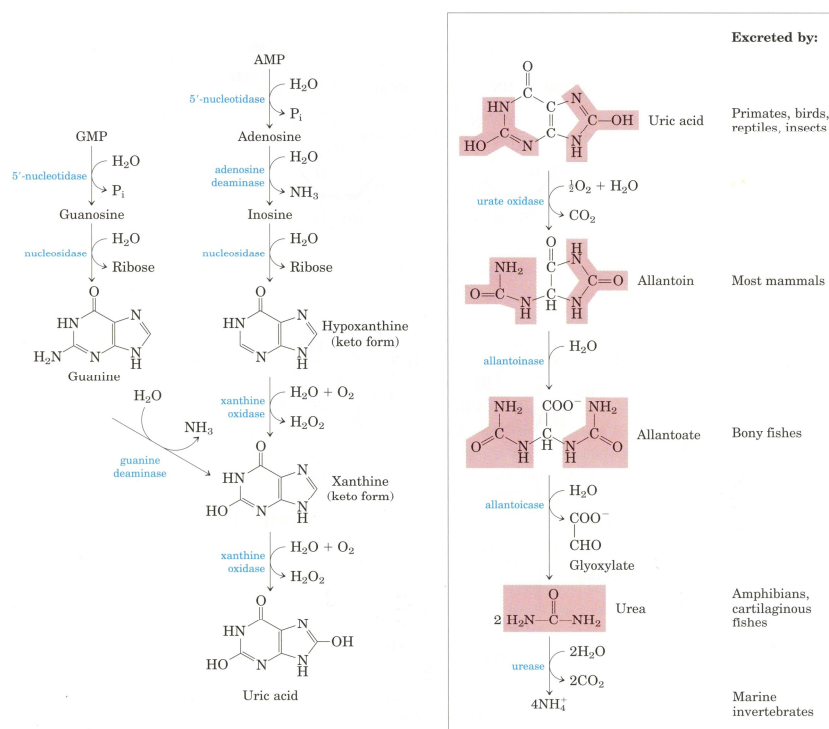
# 1 Úvod

Většina savců v katabolické dráze purinů degraduje kyselinu močovou za pomoci urát oxidasy na allantoin, který je volně vylučován z těla močí. U člověka a některých vyšších primátů došlo v průběhu evoluce ke snížení nebo ztrátě aktivity urát oxidasy. Ukázalo se, že kyselina močová, zpočátku potenciálně toxický metabolit, může být organismu prospěšná. Velká část její produkce je aktivně udržována v krvi a dlouhodobé vychýlení z této rovnováhy může mít pro organismus patologické následky.

V této práci předkládám hypotézy pro využití kyseliny močové v evoluci některých druhů a zabývám se současnými poznatky o významu tohoto metabolismu pro organismus.

## 2 Kyselina močová, metabolit degradace purinů

Kyselina močová je konečným produktem degradace purinů u člověka a některých vyšších primátů (Obr.1). Většina savců kyselinu močovou rychle oxiduje za pomoci enzymu urát oxidasy na allantoin. Kyselina močová a allantoin jsou metabolity jednak z purinů obsažených ve stravě a jednak z obratu nukleotidů a nukleových kyselin (Nelson & Cox, 2008).



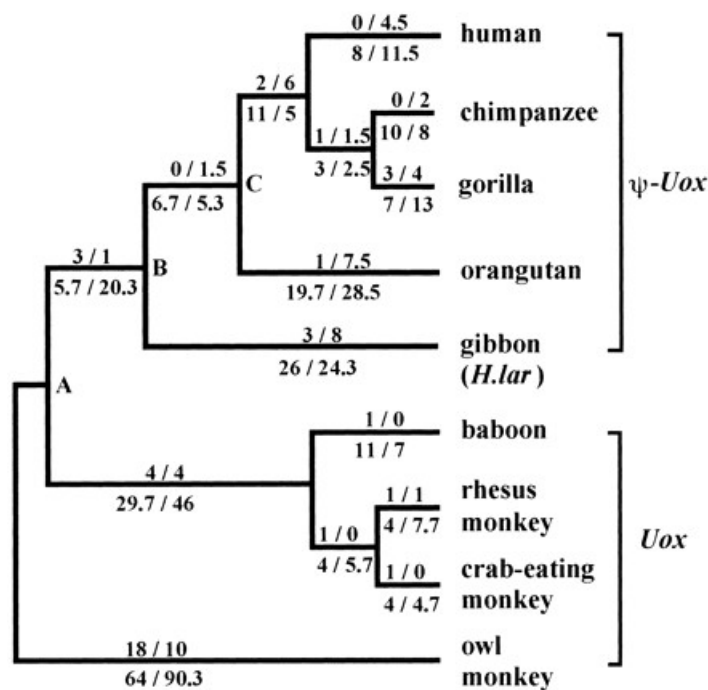
Obr.1 Schéma metabolické dráhy degradace purinů (převzato z Nelson & Cox, 2008)

Urát oxidasa (uricase) je přítomna v celé řadě organismů od bakterií po savce a vykazuje různé aktivity v závislosti na hostitelském druhu. Pro její zásadní roli v metabolismu purinů svědčí fakt, že zůstala evolučně konzervována napříč organismy (Oda *et al.*, 2002).

Urikasy u různých živočišných druhů se stejnou tkáňovou specifitou mají stejnou molekulovou hmotnost, lokalizaci a jsou schopné křížové reakce mezi jednotlivými druhy (Varela-Echevarría *et al.*, 1988).

### 3 Ztráta uricasy v evoluci hominoidů

Mezi hominoidy došlo v evoluci k několika nezávislým mutacím v genu Uox pro urát oxidasu. Někteří primáti, poloopice a opice Starého světa vykazují 2 x až 4 x nižší enzymatickou aktivitu uricasy v porovnání s ostatními savci (myši a králíci) (Oda *et al.*, 2002). U člověka, šimpanze, gorily, orangutana a gibona mutace v Uox genu zapříčinily, že tento enzym zcela ztratil schopnost metabolizovat kyselinu močovou na allantoin (Obr.2). Transkripce nefunkčního  $\psi$ -Uox genu u lidí probíhá v játrech (Oda *et al.*, 2002).



**Obr.2** Fylogenetický strom vytvořený metodou maximální parsimonie založený na sekvencích promotoru, kódujících regionů a intronů Uox genů u devíti primátů *Homo sapiens*, *Pan troglodytes*, *Gorilla gorilla*, *Pongo pygmaeus*, *Hylobates lar*, *Papio hamadryas*, *Macaca mulatta*, *M. fascicularis*, *Aotus trivirgatus*. Funkční gen je označen Uox, nefunkční  $\psi$ -Uox (převzato z Oda *et al.*, 2002).



Sérové hladiny kyseliny močové jsou u těchto primátů přibližně desetkrát vyšší než u ostatních savců. Kyselina močová je filtrována ledvinami a z velké části dochází u člověka k její reabsorpci (z 90%). Pouze malá část její produkce je vylučována z těla močí (Álvarez-Lario & Macarrón-Vicente, 2010).

