

**Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická**

HPLC/ED stanovení kyseliny lipoové v lidské plazmě

Diplomová práce

2009

Bc. Ladislav Pyskatý

University of Pardubice
Faculty of chemical technology

HPLC/ED determination of lipoic acid in human plasma

Thesis

2009

Bc. Ladislav Pyskatý

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracoval samostatně. Veškeré zde využití literární prameny a informace jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 4. 5. 2009

.....
Ladislav Pyskatý

Poděkování:

Na tomto místě bych chtěl poděkovat vedoucí práce Mgr. Pavle Žákové, Ph.D. za zadání zajímavého tématu diplomové práce a její odborné vedení a konzultantovi Mgr. Romanu Kand'árovi, Ph.D. za cenné připomínky a rady při práci v laboratoři. Zároveň chci poděkovat rodině za velikou podporu při studiu a jeho umožnění a nakonec přátelům za pevné nervy.

Obsah

Úvod.....	1
A. TEORETICKÁ ČÁST.....	2
1. Kyselina lipoová.....	2
2. Funkce kyseliny lipoové.....	4
2.1 Kyselina lipoová v bioenergetice.....	4
2.1.1 Kyselina lipoová jako kofaktor pyruvátdehydrogenázového komplexu.....	4
2.2 Antioxidační vlastnosti	7
2.2.1 Reaktivní formy kyslíku a dusíku a jejich funkce.....	7
2.2.2 Kyselina lipoová jako silný antioxidant.....	7
2.3 Kovový chelátor.....	9
2.4 Regulátor glukózové homeostázy.....	10
2.5 Další účinky kyseliny lipoové.....	11
3. Metabolismus kyseliny lipoové.....	14
4. Zdroje kyseliny lipoové a její doplňování.....	15
5. Koncentrace kyseliny lipoové v plasmě.....	16
6. Kyselina lipoová a onemocnění.....	16
6.1 Diabetes mellitus.....	16
6.1.1 Diabetes mellitus I. typu.....	17
6.1.2 Diabetes mellitus II. typu.....	18
6.1.3 Oxidační stres a diabetes.....	18
6.1.4 Inzulinová rezistence.....	20
6.1.5 Kyselina lipoová a její role v diabetu.....	21
6.2 Komplikace diabetu.....	23
6.2.1 Ateroskleróza.....	24
6.2.1.1 Rozvoj aterosklerózy.....	25

6.2.1.2 Význam LDL částic pro aterogenezi.....	26
6.2.1.3 Jednotlivá stadia aterogeneze.....	27
6.2.1.4 Role LA v aterogenezi.....	28
6.2.2 Diabetická polyneuropatie.....	29
6.2.2.1 Význam kyseliny lipoové.....	30
6.2.3 Katarakta.....	30
6.2.3.1 Význam kyseliny lipoové.....	31
7. Možnosti stanovení kyseliny lipoové.....	31
7.1 Plynová chromatografie.....	32
7.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie.....	33
7.3 Stanovení LA metodou HPLC s elektrochemickou detekcí.....	35
7.3.1 Příprava vzorku k analýze.....	35
7.3.1.1 Stabilita vzorků LA.....	36
7.3.2 HPLC separace.....	36
7.3.3 Elektrochemická detekce.....	36
7.3.4 Elektrochemický detektor Coulochem III.....	37
B. Experimentální část.....	39
8. Materiál a metodika.....	39
8.1 Odběr a uchování vzorku.....	39
8.2 Seznam chemikálií.....	39
8.3 Přístroje a pomůcky.....	40
8.4 Příprava použitých roztoků.....	41
8.5 HPLC/ED stanovení kyseliny lipoové.....	42
8.5.1 Příprava vzorků a standardů pro kalibraci.....	42
8.5.2 Příprava mobilní fáze.....	42
8.5.3 Chromatografická analýza.....	43
8.5.4 Kvalitativní analýza.....	44

8.5.5 Kvantitativní analýza.....	44
8.5.5.1 Kalibrace.....	44
8.5.5.2 Přesnost.....	44
8.5.5.3 Správnost.....	44
8.5.5.4 Detekční limit.....	45
C. VÝSLEDKY	46
9. Volba vhodných podmínek separace.....	46
9.1 Hydrodynamický voltamogram LA.....	46
9.2 Volba mobilní fáze.....	46
10. Kvalitativní analýza.....	47
11. Kvantitativní analýza.....	47
11.1 Kalibrace.....	47
11.2 Přesnost.....	48
11.3 Správnost.....	51
11.4 Detekční limit.....	49
D. DISKUSE.....	50
E. ZÁVĚR.....	55
F. LITERATURA.....	56
G. PŘÍLOHY.....	60

Souhrn

Kyselina lipoová je přírodně se vyskytující sloučenina, přítomna jako kofaktor v několika mitochondriálních enzymech, které jsou zahrnuty v metabolismu a energetické produkci. Jedná se o 8-uhlíkovou sloučeninu, obsahující dva atomy síry v dithiolanovém kruhu a skládající se ze dvou enantiomerů. Ve své volné formě je kyselina lipoová, především její redukovaná forma, kyselina dihydrolipoová, silným antioxidantem, fungujícím jako „odklizeč“ reaktivních forem kyslíku. Dnes je studována zejména pro tyto antioxidační vlastnosti. Pro její analýzu je dostupných mnoho metod. Většina z nich však nejsou vyhovující kvůli jejich nespecifitě, nedostatku citlivosti, dlouhotrvající přípravě vzorku a potřeby drahého analytického vybavení. Z tohoto důvodu jsme se pokusili vyvinout jednoduchou a účinnou metodu pro její stanovení v lidské plazmě použitím HPLC s elektrochemickou detekcí na principu coulometrie. Mobilní fáze byla složená ze směsi 20 mmol/l NaH_2PO_4 /acetonitril/metanol (70:25:5 v/v) a její průtok byl 1 ml/min. Potenciály analytické cely byly nastaveny na 450 mV a 750 mV. Analytické parametry metody jsou dostačující s detekčním limitem 1,5 nmol/l. Naše metoda může být použita pro stanovení jak endogenních koncentrací kyseliny lipoové, tak i pro suplementační studie.

klíčová slova: kyselina lipoová, kyselina dihydrolipoová, antioxidační vlastnosti, HPLC, elektrochemická detekce

Summary

Lipoic acid is a natural compound present as a cofactor in several mitochondrial enzymes that are involved in metabolism and energy production. It is an eight-carbon compound containing two sulphur atoms in a dithiolane ring structure and consists of two enantiomers. In its free form, lipoic acid, especially its reduced form, dihydrolipoic acid, is a powerful antioxidant, functioning as a reactive oxygen species scavenger. At present, the lipoic acid is studied primarily for its antioxidant properties. Many methods are currently available for the analysis of lipoic acid. Most of these methods are not satisfactory due to their non-specificity, lack of sensitivity, long-term sample preparation and need for expensive analytical equipment. This is the reason for our tendency to develop simple and effective method for its determination in human plasma by using HPLC with electrochemical detection on the principle of coulometry. The mobile phase consisted of a mixture 20 mmol/l NaH_2PO_4 /acetonitril/methanol (70:25:5 v/v) and the flow rate was 1 ml/min. Potentials of analytical cell were set to 450 mV and 750 mV. Analytical performance of this method is satisfactory with the detection limit 11.5 nmol/l. Our method can be applied for both the determination of lipoic acid in endogenous levels and for supplementation study.

keywords: lipoic acid, dihydrolipoic acid, antioxidant properties, HPLC, electrochemical detection

Seznam zkratek

ACN	acetonitril
AGE(s)	produkty pokročilé glykace
CoA	koenzym A
DHLA	kyselina dihydrolipoová
DTE	1,4-dithioerythritol
ED	elektrochemická detekce
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
FADH2	redukováný flavinadenindinukleotid
FD	fluorescenční detekce
GC	plynová chromatografie
GLUT-4	glukózový přenašeč
GSH	glutathion
HDL	lipoproteiny o vysoké hustotě
HIV	human imunodeficiency virus
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
ICAM-1	intracelulární adhezivní molekula-1
LA	kyselina lipoová
LDL	lipoproteiny o nízké hustotě
MDA	malondialdehyd
MS	hmotnostní spektrometrie
NADH	redukováný nikotinamidadenindinukleotid

NADPH	redukovaný nikotinamidadeninukleotidfosfát
NIDDM	na inzulínu nezávislý diabetes mellitus
NO[•]	oxid dusnatý
•OH	hydroxylový radikál
O₂^{•-}	superoxidový radikál
ox-LDL	oxidovaný lipoprotein o nízké hustotě
DM	diabetes mellitus
PDC	pyruvátdehydrogenázový komplex
RNOS	reaktivní formy oxidu dusíku
ROS	reaktivní formy kyslíku
SPE	extrakce na tuhé fázi
UV	UV spektrometrie
VCAM-1	vaskulární adhezivní molekula-1
WHO	světová zdravotnická organizace

Úvod

Kyselina lipoová je ve vodě a v tucích rozpustná, přírodně se vyskytující disulfidická sloučenina. Molekula se skládá z 8-uhlíkového řetězce mastné kyseliny se dvěma vzájemně propojenými atomy síry a obsahuje chirální centrum, díky čemuž rozlišujeme dva antipody, přírodní R- a S-antipod. Jedná se o látku tělu vlastní, která je ovšem syntetizována v nepatrných koncentracích, proto musí být přijímána z potravy.

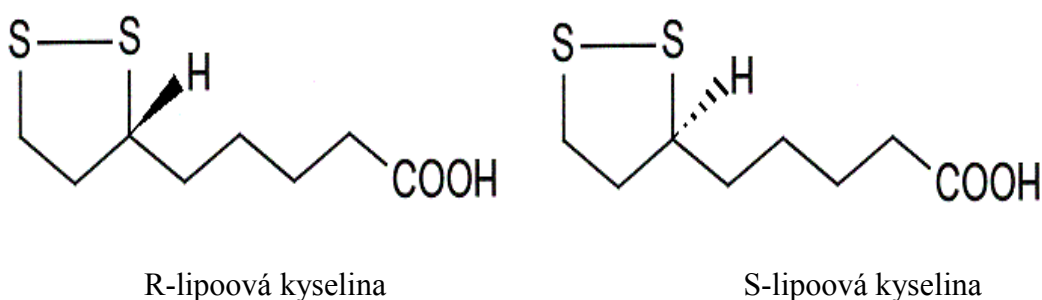
V současnosti je studována kvůli vlivu na metabolismus sacharidů, jelikož se podílí na snížení krevní glykémie, ale především pro její silné antioxidační vlastnosti, zejména její redukované formy, kyseliny dihydrolipoové. Řadou klinických studií se zjistilo, že kyselina lipoová má vztah k mnoha onemocněním, zejména k diabetes mellitus a jeho komplikacím, kde zabraňuje nebo alespoň oddaluje vznik jejich projevu.

Cílem této práce je shrnout dostupné poznatky o kyselině lipoové, zejména se zaměřením na diabetes mellitus a možné antiaterogenní účinky, a pokusit se vypracovat metodiku pro její stanovení v lidské plazmě pomocí HPLC s elektrochemickou detekcí.

A. TEORETICKÁ ČÁST

1. Kyselina lipoová

Kyselina lipoová (LA) byla poprvé izolována z hovězích jater v r. 1951 Reedem a kol. Jedná se o přírodně se vyskytující látku, přítomnou jako kofaktor v několika mitochondriálních enzymech, které jsou zapojeny v metabolismu a energetické produkci. Obsahuje 8-uhlíkatý řetězec a dva atomy síry v dithiolanovém kruhu [1]. V její molekule se vyskytuje chirální centrum na pozici 3 v 1,2-dithiolanové části [2]. Je tedy tvořena dvěma enantiomery, R- a S-formou, jak je vidět na obrázku 1. Pouze R-izomer je v těle syntetizován a vázán na proteiny.



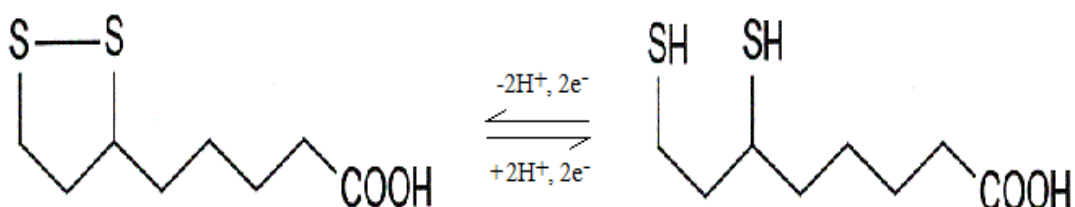
Obr. 1 Strukturní vzorce obou enantiomerů

Ve své volné formě je LA silným antioxidantem, fungujícím jako „odklizeč“ reaktivních forem kyslíku a dusíku, produkovaných jako vedlejší produkty mitochondriálního dýchání. V porovnání s ostatními endogenními thioley (glutathion, cystein) je LA snadno vstřebávána ze stravy, transportována, přijímána buňkami a redukována do silnější antioxidantní formy, dihydrolipoové kyseliny (DHLA). Vychytávání LA buňkami bylo studováno v promytých krysích játrech a izolovaných hepatocytech, přičemž se uplatňovaly dva odlišné transportní mechanismy: nosičem zprostředkovaný záchyt a pasivní difúze, která je významná při vyšších koncentracích [1].

Ve tkáních je lipoát, sůl kyseliny lipoové, koenzymem kovalentně vázaným k lysinovým zbytkům ve formě lipoamidu v dehydrogenasach α -keto kyselin (pyruvát dehydrogenázový komplex, α -ketoglutarát dehydrogenázový komplex a v dehydrogenase rozvětvených α -keto kyselin) a v glycin štěpicím

enzymatickém systému. Tyto enzymatické komplexy přednostně využívají R-stereoisomer. Ledviny, srdce a kosterní svalovina obsahuje nejvyšší koncentraci proteinově vázaného lipoátu. Protože je velká část právě vázána na bílkoviny, jsou koncentrace volného lipoátu in vivo velmi nízké. Nicméně po potravinovém doplnění se vyskytuje dočasné zvýšení nevázaného lipoátu uvnitř všech buněk těla, převážně srdce, mozku a jater [2].

Spolu se svou redukovanou formou tvoří LA účinný redoxní pár s redoxním potenciálem -0.32 V a vykazuje velmi silnou antioxidační aktivitu (obr. 2). Díky svým unikátním redoxním vlastnostem nejen že odstraňuje řadu druhů volných radikálů, jako jsou superoxidové, hydroxylové, peroxylové radikály, kyselina chlorná a singletový kyslík, ale dokáže recyklovat ostatní fyziologické antioxidanty, jako jsou askorbát, glutathion a vitamín E. Navíc LA chelatuje kovové ionty, což má za následek redukcí produkce volných radikálů. Běžné antioxidanty jsou buď ve vodě nebo v tucích rozpustné. Ve srovnání s nimi vykazuje LA jak hydrofilní tak hydrofobní vlastnosti. Může tedy vyvolat své antioxidační působení v cytosolu stejně dobře jako v plazmatických membránách (vodné a lipidové prostředí buňky) a také v séru a lipoproteinech (vodné a lipidové prostředí krve) [3].



Obr. 2 Schéma elektrochemické aktivity kyseliny lipoové

Ve skutečnosti nemusí být prospěšné účinky způsobeny LA, ale právě její redukovanou formou, DHLA, protože savčí buňky dokáží rychle enzymaticky redukovat exogenní LA na DHLA in vitro. Biologická aktivita exogenní LA pravděpodobně vyžaduje obě formy, redukovanou i oxidovanou [4].

Vzhledem k její roli v biologických procesech byla LA zpočátku zahrnuta v komplexu vitamínů B. Nicméně v současnosti není považována za vitamín, neboť se jedná o látku tělu vlastní. Je však syntetizována v tak malých

dávkách, které se dále s věkem nebo při některých onemocněních snižují, že musí být přijímána potravou [3].

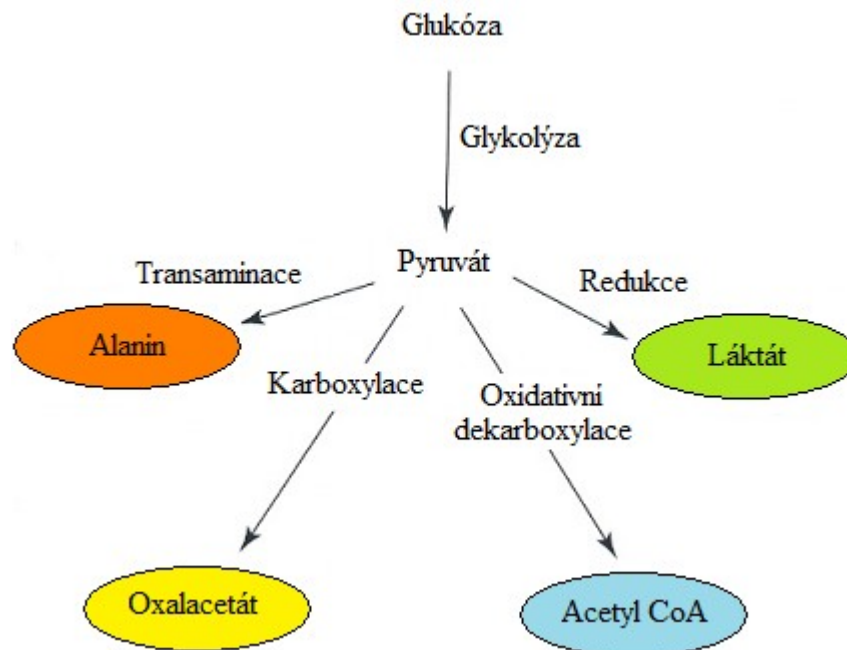
2. Funkce kyseliny lipoové

2.1 Kyselina lipoová v bioenergetice

Energetická produkce mitochondrií je primárně závislá na několika enzymatických dehydrogenázových komplexech, majících schopnost využívat různé substráty, které jsou dopraveny do mitochondrie pro NAD^+ a FAD redukcí na NADH a FADH_2 . Tyto molekuly jsou schopny darovat elektrony do elektronového transportního řetězového systému, zakotveného podél mitochondriální vnitřní membrány. Kyselina lipoová je právě těchto dehydrogenázových komplexů součástí. Je přítomna ve vázané lipoyllysinové formě jako přírodně se vyskytující kofaktor v pěti mitochondriálních proteinech, které hrají hlavní roli v oxidativním metabolismu, kde katalyzují oxidativní dekarboxylaci různých 2-oxokyselinových substrátů v glykolýze, citrátovém cyklu a v metabolismu rozvětvených aminokyselin. Sem patří acyltransferázová složka pyruvátového komplexu, α -ketoglutarátového komplexu a dehydrogenázového komplexu α -ketokyselin s rozvětvenými řetězci, protein X pyruvátového dehydrogenázového komplexu a H-protein systému glycinového štěpení. Začlenění do těchto proteinů je vždy v ϵ -amino skupině specifického lyzinového zbytku proteinu amidovou vazbou pomocí enzymů lipoyltransferas I a II [1].

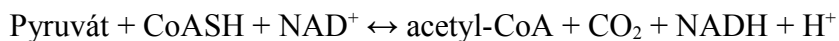
2.1.1 Kyselina lipoová jako kofaktor pyruvátdehydrogenázového komplexu

Během aerobní glykolýzy je glukóza nebo ostatní hexózy přeměněna na pyruvát, konečný produkt této cytosolické cesty. Pyruvát je také tvořen degradací aminokyselin, jako je alanin nebo serin a má několik osudů v závislosti na tkáni a jejím metabolickém stavu (obr. 3) [5].



Obr. 3 Metabolické osudy pyruvátu (upraveno dle [5])

Kyselina lipoová je kofaktorem pyruvát dehydrogenázového komplexu (PDC), který katalyzuje přeměnu pyruvátu na acetyl-koenzymA (CoA):

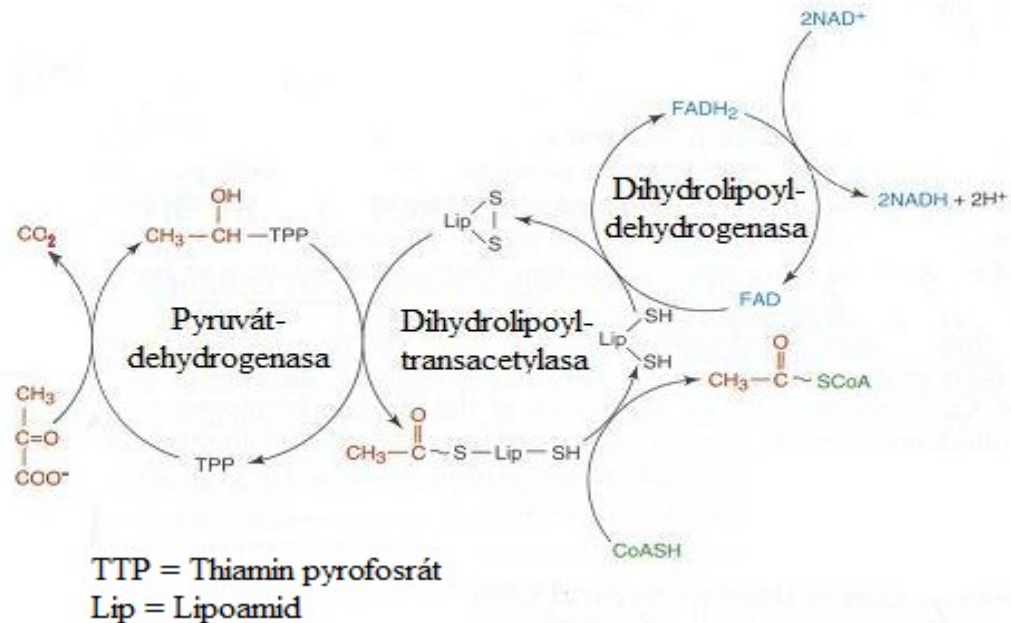


Mechanismus reakce je mnohem složitější než naznačuje souhrnná reakce. Jak je patrné z tabulky 1, savčí pyruvát dehydrogenázový komplex se skládá ze tří typů katalytických podjednotek.