S největší pravděpodobností byla nejdříve postupně degradována promotorová oblast *Uox* genu a snižována exprese (u člověka specifická delece 26 párů bází v enhancerové oblasti) (Oda *et al.*, 2002). Teprve později došlo k mutacím v kódující oblasti, které měly za následek úplnou inaktivaci genu. Knock-out genu pro urikasu u myši způsobuje vysokou hyperurikémii s následkem nefropatie. Smrt nastává během 4 týdnů postnatálního vývoje (Álvarez-Lario & Macarrón-Vicente, 2010)

U pěti hominoidů s  $\Psi$ -*Uox* pseudogenem lze detekovat druhově specifické mutace. Jedna z mutací (kodón 33 v exonu 2) je společná pro člověka, šimpanze, gorilu a orangutana a právě tato mutace je považována za příčinu úplné ztráty uricasové aktivity u těchto čtyř skupin primátů. Na základě fylogeneze hominoidů bylo navrženo, že k této události došlo před 24 až 13 miliony lety.

U člověka, šimpanze a gorily byla dále identifikována další společná non-sense mutace od společného předka na pozici 187. aminokyseliny. V obou případech (kodón 33 a 187) byly původní kodóny pro arginin CGA nahrazeny STOP kodóny TGA (Obr.3). U primátů je zajímavý fakt, že v rámci translace genu pro uricasu je pro aminokyselinu arginin preferenčně využíván kodón CGA, který s vyšší pravděpodobností spontánně mutuje na terminační kodón TGA. Konkrétně v exonu 6 jsou všechny čtyři CGA (kromě jednoho) převedeny na TGA. Pro arginin je v genech obecně využíváno 6 různých kodónů (tripletů) a jejich využití se v různých genech liší. Ve většině organismů je arginin zpravidla kódován jinak než výše zmíněným kodómem CGA (Oda *et al.*, 2002).

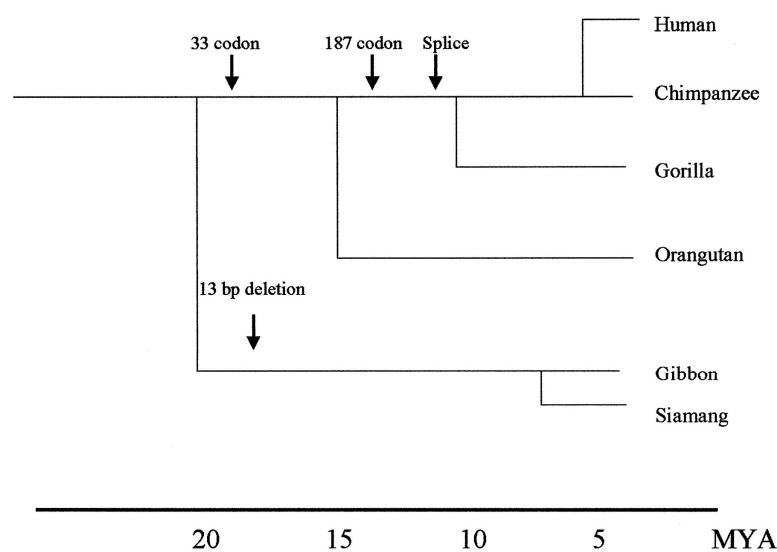
```

11
ctgtgttttcattgcag AAT GAT GAG GTG GAG TTT GTC CGA ACT GGC TAT GGG AAG
asn asp glu val glu phe val arg thr gly tyr gly lys
31
GAA ATG GTA AAA GTT CTC CAT ATT CAG TGA GAT GGA AAA TAT CAC AGC ATT
glu met val lys val leu his ile gln STOP asp gly lys tyr his ser ile
51
AAA GAG GTG GCA ACT TCA GTG CAA CTT ACT CTA AGT TCC AAA AAA GAT TAC
lys glu val ala thr ser val gln leu thr leu ser ser lys lys asp tyr
71
CTG CAT GGA GAT AAT TCA GAC ATC ATC CCT ACA GAC ACC ATC AAG AAC ACA
leu his gly asp asn ser asp ile ile pro thr asp thr ile lys asn thr
GTT CAT GTC TTG GCA AAG TTT AAA GAA gtagtgtgcacttcttc
val his val leu ala lys phe lys glu
149
tacttgaacag GGA CCC CAA GTC ATT CAT TCT GGA ATC AAA GAC CTC AAG GTC
gly pro gln val ile his ser gly ile lys asp leu lys val
169
TTG AAA ACA ACA CAG TCT GGA TTT GAA GGT TTC ATC AAG GAC CAG TTC ACT
leu lys thr thr gln ser gly phe glu gly phe ile lys asp gln phe thr
189
ACC CTC CCT GAG GTG AAG GAC TGA TGC TTT GCC ACC CAA GTG TAC TGC AAG
thr leu pro glu val lys asp STOP cys phe ala thr gln val tyr cys lys
209
TGG CGC TAC CAC CAG TGC AGG GAT GTG GAC TTC AAG GCT ACC TG gtagtaac
trp arg tyr his gln cys arg asp val asp phe lys ala thr trp

```

**Obr. 3** Sekvence dvou exonů (exon 2, exon 5) z lidské urát oxidasy obsahuje dvě non-sense mutace. Přítomnost těchto STOP kodónů na pozici aminokyseliny 33 a 187 v kódující oblasti ukazuje, že gen pro lidskou urát oxidasu je nefunkční. (převzato a upraveno z Wu *et. al.*, 1989)

Gibon narozdíl od člověka, šimpanze, gorily a orangutana vykazuje jinou inaktivující mutaci a to delecí 13 párů bází v exonu 2, ke které došlo nezávisle až po odštěpení tohoto druhu z vývojové větve (Obr.4) (Watanabe *et al.*, 2002).



**Obr.4** Navržené časové uzly pro mutace v uricase v rámci evoluce hominoidů v mil. let (převzato z Watanabe *et al.* 2002).

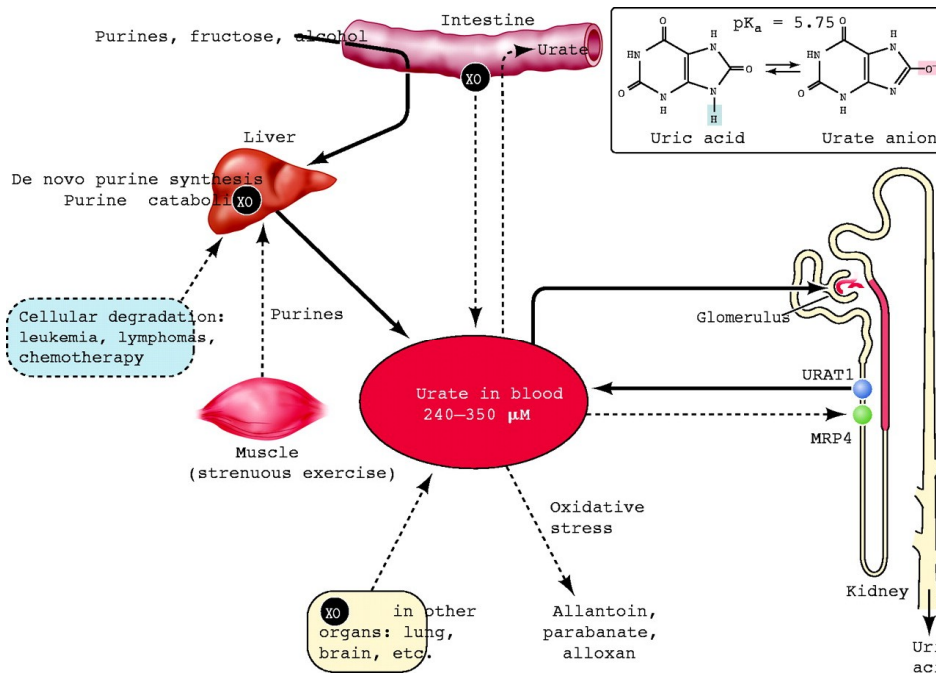
Postupné snižování urikasové aktivity znamenalo pro organismus určitou zátěž. Bylo potřeba přizpůsobit se novým podmínkám a vyrovnat se s negativním působením vysokých koncentrací kyseliny močové. Mechanismem, který se v evoluci osvědčil, bylo snížení transkripce genu pro xanthin oxidoreduktasu (Xor) (Obr.1), která přeměňuje xanthin na kyselinu močovou. Ta má u lidí 100 x nižší aktivitu než např. u skotu, krys a myší (Oda *et al.*, 2002).

Kromě mezidruhových mutací existuje genetická variabilita Uox genu i v moderní lidské populaci. Různé úrovně hladiny kyseliny močové u lidí se dají přičíst na vrub nejen stravovacím návykům, ale jsou také výsledkem evolučních mutací, ke kterým docházelo po více než 8 miliónů let (Oda *et al.*, 2002).

Právě poznatek, že v minulosti docházelo k nezávislým mutacím uricasy u různých druhů primátů a tudíž v konečném důsledku ke ztrátě schopnosti metabolizovat kyselinu močovou, vedl k interpretaci, že zvýšení hladiny kyseliny močové v krvi znamenalo pro časně primáty jistou evoluční výhodu. Tento metabolit se prioritně nevyměšuje jako je tomu u allantoinu, ale naopak jeho stabilní hladina je aktivně udržována reasorpcí v ledvinách (Waring *et al.*, 2000).

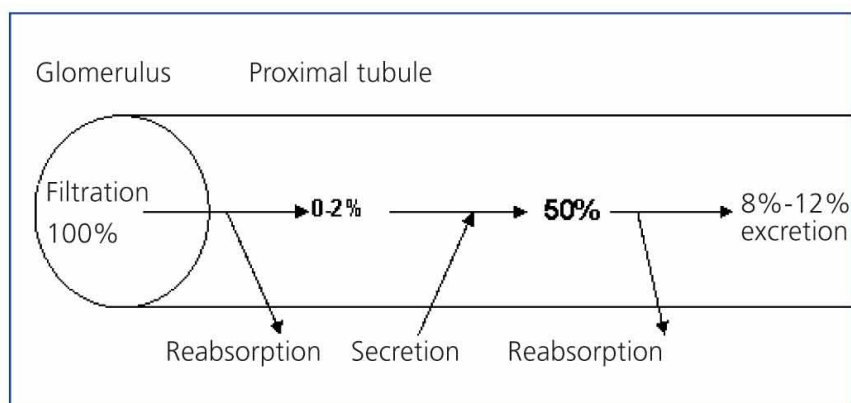
## 4 Zajištění fyziologické rovnováhy kyseliny močové v organismu

Kyselina močová je slabá kyselina. V extracelulárním prostoru je distribuována jako urát sodný. Hladina urátu v krvi závisí na příjmu purinů, jejich metabolismu a rychlosti vylučování kyseliny močové ledvinami (Obr.5).



**Obr.5** Kyselina močová je produkována v játrech, svalecth a ve střevě. Přibližně 2/3 denního obrátu kyseliny močové je vylučováno ledvinami a zbývající 1/3 odchází z těla via feces. Reabsorpce v ledvinách probíhá přes URAT1 transportér, tubulární sekrece přes MRP4 kanál. Fruktosa ve stravě, konzumace alkoholu a buněčná degradace mohou zvyšovat hladinu kyseliny močové v krvi. (převzato z Hediger, 2005)

Plazmatické hladiny kyseliny močové jsou regulovány čtyřmi-komponentami renálního systému zahrnujícími: glomerulární filtraci, reabsorpci, tubulární sekreci a postsekreční reabsorpci. Kyselina močová je nejdříve pasivně filtrována v glomerulu. Velká část filtrované kyseliny močové (99 – 100%) je reabsorbována v proximálním tubulu. V lumen zůstává pouze 0% - 2%. Poté nastává tubulární sekrece, kdy 50% primárně filtrované kyseliny močové je sekretováno do tubulárního lumen. Nakonec dochází k reabsorpci 80% sekretované kyseliny močové v proximálním tubulu (Obr.6) (Esparza & Garcia, 2011).



**Obr. 6** Schématické znázornění transportu kyseliny močové v proximálním tubulu ledvin (převzato z Esparza & Garcia, 2011)

Na regulaci plazmatické hladiny kyseliny močové se podílí množství urátových transportérů. Patří mezi ně transportér URAT1, zodpovědný za reabsorpci kyseliny močové a celá řada transportérů podílejících se na sekreci urátu: transportéry organických iontů OAT1 a OAT3, dále ATP-dependentní urát transportér MRP4 (Obr.5).

U lidí je přibližně 90% ledvinami filtrované kyseliny močové reabsorbováno. Zásadní význam pro regulaci plazmatických hladin kyseliny močové má transportér URAT1 (Hediger *et al.*, 2005). Normální rozsah sérových hladin kyseliny močové u člověka se pohybuje v rozmezí 120 – 380  $\mu\text{M}$  a liší se v závislosti na pohlaví. Na základě výsledků několika studií byla pro hyperurikémii u mužů definována koncentrace vyšší než 386  $\mu\text{M}$ , případně 420  $\mu\text{M}$  (Klemp *et al.*, 1997; Johnson *et al.*, 2003). U žen je hyperurikémie definovaná hladinou kyseliny močové vyšší než 360  $\mu\text{M}$ . Za hypourikémický se obecně považuje stav, kdy koncentrace kyseliny močové je nižší než 120  $\mu\text{M}$  (Hisatome *et al.*, 1996).

Normální koncentrace u některých opic je vyšší než 2 mg/dl (případně 120  $\mu\text{M}$ ). U ostatních savců je tato hladina vždy nižší.

## 5 Patologické stavy

### 5.1 Patologické stavy spojené s vysokými hladinami kyseliny močové v séru

Zvýšené sérové hladiny kyseliny močové mohou vyplývat z různých akutních i chronických příčin. Mezi akutní příčiny hyperurikémie patří příjem velkého množství alkoholu, tumor lysis syndrom (komplikace léčby rakoviny, chemoterapie) a strava obsahující velké množství purinů nebo bílkovin. Chronická hyperurikémie nastává za podmínek, kdy je snížena glomerulární filtrace, snížené vylučování kyseliny močové nebo zvýšena celková tubulární absorpce (Kutzing & Firestein, 2008). Hyperurikémie je spojena s řadou onemocnění včetně dny, hypertenze, kardiovaskulárních onemocnění, infarktu myokardu, cévní mozkové příhody, a onemocnění ledvin (Jossa *et al.*, 1994; Freedman *et al.*, 1995; Kang *et al.*, 2002; Bos *et al.*, 2006). Zůstává nejasné, zda vyšší úroveň kyseliny močové je příčinou těchto onemocnění nebo důsledek některé z těchto chorob.

Přestože některé změny hladin kyseliny močové mohou být způsobené v důsledku těchto nemocí, je pravděpodobné, že kyselina močová hraje důležitou roli nejen v rozvoji ale i prevenci mnohých chorob. Její účinky mohou být jak prospěšné (antioxidant a likvidátor volných radikálů), tak škodlivé (pokud je v séru přítomna na zvýšené úrovni). Pro léčbu řady onemocnění (Tab.1) vypadá nadějně využití metod manipulace se sérovou hladinou kyseliny močové (Kutzing & Firestein, 2008).