Tabulka 1 Savčí pyruvát dehydrogenázový komplex (upraveno dle [5])

Enzym	Počet podjednotek	Prosthetická skupina	Katalyzovaná reakce
Pyruvát dehydrogenasa	20 nebo 30	TPP	Oxidativní dekarboxylace pyruvátu
Dihydrolipoyl transacetylasa	60	Lipoamid	Přenos acetylové skupiny na CoA
Dihydrolipoyl dehydrogenasa	6	FAD	Regenerace redukováného lipoamidu a přenos elektronů do NAD ⁺

Pyruvát dehydrogenasa (E1) je první katalytickou komponentou PDC. Katalyzuje následující dvě parciální reakce: na thiamin pyrofosfátu (TPP) závislou dekarboxylaci kyseliny pyrohroznové na 2-hydroxyethyliden-TPP (HETTP) a acetylaci zbytků kyseliny lipoové, kovalentně vázaných k druhé katalytické složce dihydrolipoamidové acetyltransferasy. Dihydrolipoyl



Obr. 4 Pyruvátdehydrogenasový komplex (upraveno dle [5])

acetyltransferasa, označována jako E2 enzym savčího PDC, obsahuje lipoyllysinový zbytek a její hlavní funkcí je přenos acetylové skupiny na CoA. Třetí část PDC je dihydrolipoamidová dehydrogenasa, označena jako E3. Patří k rodině homodimerních FAD-dependentních disulfidových oxidoreduktáz a její hlavní funkcí je reoxidovat DHLA v prosthetické skupině enzymu dihydrolipoyl acetyltransferasy zpět na lipoát využitím NAD^+ za produkce NADH. Tento enzym je u lidí kódován pouze jedním genem. Nedostatek E3 způsobuje redukci v aktivitách všech tří dehydrogenázových komplexech alfa-ketokyselin, zapojených stejně dobře v systému štěpení glycinu [1].

Pyruvát dehydrogenázový komplex je regulován dvěma způsoby a to zpětnovazebnou inhibicí produktů reakce, acetyl CoA a NADH, a pomocí fosforylace a defosforylace. Komplex je aktivní, je-li defosforylován a inaktivní, je-li fosforylován. Inaktivace je uskutečněna Mg^{2+} -ATP dependentní proteinkinasou, která je pevně spojena s komplexem. Aktivace je uskutečněna

fosfoproteinovou fosfatasou, která je také spojena s komplexem a je závislá na Mg^{2+} a Ca^{2+} [1, 5].

2.2 Antioxidační vlastnosti

2.2.1 Reaktivní formy kyslíku a dusíku a jejich funkce

Molekulární kyslík je nezbytný pro přežití všech aerobních organismů. Částečně redukované metabolity molekulárního kyslíku, jako je superoxidový aniont a hydrogen peroxid, normálně vznikají jako meziprodukty během metabolismu v mitochondriích a peroxysomech a také aktivitou různých enzymatických systémů, jako je například cytochrom P-450. Ačkoliv se jedná o slabá oxidační činidla, slouží jako meziprodukty v produkci reaktivnějších a toxičtějších metabolitů (např. kyselina chlorná, hydroxylový radikál). Tyto částečně redukované metabolity molekulárního kyslíku jsou označovány jako reaktivní formy kyslíku (ROS). Oxid dusnatý (NO^{\bullet}), je-li produkován ve vysokých koncentracích, také představuje zdroj vysoce toxických oxidantů, souhrnně nazývaných reaktivní formy oxidu dusíku (RNOS), zahrnující peroxyinitrit a nitroxyl, které jsou tvořeny reakcí NO^{\bullet} se superoxidovým anionem nebo molekulárním kyslíkem [6].

Hlavní uplatnění ROS a RNOS je především v imunitních obranných reakcích. Jsou totiž produkovány makrofágy a neutrofilny jako toxická činidla pro eliminaci fagocytovaných mikrobů a cizích molekul. Pravděpodobně také mohou fungovat jako signální molekuly. Nicméně jejich vysoké hladiny zapříčiňují poškození buněčných makromolekul, lipidů, proteinů a DNA. Proto je nadprodukce ROS a RNOS zahrnuta v patogenezi a progresi různých stavů, souvisejících s oxidačním stresem, jako je proces stárnutí, diabetes mellitus, ateroskleróza, rakovina, chronické zánětlivé onemocnění nebo neurodegenerativní choroby [6]. Jejich zvýšené hladiny musí být tedy účinně redukovány pomocí antioxidantů.

2.2.2 Kyselina lipoová jako silný antioxidant

Kyselina lipoová ve své volné formě a její redukovaná forma DHLA fungují jako silný redoxní pár. Antioxidační účinek DHLA a LA byl zkoumán

in vitro na základě jejich interakcí s peroxylovými radikály, které jsou nezbytné pro zahájení lipidové peroxidace, s chromanoxyllovými radikály vitamínu E a s askorbylovými radikály vitamínu C. Na základě těchto pozorování bylo zjištěno, že DHLA (ne LA) je účinným přímým odklížečem peroxylových radikálů, vytvořených ve vodné fázi ve vodě rozpustným azoiniciátorem 2,2'-azobis(2-amidinopropan)-dihydrochloridem a v liposomech nebo v mikrosomálních membránách v lipidech rozpustným azoiniciátorem 2,2'-azobis(2,4-dimethylvaleronitrilem). Dále, že ani DHLA ani LA nereagují přímo s chromanoxyllovými radikály vitamínu E, tvořenými v liposomech nebo v membránách buď UV zářením, peroxylovými radikály 2,2'-azobis(2,4-dimethylvaleronitrilu) nebo peroxylovými radikály linolenové kyseliny, tvořenými lipoxygenázou katalyzovanou oxidací, a nakonec, že DHLA (ne však LA) recykluje askorbylové radikály a redukuje dehydroaskorbát, tvořený v průběhu oxidace askorbátu chromanoxyllovými radikály. Tato interakce má za následek askorbátem zprostředkovanou DHLA-dependentní redukci chromanoxyllových radikálů vitamínu E, tedy recyklaci tohoto vitamínu [1, 7]. Regenerace antioxidantů je velice důležitá, neboť když antioxidant odstraní volný radikál, sám se zoxiduje a není schopen odstraňovat další ROS nebo RNOS, dokud není redukován. Z tohoto důvodu může DHLA zvyšovat antioxidační účinnost ostatních antioxidantů jak ve vodné fázi, tak stejně dobře v hydrofobní membráně. Spolu s vitamínem E, C a glutathionem vytváří antioxidační síť, která jim umožňuje recyklaci a regeneraci. Schopnost LA působit jako antioxidant a její schopnost chránit byla dokázána také in vivo použitím zvířecího modelu s navozeným nedostatkem vitamínu E. Suplementovaná LA byla ve tkáních redukována na DHLA, která chránila zvířata proti příznakům této deficience [1].

Jednou z důležitých vlastností LA jako antioxidantu v živých buňkách je, že její aktivace a redukce na silnější antioxidační formu je regulována metabolickými cestami buňky. Inkubace linie lidských T-buněk kyselinou lipoovou (0.5 mM) po dobu 24 hodin mělo za následek snížení buněčných NADH, NADPH hladin, NADH/NAD⁺, laktát/pyruvát a zvýšení příjmu glukózy. Pokles v poměru NADH/NAD⁺ následkem ošetření LA může mít přímé důsledky v ischemicko-reperfúzním onemocnění, diabetes mellitus a ostatních patologických stavech, kde jsou redukční (vysoký poměr NADH/NAD⁺)

a oxidační (nadbytek ROS) nerovnováhy považovány za hlavní faktor přispívající k metabolickým poruchám. Za podmínek redukčního stresu snižuje LA vysoké hladiny NADH v buňce jeho využitím jako kofaktoru pro vlastní redukční proces, zatímco v oxidačním stresu, α -lipoát a jeho redukovaná forma (DHLA) mohou chránit přímým odstraňováním volných radikálů a recyklací ostatních antioxidantů z jejich oxidovaných forem [1].

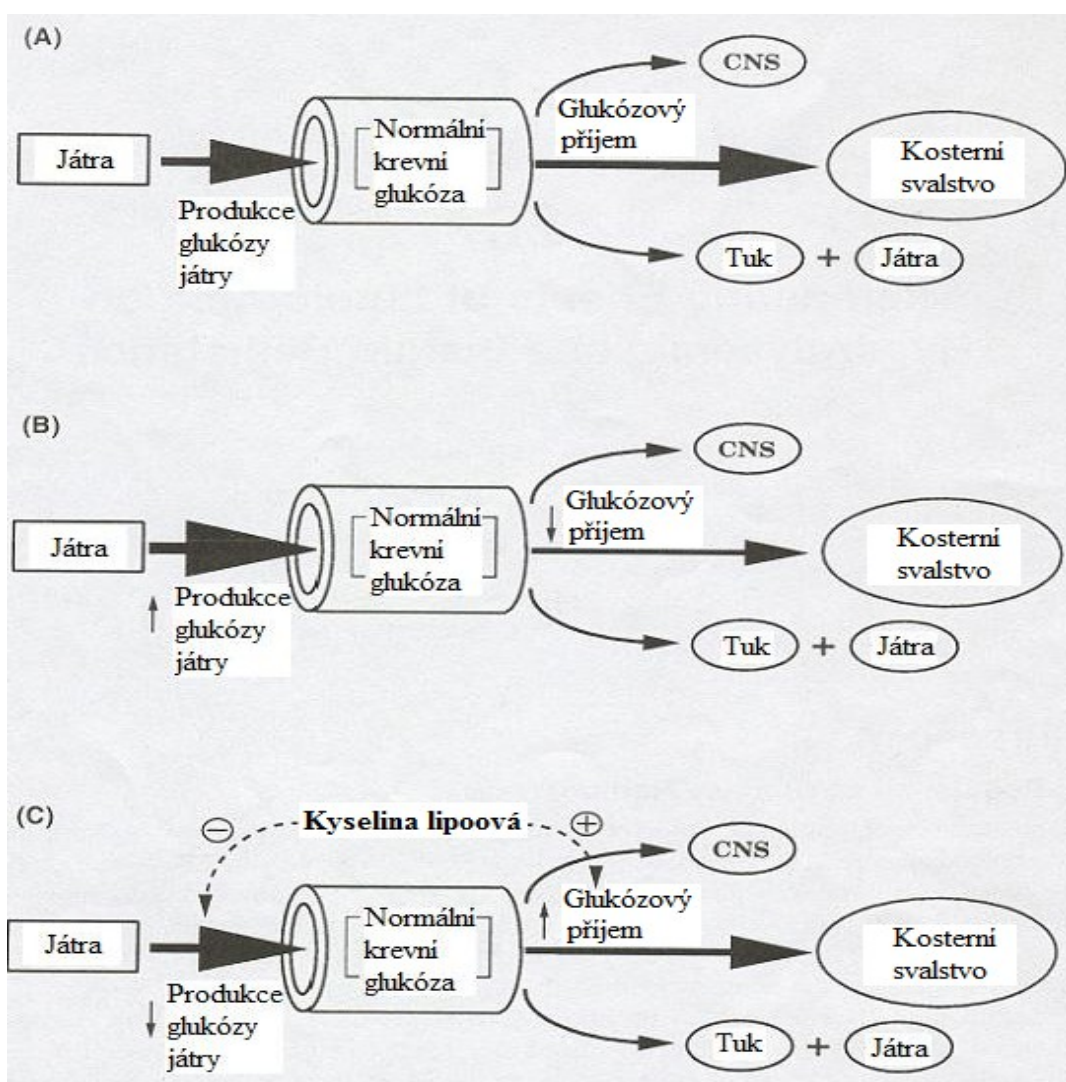
V živých buňkách se redukce LA na DHLA uskutečňuje enzymatickými procesy. Byly identifikovány enzymatické systémy k redukci LA na DHLA. Mitochondriální dihydrolipoamidová dehydrogenasa je schopná redukce LA na DHLA na úkor NADH. Tento enzym vykazuje specifitu k přírodnímu R-enantiomeru LA. NADPH-dependentní cytosolická glutathion reductasa také katalyzuje redukci LA, vykazuje ovšem specifitu pro S-enantiomer. Mechanismy redukce α -lipoátu jsou tedy vysoce tkáňově specifické a účinky zevně dodávaného α -lipoátu jsou určeny tkáňovou glutathion reductázovou a dihydrolipoamid dehydrogenázovou aktivitou [1, 6]. Bylo zjištěno, že také thiredoxin reductasa z telecího brzlíku a jater, lidské placenty a krysích jater efektivně redukuje LA i lipoamid [8].

2.3 Kovový chelátor

Naše tělo obsahuje přechodné kovy - železo a měď - které podněcují tvoření jednoho z nejvíce reaktivních ROS, hydroxylového radikálu (\cdot OH). In vivo vázání kovu na proteinem je nezbytné k tomu, aby chránilo kovem indukované oxidační poškození cirkulujících lipoproteinů, polynenasycených mastných kyselin, polypeptidů a nukleobasí. Malá množství volného kovu jsou fyziologicky přítomna v těle. Jakmile jsou však vyvázány z vazby na bílkoviny, jsou rychle oxidovány peroxidem vodíku reakcí, která generuje \cdot OH. Věří se, že železo je hlavním kovovým iontem, zodpovědným za tvorbu \cdot OH in vivo. Zvýšení redoxně aktivního železa ve tkáních tedy představuje významný rizikový faktor pro zvýšení oxidačního stresu a hraje hlavní roli ve stavech, jako jsou koronární srdeční choroba, neurodegenerativní choroby a stárnutí. Bylo dokázáno, že jak LA tak DHLA inhibují měď a železem zprostředkované oxidativní poškození in vitro a inhibují nadbytečné hromadění železa a mědi ve zvířecích modelech [2, 3].

2.4 Regulátor glukózové homeostázy

Udržování celotělové glukózové homeostázy vyžaduje souhru mezi odstraněním krevní glukózy na periférii, zejména v kosterních svalech, a dodáváním glukózy do krve, buď endogenně z jater nebo z vnějšku z potravinových zdrojů (obr. 5). Porucha v normální regulaci obou výše zmíněných procesů by vedla k chronickým zvýšením krevní glukózy a k vývoji diabetes mellitus. Kosterní svalstvo, které tvoří kolem 40% tělesné hmotnosti člověka je hlavní tkání, zodpovědnou za periferní odstranění glukózy v odpovědi na glukózovou či inzulínovou stimulaci nebo během cvičení. Glukózová transportní aktivita kosterního svalu je regulována inzulínem přes aktivaci série intracelulárních proteinů počínaje inzulínovým receptorem [9].



Obr. 5 (A) Regulace hladiny krevní glukózy u zdravých jedinců; (B) u inzulín-rezistentních diabetických jedinců; (C) u inzulín-rezistentních diabetických jedinců léčených kyselinou lipoovou (upraveno dle [9])

LA se uplatňuje především při vytvoření inzulínové rezistence, neboť podporuje účinky inzulínu a redukuje vysoké hladiny krevní glukózy zvýšením transportní aktivity kosterního svalu a také tím, že snižuje její produkci v játrech. Redukuje totiž glukoneogenezi v játrech z prekurzorů, jako jsou pyruvát, laktát, alanin či glycerol [9]. Stručně řečeno, LA zvyšuje záchyt glukózy buňkami kosterní svaloviny a snižuje její produkci v játrech. Podrobněji o této schopnosti LA je pojednáno v kapitole 5.1.

2.5 Další účinky kyseliny lipoové

- Regulátor procesu stárnutí

Díky svým silným schopnostem odstraňovat ROS, RNOS a schopnosti chelatovat kovové ionty je LA úzce spojena s procesem stárnutí buněk a orgánů. Stárnutí může být definováno jako vzrůstající akumulace strukturních a funkčních škodlivých změn, které obvykle začínají v dospělosti a vyvrcholí smrtí. Je značené postupným poklesem v schopnosti těla vypořádat se s poškozujícími účinky přírodních zátěžových faktorů a přidruženém vzestupu v náchylnosti k onemocnění a riziku smrti [2].

Existují přesvědčivé důkazy, že ROS jsou významným zdrojem stárnutí a patologických stavů s ním spojeným. Podstata volné radikálové teorie stárnutí byla poprvé popsána Harmanem již v roce 1956. Harman tvrdil, že plynulá tvorba ROS a značné pomnožení volných radikálů uvnitř buňky je jedním z hlavních faktorů zapojených v procesu stárnutí. Volné radikály mají nepárový elektron, který reaguje s hlavními organickými molekulami (lipidy, peptidy, nukleové kyseliny) a kovy (železo, měď). Při této reakci ROS upravují strukturu a funkci organických buněčných složek, ze kterých vytváří organické radikály a zvyšuje reaktivitu kovových iontů. Za hlavní intracelulární zdroj ROS byly označeny mitochondrie. Okolo 1% kyslíku spotřebovaného mitochondriemi je přeměněno zejména na $O_2^{\cdot-}$ v mitochondriální matrix. Většina $O_2^{\cdot-}$ radikálu je rychle přeměněna na peroxid vodíku a kyslík, buď spontánně nebo enzymaticky mitochondriální Mn-superoxid dismutasou. Přestože je H_2O_2 slabý oxidant, jeho poločas rozpadu je relativně dlouhý. Tudíž může pronikat z mitochondrie, difundovat po celé buňce, včetně jádra. Při reakci s redukovanými kovovými ionty je H_2O_2 přeměněn na vysoce reaktivní a škodlivý $\cdot OH$, který může poškodit

širokou skupinu biomolekul. Navíc, $O_2^{\cdot-}$ může redukovat volné kovové ionty na reaktivnější stav, produkovat peroxynitrit ($ONOO^-$) reakcí s oxidem dusnatým (NO) a také uvolňovat kovové ionty z vazby na proteiny, jako je ferritin. S věkem podíl kyslíku, částečně redukovaného na ROS v mitochondriích stoupá na 2-4%, což přispívá k zvýšenému poškození biomolekul. Stárnutí má tedy za následek proces stále rostoucích hladin ROS unikajících z mitochondrií, který vede k zvýšení buněčného poškození, následovaný stále se snižující účinnosti elektronového transportu, což může způsobit další redukci O_2 na ROS. Moderní pojetí této teorie mluví především o posunu v rovnováze mezi antioxidanty a prooxidanty s rostoucím věkem, vedoucí ke zvýšení oxidativního stresu. V pokročilejším věku jsou nízké hladiny cirkulujících antioxidantů spojeny s velkým počtem onemocnění a vyššími rizikovými faktory nemocí, jako jsou rakovina, kardiovaskulární onemocnění, katarakta a mozková dysfunkce, u kterých se čím dál více předpokládá, že mají oxidativní původ [2].

Představa, že LA může chránit proti oxidačnímu poškození, jdoucímu ruku v ruce s věkem, je založena na její vlastnostech regenerovat ve vodě a v tučných rozpustné endogenní antioxidanty (vitamin C, E a thiolové sloučeniny), odstraňovat ROS a předcházet lipidové peroxidaci. Navíc je LA chelátor kovových iontů, který může být účinný proti s věkem spojeným zvýšením obsahu železa a mědi v biologických systémech. Tyto vlastnosti dělají z LA potenciálně užitečnou sloučeninu nejen pro boj proti účinkům stárnutí, ale také proti některým s věkem přidruženým poruchám, jako je samovolná apoptóza, kardiovaskulární onemocnění či tvorba katarakty [2].

- Efekt na nukleární transkripční faktor NF- κ B

Redoxně citlivý transkripční faktor NF- κ B je pleiotropický regulátor mnoha genů, zapojený v imunitních a zánětlivých odpovědích, zahrnujících produkci např. adhezivních molekul, jako je intracelulární adhezivní molekula 1 (ICAM-1). Přídavek LA v klinicky významných dávkách (50-100 μ M) inhibuje tento faktor, čímž negativně reguluje expresi adhezivních molekul a adhezi leukocytů k endoteliálním buňkám. Ošetření LA v kombinaci s α -tokoferolem inhibuje UV zářením indukovanou aktivaci NF- κ B lépe než použitím obou antioxidantů zvlášť. Oxidačně upravené lidské lipoproteiny o nízké hustotě (low density lipoprotein - LDL) mohou také sloužit jako signál pro aktivaci zánětlivých

odpovědi v endoteliálních a ostatních buňkách aktivací jaderného transkripčního faktoru NF- κ B [1].

- LA a programovaná buněčná smrt

Somatické buňky vlastní potenciál pro sebedestrukci aktivací vnitřních cest, které se obvykle zapínají, nejsou-li buňky déle potřebné nebo se stanou vážně poškozené. Tato biologická kaskáda, která byla označena jako apoptóza, je často spojena s morfologickými a biochemickými změnami, jako je náhlé snížení buněčného objemu následkem ztráty vody a elektrolytů, kondenzace jádra a cytoplasmy umírající buňky a tvorba apoptotického tělíska. Dochází k aktivaci nukleáz, které způsobují degradaci chromozomální DNA. Apoptóza může být zahájena různými druhy endogenních a exogenních signálů, zahrnujících oxidanty, virovou infekci, buněčné interakce a hormony. V současné době jsou mitochondrie považovány za jednu z hlavních řídicích jednotek, která určuje, zda buňka prodělá apoptózu. U savců je buněčná smrt regulována proteiny Bcl-2 rodiny, antiapoptotickými Bcl-2 a Bcl-xL, lokalizovanými na vnější mitochondriální membráně, a proapoptotickými Bax a Bad, které se po aktivaci oxidativním stresem přemísťují z cytosolu do mitochondrií. To má za následek uvolnění cytochromu c do cytosolu a prudký pokles potenciálu vnitřní mitochondriální membrány ($\Delta\psi$). Kolaps $\Delta\psi$ zahrnuje otevření mitochondriálního póru, což značně ovlivňuje permeabilitu mitochondrií. Tento takzvaný mitochondriální permeabilitní přechod se zdá být charakteristickým znakem buněk, vstupujících do ireverzibilní apoptózy [1, 2].