Snižování koncentrace kyseliny močové, léčba pro:	Zvyšování koncentrace kyseliny močové, léčba pro:	Nemoci asociované se zvýšenými hladinami kyseliny močové v krvi	Nemoci asociované se sníženými hladinami kyseliny močové v krvi
dna	poranění míchy	dna	roztoušená skleróza
kardiovaskulární onemocnění	roztoušená skleróza a jiná neurodegenerativní onemocnění	onemocnění ledvin	Parkinsonova choroba
hypertenze		hypertenze	Alzheimerova choroba
onemocnění ledvin		kardiovaskulární onemocnění	nádorová onemocnění

**Tab.1** Přehled chorob souvisejících se zvýšenými či sníženými hodnotami kyseliny močové v krvi a využití manipulace s hladinou kyseliny močové při léčbě některých onemocnění. (převzato z Kutzing & Firestein, 2008)

## 5.2 Onemocnění spojená s nízkými hladinami kyseliny močové v séru

Existují důkazy, že nízká hladina kyseliny močové v séru souvisí s vývojem a progresí některých onemocnění. Řada studií potvrdila nezávisle negativní korelace mezi nízkou úrovní kyseliny močové a rozvojem roztroušené sklerózy. Korelace byla také nalezena mezi nízkou úrovní kyseliny močové a zánětlivým demyelinizačním onemocněním zřetelného nervu, který je často prvním příznakem právě roztroušené sklerózy. Stejně tak existuje souvislost mezi nízkou úrovní kyseliny močové a rizikem onemocnění Alzheimerovou či Parkinsonovou chorobou. U pacientů s Parkinsonovou chorobou byla navíc potvrzena nízká úroveň kyseliny močové v substantia nigra. Snížená koncentrace kyseliny močové ve slinách může přispívat k rozvoji nádoru v horní části žaludku. Je pravděpodobně zapojena v obraně proti dusíkovým radikálům, které zde vznikají reakcí dusitanů ze slin s kyselou žaludeční šťávou. Sliny jedince, který má deficit v kyselině močové, nemusí být schopny zabránit poškození tkání reaktivním dusíkem a s větší pravděpodobností zde pak může docházet k mutagenézi. (Kutzing & Firestein, 2008).

## 6 Hypotézy pro evoluční tlak k využití kyseliny močové

Proč se po ztrátě aktivity urát oxidasy nesnažil organismus hromadící se metabolit eliminovat, ale naopak udržet si jeho podstatnou část v těle? Jaký benefit získali někteří savci v utilizaci kyseliny močové? Výhody spojené s tímto trendem musely být větší, než zjištěná rizika spojená s hyperurikémií včetně dny, hypertenze a dalších onemocnění.

Tyto úvahy vedly k navržení následujících hypotéz, vysvětlujících možný evoluční tlak:

- kyselina močová koreluje s inteligencí, mohla se podílet na procesech souvisejících s rozvojem myšlení u lidí – nejstarší hypotéza
- díky kyselině močové se podařilo hominoidům stabilizovat krevní tlak při zachování vzpřímené postavy v obdobích nízkého obsahu soli v potravě
- přínosem kyseliny močové je především antioxidační schopnost, podílí na zvýšené průměrné délce života a kompenzuje se ztráta schopnosti syntetizovat kyselinu askorbovou
- význam kyseliny močové je v ochraně nervového systému, je schopna bránit poškozením způsobeným peroxynitritem, zvýšení hladiny kyseliny močové nastalo v lidské evoluci především proto, aby se předcházelo škodám způsobených aktivovanými monocyty produkujícími peroxynitrit

### 6.1 Kyselina močová a inteligence

Podle nejstarší hypotézy vyslovené E. Orowanem (1955) by mohlo zvýšené množství kyseliny močové v krvi vést ke kvantitativnímu a kvalitativnímu skoku v duševních schopnostech hominidů. Předpoklad vznikl na základě podobnosti struktury kyseliny močové a některých mozkových stimulantů jako kofein a theobromin. (Orowan, 1955). Navíc kyselina močová má ochranné účinky proti několika neurodegenerativním chorobám, mohla by být důležitá při neurálním vývoji a funkcích stále složitějšího nervového systému. V souladu s touto myšlenkou jsou výsledky terapeutického využití kyseliny glutamové, která je zapojena do endogenní produkce kyseliny močové.



U mentálně retardovaných pacientů dochází ke zlepšení kognitivních funkcí (Vogel *et al.*, 1966).

Někteří autoři našli významnou korelaci mezi hladinou kyseliny močové a vyšší inteligencí u dětí nebo mladých dospělých a souvislost mezi onemocněním dny s vyšší inteligencí. Studie byla provedena na rodinách dvojčat. Výsledek poukazyval na odlišné genetické dispozice pro úroveň kyseliny močové v krvi. Její rozdílná hladina v séru jedinců může být následkem polymorfismu pro enzymy v metabolické dráze purinů. Významná korelace mezi plazmatickou hladinou kyseliny močové a IQ může mít souvislost s příspěvkem částečně společných genových lokusů dvou kvantitativních znaků (Inouye *et al.*, 1984). Jiní autoři tuto přímou souvislost zamítli s odůvodněním, že lze jen obtížně oddělit další faktory jako je ekonomická, kulturní a intelektuální situace rodiny.

Je třeba neopomenout fakt, že významný nárůst mozku rodu Homo nastal v relativně krátkém časovém úseku (ztrojnásobení v období posledních 2,5 mil let), avšak ztráta uricasy je odhadována v období zhruba před 13 mil lety. Je tedy dosti nepravděpodobné, že by se urát, jako hlavní faktor, přímo podílel na těchto změnách.

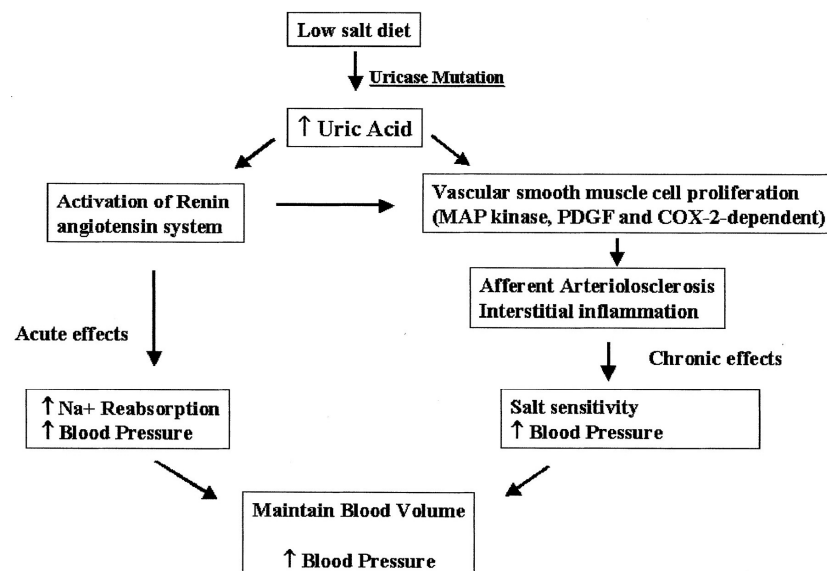
## **6.2 Stabilizace krevního tlaku v období miocénu**

Fosilie naznačují, že časní hominoidé z období před 22 až 17 miliony let žijící v subtropických lesích a mokřadách tehdejší východní Afriky, se živili převážně ovocem a listy. U prvních lovců- sběračů v pozdním pleistocénu se odhaduje množství sodíku ve stravě na 690 mg (tedy 1,9 g NaCl) denně. Existují odhady, že v přísně vegetariánské stravě paleolitických primátů mohl činit příjem soli okolo 0,6 g denně. Pro srovnání v současné americké stravě je to 10 g na den (Watanabe *et al.*, 2001). Zvýšení krevního tlaku při nízkém obsahu soli mohlo být zásadní pro zachování svislé polohy hominoidů (Du *et al.*, 2007).

Pro ověření hypotézy, zda kyselina močová může regulovat tlak krve, byli použiti potkani jednak s mírnou hyperurikémií (po podání inhibitoru uricasy) a jednak potkani normální. Obě skupiny byly udržovány na stravě s nízkým obsahem NaCl. Normální potkani nevykazovaly buď žádné změny nebo byl u nich postupně zaznamenán pokles

krvního tlaku. Oproti tomu u hyperurikémických potkanů došlo k nárůstu krevního tlaku po 3 týdnech a k renálnímu poškození arteriol se zjevnou proliferací hladké svaloviny cév s následkem jejich zúžení. Mírná hyperurikémie zapříčinila hypertenzi a poškození ledvin částečně stimulací renin–angiotenzinového systému a současně inhibicí neuronální NO syntasy (Mazzali *et al.*, 2001) Renin–angiotenzinový hormonální systém hraje klíčovou roli v udržování krevního tlaku, v množství glomerulární filtrace, působí vasokonstrikčně a indukuje maximální reasorpci sodíku při nedostatečném příjmu soli. Antagonisticky působí oxid dusnatý, produkovaný NO syntasou.

U živočichů, kteří měli v miocénu mutaci v genu pro uricasu, docházelo díky zvýšení hladiny kyseliny močové v séru k akutnímu zvýšení krevního tlaku. Díky působení kyseliny močové na renin–angiotenzinový systém docházelo k maximální reasorpci sodíku a k jeho udržení v těle. Navíc rozpustná kyselina močová stimuluje proliferaci buněk hladkého svalstva cév aktivací Map kinasy Erk1/2 a stimulací exprese růstového faktoru PDGF a jeho receptorů. Zároveň se na proliferaci podílí kyselinou močovou indukovaná exprese cyklooxygenasy-2 (COX-2), vznik tromboxanů a částečně výše zmíněná aktivace renin–angiotenzinového systému. Výsledkem těchto procesů je trvalé zvýšení krevního tlaku s udržením rovnováhy sodíku (Obr.7) (Watanabe *et al.*, 2002).



**Obr.7** Schéma působení kyseliny močové v rámci regulace krevního tlaku u hominoidů v období miocénu (převzato z Watanabe *et al.*, 2002)

Mutace uricasy, které se vyskytly během evoluce hominoidů byly původně výhodné, pomáhaly udržovat krevní tlak jak akutně, tak chronicky. Přechod na stravu s velmi vysokým obsahem soli v moderní společnosti má za následek častý výskyt hypertenze a kardiovaskulárních onemocnění (Watanabe *et al.*, 2002).

Hyperurikémie u lidí vede ke zvýšenému riziku hypertenze v následujících 5 letech bez ohledu na další rizikové faktory. Poznatek, že hyperurikémie není důsledkem hypertenze je v souladu s domněnkou, že zvýšení krevního tlaku je výsledkem ztráty urikasy, nikoliv příčinou.

Jiní býložraví savci byli schopni přizpůsobit se podmínkám nízkého obsahu soli ve stravě se zachováním činnosti uricasy.

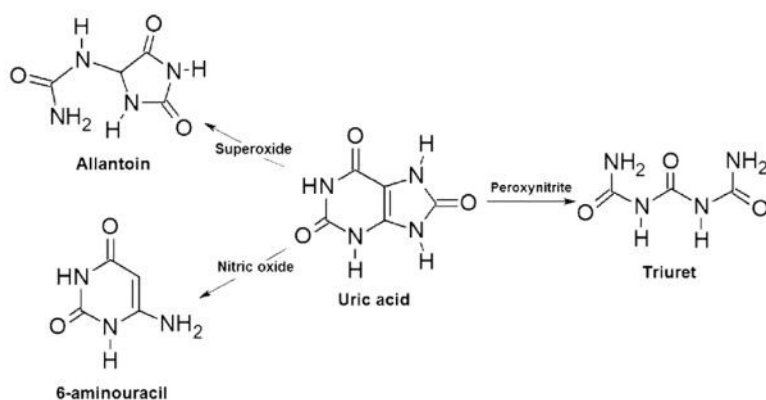
### **6.3 Vyšší antioxidační schopnost a delší průměrná délka života**

Ztráta uricasy a zisk kyseliny močové jako antioxidantu by mohl být jistým způsobem náhradou za evolučně ztracenou schopnost syntetizovat vitamín C. Tato mutace v L-glukono-lakton oxidase proběhla před 40-50 mil. lety v období, kdy primáti přijímali ve stravě velké množství vitamínu C. V této době mohla být tato mutace neškodná, avšak se změnou stravy a snížením množství přijatého vitamínu C se antioxidační kapacita snížila a řešením mohlo být následné zvýšení hladiny kyseliny močové v krvi (Johnson *et al.*, 2005).

Reaktivní kyslíkové radikály (ROS) jsou přítomny v buňkách za fyziologických podmínek. Pokud se však jejich produkce zvýší a přesáhnou antioxidační kapacitu buněk, vykazují toxický efekt.

Kyselina močová je v současné době považována za jeden z nejdůležitějších rozpustných antioxidantů v plazmě. Přispívá více jak z 50% k antioxidační kapacitě krve. (Álvarez-Lario & Macarón-Vincente, 2010).

Kyselina močová je schopna neenzymaticky reagovat se superoxidem, oxidem dusnatým a s peroxynitrem. Vznikajícími metabolity jsou allantoin, 6-aminouracil a triuret (Obr.8) (Kim *et al.*, 2009).



**Obr.8** Metabolity neenzymatických reakcí kyseliny močové (převzato z Kim et al., 2009)

Může také reagovat s peroxidem vodíku a s hydroxylovým radikálem. Z uvedených reakcí nejochotněji reaguje s peroxynitritem. Reakce jsou iniciovány kyselinou močovou jako donorem elektronu, následně se vytváří radikál kyseliny močové a dochází k ireversibilní degradaci na některý z metabolitů (Gersch *et al.*, 2009).

Při fyziologických koncentracích tvoří kyselina močová stabilní komplexy s ionty železa (jak železnatými, tak železitými). V této reakci kompetuje o ionty železa s askorbátem. Význam v tomto případě spočívá v inhibici peroxidací lipidů (Davies *et al.*, 1986). Vytváření komplexu askorbátu s ionty železa souvisí s tvorbou kyslíkových radikálů a v mikrozómech iniciuje peroxidaci lipidů (Casalino *et al.*, 1996). Peroxidace lipidů v membránách může vést k poškození a k lyzi buněk.

Další vlastností, kterou přispívá kyselina močová k ochraně nespecifické oxidace v buňkách, je její vyšší afinita k singletovému kyslíku, než kterou vykazují deoxynukleosidy. S menší pravděpodobností tak dochází k oxidaci deoxynukleosidů (Ames *et al.*, 1981).