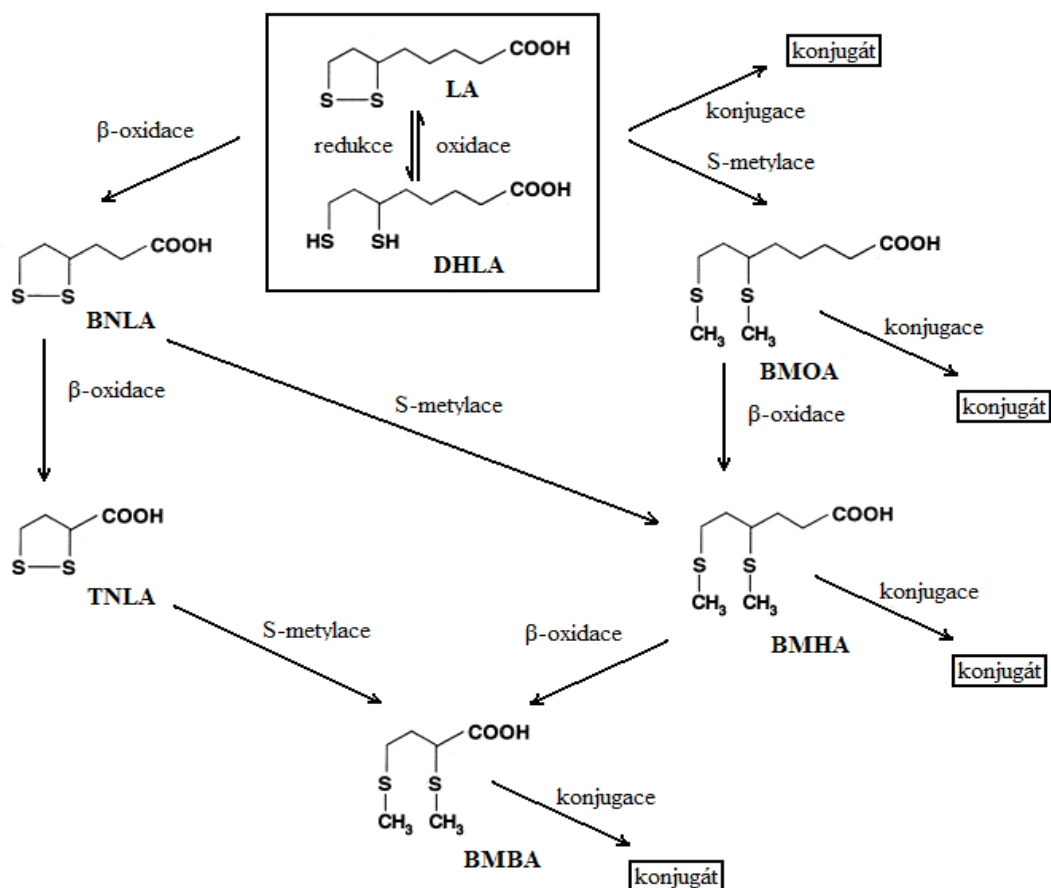
Díky schopnosti ovlivňovat programovanou buněčnou smrt má LA význam u AIDS, neboť smrt T-buněk je viděna jako proces apoptotické smrti. U pacientů s AIDS, chronický zánět a zvýšené hladiny cytokinů jsou spojeny s redukovánými hladinami glutathionu (GSH). GSH a N-acetylcystein inhibují proces reverzní transkriptázy HIV-1. Léčba antioxidanty, obzvláště thiolovými, tomu může zabránit nebo přinejmenším zpomalit, podobně jako apoptotickou smrt T-buněk. LA je tedy účinný inhibitor replikace lidského HIV-1 viru v buňkách imunitního systému. Antiapoptotický účinek LA lze demonstrovat na apoptotickém modelu krysích tymocytů. Předem ošetřené tymocyty nízkou, klinicky významnou koncentrací LA po dobu dvou hodin, po které byla apoptóza indukována zpracováním buněk s etoposidem (25 μ M). Lipoát o koncentraci

50-100 μM byl schopen ochrany proti typickým jaderným změnám, které se vyskytují v etoposidem ošetřených buňkách. Antiapoptotický efekt LA lze značně rozšířit chemickou modifikací LA [1].

Opačný účinek LA lze využít v nádorové terapii. Výzkum schopnosti zabíjení nádorových buněk prostřednictvím receptoru Fas kyselinou lipoovou ukázal, že léčba buněk 100 μM lipoátem po 72 hodin značně umocnila Fas receptorem zprostředkovanou apoptózu leukemických Jurkat buněk, ale nikoliv periferních krevních lymfocytů zdravých lidí. Tento výzkum dokázal, že běžně používané nutriční antioxidanty umocňují apoptotickou smrt leukemických buněk. Data z různých modelů apoptózy ukazují, že LA je unikátní sloučeninou, která v některých případech může umocnit apoptotickou buněčnou smrt, nicméně dokáže také ochránit buňky proti apoptotickým poškozením [1].

3. Metabolismus kyseliny lipoové

Kyselina lipoová je syntetizována v játrech z 8-uhlíkové mastné kyseliny (kyseliny oktanové) a cysteinu, představujícího zdroj síry. Její biotransformace se také odehrává v játrech. O metabolických cestách LA nemáme stále úplné informace, neboť až doposud jím byla věnována menší pozornost. Nedávno byla nově vytvořena HPLC metoda s elektrochemickou detekcí pro stanovení metabolitů LA. Díky ní bylo u člověka identifikováno 5 metabolitů a byla navržena předpokládaná metabolická cesta LA (obr. 6). Jak potvrdily studie, prováděné převážně na zvířatech a využívajících [^{14}C] LA, hlavními metabolickými cestami v biotransformaci LA je β -oxidace postranního uhlíkatého řetězce a S-methylace dithiolanového kruhu, kterému musí předcházet jeho redukce na dvě thiolové skupiny. Pro vylučování močí je nutná konjugační reakce, nicméně jak se zdá, vylučování močí nehraje významnou roli v eliminaci metabolitů LA, neboť pouze 12% podané dávky bylo objeveno v moči jako výchozí látka či její metabolity. Za předpokladu, že je téměř kompletně absorbována z lidského gastrointestinálního traktu, jak bylo dokázáno u zvířat, musí být zvažovány jiné eliminační cesty. Další výzkumy metabolismu LA u člověka by se měly zaměřit na vylučování žlučí [10, 11].



Obr. 6 Předpokládané metabolické cesty LA (upraveno dle [11])

BNLA - bisnorlipoová kyselina; TNLA - tetranorlipoová kyselina; BMOA – 6,8-bis(methylthio)oktanová kyselina; BMHA - 4,6-bis(methylthio)hexanová kyselina; BMBA – 2,4-bis(methylthio)butanová kyselina

4. Zdroje kyseliny lipoové a její doplňování

Kyselina lipoová je u lidí biosyntetizována především v játrech, ale také v jiných metabolicky aktivních tkáních, ale musí být také přijímána v potravě jak ze živočišných, tak i rostlinných zdrojů. Je snadno absorbována z potravy a převedena na DHLA redukováním NAHD nebo NADPH ve většině tkání. R-LA se přírodně vyskytuje v potravinách, kde je kovalentně vázána k ε-amino skupině lysinového zbytku, je tedy přítomna ve formě lipoamidu. Nejbohatšími rostlinnými zdroji R-LA je špenát, brokolice a rajčata, která obsahují $3,15 \pm 1,11$, $0,94 \pm 0,25$ a $0,56 \pm 0,23$ μg lipoyllysinu/g sušiny. Nejvyšší koncentrace lipoyllysinu v živočišných tkáních byla nalezena v játrech, ledvinách a srdci, obsahujících $2,64 \pm 1,23$, $1,51 \pm 0,75$ a $0,86 \pm 0,33$ μg lipoyllysinu/g sušiny [6]. Na rozdíl od potravin je LA v doplňcích stravy ve volné formě, není tedy

vázána na proteiny. Navíc množství LA dostupné z potravinových doplňků (200-600 mg) jsou asi více jak tisíckrát vyšší než množství, které může být získáno z potravy. Udává se, že příjem potravy redukuje biologickou dostupnost LA, proto je všeobecně doporučováno užívat LA nalačno (1 hodinu před nebo 2 hodiny po jídle). I když je R-LA přírodně se vyskytujícím izomerem, který je syntetizován živočichy a rostlinami, jako potravinový doplněk stravy se používá racemická směs LA. Důvodem je fakt, že v současné době stále není jasné, zda je u lidí efektivnější suplementace R-LA, než racemické LA [3].

5. Koncentrace kyseliny lipoové v plasmě

Referenční intervaly pro LA a DHLA v lidské plasmě stanovili Teichert a Preiss [12] na hodnoty 4 - 121 nmol/l pro LA a 158 - 696 nmo/l pro DHLA. Jiné zmínky o jejich hodnotách nebyly objeveny, měření jejich endogenních hladin je velice obtížné, protože jsou tak nízké, a nebyly nalezeny práce, které by se touto problematikou zabývaly. I ty nejnovější, zabývající se LA, se odkazují právě na jimi udané hodnoty. Člověk je schopen syntetizovat LA, aby pokryl její potřebu jako kofaktor pro enzymatické komplexy. Nicméně její syntéza se snižuje s věkem a při onemocněních jako např. diabetes mellitus a jeho komplikace. V takových případech musí být LA dodávána zvenčí [3].

6. Kyselina lipoová a onemocnění

Několik experimentálních a klinických studií prokázalo potenciál LA jako terapeutického antioxidantu v takových stavech, jako diabetes, ischemicko-reperfúzní onemocnění, otrava těžkými kovy, radiační poškození, neurodegenerativní onemocnění a HIV infekce.

6.1 Diabetes mellitus

Diabetes mellitus (DM) je heterogenní porucha vyvolaná nedostatkem inzulínu nebo rezistencí a změněným vzorcem vylučování inzulínu

s nejrůznějšími abnormalitami v metabolismu cukrů, bílkovin a tuků. Znamená chronickou hyperglykémii, která může být provázena příznaky zvýšené žízně a močení, ztráty váhy, rozmazaného vidění nebo stuporu vrcholícího v kómatu. Podle Světové zdravotnické organizace (WHO) zakládá diagnózu DM spontánní zvýšená hladina krevní glukózy o hodnotě 7,8 mmol/l a vyšší, hladina glukózy v krvi neodebírané nalačno na úrovni 11,1 mmol/l nebo vyšší či glukóza v moči provázená spontánními hodnotami krevní glukózy 7,8 mmol/l nebo vyššími. Hladiny glukózy v rozmezí mezi těmi, jaké se vyskytují u normálních a diabetických jedinců (7,8 - 11,1 mmol/l 2 hodiny po podání 75 g glukózy = orální glukózový toleranční test), naznačují porušenou glukózovou toleranci. Tento stav bývá označován jako „hraniční diabetes“, avšak tento termín je nevhodný, protože u mnoha lidí s touto poruchou se diabetes vůbec nevyvine. Rozlišujeme dvě hlavní formy DM, a to typ I a typ II. Dále můžeme rozlišit DM, který vzniká druhotně jako komplikace při jiných chorobách, nebo DM objevující se v období těhotenství [13, 14].

6.1.1 Diabetes mellitus I. typu

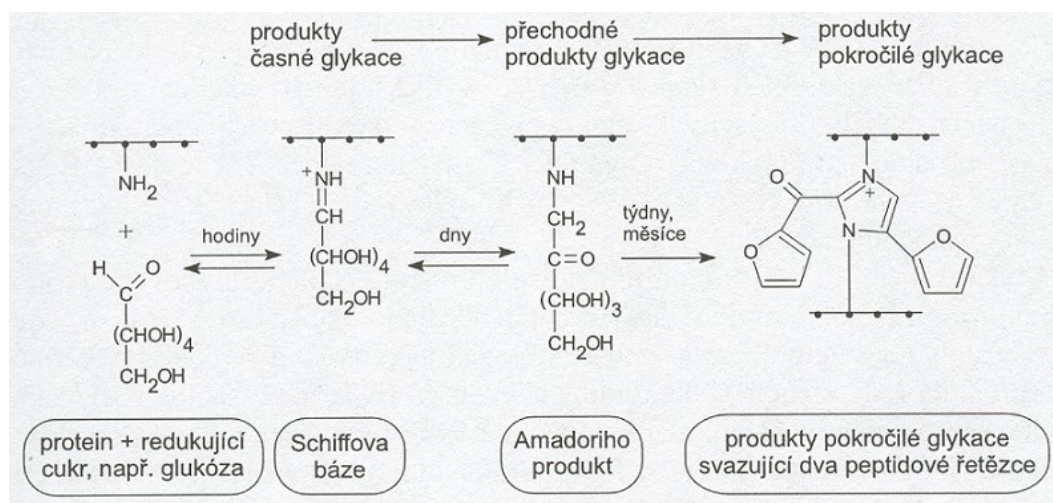
Reprezentuje přibližně 5-10% všech případů diabetu. Jedná se nejčastěji o autoimunitní poruchu, ve které jsou zničeny inzulín produkující buňky slinivky břišní, β -buňky Langerhansových ostrůvků. Činí postižené jedince zcela závislé na intravenózním příjmu inzulínu pro regulaci hladiny glukózy v krvi, proto se také označuje jako na inzulínu závislý DM (IDDM) [9]. U nemocných dochází k převaze Th1 podskupiny T-buněk zodpovědných za imunitní odpověď nad Th2 podskupinou. Cytokiny produkované Th1 buňkami (interleukin-2, interferon γ , tumor nekrotizující faktor α) aktivují makrofágy a cytotoxické T-buňky CD8+. Destrukce β -buněk probíhá dvěma způsoby, přímou interakcí s antigen specifickými cytotoxickými T-buňkami a reaktivními druhy kyslíku tvořenými makrofágy ($O_2^{\cdot-}$, H_2O_2) a NO^{\cdot} . Uvedené cytokiny mohou inhibovat uvolňování inzulínu i bez zničení buněk [15]. Primárním základem u DM I. typu je častý monitoring krevní glukózy a přiměřená inzulínová náhrada pro normalizaci regulace glukózy. V ideálním případě to může být splněno intenzivní inzulínovou terapií s častým stanovením koncentrace krevní glukózy a vhodnou inzulínovou léčbou [9].

6.1.2 Diabetes mellitus II. typu

DM II. typu, který reprezentuje přes 90% všech případů, je multifaktoriálním stavem, který je charakterizován redukovanou schopností inzulínu stimulovat glukózový transport do kosterních svalů. Tato inzulínová rezistence kosterního svalového glukózového transportu, na kterou β -buňky Langerhansových ostrůvků reagují zvýšenou sekrecí inzulínu, představuje hlavní poruchu v údržbě normálních hladin glukózy a je často doprovázena různými druhy metabolických odchylek, např. hyperinsulinemií a dyslipidemií [9]. U pacientů s hyperinzulinemií byl prokázán vztah mezi nadprodukcí tohoto hormonu a tvorbou ROS. Krieger-Brauerová a Kather již v roce 1990 dokázali v lidských tukových buňkách zvýšení tvorby H_2O_2 účinkem inzulínu. Nadbytek inzulínu tedy podporuje oxidační stres při DM. Oproti tomu ROS snižují aktivitu inzulínu, což přispívá k tvorbě inzulínové rezistence. DM II. typu, také označován jako na inzulínu nezávislý diabetes mellitus (NIDDM), je tedy nejběžnější ze všech metabolických poruch a je doprovázen řadou dlouhodobých komplikací. Ty zahrnují vysoký poměr kardiovaskulárních poruch a amputací kvůli intenzivní ateroskleróze, stejně jako typické komplikace diabetu, kterými jsou retinopatie, nefropatie a neuropatie [15].

6.1.3 Oxidační stres a diabetes

Hlavním příznakem diabetu a zároveň příčinou vzniku jeho komplikací, postihujících především cévní systém (ateroskleróza, retinopatie, nefropatie, neuropatie), je hyperglykémie. Glukóza se velmi snadno kovalentně váže na aminoskupiny proteinů. Reakce je nazvána glykace a produktem je tzv. Schiffova báze. Při hyperglykémii dosahuje tato reakce patologické úrovně. Schiffova báze se postupem času přestavuje na Amadoriho produkt a ten se přetváří na tzv. konečné produkty pokročilé glykace (AGE(s)- advanced glycation end products) neboli Millardovy sloučeniny (obr. 7). Celý proces se děje neenzymatickou cestou [15].



Obr. 7 Glykační reakce (upraveno dle [15])

Glukóza a AGE(s) se mohou oxidovat kyslíkem, podléhat tzv. autooxidaci, která zapříčiňuje vznik superoxidu a dalších ROS (H_2O_2 , $HO\cdot$). Glykace je tedy doprovázena glykoxidací a oxidačním stresem [15]. DM a jeho komplikace jsou tedy silně spojeny se zvýšeným oxidačním stresem. Ten může být odvozen buď od zvýšené tvorby ROS nebo snížením schopnosti jejich inaktivace. Tak či tak dochází k nerovnováze mezi produkcí volných radikálů a antioxidační ochranou. Z dalších biologických cest, majících za následek zvýšenou produkci ROS můžeme jmenovat polyolovou cestu, což je alternativní cesta metabolismu glukózy, nebo aktivace proteinkinasy C. Mnoho klinických studií prokazuje zvýšení hladin markerů oxidačního stresu, jak dokládá tabulka 2 [16].

Tabulka 2 Markery oxidačního stresu, které jsou zvýšeny u pacientů s DM (upraveno dle [16])

Doklad tvorby ROS v diabetu

- zvýšená vznik isoprostanů
- zvýšená tvorba lipidhydroperoxidů
- zvýšený oxidovaný a glykoxidovaný LDL
- vznik MDA
- změny v antioxidačních enzimech
- změny v redoxním systému (NADPH, glutathion, antioxidační vitamíny)
- zvýšené oxidační poruchy DNA

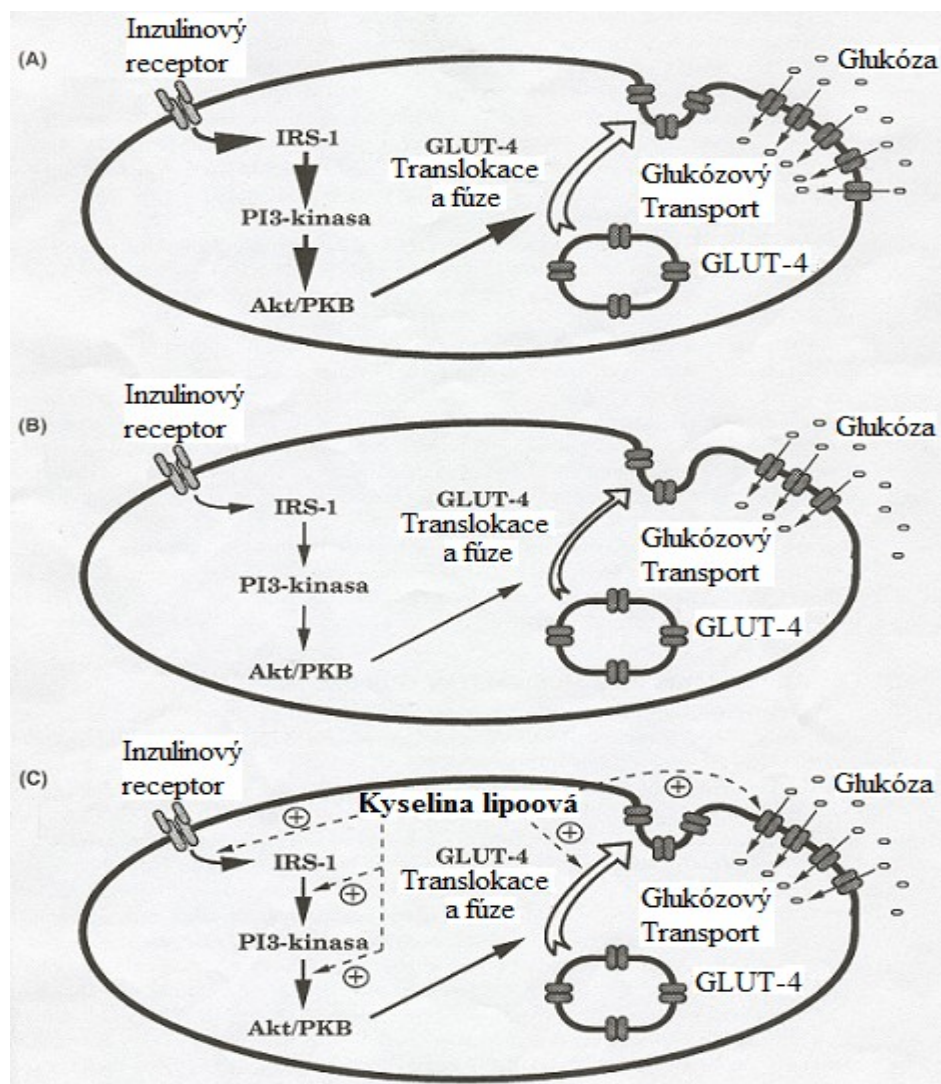
Zvýšené hladiny těchto markerů byly pozorovány v plazmě u obou typů diabetických pacientů. Velice specifickým markerem oxidačního stresu je tvorba isoprostanů, jako například 8-epi-isoprostaglandin F_{2a} , které jsou syntetizovány neenzymaticky z kyseliny arachidonové. Dalším významným markerem, především ve vztahu ke kardiovaskulárním komplikacím diabetu, je oxidovaný LDL. Glykací jejich proteinových částic se zvyšuje jejich náchylnost k oxidativním modifikacím. Glykovaný LDL je tedy mnohem snadněji oxidován. U diabetických pacientů jsou zvýšeny jak oxidovaný, tak i glykoxidovaný LDL [16]. Toto nové pojetí oxidačního stresu, jako důležitého spouštěče v počátku a vývoji diabetu, může nabízet unikátní terapeutickou možnost k léčbě onemocnění a jejich komplikací použitím látek s vysokou antioxidační kapacitou, jakou je právě kyselina lipoová.

6.1.4 Inzulínová rezistence

Normální glukózová homeostáza závisí na několika faktorech; schopnost tkání zachytit glukózu v odpovědi na insulin (insulinová citlivost); schopnost buněk zachycovat glukózu za absence insulinu (na inzulínu nezávislá glukózová absorpce, někdy označovaná jako glukózová citlivost); a schopnost pankreatických β -buněk kontrolovat tento proces rychlou a trvalou insulinovou sekrecí (tj. první a druhou fází inzulínové sekrece). Pacienti s NIDDM vykazují dva defekty a to snížení v odpovědi periferních tkání k inzulínu (tj. insulinová rezistence) a porucha β -buněk vyrovnat inzulínovou rezistenci vhodným zvýšením inzulínové sekrece [1]. Inzulínová rezistence se vytváří v důsledku defektu aktivačních kroků intracelulárních proteinů, které jsou nutné k translokaci glukózového přenašeče GLUT-4 do membrány a tedy jejímu zachytu tkáněmi (obr. 8). Aktivační kroky zahrnují autofosforylaci inzulínového receptoru a aktivaci tyrozinkinasy, fosforylaci tyrosinu inzulín receptorového substrátu-1 (IRS-1), aktivaci fosfatidylinositol-3-kinasy (PI3-kináza) a konečně aktivaci Akt/proteinkinasy B (Akt/PKB). Tyto kroky vedou k translokaci glukózového transportního proteinu, izoformy GLUT-4, do plazmatické membrány, kde se transport odehrává procesem usnadněné difúze. Translokační mechanismus pro zvýšení počtu přenašečů GLUT-4 se zdá být pro zajímavost také funkcí odpovědi na kontrakci a hypoxii svalu, tedy na inzulínu nezávislém mechanismu [9].

6.1.5 Kyselina lipoová a její role v diabetu

Jak již bylo uvedeno, vazba inzulínu na inzulínový receptor spouští autofosforylaci několika tyrosinových zbytků na inzulínovém receptoru. Takto vyvolaná aktivace receptoru stimuluje kaskádu proteinových fosforylací, majících za následek translokaci glukózových transportérů (GLUT4) do buněčné membrány a zvyšuje buněčný glukózový příjem.



Obr. 8 (A) Regulace glukózového transportu v kosterní svalovině inzulínem u zdravých jedinců; (B) u inzulín-resistentních diabetických jedinců; (C) u inzulín-resistentních diabetických jedinců léčených kyselinou lipoovou (upraveno dle [9])

Přímý stimulační efekt LA na transportní aktivitu byl ukázán v L_6 myocytech a v 3T3- L_1 adipocytech. Bylo zjištěno, že LA interaguje s aktivační kaskádou a pozitivně tedy působí na translokaci GLUT4 do buněčných membrán v kultivovaných tukových a svalových buňkách [9]. Zajišťuje tedy inzulínem

signalizující cesty, čímž zvyšuje glukózový příjem do svalových a tukových buněk. Jelikož kosterní svalová tkáň je v těle hlavním odvaděčem glukózy po jídle, činitelé, kteří zvyšují glukózový záchyt kosterními svaly, jsou potenciálně užiteční v dlouhodobé léčbě DM II. typu.

K ověření těchto vlastností byly použity i různé zvířecí modely diabetu. Základním zvířecím modelem DM I. typu je ten, ve kterém jsou inzulín sekretující buňky pankreatu zničeny a dochází ke stavům insulinopenie a hyperglykémie. Toho je nejčastěji dosaženo u běžných krys činidly, jako je streptozotocin nebo alloxan. Tento zvířecí model je charakterizován oxidačním stresem, o čemž svědčí značně redukováné tkáňové hladiny redukováného GSH. Krátkodobé intravenózní či dlouhodobé intraperitoneální ošetření LA významně snižuje jinak zvýšenou hladinu glukózy v krvi u těchto zvířat tím, že pozitivně ovlivňuje transportní aktivitu glukózy. Dále také způsobuje normalizaci v kyslíkovém příjmu myokardu, hladinách ATP a srdečního výkonu [9].

„Obézní Zucker krysa“ je zvířecí model těžké inzulínové rezistence kosterního svalu, který je také charakterizován výraznou hyperinsulinémií, glukózovou intolerancí, dyslipidémií, hypertenzí a centrální obezitou. Izolovaná kosterní svalová tkáň z těchto zvířat vykazovala podstatně zhoršenou translokaci proteinu GLUT-4 a glukózové transportní aktivity v důsledku závažných defektů v aktivaci proteinové kaskády. Přímé ošetření svalových preparátů těchto krys kyselinou lipoovou významně zvýší glukózovou transportní aktivitu [9].

Několik klinických studií ukázalo prospěšný účinek LA na celotělový glukózový metabolismus u pacientů s DM II. typu. Jacob a kol. poprvé v klinickém prostředí testovali a prokázali, že LA suplementace zvyšuje inzulínem zprostředkované odstranění glukózy v NIDDM po jejím parenterálním podání. Konrad a kol. vedl studii, která zahrnovala orální podávání LA hubených a obézních pacientů s DM II. typu. Léčba výrazně zvýšila inzulínovou citlivost u hubených osob a glukózovou účinnost a redukcí sérových hladin laktátu a pyruvátu u obou typů pacientů. Tyto studie poskytují slibné svědectví pro pokračující výzkum užitečnosti LA pro léčbu inzulínové rezistence, spojené s DM II. typu. Efekty LA, vyplývající z dosavadních studií, jsou shrnuty v tabulce 3. Ve srovnání s intravenózním podáním LA je zlepšení inzulínové citlivosti

po orálním podávání minimální (<20%), navzdory použití vyšších dávek a delší době léčby [3, 9].

Tabulka 3 Prospěšný metabolický účinek LA ve zvířecím a lidském diabetu (Upraveno dle [9])

Okolnost	Efekt léčby pomocí LA
Inzulinopenická krysa	Snižování zvýšených krevních hladin
	Zvýšený kosterní svalový GLUT-4 protein
	Zvýšený kosterní svalový glukózový transport
	Zvýšený srdeční svalový glukózový transport
	Zvýšená glukózová tolerance
	Redukovaný výtěžek tvorby glukózy játry
„Obézní Zucker krysa“	Zvýšený kosterní svalový glukózový transport
	Zvýšený srdeční svalový glukózový transport
	Zvýšená glukózová tolerance
	Snižování zvýšených plazmatických inzulínových hladin
	Snižování zvýšených plazmatických lipidových hladin
Lidský DM II. typu	Zvýšení odstranění glukózy kosterní svalovinou
	Snížení plazmatických hladin laktátu a pyruvátu

Dosavadní výsledky těchto studií jsou v souladu s představou, že LA interaguje s různými vadnými stupni v aktivaci inzulinem stimulované kaskády proteinů, která nakonec vede k zvýšené translokaci proteinu GLUT-4 a tedy ke zvýšené transportní aktivitě. Existuje i možná role LA v přímém zvyšování glukózového transportu, pravděpodobně díky schopnosti redukovat cirkulující volné mastné kyseliny a tím snížit inhibiční efekt těchto kyselin na glukózový transportní protein. Nicméně jsou stále potřebné další obsáhlé klinické studie pro získání přímého důkazu účinnosti LA u pacientů s DM I. a II. typu [9].

6.2 Komplikace diabetu

Diabetes je metabolickou poruchou, která může vést k četným vážným komplikacím. Hyperglykémie, jež je spojena se zvýšenou tvorbou ROS, kterou již nemohou antioxidační obranné mechanismy vyrovnat, je hlavním příznakem diabetu a zároveň hlavní příčinou vzniku diabetických komplikací, postihující

především cévní systém. Diabetičtí pacienti mají 2 – 4krát zvýšené riziko vzniku kardiovaskulárních onemocnění ve srovnání se zdravými jedinci [17]. Obecně je můžeme označit jako makroangiopatie (ateroskleróza) a mikroangiopatie (retinopatie, nefropatie, neuropatie). Glykace mění vlastnosti modifikovaných proteinů, některé se odbourávají rychleji než neglykované formy, jiné se takto stávají rezistentní k proteasam a patologicky přetrvávají ve tkáni. Například glykací apoproteinu B-100 v LDL se odstraní pozitivní náboj potřebný k jeho rozpoznání specifickými receptory a LDL částice jsou odbourávány alternativní cestou, pomocí scavengerových receptorů makrofágů [15]. K pozdním komplikacím DM také významně přispívá redoxně citlivý jaderný faktor NF- κ B. Jeho aktivace je závislá na AGE(s) produktech. Na povrchu lymfocytů, monocytů, makrofágů, endotelových buněk, buněk hladké svaloviny, fibroblastů a mezangiálních buněk se nacházejí receptory pro tyto produkty - RAGE. Přes tyto receptory je tedy ovlivňován jaderný faktor NF- κ B a tím tedy i exprese genů cílových buněk, řídících diferenciaci, proliferaci nebo syntézu adhezních molekul, přispívajících k aterogenezi [2, 15].

6.2.1 Ateroskleróza

Ateroskleróza je cévní onemocnění nejčastěji spojené s nemocností a úmrtností v západních společnostech. Jedná se o systémové onemocnění, postihující střední a velké cévy tepenného řečiště. Předstupněm v rozvoji aterosklerózy je endotelová dysfunkce. Existuje celá řada příčin pro vznik dysfunkce cévního endotelu, tedy i pro rozvoj aterosklerózy. Mezi ně patří zvýšená hladina celkového cholesterolu a LDL částic, snížení HDL částic, oxidační stres, hypertenze, hyperhomocysteinémie, kouření a také přítomnost infekčního agens jako jsou herpetické viry, cytomegalovirus, Hemophilus influenzae, Chlamydia pneumoniae nebo Helicobacter pylori [18]. Rizikové faktory shrnuje tabulka 4.

Přirozenou reakcí na poškození endotelu je migrace buněk imunitního systému do místa poruchy, která je následována poměrně složitým dějem, vrcholícím různě velkým uzávěrem cévy. Dochází k nedostatečnému zásobení daného orgánu kyslíkem a glukózou, což vede k jeho postupnému odumírání. Je-li daným orgánem srdce, dochází k infarktu myokardu. Jedná-li se o mozek, pak dojde k mozkové mrtvici.

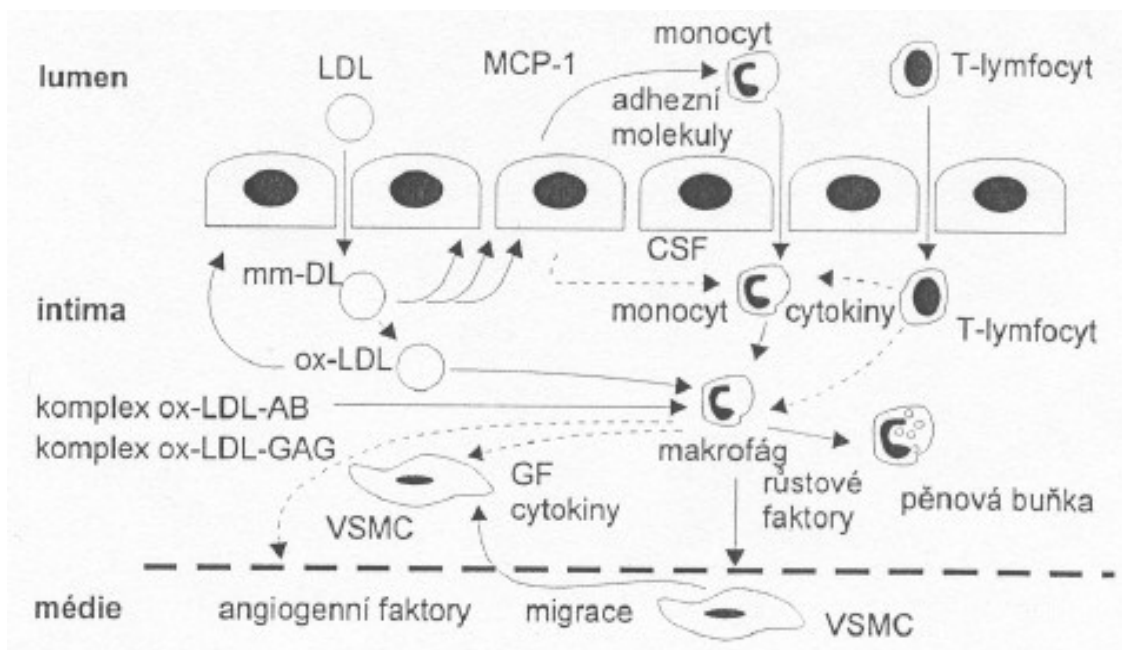
Tabulka 4 Rizikové faktory vzniku aterosklerózy [19]

Rizikové faktory	
<i>Tradiční</i>	<i>Nové</i>
Celkový cholesterol a LDL chol.	„malé denzní“ LDL částice
Kouření	Homocystein
Hypertenze	Lipoprotein (a)
Diabetes mellitus	Oxidační stres
Fyzická inaktivita	Hemostatické markery
Obezita	Infekční agens
Dědičné predispozice	C-reaktivní protein

6.2.1.1 Rozvoj aterosklerózy

Na patogenezi aterosklerózy se podílí komplex po sobě jdoucích událostí, zahrnujících rozvoj chronického zánětlivého procesu stěny arterií jako odpověď na hemodynamické poškození cévní stěny v nejvíce namáhaných místech, jejíž příčina nebyla odstraněna a proces nebyl neutralizován. To způsobuje nejprve dysfunkci cévního endotelu s tvorbou cytokinů, adhezních molekul, růstových faktorů. Dysfunkce endotelu vede ke kompenzační odpovědi, která mění normální homeostatické vlastnosti cévního endotelu. Tato porucha se projevuje posunem rovnováhy vazoaktivních mechanismů ve prospěch vazokonstrikce a vychýlením rovnováhy ve prospěch vzniku trombů. Dále se zvyšuje adhezivita endotelových buněk vzhledem k leukocytům nebo krevním destičkám, roste permeabilita cévní stěny pro lipoproteinové částice, endotelie získávají prokoagulační vlastnosti namísto antikoagulačních, zvyšuje se produkce cytokinů, chemokinů a růstových faktorů a snižuje se tvorba NO[•]. Díky tomu dochází k oslabení antiproliferativního účinku a ztlouštění intimy-médie [18].

V časném stádiu formování aterosklerotické léze hrají nejdůležitější roli dva patologické děje: zachycení a průnik leukocytů do cévní stěny a průnik s následnou mírnou oxidační modifikací LDL, která je signálem pro další aktivaci endotelových buněk. Aktivované endotelie syntetizují adhezní molekuly, selektiny typu P, E, L a integriny ICAM-1, VCAM-1. Svou roli hrají také cytokiny, jako je MCP-1 (monocyte chemotacting protein-1) a Interleukin-8, které vykazují chemotaktickou aktivitu pro přitáhnutí dalších leukocytů do míst aktivovaného endotelu [15].



Obr. 9 Oxidační stres a rozvoj časných stádií aterosklerotického plaku [15]

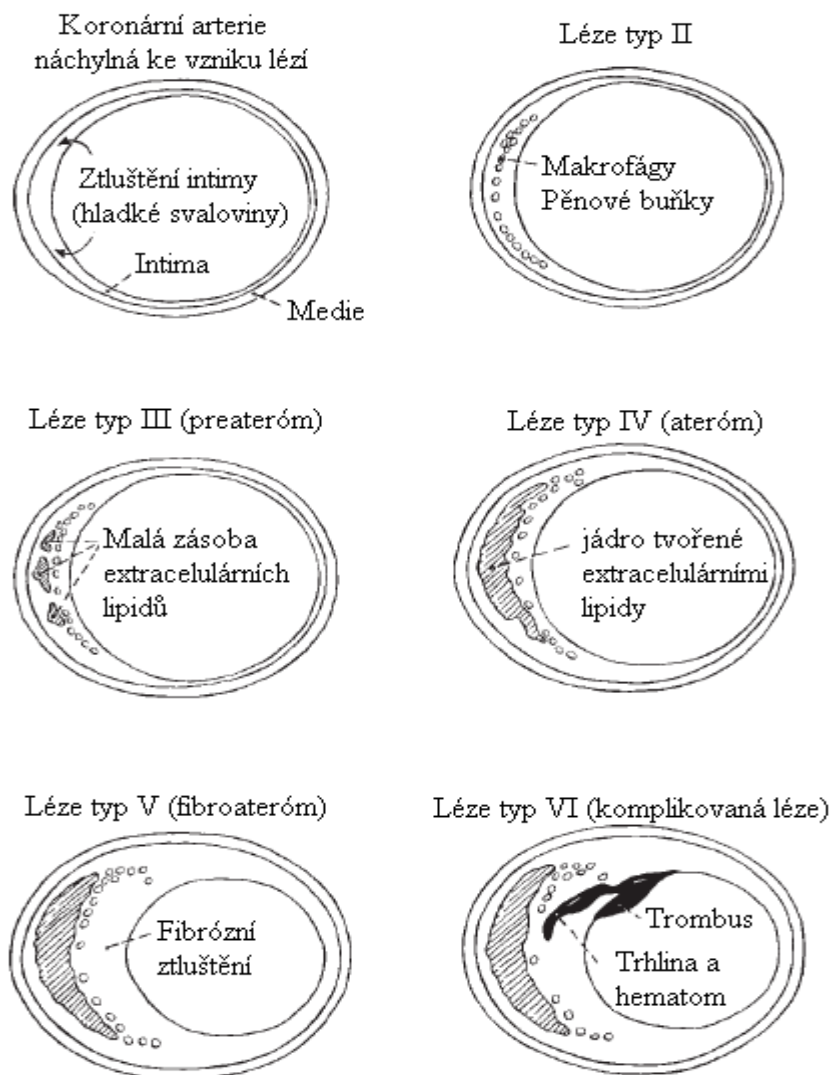
AB - protilátky, CSF - faktor stimulující kolonie, VSMC -buňky cévní hladké svaloviny, MCP-1 -monocyte chemotacting protein-1

6.2.1.2 Význam LDL částic pro aterogenezi

Významným faktorem pro aterogenezi je průnik lipoproteinů, hlavně LDL, do stěny cév a jejich modifikace. Na těchto pochodech se podílejí veškeré buněčné komponenty (endotelie, buňky hladké svaloviny, monocyty, makrofágy) a neenzymatické reakce. Míra průniku LDL je funkcí jejich plazmatických koncentrací a nevyžaduje vazbu na transportní systém či specifické receptory. Po průchodu stěnou vznikají z nativních a modifikovaných LDL působením ROS a RNOS (lipoperoxidace, glykoxidace) oxidované LDL (ox-LDL) [15]. Předpokládá se, že vitamín E, který je transportován LDL částicemi, hraje důležitou roli v ochraně proti jejich oxidaci [7]. Působením ox-LDL dochází v makrofázích k produkci různých cytokinů a růstových faktorů, ale především scavenger receptorů (SR-B1 a CD36). Jejich prostřednictvím dochází v intimě k vychytávání ox-LDL makrofágy, které se postupně přeměňují na pěnové buňky. Ty již nejsou schopny vycestovat do krevního řečiště. Toxické ox-LDL indukují v pěnových buňkách apoptotický proces a uvolněné lipidy jsou substrátem pro další fagocytózu nebo zůstávají jako extracelulární lipidy v bazální části ateromu [15, 18, 20].

6.2.1.3 Jednotlivá stádia aterogeneze

Ateroskleróza se histologicky manifestuje ve formě arteriálních lézí, označovaných jako plaky. Rozlišujeme šest hlavních typů lézí, které zobrazují časné, rozvíjející a zralé fáze tohoto onemocnění (obr. 10). Léze I. typu se vyznačuje ztloušťnutím intimy. To je kompenzováno dilatací a lumen cévy zůstává tedy nezměněno. Nahromaděním pěnových buněk, obsahujících intracelulárně akumulované lipidy, se přeměňuje v II. typ léze, známý také jako tukový proužek. Pokračující hromadění pěnových buněk a jejich nekróza může dát příčinu vzniku léze III. typu, tzv. preaterómu, který již obsahuje malé zásoby extracelulárních lipidů. Tyto tři typy lézí patří mezi časné fáze. Mezi rozvíjející se fáze patří následující dva typy lézí, charakterizované výraznými oblastmi nekrotických hmot a extracelulárních lipidů, tvořících lipidové jádro. Léze typ V (fibroateróm) je charakterizována fibrózní ztloušťnutím stěny cévy a Léze typ VI (komplikovaná léze) je charakterizována tvorbou trombu a hematomu v lumen cévy.



obr. 10 Jednotlivá stádia aterosklerózy (Upraveno dle [19])

Léze typu IV. (ateróm) je charakterizována tenkou přepážkou mezi lipidovým jádrem a arteriálním lumen, zatímco V. typ (fibroateróm) vykazuje fibrózní ztloustnutí této přepážky, tvořící tzv. čepičku léze. V tomto stádiu již céva nedokáže kompenzovat zúžení lumen dilatací, dochází tedy ke snížení průtoku krve. Zralou fází představuje léze VI. typu (komplikovaná léze), která vykazuje strukturu, jež je charakterizovaná exulceracemi, krvácením do plátu, kalcifikacemi nekrotických hmot a přítomností trombózy. Dřívější představa aterosklerózy zahrnovala postupné zužování lumen arterie až do té doby, kdy dojde k takovému omezení toku krve, že dojde k ischemii orgánu. Bylo však prokázáno, že dochází k náhlé změně v morfologii léze. Fyzikálními silami toku krve dochází k ruptuře nestabilního plaku, ke krvácení do plaku a vzniku trombózy, uzávěru cévy a ischemii daného orgánu. Tyto projevy se nejčastěji vyskytují v koronárních tepnách, tepnách mozku nebo tepnách dolních končetin [18, 19].