Oxidativní stres je spojen s fyziologickými a patologickými stavy včetně stárnutí a nádorového bujení. Provedené experimenty přinesly důkazy u bezobratlých. Do jaké míry se podílejí volné kyslíkové radikály na procesech stárnutí, bylo testováno na transgenních octomilkách (*Drosophilla melanogaster*). Testování jedinci nesly tři kopie genů pro katalázu a superoxid dismutasu (významné antioxidační enzymy) ve srovnání s normálními diploidními jedinci.. Overexpresí těchto enzymů u transgenních jedinců bylo dosaženo prodloužení života o jednu třetinu (Orr & Sochal, 1994).

U myši, kdy mutace v antioxidantních enzymech vyvolávají neoplázie, se ovšem zatím neprokázal zřímý vliv na snížení průměrné délky života. (Pérez *et al.*, 2009).

Jiní savci, například sloni dosáhli dlouhověkosti i přesto, že mají minimum kyseliny močové v séru (Miller, 2006).

## 6.4 Kyselina močová jako ochrana nervového systému

Vysoká antioxidantní schopnost kyseliny močové hraje důležitou roli pro CNS (centrální nervový systém), který je v tomto ohledu velice zranitelný. Jako energeticky náročný orgán spotřebuje každou pátou molekulu O<sub>2</sub>, kterou dýcháme. Produkce volných radikálů je zde vyšší a organismus tím pádem musí zabezpečit ochranu nervových buněk před degenerativními poškozeními (Scott & Hooper, 2001). Zvýšená hladina kyseliny močové se v tomto ohledu jeví jako evolučně výhodná pro člověka, který procházel vývojem ke stále složitějšímu CNS.

Existuje stále více důkazů, že kyselina močová má ochranné účinky proti nemocem jako např. Parkinsonova a Alzheimerova choroba nebo amyotrofická laterální skleróza. Nižší hladina kyseliny močové koreluje s vyšší prevalencí a horším vývojem těchto onemocnění. Dna, pro kterou je typická hyperurikémie se s roztroušenou sklerózou vzájemně vylučují. Dosud nebyly hlášeny případy pacientů, kteří by trpěli zároveň roztroušenou sklerosou a dnou. (Kutzing & Firestein, 2008)

Při úvaze o opodstatněnosti hypotézy, zda kyselina močová může bránit rozvoji poškození mozku, je třeba vzít v úvahu její selektivitu při zneškodňování peroxynitritu (ONOO<sup>-</sup>), který se podílí na zánětlivých onemocněních CNS. Přestože kyselina močová byla používána jako antioxidant v celé řadě *in vitro* studií, její vztah k ONOO<sup>-</sup> byl prokázán teprve nedávno (Scott & Hooper, 2001). Kyselina močová není primárně přímým likvidátorem peroxynitritu *in vivo*, ale neutralizuje superoxid, brání jeho reakci s oxidem dusnatým a formaci peroxynitritu ( $\text{NO} + \text{O}_2^- \rightarrow \text{ONOO}^-$ ). Dále je schopna vylučovat volné radikály, jako je CO<sub>3</sub> a NO<sub>2</sub>, které vznikají po rozpadu peroxynitritu (Squadrito *et al.*, 2000).

ONOO<sup>-</sup> může mít toxické účinky včetně peroxidace mastných kyselin, inhibice mitochondriální respirace nebo tyrosinové nitrace, která je katalyzována superoxid

dismutasou. Vzniklý nitrotyrosin byl detekován v mozkové tkáni u roztroušené sklerózy a v CNS myši s EAE (Scott & Hooper, 2001).

ONOO<sup>-</sup> je potenciální mutagen. Jedním z mechanismů, kterými škodí struktuře DNA je oxidace guaninu, kdy následně může docházet k mutacím DNA. ONOO<sup>-</sup> způsobuje zlomy v DNA s následnou indukci apoptózy a buněčné smrti (Virág *et al.*, 1998).

Kyselina močová dokáže účinně bránit peroxynitrem zprostředkované tyrosinové nitraci (Ames *et al.*, 1981).

NO a reaktivní formy kyslíku přispívají k imunotoxicitě v případě roztroušené sklerózy. V lézích CNS, charakteristických pro roztroušenou sklerózu je zřetelná nadprodukce NO syntasy. Pokud je NO a superoxid produkován v bezprostřední blízkosti, vzniká vysoce reaktivní forma ONOO<sup>-</sup>. O<sub>2</sub><sup>-</sup> je vytvářen ve všech buňkách během respirace zatímco pouze omezené množství buněk má schopnost zpracovávat NO. Cévní endoteliální buňky a neurony využívají konstitutivní formu NO syntasy k produkci nízké hladiny NO jako signální molekuly. Produkce ONOO<sup>-</sup> endoteliálními buňkami cév prostřednictvím eNOS přispívá k patogenezi ischemických onemocnění orgánů včetně CNS (Scott & Hooper, 2001).

#### **6.4.1 Kyselina močová a EAE**

EAE (experimentální alergická encefalomyelitida) je zvířecí onemocnění analogické roztroušené skleróze u lidí. Výhodou při posuzování účinků mechanismu kyseliny močové v patogenezi EAE u myši je fakt, že myši mají normální nízkou hladinu kyseliny močové. Po aplikaci kyseliny močové a udržování její zvýšené hladiny v krvi byl rozvoj EAE u vnímavých myši značně omezen. Pokud bylo podávání kyseliny močové ukončeno, začala se u myši rychle rozvíjet těžká forma EAE. (Hooper *et al.*, 1998).

Kyselina močová chrání před EAE na dvou úrovních:

- 1) prevencí před poškozením ONOO<sup>-</sup> v rámci leze
- 2) manipuluje s invazivitou zánětlivých buněk v CNS (Scott & Hooper, 2001)

Pokud byly myši léčené kyselinou močovou až po imunizaci MBP (myelinovým bazickým proteinem), buňky exprimující iNOS se objevily v lymfatických uzlinách od

místa imunizace a v periferní krvi a zároveň došlo k silnému snížení akumulace iNOS pozitivních buněk v míše (Varela-Echevarri'a *et al.*, 1988).

#### **6.4.2 Kyselina močová a roztroušená skleróza**

U pacientů s roztroušenou sklerózou jsou znatelně nižší hladiny kyseliny močové v séru než u pacientů s nezánettivými neurologickými onemocněními (Hooper *et al.*, 1998). Tento fakt může být zapříčiněn buď zvýšenou spotřebou kyseliny močové k inaktivaci peroxynitritu v průběhu onemocnění nebo naopak - onemocnění může vznikat predispozičně v důsledku nižších hladin kyseliny močové (Scott & Hooper, 2001).

U žen před menopauzou, které mají obecně o 20% nižší sérové hladiny kyseliny močové než muži, je pravděpodobnost výskytu onemocnění 2 x vyšší než u mužů (Scott & Hooper, 2001).

#### **6.4.3 Role kyseliny močové v hematoencefalické bariéře**

Integrita hematoencefalické bariéry je ohrožena v obou případech onemocnění, roztroušené sklerózy i EAE. Zvýšení propustnosti bylo prokázáno u myši s EAE, avšak po exogenním podávání kyseliny močové došlo následně k poklesu propustnosti (Varela-Echevarri'a *et al.*, 1988).

ONOO<sup>-</sup> je příčinou zvýšené propustnosti a následně migrace látek do CNS. Dokáže modifikovat proteiny, lipidy a nukleové kyseliny, jak bylo zmíněno výše. Tato permeabilita umožňuje infiltraci zánětlivých buněk do CNS. Je pravděpodobné, že kyselina močová inhibuje expresi adhezivních molekul v endoteliálních buňkách nebo expresi chemokinů a cytokinů. Snižuje tak adhezi zánětlivých buněk a extravazaci cév (Scott & Hooper, 2001).