6.2.1.4 Role LA v aterogenezi

Heinecke a kol. prokázali, že oxidativní modifikace lipidových částí v LDL v kultivovaných buňkách vyžaduje redoxně aktivní kovové ionty, jako je železo a měď. Kovové chelátory a v lipidech rozpustné antioxidanty mohou tedy blokovat oxidativní poškození lipoproteinů. Kyselina lipoová vykazuje právě takové vlastnosti, proto může působit proti oxidativním stresem vyvolané aterogenezi. Dále může působit proti vzniku endotelové dysfunkce přímou inhibicí nukleárního faktoru NF- κ B. Po přemístění do jádra NF- κ B stimuluje transkripci genů spojených s imunitní a zánětlivou odpovědí. Endotelové buňky, buňky imunitního systému a epiteliální buňky pro svou funkci regulovat odpovědi na patogenní podmínky produkcí různých látek, jako jsou například adhezivní molekuly, potřebují právě tento faktor. Zabráněním produkce adhezivních a chemotaktických molekul inhibicí aktivační cesty NF- κ B pomocí LA má význam v počátečních fázích aterogeneze, neboť počátečním krokem ve formování aterosklerotické léze je adheze cirkulujících monocytů k endotelu a jejich migrace do arteriální intimy. LA může inaktivovat NF- κ B i nepřímo regenerací vitamínu E. α -Tokoferol totiž inhibuje proteinkinasu C, známou tím, že přispívá k aktivaci NF- κ B. Tak LA může celkově snížit adhezi monocytů a jejich odvod do cévní stěny a inhibuje průběh aterogeneze [2].

6.2.2 Diabetická polyneuropatie

Toto onemocnění patří mezi nejčastější komplikace provázející diabetes. U každého diabetika se v průběhu vývoje diabetu vyvine určitá forma neuropatie. Jedná se o velice závažné onemocnění, spojené se značným rizikem mortality. Klinickými projevy jsou převážně bolestivá periferní neuropatie spolu s autonomní neuropatií, kterou provází především kardiovaskulární, gastrointestinální a urogenitální poruchy. Z hlediska ohrožení života diabetika je nejvíce nebezpečná kardiální neuropatie. Tabulka 5 shrnuje symptomy periferní a kardiální neuropatie [21].

Tabulka 5 Symptomy jednotlivých neuropatií [21]

neuropatie	symptomy
periferní	výpadky citlivosti, snížení vnímání bolesti, parestezie, spontánní bolesti, snížení vibrační citlivosti, hyperpatie, svalová slabost, paresy
autonomní	klidová tachykardie, pokles variability srdeční frekvence, "němá"ischémie myokardu/bezbolestný infarkt, ortostatická dysregulace, prodloužení QT intervalu

Patogeneze této komplikace nebyla dosud kompletně objasněna, jisté však je, že základním předpokladem pro její vznik je zvýšená koncentrace glukózy, související s oxidačním stresem. Dochází k inhibici Na^+/K^+ -ATPazy snížením intracelulárního myoinositolu, ke zvýšení aktivity polyolové cesty s hromaděním sorbitolu a fruktózy v nervových vláknech, k deficitu NADPH, který je kofaktorem NO-syntasy a GSH-syntasy, což vede k poklesu schopnosti odstraňovat volné radikály a tvořit NO^{\cdot} . Pro vznik volných radikálů je důležitá také glykace proteinů s tvorbou AGE(s). Výsledkem jsou metabolické a cévní změny, projevující se poruchou ve vedení vzruchu nervem [21].

Neuropatická postižení společně s hyperglykemií, makro- a mikroangiopatiemi jsou příčinami vzniku diabetické nohy, závažného postižení dolních končetin diabetiků, vrcholícího často v jejich amputaci.

6.2.2.1 Význam kyseliny lipoové

V experimentálním zvířecím modelu diabetu zlepšovala léčba LA nervový krevní průtok a nervovou vodivost. Tyto pozitivní výsledky inspirovaly k mnohým klinickým experimentům, zkoumajících účinnost LA na zlepšení diabetických polyneuropatií. LA byla poprvé terapeuticky použita v Německu k léčbě diabetické polyneuropatie, navzdory nedostatku informací v té době, týkajících se příčin vzniku tohoto onemocnění. Věřilo se, že LA zvyšuje glukózovou utilizaci v periferních nervech. Bylo vypracováno několik kontrolních klinických studií, hodnotících účinnost léčby LA v diabetem indukovaných neuropatických stavech. Můžeme jmenovat například ALADIN (Alpha Lipoic Acid in Diabetic Neuropathy) nebo SYDNEY (Symptomatic Diabetic Neuropathy). Navzdory některým nesrovnalostem prokázaly, že LA, hlavně v relativně vysokých dávkách, významně zlepšuje jak periferní tak i autonomní neuropatie, spojené s DM [3].

6.2.3 Katarakta

Katarakta neboli šedý zákal je onemocnění, charakterizované zvyšující se neprůhledností a rozptylem světla očních čoček, které překáží vidění. Jedná se opět o poruchu asociovanou s oxidačním stresem. Podle WHO je senilní katarakta hlavní příčinou slepoty na světě. Existuje mnoho faktorů, které ji mohou způsobit, fyzikální (radiace), chemické (jedy, oxidanty) a fyziologické (metabolické poruchy vyplývající z diabetes mellitus nebo stárnutí) [2].

Přes 95% sušiny oční čočky se skládá ze specializovaných proteinů zvaných krystaliny. Neprůhlednost čočky je způsobena seskupováním a precipitací těchto proteinů, zatímco rozptyl světla vnějším povrchem čočky zahrnuje tvorbu intracelulárních vakuol, naplněných tekutinou jiného indexu lomu. Existuje celá řada experimentálních důkazů, že volné radikály jsou zapojeny ve vývoji kataraktogeneze, ať už jde o významné zvýšení množství H_2O_2 v očním moku, až čtyřnásobné zvýšení MDA (rozkladného produktu lipidových peroxidů) nebo snížení antioxidačních účinků v čočkách postižených kataraktou. Volné radikály, zdá se, nepoškozují pouze krystaliny, které se seskupují, precipitují a tvoří neprůhlednost čočky, ale také enzymovou aktivitu proteas, které eliminují poškozené proteiny. Krystaliny, které prodělají slabé oxidační poškození, jsou rychle degradovány systémem proteas čoček.

Avšak jejich rozsáhlá oxidace a zesítnění vážně snižují citlivost krystalinů k těmto proteasám [1].

6.2.3.1 Význam kyseliny lipoové

Protože je DHLA silným antioxidantem schopným regenerovat ostatní látky s antioxidačními účinky normálně obsaženými v oku, byla LA studována jako potenciální faktor prevence katarakty. Tyto užitečné efekty k ochraně a léčbě katarakty byly prokázány v několika studiích. Například formování neprůhlednosti u normálních krysích čoček, inkubovaných s 55.6 mM glukózou, což představuje model pro ex vivo diabetickou kataraktogenezi, bylo potlačeno přidáním 1 mM R-LA. Katarakta může být také indukována u novorozenečích krys inhibicí syntézy glutationu pomocí buthionin sulfoximinu (BSO). Ošetřením BSO indukované katarakty pomocí LA vedlo k výraznému snížení dopadu katarakty a k obnovení obsahu askorbátu a α -tokoferolu stejně jako k obnovení aktivity antioxidačního enzymového systému. Ve všech těchto studiích bylo prokázáno, že nejvyšší účinnost vykazovala R-forma. S-forma dokonce potenciovala poškození čočky a nedokázala ani udržet hladinu glutathionu v čočce. To pravděpodobně souvisí s tím, že R-LA se přednostně redukuje na DHLA mitochondriální lipoamidovou dehydrogenasou v buňkách čoček. R-forma je také začleněna do savčího pyruvát dehydrogenázového komplexu nebo dehydrogenázového komplexu α -ketokyselin. Tak by mohla léčba R-LA podporovat mitochondriální syntézu ATP, která je nutná pro syntézu GSH. Proto prevence katarakty kyselinou lipoovou nemusí být založeno jen na její antioxidační schopnosti, ale také na roli jako koenzymu v produkci ATP [1, 2].

7. Možnosti stanovení kyseliny lipoové

Schopnost měřit oxidovanou a redukovanou formu LA významně napomůže k pochopení jejich biologických aktivit, proto je vyžadovaná spolehlivá metoda kvantitativní analýzy LA a DHLA, která může být snadno aplikována ve všech standardních laboratořích. Tato analýza je velice důležitá ve studiích, zahrnujících biochemické, nutriční a farmakokineticko-dynamické výzkumy, týkajících se role LA v homeostáze redoxního stavu stejně jako pochopení jejich

užitečných vlastností v onemocněních, u kterých suplementace tímto antioxidantem představuje možnost jejich léčby.

Na druhé straně je LA již užívána jako léčivo pro léčbu různých onemocnění, jako je D, otrava houbami či těžkými kovy, alkoholické poškození jater, glaukom, nemoc z ozáření nebo neurodegenerativní onemocnění. Přírodně se vyskytující R-enantiomer vykazuje rozdílné biologické účinky na rozdíl od S-formy, proto je metoda pro enantiomerní separaci a stereochemickou analýzu také potřeba ke studiu farmakokinetiky a enantioselektivního metabolismu LA.

Stanovení LA může být provedeno mikrobiologickou analýzou, kolorimetrickou analýzou, plynovou či kapalinovou chromatografií, kapilární elektroforézou, enzymovou imunoanalýzou či „enzym cycling“ analýzou. Vzhledem k zadání této diplomové práce a také k tomu, že nejběžněji používanými a nejoblíbenějšími metodami stanovení jsou ty chromatografické, bude se zde dále zabýváno pouze jimi [22].

7.1 Plynová chromatografie

Plynová chromatografie (GC) je široce používána pro analýzy těkavých sloučenin díky svým podstatným výhodám, jednoduchosti, vysoké rozlišovací schopnosti, vysoké citlivosti a nízké ceně. Stanovení LA a příbuzných sloučenin v nízkých koncentracích tedy vyžaduje úpravu vzorku vhodným derivatizačním činidlem pro převedení na těkavé deriváty. Metody plynové chromatografie s plamenovou ionizační detekcí a plamenovou fotometrickou detekcí jsou běžně používány pro stanovení proteinově vázané formy LA po kyselé nebo zásadité hydrolýze vzorku, dokáže však detekovat pouze LA, nikoliv DHLA. Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí představuje velice výkonnou techniku, její největší nevýhodou jsou však vysoké pořizovací náklady [22].

7.2 Vysokoučinná kapalinová chromatografie

HPLC je jednou z nejpoužívanějších analytických technik, která může být použita v kombinaci s různými detekčními systémy, jako je ultrafialový (UV), fluorescenční (FD), elektrochemický (ED) nebo hmotnostní (MS) detektor. HPLC separace se nejčastěji provádí v systému obrácených fází, kdy se používá nepolární stacionární fáze a polární mobilní fáze. Tato metoda je užívána hlavně pro stanovení volných forem LA, DHLA a jiných odvozených sloučenin [22].

- HPLC/UV

LA a některé její příbuzné sloučeniny mohou být separovány v systému obrácených fází použitím UV detekce při 330 nm (absorpční maximum dithiolanového kruhu) a gradientového elučního systému. Nicméně tato metoda není často využívána, jelikož detekční limity separovaných sloučenin jsou velmi vysoké, díky nedostatku silného chromoforu v molekule LA [22].

- HPLC/FD

Pro detekci separovaných látek je nutné do jejich molekuly vnést fluorofor reakcí s vhodným derivatizačním činidlem. Můžeme jmenovat například silný fluorofor 2-(4-aminofenyl)-6-methylbenzothiazol. Před derivatizací je vhodné ochránit thiolové skupiny DHLA, aby nedošlo k jejich oxidaci a mohlo dojít ke stanovení obou látek. Derivatizační činidlo reaguje s volnými karboxylovými skupinami LA a DHLA s ochráněnými SH- skupinami za vzniku jejich amidových derivátů, které jsou separovány v systému obrácených fází použitím isokratické eluce a detekovány fluorimetricky ($\lambda_{EX} = 343$ nm, $\lambda_{EM} = 423$ nm). Tato metoda je sice velice citlivá, reprodukovatelná, lehce aplikovatelná pro simultánní stanovení LA a DHLA v biologických vzorcích a kalibrační křivky vykazují linearitu v širokém koncentračním rozmezí, nicméně vykazuje nižší selektivitu, neboť fluorescenční činidlo reaguje s karboxylovou skupinou, která je obsažena v mnoha dalších sloučeninách [23]. Z dalších derivatizačních činidel lze jmenovat o-ftalaldehyd v přítomnosti D-fenylalaninu pro analýzu R- a S-enantiomerů [22] nebo monobromobiman (mBBr) [24]. Satoh a kol. [25] navrhli další možnost simultánního stanovení LA a DHLA pomocí HPLC/FD. Nejdříve je označena DHLA ve vzorku pomocí ABD-F (4-(aminosulfonyl)-7-

fluoro-2,1,3-benzoxadiazol) při pokojové teplotě po dobu 10 minut. Poté je LA přeměněna na DHLA pomocí redukčního činidla TCEP (tris(2-karboxyethyl) fosfin hydrochlorid). Takto vzniklá a prozatím neoznačená DHLA je značena pomocí SBD-F (4-fluoro-2,1,3-benzoxadiazol-7-sulfát amonný) při 50°C po dobu 1 hodiny. Výsledné fluorofory, ABD-DHLA a SBD-DHLA, jsou separovány v systému obrácených fází a detekovány při 510 nm (excitace při 380 nm).

- HPLC/ED

Tento typ metody je vhodný pro simultánní stanovení redukované a oxidované formy vedle sebe, neboť LA a DHLA mohou být rychle vzájemně převedeny aplikací elektrického potenciálu. Proto jsou tyto sloučeniny vhodné pro měření elektrochemickým detektorem. Stanovení LA pomocí HPLC/ED je vysoce citlivé a nevyžaduje vysoké nároky na přípravu vzorku ve srovnání s ostatními metodami, kalibrační křivky však vykazují linearitu pouze v úzkém koncentračním rozmezí. V kombinaci HPLC/ED se používá izokratická eluce. Tato metoda může být použita pro měření volných forem LA a DHLA, vázané formy těchto sloučenin bez jejich uvolnění z vazby nemohou být detekovány [22].

Výběr nástrojů, materiálu elektrody a složení mobilní fáze jsou faktory, které ovlivňují citlivost a selektivitu analýzy. Handelman a kol. a Han a kol. [4] aplikovali dvouelektrodivý Hg-Au systém s amperometrickou detekcí ke stanovení LA a DHLA v nanomolárních koncentracích v lidských buňkách. Elektrody byly sice vysoce citlivé a především vysoce selektivní pro thiolové sloučeniny, ale elektrody po 30 - 50 nástřicích ztráceli citlivost a jejich povrch musel být renovován. Teichert a Preiss [26, 27] měřili α -lipoovou kyselinu v lidské plasmě pomocí amperometrické detekce při vysokém oxidačním potenciálu +1,1 V, což také způsobilo ztrátu citlivosti použité skleněné porézní uhlíkové elektrody. Později stejní autoři odstranili tuto stinnou stránku pomocí pulzní amperometrické detekce. Skleněná uhlíková elektroda ovšem není tak selektivní, obzvláště při vysokém potenciálu, který je nutný pro stanovení LA. Podle autorů však koextrahované endogenní komponenty plazmy nijak výrazně neinterferují. Sen a kol. [8] se pokusili vyvinout metodu pro sledování osudu exogenní LA v lidských a zvířecích buňkách a tkáních. K tomu použili detekci

na principu coulometrie, která vykazuje několikanásobně vyšší detekční účinnost (zhruba 100%) ve srovnání s amperometrickou detekcí (5-15%).

Veškeré metody elektrochemické detekce však dosud nejvíce trpí nenalezením vhodného vnitřního standardu, který by vyřešil problém snížení citlivosti elektroodového systému.

- HPLC/MS

Po vyřešení propojení HPLC s hmotnostním detektorem se právě tento typ detekce stal další alternativou pro stanovení LA pro klinické a farmakokinetické studie. Obdobně jako HPLC/ED nevyžaduje nikterak složitou úpravu vzorku, nejsou nutné žádné derivatizační reakce. Chen a kol. [28] vyvinuli pro stanovení LA v lidské plasmě relativně jednoduchou, rychlou, selektivní a vysoce citlivou metodu použitím HPLC ve spojení s hmotnostním detektorem (kvadrupól v negativním SIM modu - selected ion monitoring) po ionizaci elektrosprejem. Ačkoliv není chemicky podobný LA, jako vnitřní standard použili naproxen (nesteroidní antirevmatikum) pro svou stabilitu a pro symetrii píku, podobnou LA. Dosáhli linearity v širokém koncentračním rozmezí (5-10 000 ng/ml). Durrani a kol. [29] tuto metodu upravili použitím hmotnostního detektoru na principu iontové pasti (v MRM modu - multiple reaction monitoring) a použitím bisfenolu A jako vnitřního standardu, čímž dosáhli zvýšení selektivity a citlivosti stanovení.

Bylo vyvinuto mnoho dostatečně specifických a velice citlivých metod pro stanovení LA a DHLA, ale je nutno dodat, že jejich hladiny byly měřeny až po jejím exogenním podání.

7.3 Stanovení LA metodou HPLC s elektrochemickou detekcí

7.3.1 Příprava vzorku k analýze

Protože biologické vzorky obsahují velké množství látek, které mohou interferencí rušit stanovení, je nutné vzorek vhodným způsobem upravit. K tomu se používá extrakce a deproteinace vzorku.

Při extrakci se snažíme převést námi stanovovanou látku ze vzorku plazmy do vhodného organického rozpouštědla. Pro přípravu vzorku LA lze použít extrakci kapalina-kapalina nebo extrakci na tuhé fázi (SPE). Jako extrakční činidlo pro LA lze použít například diethyl ether. Po této reakci odpaříme extrakt do sucha pod proudem dusíku, čímž dojde ke zkoncentrování vzorku, a do doby analýzy ho uchováme za vhodných podmínek. Před analýzou odparek rozpustíme v roztoku, který složením připomíná použitou mobilní fázi.

7.3.1.1 Stabilita vzorků LA

Stabilitou vzorků LA se zabýval Chen a kol [28]. Připravené vzorky nechali zmrazit na 30 dnů při -20°C . Poté všechny vzorky rozmrazili, analyzovali a srovnali s čerstvě připravenými. Dále se zabývali stabilitou vzorků při opakovaném rozmražení a zmražení. Třikrát provedli rozmražení a zmražení a poté vzorky zanalyzovali a opět porovnali. Zjistili, že stabilita vzorku LA po jeho rekonstrukci je přibližně 24 hodin. Nakonec zkoušeli stabilitu vzorků po jejich přípravě a umístění do auto-sampleru měřícího přístroje na 24 hodin při 25°C . Všechny jimi provedené pokusy prokázaly velice dobrou stabilitu vzorků LA.

7.3.2 HPLC separace

Provádí se v systému obrácených fází, kde používáme nepolární stacionární fázi, vázanou na silikagelu jako nosiči, a polární mobilní fázi, která je tvořená z větší částí vodou s přidavkem organických rozpouštědel (acetonitril, metanol). Separace probíhá na principu hydrofobních interakcí mezi stanovovanou látkou a nosičem a retence látky je tím silnější, čím je látka více nepolární. Selektivitu lze ovlivnit volbou organické složky mobilní fáze, eluční síla mobilní fáze roste s klesající polaritou organického rozpouštědla. Separace na obrácených fázích představuje převážnou většinu všech HPLC aplikací.

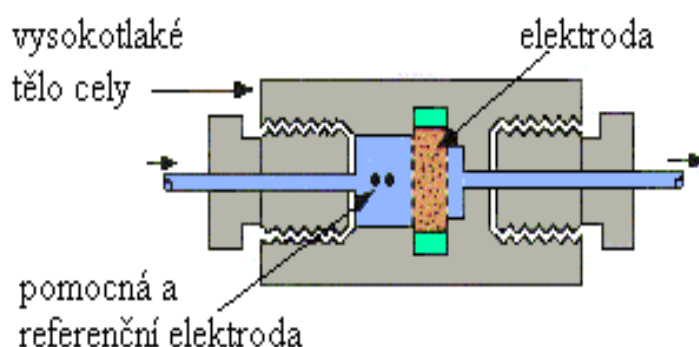
7.3.3 Elektrochemická detekce

Elektrochemická detekce je založena na měření proudu, vyvolaného při průchodu redukované či oxidované látky měrnou celou, ve které jsou umístěny elektrody, na něž se vkládá pracovní napětí, nutné pro průběh dané elektrochemické reakce. Selektivita a vysoká citlivost představují výhody těchto

detektorů, naopak nevýhodou je jejich obtížné spojení s gradientovou elucí a především vysoké nároky na čistotu chemikálií, vody a z nich připravených vzorků a mobilních fází. Použitá voda je nutné mít o předepsané vodivosti ($18,2 \text{ S.cm}^{-1}$) a prostou bakteriemi produkovaných organických látek, protože veškeré nečistoty mohou postupně deaktivovat povrch elektrod a snižovat tak citlivost stanovení. Dále je nutné odstranit z mobilní fáze kyslík odvzdušněním ultrazvukem. Mobilní fáze musí být vodivá, proto odpadá možnost použití tohoto typu detektoru pro separaci s normálními fázemi. Dále není vhodné používat vysokého obsahu organických rozpouštědel, které její vodivost snižují.

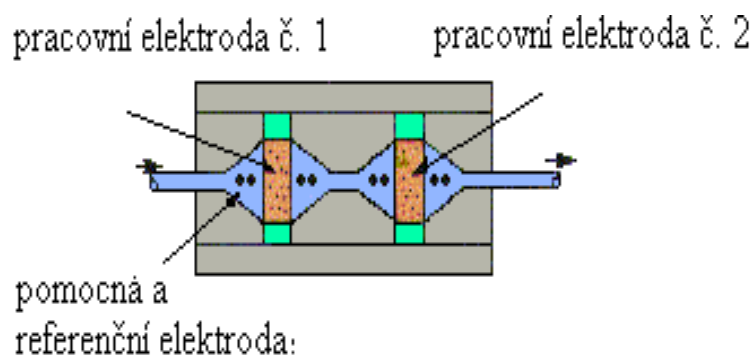
7.3.4 Elektrochemický detektor Coulochem III

Pro simultánní stanovení oxidované a redukované formy LA je možno použít tento typ detektoru, pracujícího na coulometrickém principu. Analyt je stanovován z velikosti náboje, vznikajícího na elektrodách s vloženým konstantním potenciálem při 100% průběhu reakce. Pro stanovení LA je detektor Coulochem III vybaven analytickou a ochrannou celou.



Obr. 11 Ochranná cela (model 5020) (upraveno dle [30])

Ochranná cela (model 5020, obr. 11) se skládá z pórovité grafitové elektrody, na kterou se vkládá takové napětí, které odstraňuje nežádoucí elektroaktivní látky z mobilní fáze. Lze jí také využít k oxidaci či redukcii stanovovaných látek.



Obr. 12 Analytická cela (model 5010) (upraveno dle [30])

Analytická cela (model 5010) se skládá ze dvou pracovních grafitových elektrod, na které se vkládají vzájemně odlišná napětí, lze tedy stanovovat různé látky. Výsledný proud je zaznamenáván jako funkce času ve formě píků. Při stanovení LA je na obě elektrody vloženo kladné napětí. Jejich hodnota se volí podle hydrodynamického voltamogramu separovaných látek. Volí se takové napětí, které zajišťuje dostatečnou odezvu detektoru, přičemž nedochází ke snížení životnosti analytické cely. Referenční elektrody jsou hydrogen paladiové.

B. Experimentální část

8. Materiál a metodika

8.1 Odběr a uchování vzorku

Nebyl nalezen žádný záznam, který by uváděl rozdíly mezi stanovením LA v plazmě nebo séru. Výhoda stanovení v plazmě je v její rychlejší přípravě ke zpracování a tedy ke snížení pravděpodobnosti zoxidování redukované formy při simultánním stanovení společně s její oxidovanou formou.

Vzorky krve byly odebírány od tří zdravých dobrovolníků do sterilních vakuových zkumavek VACUETTE® (Greiner bio-one, Německo). Plná krev se dala na 10 minut zchladit na 4°C a nechala se srazit. Následovala centrifugace při 3500 otáčkách za minutu po dobu 15 minut. Sérum bylo odpipetováno při 3500 otáčkách za minutu po dobu 15 minut. Sérum bylo odpipetováno a zpracováno, nebo zmrazeno na -80°C. Vzorky plazmy byly odebírány do zkumavek VACUETTE® (Greiner bio-one, Německo) s kyselinou ethylendiamintetraoctovou (EDTA).

8.2 Seznam chemikálií

kyselina lipoová ($C_8H_{14}O_2S_2$, $M_r = 206,3$) (Sigma, Německo)

acetonitril pro HPLC (CH_3CN , $M_r = 41,05$) (Merck, Německo)

metanol pro HPLC (CH_3OH , $M_r = 32,04$) (Merck, Německo)

deionizovaná voda ($\gamma \leq 18,2 \mu S \cdot cm^{-1}$)

dihydrogenfosforečnan sodný (NaH_2PO_4 , $M_r = 119,98$) (Sigma, Německo)

kyselina trihydrogenfosforečná (H_3PO_4 , 85 %, $M_r 98,00$) p.a. (Sigma, Německo)

kyselina chlorovodíková (HCl, 36,6 %, $M_r 36,46$) p.a. (Sigma, Německo)

hydroxid sodný (NaOH, $\geq 98\%$, $M_r 40$) p.a. (Sigma, Německo)

kyselina ethylendiamintetraoctová ($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \cdot 2H_2O$, 99%, $M_r = 372,2$) (Sigma, Německo)

1,4-dithioerythritol ($C_4H_{10}O_2S_2$, $M_r = 154,25$) (Sigma, Německo)

8.3 Přístroje a pomůcky

elektrochemický detektor Coulochem III 5200 (ESA, USA), pracovní elektroda – porézní uhlíková, referenční elektroda – α -hydrogen paladiová
analytická cela, model 5010 (ESA, USA)
ochranná cela, model 5020 (ESA, USA)
dávkovací ventil Rheodyne 9725i (Rheodyne, L. P., Rohnett Park, CA, USA)
vysokotlaké analytické čerpadlo LC-10AD VP (Shimadzu, Japonsko)
chromatografická kolona LiChroCart® 254-4, Purospher ® Star (RP-C18), 5 μ m (Merck, Německo)
mikrostříkačka Hamilton 710, 100 μ l (Hamilton-Bonaduz, Švýcarsko)
vyhodnocovací software CLARITY (Data Apex s. r. o., ČR)
tabulkový procesor Microsoft Excel (Windows, USA)
analytické váhy LB – 1052/2 (Laberte, Maďarsko)
předvážky p3/200 (CHIRANA, ČR)
pH metr Gryf 208, elektroda THETA, typ: HC 113
ultrazvuková vana K2 (Kraintek, Slovensko)
ultrazvuková vana K12 (Kraintek, Slovensko)
třepačka Heindolph Reax top (Heindolph, Německo)
chlazená odstředivka Jouan 23i (Jouan SA, Francie)
termoblok Isotemp 145 D (Fischer Scientific, Kanada)
hlubokomrazicí box MDF-U3086S (Sanyo electric, Japonsko)
filtrační aparatura (Supelco, USA)
nylonové filtry (Nylon 66) 0,2 μ m x 47 mm (Supelco, USA)
nylonové filtry (N-4-2) 0,25 μ m x 4 mm (Supelco, USA)
stacionární fáze CP Separon SGX C18; 60 μ m (Tessek, ČR)
mikrozkumavky s nylonovým filtrem Spin-X® Centrifuge Tube Filter, 0,22 μ m Nylon (Corming, USA)
automatické pipety (Biohit, Finsko)
špičky různých objemů pro automatické pipety
mikrozkumavky Eppendorf
odběrové zkumavky VACUETTE® (Greiner bio-one, Německo)
odměrné laboratorní sklo kategorie A a B

8.4 Příprava použitých roztoků

- ***Deionizovaná voda pro HPLC analýzu***

Deionizovaná voda pro HPLC analýzu se připravuje přečištěním deionizované vody přes kolonku se stacionární fází CP Separon SGX C18 o velikosti částic 60 μm .

- ***0,05 M roztok NaOH pro přípravu zásobního roztoku kyseliny lipoové***

Roztok připravíme rozpuštěním 0,2 g NaOH ve 100 ml přefiltrované deionizované vody pro HPLC analýzu.

- ***50 mmol/l zásobní roztok kyseliny lipoové***

Roztok se připraví rozpuštěním 1 g LA ve 100 ml 0,05 M NaOH. Připravený zásobní roztok se rozpipetuje po 1 ml do mikrozkušavek Eppendorf a uschová při -80°C .

- ***50 $\mu\text{mol/l}$ roztok kyseliny lipoové***

Roztok připravíme tak, že zásobní roztok o koncentraci 50 mmol/l 1000x naředíme přefiltrovanou vodou pro HPLC analýzu.

- ***100 mmol/l roztok EDTA pro přípravu vzorků a standardů***

Roztok připravíme rozpuštěním 0,3722 g EDTA v 10 ml přefiltrované deionizované vodě pro HPLC analýzu. Poté upravíme pH roztoku 6 mol/l NaOH (pH = 8).

- ***6 mol/l NaOH na úpravu pH roztoku EDTA***

Roztok připravíme rozpuštěním 1,2 g NaOH v 5 ml deionizované vody pro HPLC analýzu.

- ***5 mmol/l roztok 1,4-dithioerythritolu***

Roztok připravíme rozpuštěním 0,0771 g 1,4-dithioerythritolu (DTE) ve 100 ml deionizované vody pro HPLC analýzu.

- ***Proplachovací roztok a roztok na rozpuštění odparku***

Roztok připravíme smícháním acetonitrilu (ACN) a deionizované vody pro HPLC analýzu v poměru 1:1. Tento roztok pak přefiltrujeme na nylonovém filtru a 45 minut odvzdušníme v ultrazvukové lázni.

- ***Roztok na proplachování dávkovací smyčky***

Roztok na rozpuštění odparku připravíme stejným způsobem jako roztok proplachovací, není však nezbytné ho odvzdušňovat na ultrazvukové lázni.

8.5 HPLC/ED stanovení kyseliny lipové

8.5.1 Příprava vzorků a standardů pro kalibraci

- ***Příprava vzorků plazmy (séra)***

K 500 μ l plazmy (séra) v 2 ml mikrozkuvkách Eppendorf nepipetujeme 7,5 μ l 100 mM EDTA, 50 μ l DTE a necháme 10 minut inkubovat při laboratorní teplotě. Poté přidáme 100 μ l ACN k deproteinaci. Následuje přidavek 1 ml diethyl etheru a 10 μ l kyseliny fosforečné, třepání a centrifugace 5 minut při 2500 G a 25°C. Po centrifugaci odpipetujeme 800 μ l etherové vrstvy a odpařujeme pod proudem dusíku. Odparky jsou buď hned zpracovány, nebo se uchovávají do doby analýzy při -80°C.

- ***Příprava standardních vzorků pro kalibraci***

Standardní vzorky pro kalibraci se připravují stejným způsobem. Zásobní roztok LA naředíme na vhodné koncentrace a 20 μ l každého naředěného standardního roztoku přidáme k 480 μ l plazmy. Následuje naprosto stejný postup, jak je popsáno výše. U kontrolního vzorku namísto 20 μ l naředěného standardu přidáme ke 480 μ l plazmy 20 μ l deionizované vody pro HPLC analýzu.

8.5.2 Příprava mobilní fáze

Mobilní fáze je složena ze 70 % 20 mM dihydrogenfosforečnanu sodného, 25 % acetonitrilu a 5 % metanolu. Navážku 4,7992 g

dihydrogenfosforečnanu sodného rozpustíme ve 1400 ml deionizované vody pro HPLC analýzu a přidáme 500 ml acetonitrilu a 100 ml metanolu. Upravíme pH mobilní fáze pomocí kyseliny trihydrogenfosforečné na hodnotu 2,7, přefiltrujeme ji přes nylonový filtr o velikosti pórů 0,2 μm a před začátkem analýzy či podle potřeby ji 45 minut odvzdušíme v ultrazvukové lázni.

8.5.3 Chromatografická analýza

Odparek vzorku či standardu těsně před analýzou rozpustíme ve 30 μl roztoku na rozpouštění odparku. Pomocí mikrostříkačky Hamilton 710 (Hamilton-Bonaduz, Švýcarsko) tento roztok vstříkneme do smyčky dávkovacího ventylu Rheodyne 9725i (Rheodyne, L. P., Rohnett Park, CA, USA) o objemu 10 μl . HPLC/ED systém byl složen z vysokotlakého analytického čerpadla LC-10AD VP (Shimadzu, USA), kolony LiChroCart 254-4, Purospher RP-18e (Merck, Německo) a elektrochemického detektoru Coulochem III (ESA, USA). Nastavení detektoru, použitého k řízení analytické cely (model 5010A (ESA, USA)) a ochranné cely (model 5020 (ESA, USA)) ukazuje tabulka 6.

Tabulka 6 Nastavení elektrochemického detektoru Coulochem III

	Ochranná cela	Analytická cela	
		Kanál 1	Kanál 2
měřicí mód		DC mód	
napětí (mV)	750	450	750
citlivost	-	10 μA	200 nA
výstupní napětí (V)	-	1	1
filtr (s)	-	5	5

Vyhodnocovací software Clarity (DataApex, ČR) sloužil ke zpracování signálu detektoru. Před vlastní analýzou byl systém 30 minut promýván roztokem na proplachování. Poté byla do systému zapojena mobilní fáze, kterou jsme proplachovali až do ustálení signálu detektoru. Teprve poté mohla být zahájena analýza vzorků. Průtok mobilní fáze byl 1 ml/min a kolona byla temperovaná na 37°C.

8.5.4 Kvalitativní analýza

Porovnáním retenčních časů kyseliny lipoové ve standardech a vzorcích, naměřených při stejných podmínkách, jsme dokazovali její přítomnost v plazmě. K ověření retenčních časů jsme k plazmě přidávali před extrakcí známé množství stanovované látky.

8.5.5 Kvantitativní analýza

8.5.5.1 Kalibrace

Pro kvantifikaci LA ve vzorcích byla použita metoda kalibrační křivky. Pro eliminaci chyby, způsobené nestabilitou detektoru, je vhodné použít vnitřní standardy. Je však třeba připomenout fakt, že pro LA je velmi obtížné vnitřní standard nalézt. Existují studie, ve kterých byly používány pro stanovení LA vnitřní standardy, např. naproxen, bisfenol A, kyselina dekanová, nicméně pro naši metodu stanovení jsou tyto látky nevyhovující. Rovnice kalibrační křivky byla získána proložení závislosti plochy píku na koncentraci metodou nejmenších čtverců.

8.5.5.2 Přesnost

Přesnost stanovení LA v sérii jsme určili analýzou 5-ti nezávisle připravených stejných vzorků. Ty jsme společně se standardy analyzovali během jednoho dne. Jako míru přesnosti jsme použili variační koeficient:

$$CV (\%) = (STD / AVG) \times 100$$

kde STD je standardní odchylka měření a AVG je aritmetický průměr.

8.5.5.3 Správnost

Pro určení správnosti stanovení LA byl použit recovery experiment. Výťažnost metody (recovery) byla zjištěna pomocí přidavků známého množství LA ke vzorkům plazmy nebo séra s předem stanoveným množstvím endogenní LA. Hodnoty recovery byly vypočteny jako stonásobek poměru mezi nalezeným a přidaným množstvím LA:

$$\text{Recovery (\%)} = (x_1 - x_0 / A) \times 100$$

kde x_1 je koncentrace LA ve vzorku s přídatkem, x_0 je endogenní koncentrace LA a A je koncentrace přidané LA.

8.5.5.3 Detekční limit

Detekční limit neboli limita detekce (LOD - limit of detection) byl určen podle vzorce:

$$\text{LOD} = 3h / m$$

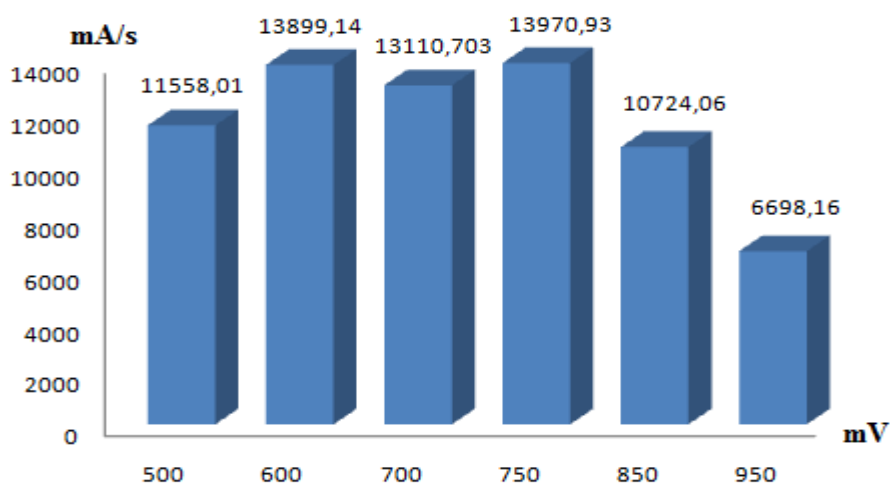
kde h je výška šumu základní linie a m je směrnice závislosti výšky píku na koncentraci [31].

C. VÝSLEDKY

9. Volba vhodných podmínek separace

9.1 Hydrodynamický voltamogram LA

Sestrojili jsme hydrodynamický voltamogram LA, tedy závislost generovaného proudu na vkládaném napětí, pro nastavení ideálních detekčních podmínek elektrochemického systému. Jak ukazuje obrázek 13, nejvyšší odezvu stanovované látky poskytlo vložené napětí o velikosti 750 mV.



Obr. 13 Hydrodynamický voltamogram LA

9.2 Volba mobilní fáze

Tabulka 7 Mobilní fáze pro stanovení LA

složení mobilní fáze [%] NaH ₂ PO ₄ /ACN/Methanol	přibližná hodnota retenčního času [min]
60/40/0	10
65/35/0	16
70/30/0	23
75/25/0	54
70/20/10	59
67,5/25/7,5	30
70/25/5	39

10. Kvalitativní analýza

Retenční časy analyzovaných látek uvádí tabulka 8 ve tvaru průměrný retenční čas \pm směrodatná odchylka (SD).

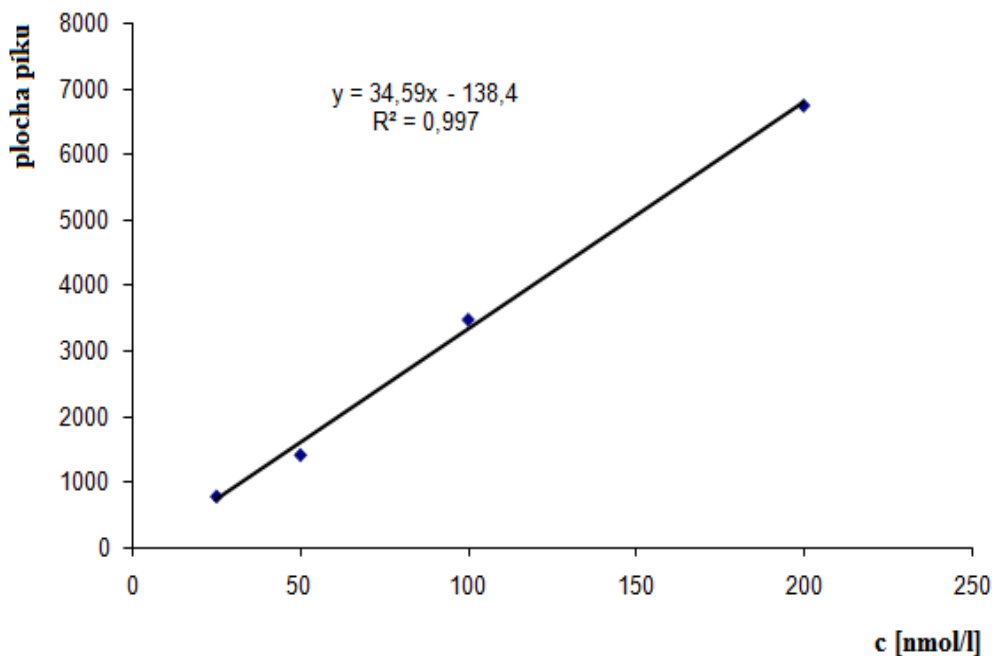
Tabulka 8 Retenční časy analyzovaných látek

Analyt	Retenční čas (t_R) [min]
Captopril	$4,73 \pm 0,01$
LA	$39,23 \pm 0,06$
DHLA	$43,22 \pm 0,10$

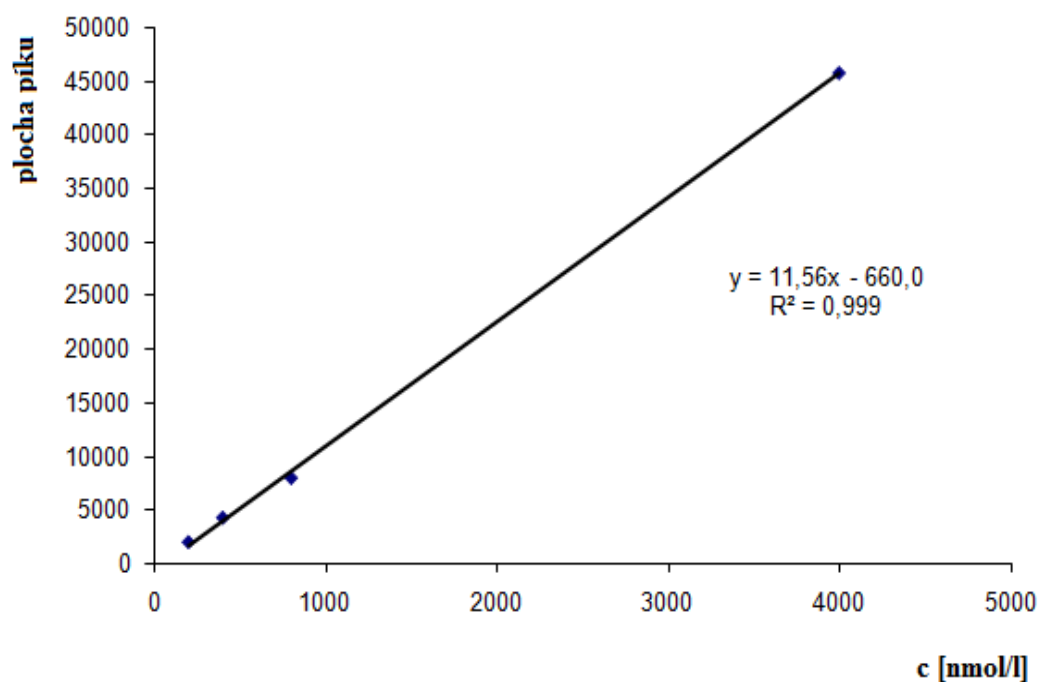
11. Kvantitativní analýza

11.1 Kalibrace

Pro konstrukci kalibračních přímek jsme připravili řadu standardů v rozmezí 25 - 200 nmol/l pro stanovení endogenních koncentrací a 200 - 4000 nmol/l pro její stanovení po suplementaci. Jejich linearita je zachována v celém rozmezí.