#### 6.4.4 Prevence glutamátové excitotoxicity v mozku

Glutamát je hlavní excitační neurotransmiter v CNS. Po vylití do synaptické štěrbině je aktivně přenášen kanály na membránách neuronů a glií zpět do buněk. Při nedostatečné funkci těchto transportérů hrozí hromadění glutamátu v mezibuněčném prostoru. Zvýšenou stimulací glutamátových receptorů na postsynaptické membráně dochází ke vstupu velkého množství vápenatých iontů do neuronů, kde zapříčiňují poškození mitochondrií. Spolu s kationty vstupuje do neuronů voda, buňky nabývají na objemu a praskají. Tento mechanismus se také podílí na buněčné smrti neuronů při ischemii.

Kyselina močová dokáže chránit neurony před toxicitou glutamátu. Pro studie byly využity kultury získané z míchy embryí krysy (Du *et al.*, 2007). Ukázalo se, že po ukončení glutamátové expozice lze zvrátit škody vyvolané glutamátem na neuronech (ve smíšené kultuře z buněk míchy) přidáním kyseliny močové. V čisté neuronální kultuře (bez astrocytů), kyselina močová toxicitě z glutamátu nebrání. Přidáním astroglií do čisté neuronální kultury se obnovuje schopnost kyseliny močové neurony chránit. Astroglie zprostředkovávají ochranný mechanismus účinku kyseliny močové na neurony.

Výsledky studií naznačují, že glie poskytující EAAT-1-2, EAAT - glutamátové transportéry k ochraně neuronů z glutamátu, mohou být podmínkou pro zprostředkování účinků kyseliny močové. Kyselina močová hraje roli v upregulaci EAAT-1 proteinu. Odhaluje se mechanismus, kterým kyselina močová může chránit neurony před poškozením během zranění, jako je poranění míchy (Du *et al.*, 2007)



## 6.5 Role kyseliny močové při ochraně tkání před škodami způsobenými aktivovanými monocyty

V aktivovaných makrofázích se produkuje simultánně NO a  $O_2^-$  (následně ONOO<sup>-</sup>) prostřednictvím inducibilní NOS (iNOS) a NADPH oxidasy. Hypotéza, že zvýšení hladiny kyseliny močové nastalo v lidské evoluci především proto, aby se předcházelo škodám způsobených aktivovanými monocyty produkujícími ONOO<sup>-</sup> se opírá o tato základní pozorování:

- iNOS pozitivní buňky u myši s přirozeně nízkými hladinami kyseliny močové cirkulují cévami, dostávají se do CNS, kde způsobují nespecifické poškození tkáně právě produkcí ONOO<sup>-</sup>. CNS je zvláště citlivý na poškození. Jedná o převážně neobnovitelnou tkáň. Snaha organismu zabránit těmto poškozením mohla být dostatečně silným impulsem pro zvýšení sérových hladin kyseliny močové.
- zvýšení hladiny kyseliny močové inhibuje propustnost hematoencefalické bariéry spojenou se záněty v CNS a brání pronikání aktivovaných iNOS monocytů
- kyselina močová selektivně inaktivuje ONOO<sup>-</sup>
- v průběhu řady onemocnění CNS byla zaznamenána zvýšená tvorba ONOO<sup>-</sup>. Hladina kyseliny močové je značně nižší v mozkomíšním moku než v séru.

Podle teorie, že kyselina močová předchází škodám zprostředkovanými aktivovanými monocyty, lze předpokládat, že příspěvek toxicity ONOO<sup>-</sup> v CNS bude významný. Zde jsou hladiny kyseliny močové nízké, tudíž je zde větší pravděpodobnost, že cirkulující monocyty aktivované reakcí na virové, bakteriální či autoantigeny (v případě EAE), nespecificky poškozují tkáň. Následuje uvolňování množství antigenů (např. komponenty myelinu), které u citlivých jedinců mohou zpustit kaskádu autoimunitních reakcí (Scott & Hooper, 2001).

## 7 Závěr

Evoluční tendence zvýhodnit jedince s nižší expresí či úplnou inaktivací urát oxidasy je patrná u nezávisle se vyvíjejících druhů primátů. Mutace v genu pro uricasu vyvolaly koevoluční změny v potlačení genové exprese xanthin oxidoreduktasy, jako ochranu organismu před nadprodukcí kyseliny močové.

Ve výsledku tito primáti využily chemických vlastností vznikajícího metabolitu a kyselina močová se stala nepostradatelnou v zajištění fyziologické rovnováhy. Vychýlení koncentrací kyseliny močové v krvi je nežádoucí a způsobuje patologické stavy. Proto je tak důležitá regulace řízená renálním systémem.

Kyselina močová je významný antioxidant a hraje důležitou roli v ochraně nervového systému. Právě to mohl být jeden z důležitých faktorů pro člověka při vývoji stále složitějšího CNS. Primární příčina zvýšení úrovně kyseliny močové v krvi zatím není objasněna.

Hypotézy týkající se využití kyseliny močové u primátů a člověka se navzájem nepopírají, ba naopak je zde patrná klíčová role tohoto metabolitu vázat volné radikály. Tato vlastnost se velmi dobře uplatňuje u zánětlivých procesů, při kterých vzniká nadměrné množství oxidu dusnatého. Ten dává vzniknout (reakcí se superoxidem) toxickému peroxinitritu. Omezení jeho tvorby díky neutralizaci superoxidu kyselinou močovou brání nespecifickému poškození tkání při zánětlivých reakcích. Z tohoto pohledu je za nejcitlivější tkáň považován mozek. Kyselina močová aktivně snižuje hematoencefalickou propustnost, brání průniku aktivovaných monocytů a škodlivých látek k neuronům. I zde přispívá ke snížení tvorby peroxynitritu a volných radikálů, které mimo jiné vznikají jeho rozpadem. Mohou nevratně poškodit nervovou tkáň a přispět ke spuštění autoimunitních reakcí. Z předcházejících vět je patrné, že všechny tyto procesy jsou vzájemně propojené.

Další úvaha se opírá o zjištění, že kyselina močová dokáže zvyšovat krevní tlak jak akutně – stimulací renin-angiotenzinového systému, tak chronicky – působením na aferentní arterioly v ledvinách aktivací MAP kinas, zvýšenou expresí růstového faktoru PDGF a cyklooxygenasy COX-2. V období miocénu, kdy předchůdce člověka procházel vývojem k bipedii a v potravě přijímal velmi malé množství soli, mohla být kyselina močová zvyšující reasorpci sodíku výborným prostředníkem ke stabilizaci krevního tlaku s udržením vzpřímené postavy.

Vysoký obsah purinů nebo bílkovin ve stravě současného člověka je jednou z příčin hyperurikémických stavů, které se podílejí na vývoji některých onemocnění, konkrétně dny, hypertenze, kardiovaskulárních onemocnění, infarktu myokardu, cévní mozkové příhody a onemocnění ledvin. Lidé jsou jediní savci, u kterých se dna spontánně vyvíjí. Na druhou stranu hypourikémické stavy souvisejí s vývojem neurodegenerativních a nádorových onemocnění.

Geneticky podmíněné poruchy rovnováhy hladiny kyseliny močové v krvi jsou předmětem zájmu současného výzkumu.

Ucelení poznatků o významu kyseliny močové v lidském organismu je základem pro mou plánovanou navazující diplomovou práci zaměřenou na funkční studie transportérů kyseliny močové v ledvinách.

## 8 Seznam použité literatury:

Álvarez-Lario B., Macarrón-Vicente J. 2010. Uric acid and evolution. *Rheumatology*; 49:2010-2015 Review.

Ames B.N., Cathcart R., Schwiers E., Hochstein P. 1981. Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: A hypothesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 78(11):6858-62.

Bos M.J., Koudstaal P.J., Hofman A., Witteman J.C., and Breteler M.M. 2006. Uric acid is a risk factor for myocardial infarction and stroke: the Rotterdam study. *Stroke*; 37:1503–1507.

Casalino E., Sblano C., Landriscina C. 1996. A possible mechanism for initiation of lipid peroxidation by ascorbate in rat liver microsomes. *Int J Biochem Cell Biol.*; 28(2):137-149.

Davies K.J., Sevanian A., Muakkassah-Kelly S.F., Hochstein P. 1986. Uric acid-iron ion complexes. A new aspect of the antioxidant functions of uric acid. *Biochem J.*; 235(3): 747–754.

Du Y., Chen C.P., Tseng C.Y., Eisenberg Y., Firestein B.L. 2007. Astroglia-mediated effects of uric acid to protect spinal cord neurons from glutamate toxicity. *Glia*; 55:463–72.

Esparza M.N., Garcia N.V. 2011 Hypouricemia and tubular transport of uric acid. *Nefrologia*; 31(1):44-50.

Freedman D.S., Williamson D.F., Gunter E.W., Byers T. 1995. Relation of serum uric acid to mortality and ischemic heart disease. The NHANES I Epidemiologic Follow-up Study. *Am J Epidemiol*; 141:637–644.

Gersch Ch., Pali S.P., Imaram W, Kim K.M., Karumanchi A., Angerhofer A., Johnson R.J., Henderson G.N. 2009. Reactions of peroxynitrite with uric acid: formation of reactive intermediates, alkylated products and triuret, and in vivo production of triuret under conditions of oxidative stress. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*; 28(2): 118–149.

Hediger M.A., Johnson R.J., Miyazaki H., Endou H. 2005 Molecular physiology of urate transport. *Physiology*; 20(2):125–133. Review.

Hisatome I., Tsuboi M., Shigemasa C. 1996. Renal hypouricemia. *Nippon Rinsho*; 54(12):3337-42.

Hooper D.C., Spitsin S., Kean R.B., Champion J.M., Dickson G. 1998. Uric acid, a natural scavenger of ONOO<sup>-</sup>, in experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis *Proc Natl Acad Sci*; 95: 675-680.

Inouye E., Park K.S., Asaka A. 1984 Blood uric acid level and IQ: a study in twin families. *Acta Genet Med Gemellol (Roma)*; 33(2):237-42.

- Johnson R.J., Kang D.H., Feig D., Kivlighn S., Kanellis J., Watanabe S., Tuttle K.R., Rodriguez-Iturbe B., Herrera-Acosta J., Mazzali M. 2003. Is there a pathogenetic role for uric acid in hypertension and cardiovascular and renal disease? *Hypertension*; 41(6):1183-1190.
- Jossa F., Farinaro E., Panico S., Krogh V., Celentano E., Galasso R., Mancini M., Trevisan M. 1994. Serum uric acid and hypertension: the Olivetti heart study. *J Hum Hypertens*; 8(9):677-681.
- Kang D.H., Nakagawa T., Feng L., Watanabe S., Han L., Mazzali M., Truong L., Harris R., Johnson R.J. 2002. A role for uric acid in the progression of renal disease. *J Am Soc Nephrol*; 13:2888–2897.
- Kim K.M., Henderson G.N., Frye R.F., Galloway Ch.D., Brown N.J., Segal M.S., Imaram W., Angerhofer A., Johnson R.J. 2009. Simultaneous determination of uric acid metabolites allantoin, 6-aminouracil, and triuret in human urine using liquid chromatography–mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*; 877(1-2):65–70.
- Klemp P., Stansfield S.A., Castle B., Robertson M.C. 1997 Gout is on the increase in New Zealand. *Annals of the Rheumatic Diseases*; 56:22–26.
- Kutzing M.K., Firestein B.L. 2008. Altered uric acid levels and disease states. *J Pharmacol Exp Ther*; 324:1–7.
- Mazzali M, Hughes J, Kim YG, Jefferson JA, Kang DH, Gordon KL, Lan HY, Kivlighn S, Johnson RJ. 2001. Elevated uric acid increases blood pressure in the rat by a novel crystal-independent mechanism. *Hypertension*; 38(5):1101-1106.
- Miller R.E. 2006. Urinary system (kap. ve Fowler M.E., Mikota S.K., eds. *Biology, medicine, and surgery of elephants*). Oxford: Blackwell Publishing Ltd; 369-392
- Nelson D.L., Cox M. M. 2008. *Lehninger Principles Of Biochemistry*, fifth edition; ISBN 9781429208925:892.
- Oda M., Satta Y, Takenaka O, Takahata N. 2002. Loss of urate oxidase activity in hominoids and its evolutionary implications. *Mol Biol Evol*; 19(5):640-653.
- Orowan E. 1955. The origin of man. *Nature*; 175(4459):683-684.
- Orr WC, Sohal RS. 1994. Extension of life-span by overexpression of superoxide dismutase and catalase in *Drosophila melanogaster*. *Science*; 263(5150):1128-30.
- Pacher P., Beckman J.S., Liaudet L. 2007. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev*; 87: 315–424.
- Pérez V.I., Van Remmen H., Bokov A., Epstein Ch.J., Vijg J., Richardson A. 2009. The overexpression of major antioxidant enzymes does not extend the lifespan of mice. *Aging Cell*; 8(1):73–75.

- Scott G.S., Hooper D.C. 2001. The role of uric acid in protection against peroxynitrite-mediated pathology. *Med Hypotheses*; 56(1):95-100.
- Squadrito G.L., Cueto R., Splenser A.E., Valavanidis A., Zhang H., Uppu R.M., Pryor W.A. 2000. Reaction of uric acid with peroxynitrite and implications for the mechanism of neuroprotection by uric acid. *Arch Biochem Biophys*; 376(2):333-7.
- Varela-Echevarría A, Montes de Oca-Luna R, Barrera-Saldaña HA. 1988. Uricase protein sequences: conserved during vertebrate evolution but absent in humans. *FASEB J*; 2:3092–3096.
- Virág L., Scott G.S., Cuzzocrea S., Marmer D., Salzman A. L., Szabó C. 1998. Peroxynitrite-induced thymocyte apoptosis: the role of caspases and poly(ADP-ribose) synthetase (PARS) activation. *Immunology*; 94: 345-355.
- Vogel W., Broverman D.M., Draguns J.G., Klaiber E.L. 1966. The role of glutamic acid in cognitive behaviours. *Psychol Bull*; 65:367-382.
- Waring W.S., Webb D.J., Maxwell S.R.J. 2000. Uric acid as risk factor for cardiovascular disease. *Q. J. Med*; 93:707-713 Review.
- Watanabe S, Kang D.H., Feng L., Nakagawa T, Kanellis J., Lan H., Mazzali M., Johnson R.J. 2002. Uric Acid, Hominoid Evolution, and the Pathogenesis of Salt-Sensitivity. *Hypertension*; 40:355-360 .
- Wu X., Muzny D.M., Lee Ch.Ch., Caskey C.T. 1989 Urate oxidase: Primary structure and evolutionary implications. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 86: 9412-9416.