Obr. 14 Kalibrační křivka LA pro její stanovení v lidské plazmě v endogenních koncentracích



Obr. 15 Kalibrační křivka LA pro její stanovení v lidské plazmě po suplementaci

Chromatografické záznamy standardů pro kalibraci LA v endogenních koncentracích je uveden v příloze 1 a pro kalibraci LA po suplementaci v příloze 2.

11.2 Přesnost

Přesnost v sérii byla ověřena opakovaným stanovením jednoho vybraného vzorku séra (tabulka 9). Přesnost mezi sériemi nebyla pro nízký počet měření prozatím stanovena.

Tabulka 9 Přesnost stanovení LA v sérii

Průměrná koncentrace v sérii [nmol/l]	Přesnost CV (%) v sérii, n = 5
243,38	8,35

11.3 Správnost

Správnost stanovení LA byla ověřena metodou standardních přídavek (tabulka 10).

Tabulka 10 Ověření správnosti stanovení LA metodou standardních přídavek

Přídavek LA (nmol/l)	Stanovená koncentrace (nmol/l)	Nalezený přídavek (nmol/l)	Výtěžnost (%)
0,0	20,3	-	-
25	24,7	4,4	17,6
50	46,3	26	52
100	106,1	85,8	85,8
200	197,9	177,6	88,8

11.4 Detekční limit

Hodnota detekčního limitu pro stanovení LA je uvedena v tabulce 11.

Tabulka 11 Detekční limit pro LA

	LA
Detekční limit	11,5 nmol/l

D. DISKUSE

Cílem naší práce bylo pokusit se vypracovat metodu, kterou bychom byli schopni stanovit nejen exogenní, ale i endogenní hladiny LA. Řadou klinických studií bylo totiž prokázáno, že tento silný antioxidant má pozitivní účinky při léčbě mnohých onemocnění, jejichž vývoj či progresse souvisí se zvýšeným oxidačním stresem, tedy s porušenou rovnováhou mezi oxidanty a antioxidanty [3, 4, 26]. Naším zaměřením bylo její působení na DM a jeho komplikace, především aterosklerózu. Pro pochopení účinků LA, farmakokinetiky a farmakodynamiky suplementace je nutná spolehlivá a citlivá metoda. Ale nejen pro suplementaci, je vhodné také znát a stanovovat její endogenní koncentrace.

Ke stanovení LA v různých vzorcích bylo vypracováno několik metod. Zpočátku dominovaly techniky plynové chromatografie, které ovšem vyžadovaly náročnou úpravu vzorku a převedení stanovované látky na těkavé deriváty. Tyto metody byly postupem času nahrazeny technikami HPLC s různými typy detekce. Nejlepší výsledky poskytují metody HPLC s fluorimetrickou a hmotnostní detekcí. Fluorimetrická detekce ovšem vyžaduje náročnou úpravu vzorku, neboť v molekule LA chybí silný fluorofor a bez derivatizační reakce není detekována. Nevýhodou hmotnostní detekce jsou její vysoké pořizovací náklady. Pro stanovení LA v lidské plazmě byla námi vybrána metoda HPLC s elektrochemickou detekcí na principu coulometrie, neboť nevyžaduje žádné derivatizační reakce k úpravě vzorku, poskytuje vysokou citlivost stanovení a umožňuje simultánní stanovení oxidované i redukované formy vedle sebe. Navíc vykazuje mnohem vyšší detekční účinnost (zhruba 100%) ve srovnání s amperometrickou detekcí (5 - 15%). Řada metod s elektrochemickou detekcí již byla popsána pro stanovení LA v různých biologických vzorcích (tělní tekutiny, buňky, tkáně), nicméně naprostá většina byla založena právě na principu amperometrie, proto pro nás bylo obtížnější z nějaké již popsané studie vycházet, ať už se jedná o přípravu vzorku, složení mobilní fáze nebo nastavení separačních a detekčních podmínek [4, 8, 22 - 29].

Sen a kol. [8] popsali metodu coulometrického stanovení LA a DHLA, ovšem v jiném biologickém materiálu (buňky a buněčné kultury), ne v plazmě.

I přesto jsme jeho studii využili, neboť používal starší typ námi vybraného detektoru. Z jeho práce jsme vycházeli, co se týče složení mobilní fáze, i když v pozměněném poměru použitých komponent, a také elektrochemických detekčních podmínek, které jsme si upravili konstrukcí vlastního hydrodynamického voltamogramu, kdy se stejný standard látky měří při různých hodnotách elektrického potenciálu a zaznamenává se závislost generovaného proudu na vkládaném napětí. Volí se takový potenciál, při kterém je dosažena nejvyšší odezva stanovované látky, ale ne tak vysoký, aby nedocházelo k poškození a snížení životnosti měřící elektrody. Detekční podmínky shrnuje tabulka 6 a obr. 13 zobrazuje hydrodynamický voltamogram LA.

Mobilní fáze byla připravena z 20 mM roztoku NaH_2PO_4 jako pufru, acetonitrilu a metanolu pro HPLC. Byly vyzkoušeny vhodné poměry jednotlivých fází (zpočátku bez metanolu), aby bylo dosaženo co nejúčinnější separace, která by netrpěla překrýváním píku stanovované komponenty (tabulka 7). Nejúčinnějšího rozdělení podle našeho názoru bylo dosaženo použitím poměru pufr/ACN/metanol 70/25/5 (obj. %), i přesto, že k retenci docházelo až ve 40. minutě.

Nebyly nalezeny žádné studie, které by dokázaly vysvětlit, jak dochází k vazbě mezi LA a bílkovinou, zda se uplatňuje i jiné interakce či vazby, než vazba na lysinový zbytek, jestli se tedy dokáže LA vázat i na jiné bílkoviny, než na výše popsané bílkoviny dehydrogenázových komplexů. Hydrolyzáza z amidových vazeb je možná kyselou či zásaditou hydrolyzou, nicméně poskytuje velmi malé výtěžky (30%). Hydrolyzáza použitím enzymů (subtilisin, alkalasa) nedokáže LA uvolnit z vazby na lysinový zbytek. Předpokládá se však, že antioxidační účinky vykazuje jen volná LA a DHLA, proto jsme se nesnažili tyto vazby nějak přerušovat a pokusili se stanovovat jen volné frakce. Nejprve jsme chtěli stanovovat obě formy současně, nicméně i po analýze standardu redukované formy bylo nadmíru patrné, že při úpravě vzorku dochází k její oxidaci (příloha 3). Proto jsme se rozhodli stanovovat celkovou LA v její redukované formě. Jako redukční činidlo bylo vybráno DTE, neboť se s výhodou používá pro sloučeniny, obsahující ve své molekule síru (glutathion, methionin, cystein). DTE nejen že dokáže přerušit vazbu na bílkoviny přes thiolovou

skupinu, dokáže také přerušit disulfidovou vazbu S-S, která se nachází v molekule LA. Tím ji zredukuje a umožní její stanovení v její redukované formě [32].

Úprava vzorku vycházela z metody, popsané Wittem a Rüstowem [24]. Vzorky séra ke kalibraci jsme zaostřovali přidavky vhodně naředěného standardu LA, připraveného jejím rozpuštěním v 0,05M roztoku NaOH. Poté jsme přidali EDTA jako antikoagulační a chelatační činidlo pro přítomné ionty a DTE, o kterém jsme se mylně domnívali, že by mohl rozvolňovat LA z vazby na bílkoviny. Jak se ukázalo, toto redukční činidlo dokázalo redukovat LA na DHLA, především u vzorků s nízkou koncentrací LA. U vzorků, které byly zaostřeny vysokou koncentrací LA tato redukce nebyla patrná, došlo pravděpodobně k překročení redukční kapacity DTE a ve vzorku byla stanovena pouze oxidovaná forma. Po přidání DTE jsme vzorek inkubovali 10 minut při laboratorní teplotě. Následoval další krok a tou byla deproteinace. K ní jsme použili ACN. Záznamy po deproteinaci byly pro stanovení LA ve vzorku kvalitnější a použitelnější. Poté následovala extrakce kapalina - kapalina přidáním 1 ml diethyl etheru a okyselením 10 μ l H_3PO_4 , třepání a stočení na odstředivce 3 minuty při 25°C a 2500 g. Po extrakci bylo z každého vzorku odsáto 800 ml organické fáze a ta byla odpařena pod dusíkem. Pro analýzu jsme odparek rozpustili v 50 μ l rozpouštěcího roztoku.

Pro kvantitativní stanovení analytů je vhodné používat vnitřní standardy, zvláště u metod, kde může dojít ke snížení citlivosti detekčního systému s časem. Vnitřním standardem by měla být látka, která je chemicky podobná stanovované látce, není endogenně přítomna ve vzorku, a která vykazuje obdobné elektrochemické vlastnosti. Pro LA je velmi obtížné takovýto standard nalézt. Byly popsány metody, které je používaly, například HPLC-MS, používající bisfenyl či naproxen [28, 29], jsou to ovšem látky, které jsou strukturně a chemicky naprosto odlišné od LA, nicméně vykazují podobné elektrochemické vlastnosti. Pro metody elektrochemické detekce nebyl dosud popsán žádný vhodný vnitřní standard. U ostatních polárnějších endogenních thiosloučenin (cystein, homocystein, methionin) se s výhodou používá osvědčený vnitřní standard penicilamin. Ten je ovšem velmi polární a proto nemůže být použit v našich podmínkách, neboť se na koloně téměř nezachycuje a je detekován v oblasti s vysokou koncentrací interferujících píků [32].

Chemicky podobnou látkou k LA je antihypertenzivum captopril (příloha 4), který je přítomen jako účinná látka ve dvou preparátech, capoten a tensiomin. Lékaři z Kardiologického oddělení Krajské nemocnice v Pardubicích potvrdili, že se tyto preparáty v současné době již téměř nepoužívají nebo jen ve zvláštních případech. Proto existuje malá pravděpodobnost, že by vzorky pacientů, trpících kardiovaskulárním onemocněním obsahovaly tuto komponentu, a proto by mohla být použita jako vnitřní standard pro LA. Navíc při tvorbě hydrodynamického voltamogramu vykazovala podobné elektrochemické vlastnosti. Jedná se o polárnější látku než LA, což bylo námi vyžadováno, aby jeho použití neprodlužovalo již tak dlouhou analýzu, nicméně chromatograficky nevyhovoval naší metodě, neboť se na záznamu objevoval moc brzy, v oblasti, která je při analýze vzorku zatížena množstvím interferujících píků (příloha 5).

Především na začátku každého záznamu vzorku se vyskytuje velké množství interferujících píků (příloha 5), které ruší analýzu a nedovolují použít takovou mobilní fázi, která by dokázala eluovat LA podstatně dříve. Navíc nedovolují využít captopril jako vnitřní standard. Z tohoto důvodu jsme se pokusili provést SPE extrakci, která vycházela z metody, popsané Teichertem a Preissem [10]. Jimi používané fenylové extrakční kolonky jsme nahradili klasickými kolonkami, naplněnými C_{18} , a jako eluční činidlo jsme použili diethyl ether. Výsledné záznamy však byly zcela nevyhovující (příloha 6), proto jsme se vrátili k extrakci kapalina-kapalina.

Námi popsaná metoda je podle našeho názoru použitelná k analýze endogenních koncentrací celkové volné LA ve formě DHLA. Přídavek $5 \mu\text{M}$ DTE dokázal zredukovat oxidovanou formu až do koncentrace 200 nmol/l . Pokud bychom chtěli stanovovat vyšší koncentrace LA, tak podle našich závěrů by bylo třeba použít větší koncentraci redukčního činidla, jak dokládá pokus se vzorkem o koncentraci LA 3000 nmol/l , kdy přídavek $50 \mu\text{M}$ DTE (tedy desetinásobek námi běžně používané koncentrace) dokázal zredukovat zhruba polovinu oxidované formy. Při studiích, zabývajících se suplementovanou LA se navíc pracuje s vyššími koncentracemi LA, než 3000 nmol/l . Řešením problému s použitím redukčního činidla by mohlo být použití kondicionální cely před kolonou s nastaveným záporným potenciálem, který by veškerou přítomnou LA zredukoval na DHLA, a celková LA by byla detekována ve formě DHLA.

Nicméně pro suplementační studie by naše metoda mohla být také použita, jak dokládá obr. 15, kdy byla LA stanovována jako celková oxidovaná forma. To potvrzuje i pokus, kdy jsme kalibrační standardy připravovali do vody, nikoliv do séra, a dokázali jsme linearitu až do koncentrace kolem 12 $\mu\text{mol/l}$, samozřejmě s nižší nastavenou citlivostí detektoru (příloha 7). Stanovovat exogenně dodávanou LA o vysokých koncentracích tedy není nijak složité. Kalibrace do vody při našich podmínkách stanovení (endogenní koncentrace - citlivost detektoru 200 nA) nemohla být použita, neboť se nedařilo ustálit signál detektoru.

Analýza vzorků námi vypracovanou metodou je sice zdlouhavá ($t_{R(LA)} = 39,23$ minut), výhodou metody je ovšem nenáročnost v přípravě vzorků. Navíc metoda vykazuje srovnatelné analytické parametry (linearita, přesnost, správnost) s již popsányi metodami elektrochemické detekce.

E. ZÁVĚR

Cílem této práce bylo pokusit se vypracovat metodu HPLC/ED, která by byla použitelná pro stanovení endogenních hladin LA v lidské plasmě nebo v séru.

Popsaná metoda je dle našeho názoru použitelná jak pro suplementační studie, tak pro stanovení celkové volné LA ve formě DHLA ve fyziologickém rozmezí, tedy pro stanovení endogenních koncentrací. Pokud bychom chtěli stanovovat vyšší koncentrace LA, podle našich závěrů by bylo třeba použít větší koncentraci redukčního činidla, tedy DTE. Řešením problému s použitím redukčního činidla by mohlo být použití kondicionální cely a stanovovat total DHLA.

Pokud bychom chtěli stanovovat LA a DHLA vedle sebe, tato metoda by byla použitelná v případě, že by se nepřidávalo redukční činidlo. Pro suplementační studie by bylo třeba zaostřovat vzorek nejen oxidovanou formou, ale i redukovanou a pro kvantitativní analýzu sestavit směšnou kalibraci. Z důvodů rychlé oxidace DHLA by však bylo stanovení zatíženo chybou, proto podle našeho názoru je vhodnější stanovovat total ve formě DHLA.

F. LITERATURA

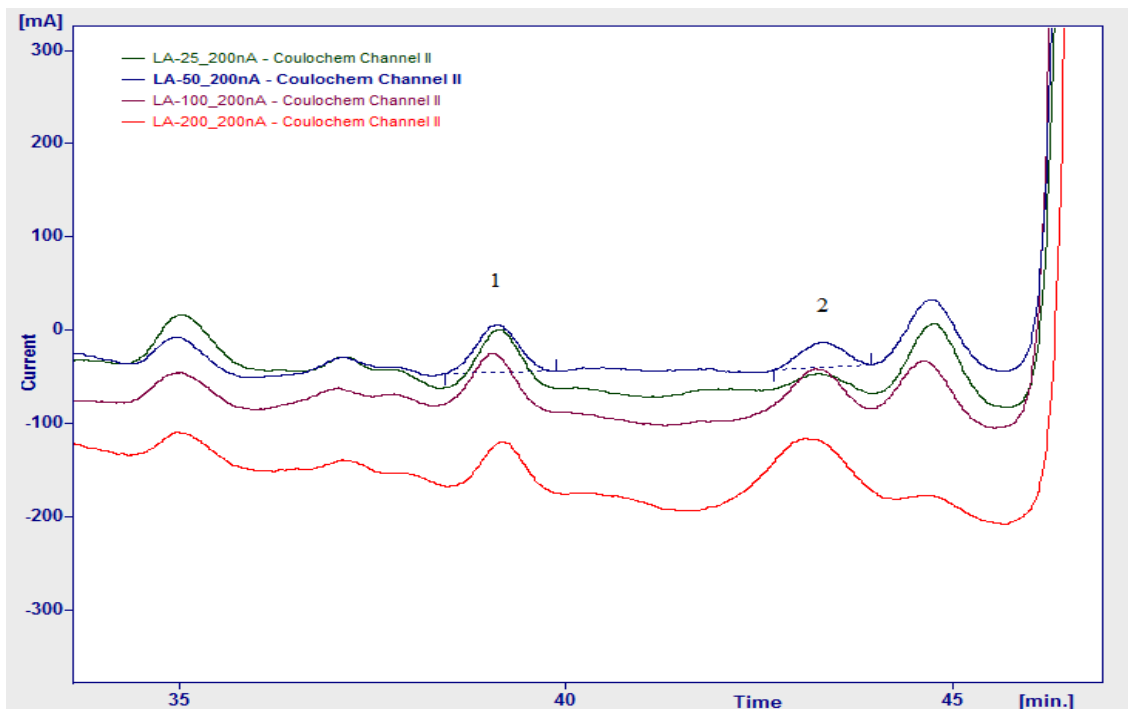
1. CADENAS, E., PACKER, L. *Handbook of antioxidants. Sekond Edition Revise and Expanded*. TIROSH, O., ROY, S., PACKER, L. Lipoic Acid: Cellular Metabolism, Antioxidant activity, and Clinical Relevance., s. 473 - 487, Dekker, 2002, New York, ISBN: 0-8247-0547-5.
2. CADENAS, E., PACKER, L. *Handbook of antioxidants. Sekond Edition Revise and Expanded*. MOREAU, R., ZHANG, W-J., HAGEN T. M. Cellular Effects of Lipoic Acid and Its Role in Aging., s. 489 - 510, Dekker, 2002, New York, ISBN: 0-8247-0547-5.
3. SINGH, U., JIALAL, I. Alpha-lipoic acid supplementation and diabetes. *Nutr Rev*, 2008, 646-657.
4. HAN, D., HANDELMAN, G. J., PACKER, L. Analysis of Reduced and Oxidized Lipoic Acid in Biological Samples by High-Performance Liquid Chromatography. *Methods Enzymol* 1995, 251, 315 - 325.
5. DEVLIN, T. M. *Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations*. 6 vyd. WILEY-LISS, 2006.
6. MOINI, H., PACKER, L., SARIS, N.-E. L. Antioxidant and prooxidant Activities of α -Lipoic Acid and Dihydrolipoic Acid. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2002, 182, 84-90.
7. KAGAN, V. E., SERBINOVA, E. A., FORTE, T., SCITA, G., PACKER, L. Recycling of vitamin E in human low density lipoproteins. *J Lipid Res*, 1992, 33, 385-397.
8. SEN, CH. K., ROY, S., KHANNA, S. Determination of Oxidized and Reduced Lipoic Acid Using High-Performance Liquid Chromatography and Coulometric Detection. *Methods Enzymol*, 1999, 299, 239 -

9. CADENAS, E., PACKER, L. *Handbook of antioxidants. Sekond Edition Revise and Expanded.* HENRIKSEN, E. J. Therapeutic Effects of Lipoic Acid on Hyperglycemia and Insulin Resistance., s. 535 - 547, Dekker, 2002, New York, ISBN: 0-8247-0547-5.
10. TEICHERT, J., PREISS, R. High-performance liquid chromatographic assay for α -lipoic acid and five of its metabolites in human plasma and urine. *J Chromatogr B*, 2002, 769, 269-281.
11. TEICHERT, J., HERMANN, R., RUUS, P., PREISS, R. Plasma Kinetics, Metabolism, and Urinary Excretion of Alpha-Lipoic Acid following Oral Administration in Healthy Volunteers. *J Clin Pharmacol*, 2003, 43, 1257-1267.
12. TEICHERT, J., PREISS, R. HPLC-methods for determinativ of lipoic acid and its reduced form in human plasma. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol*, 1992, 30, 511 -.
13. PROVAZNÍK, K., a kol. *Manuál prevence v lékařské praxi.* Doporučené preventivní postupy v primární péči. Praha: Státní zdravotní ústav, 1998. Dostupné z [www:http://www.zdravcentra.cz/cps/rde/xchg/zc/xsl/3141_3182.html](http://www.zdravcentra.cz/cps/rde/xchg/zc/xsl/3141_3182.html)
14. RACEK, J. a kol. *Klinická biochemie. Druhé, přepracované vydání.* Praha, GALEN, 2006, ISBN 80-7262-324-9.
15. ŠTÍPEK, S. a kol. *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a nemoci.* Praha: Grada Publishing, 2000. ISBN 80-7169-704-4.
16. CADENAS, E., PACKER, L. *Handbook of antioxidants. Sekond Edition Revise and Expanded.* RÖSEN, P., TRITSCHLER, H.-J., PACKER, L. Vascular Complications in Diabetes: Mechanisms and the Influence of Antioxidants., s. 511 - 533, Dekker, 2002, New York, ISBN: 0-8247-0547-5.
17. YI, X., MAEDA, N. α -Lipoic acid Prevents the Increase in Atherosclerosis Induced by Diabetes in Apolipoprotein E-Deficient Mice Fed High-Fat/Low-Cholesterol Diet. *Diabetes*, 2006, 55, 2238-2244.
18. MASOPUST, J. *Patobiochemie buňky.* [on-line]. [cit. duben 2009]. Dostupné z [www: https://www.zdravcentra.cz/cps/rde/xchg/zc/xsl/ 3141_1427.html](https://www.zdravcentra.cz/cps/rde/xchg/zc/xsl/3141_1427.html). Kapitola 6.4.1 Patogeneze aterosklerózy.

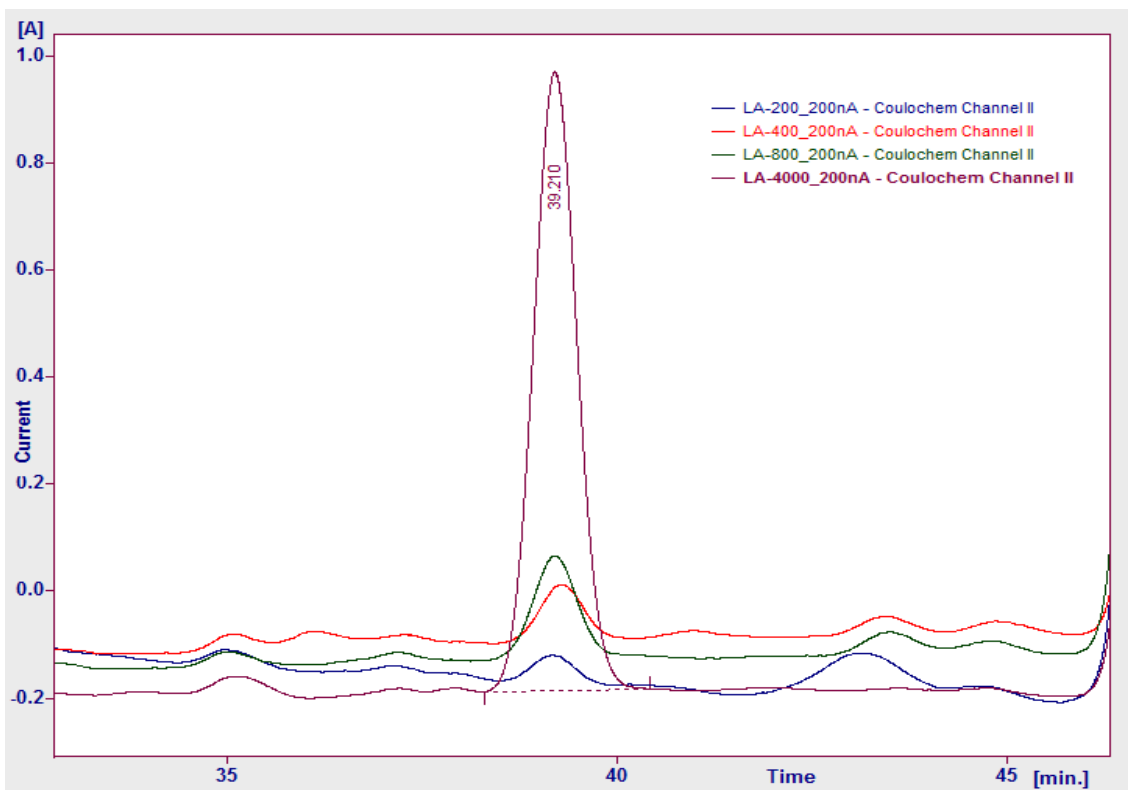
19. STOCKER, R., KEANEY, J. F. Role of oxidative modification in Atherosclerosis. *Physiol Rev*, 2004, No. 84, s. 1381 - 1479. ISSN 0031-9333.
20. GIUGLIANO, D. Dietary antioxidants for cardiovascular prevention. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2000, Vol. 10, s. 38 - 44. ISSN 0939-4753.
21. Dostupné z www: www.woerwagpharma.cz/frame/dia.html.
22. KATAOKA, H., Chromatographic analysis of lipoic acid and related compounds. *J Chromatogr B*, 1998, 717, 247-262.
23. HAJ-YEHIA, A. I., ASSAF, P., NASSAR, T., KATZHENDLER, J. Determination of lipoic acid and dihydrolipoic acid in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection. *J Chromatogr A*, 2000, 870, 381 - 388.
24. WITT, W., RÜSTOW, B. Determination of lipoic acid by precolumn derivatization with monobromobimane and reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B*, 1998, 705, 127 - 131.
25. SATOH, S., TOYO'OKA, T., FUKUSHIMA, T., INAGAKI, S. Simultaneous determination of α -lipoic acid and its reduced form by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr B*, 2007, 854, 109 - 115.
26. TEICHERT, J., PREISS, R. Determination of lipoic acid in human plasma by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J Chromatogr B*, 1995, 672, 277 - 281.
27. TEICHERT, J., PREISS, R. High-Performance Liquid Chromatography Methods for Determination of Lipoic and Dihydrolipoic Acid in Human Plasma. *Methods Enzymol*, 1997, 279, 159 - 166.
28. CHEN, J., a kol. Quantification of lipoic acid in plasma by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *J Chromatogr B*, 2005, 824, 249-257.
29. DURRANI, A., a kol. α -Lipoic acid in dietary supplements: Development and comparison of HPLC-CEAD and HPLC-ESI-MS methods. *J Pharm Biomed An*, 2007, 694-699.

30. Electrochemical Cell Designs for HPLC - Coulometric and Amperometric, ESA, Inc.[on-line]. [cit. duben 2009]. Dostupný z www: http://www.esainc.com/products/HPLC/ED_Detectors/esa_ECcell_designs.html.
31. CHURÁČEK, J. a kol. *Analytické separace látek*. Praha, SNTL, 1990, ISBN 80-03-00569-8.
32. HANSON, N. Q., ECKFELDT, J. H., SCHVWICHTENBERG, K., ARAS, O., TSAI, M. Y. Interlaboratory variation of plasma total homocysteine measurements: results of free successive homocysteine proficiency testing surveys. *Clin Chem*, 2002, 48, 1539 - 1545.

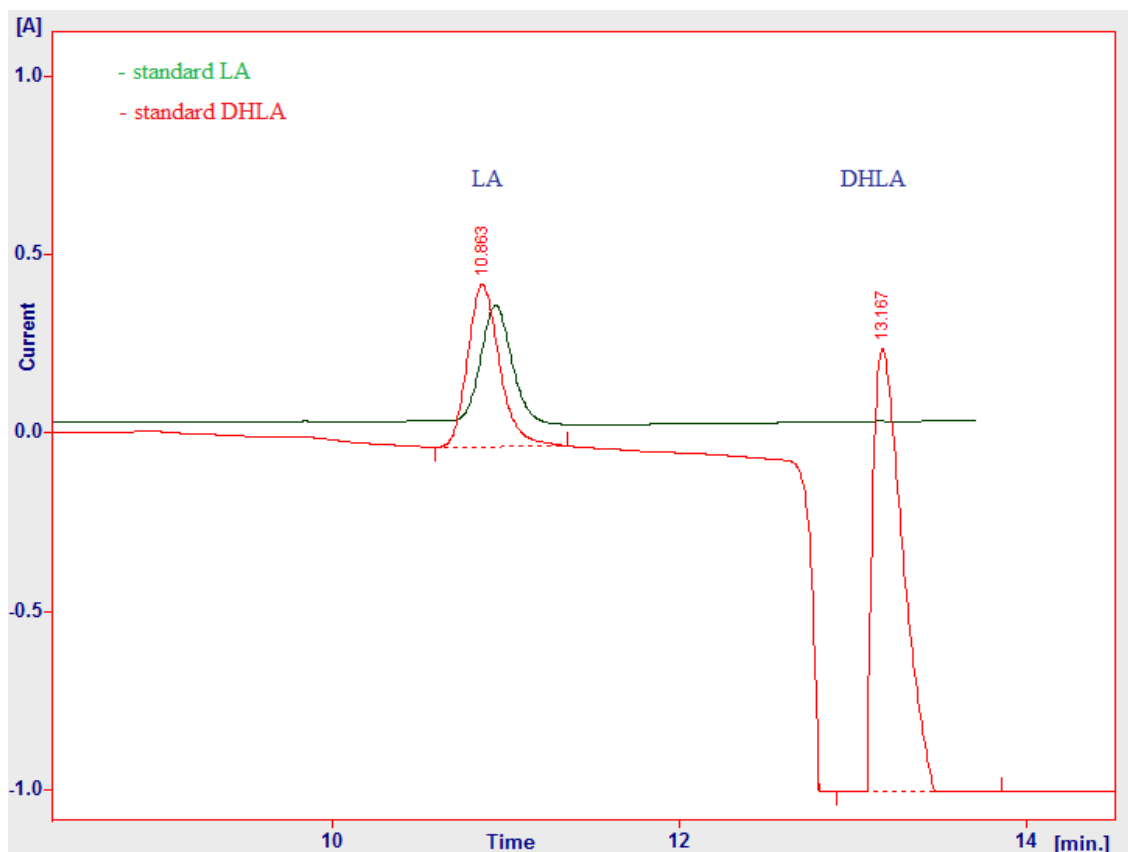
G. PŘÍLOHY



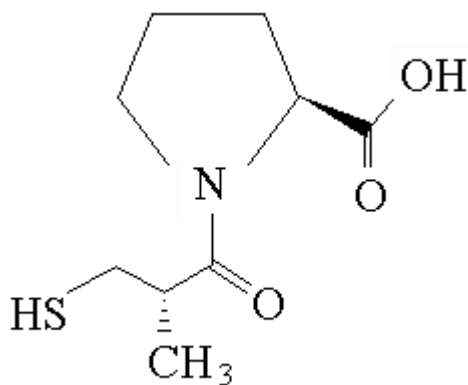
Příloha 1 Záznamy standardů pro kalibraci LA v endogenních koncentracích. (1) LA, která se ani po exogenních přídavicích nemění, redukční činidlo tedy přídávky zredukuje na DHLA. (2) DHLA, která se s přídávky zvětšuje



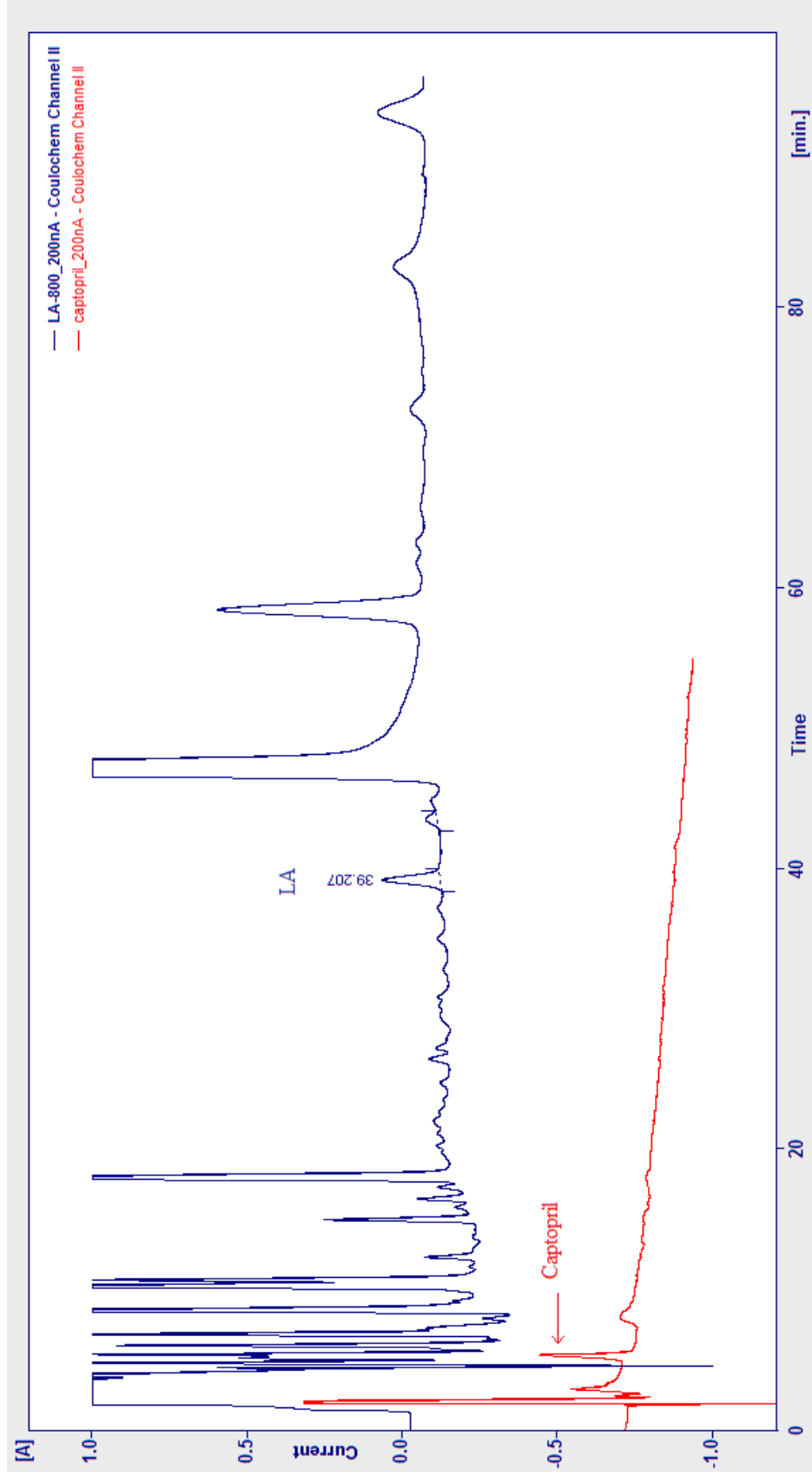
Příloha 2 Záznamy kalibračních standardů LA pro její stanovení v oxidované formě po suplementaci



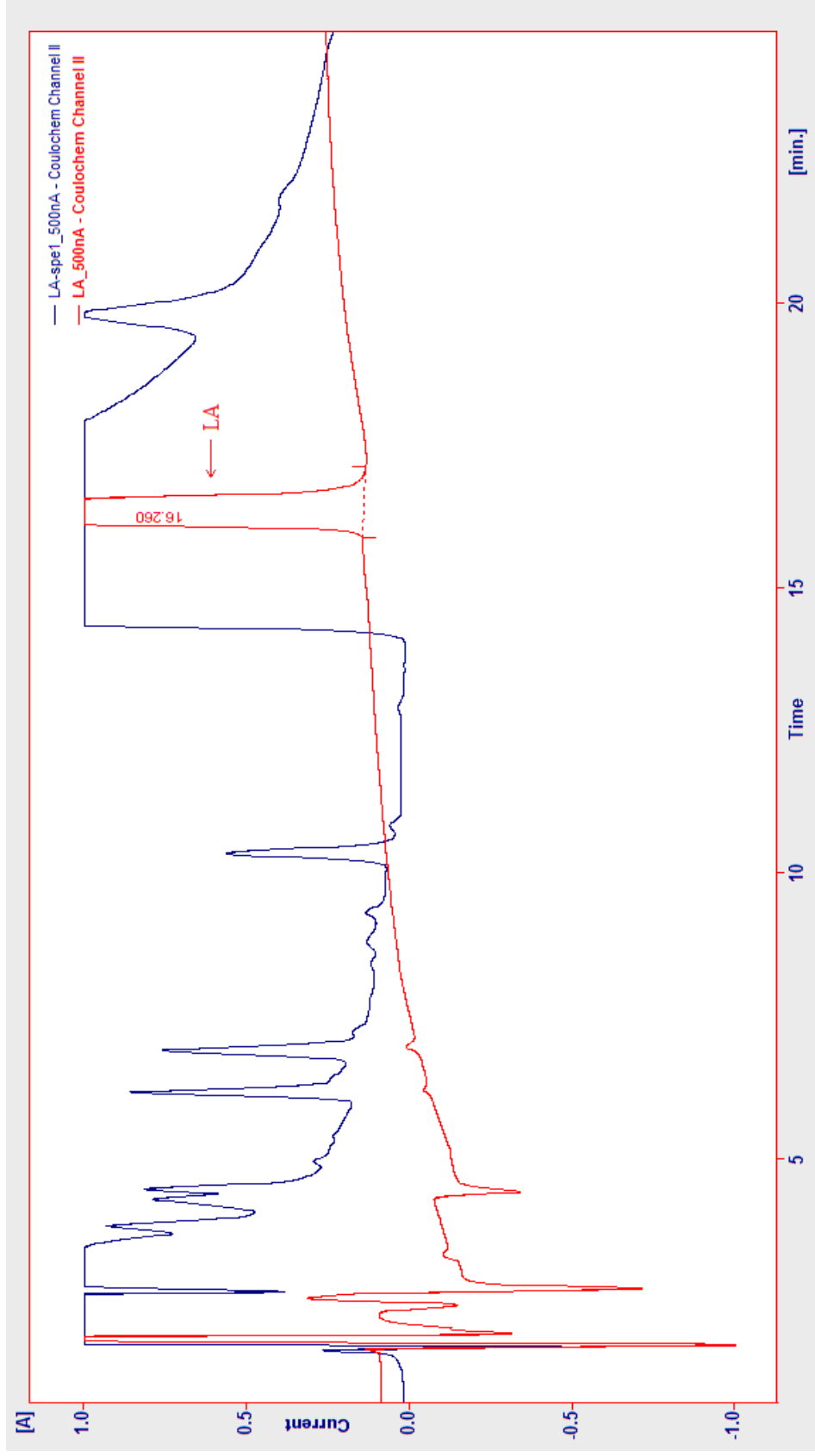
Příloha 3 Záznamy standardních roztoků oxidované i redukované formy. Vzorčky byly měřeny za stejných podmínek při mobilní fázi $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{ACN}$ 60/40 (obj. %). Je patrné, že stanovit vedle sebe obě formy je složité, neboť standardní roztok DHLA částečně zoxidoval na LA. Navíc před elucí DHLA docházelo k těžko vysvětlitelnému pádu základní linie



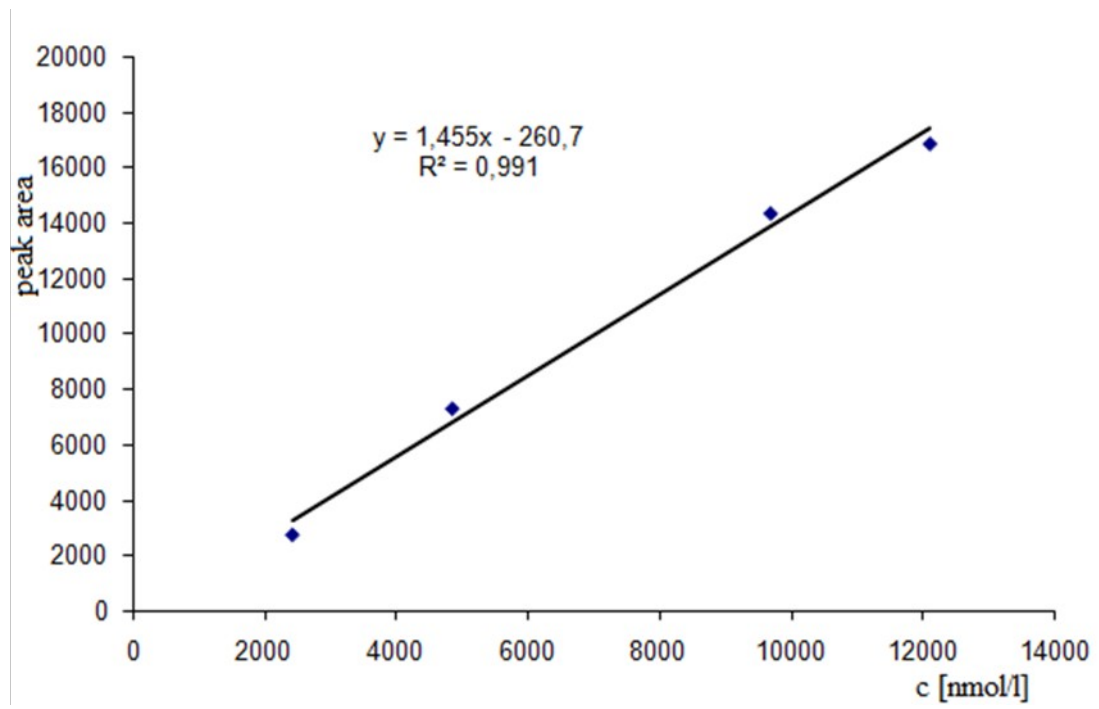
Příloha 4 Strukturální vzorec captoprilu



Příloha 5 Nahore: Celkový záznam vzorku. Na začátku je patrné velké množství interferujících piků. V čase 39,207 eluuje LA
Dole: Záznam analýzy captoprilu, ze kterého je patrné, že eluuje v oblasti, kde nemůže být spatřen



Příloha 6 Pokus s SPE extrakcí. Ze záznamu vzorku po SPE (modře) je patrné podle standardu (červeně), ve kterém čase by měla eluovat LA, analýza byla provedena při citlivosti 500 nA a s mobilní fází o složení $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{ACN}$ 65/35 (obj. %)



Příloha 7 Graf kalibrační křivky vodných standardů po suplementaci LA