

UNIVERZITA PARDUBICE  
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2017

Bc. Tereza Müllerová

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická  
Katedra biologických a biochemických věd

**Vliv kyseliny lipoové na krevní buňky**

Bc. Tereza Müllerová

Diplomová práce

2017

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2016/2017

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Tereza Müllerová**  
Osobní číslo: **C15621**  
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Bioanalytik**  
Název tématu: **Vliv kyseliny lipoové na krevní buňky**  
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

### Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

- 1) Seznamte se s literárními údaji o vlivu kyseliny lipoové na normální a nádorové buňky.
- 2) Stanovte cytotoxicitu kyseliny lipoové pomocí testu vylučování trypanové modři. Jako model využijte lidské erythrocyty a lidské mononukleární buňky izolované z periferní krve (PBMC).
- 3) Pokuste se pomocí metody HPLC s elektrochemickou detekcí blíže určit vztah mezi hladinou kyseliny lipoové v erythrocytech a její terapeutickou dávkou.
- 4) Výsledky porovnejte s aktuální dostupnou literaturou.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

**Podle pokynů vedoucího diplomové práce.**

Vedoucí diplomové práce: **Mgr. Pavla Královcová, Ph.D.**

Katedra biologických a biochemických věd

Konzultant diplomové práce: **RNDr. Karel Královec, Ph.D.**

Katedra biologických a biochemických věd

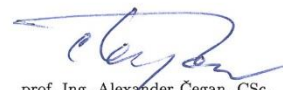
Datum zadání diplomové práce: **28. listopadu 2016**

Termín odevzdání diplomové práce: **12. května 2017**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.  
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2017

**Prohlašuji:**

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena 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.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 7. 5. 2017

.....  
Tereza Müllerová

## **Poděkování**

Ráda bych touto formou poděkovala vedoucí své diplomové práce, paní Mgr. Pavle Královcové, Ph.D., a také konzultantovi práce, panu RNDr. Karlu Královcovi, Ph.D., za odborné vedení při zpracování této diplomové práce, za milý přístup, ochotu, cenné rady a připomínky. Dále také děkuji všem mým blízkým za trpělivost a podporu při studiu.

## **ANOTACE**

Kyselina lipoová je přirozeně se vyskytující osmiuhlíkatá sloučenina. Ve své molekule má dva atomy síry a jedno chirální centrum. Vyskytuje se ve dvou izomerech jako S-lipoová a R-lipoová kyselina. Její redukovanou formou je kyselina dihydrolipoová. Kyselina lipoová má silné antioxidační účinky a terapeuticky se podává například při diabetu.

Ve vysokých koncentracích dokáže kyselina lipoová vyvolat apoptózu nádorových buněk, a proto se o ní uvažuje jako o protinádorovém léčivu. Kromě apoptózy nádorových buněk ale vyvolává apoptózu i u nenádorových buněk a tím může vyvolat poškození ledvin a jiných orgánů. Cílem této práce bylo prozkoumat působení kyseliny lipoové na krevní buňky. Důvodem bylo zejména literárně podložené podezření, že způsobuje poškození erytrocytů.

Zjistili jsme, že kyselina lipoová v koncentracích využívaných k léčbě diabetu nepoškozuje erytrocyty. Ve vysokých koncentracích, které by se podávaly proti nádorovým buňkám, způsobuje úbytek erytrocytů, což by mohlo vést k anémii.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

kyselina lipoová, erytrocyty, cytotoxicita, eryptóza, vysokoúčinná kapalinová chromatografie

## **TITLE**

The influence of lipoic acid on blood cells

## **ANNOTATION**

Lipoic acid is a naturally occurring eight carbon compound. It has two sulphur atoms and one chiral center in its molecule. It exists as two isomers, S-lipoic and R-lipoic acid. Its reduced form is called dihydrolipoic acid. Lipoic acid has strong antioxidant effects and it is therapeutically used for example in diabetes.

At high concentrations, lipoic acid is able to induce tumor cell apoptosis and it is therefore considered to be an anticancer drug. Except tumor cell apoptosis, it also induces apoptosis in non-tumor cells and this may cause damage to the kidneys and other organs. The aim of this thesis was to examine the effect of lipoic acid on blood cells. The reason for this examination was the suspicion from the literature that lipoic acid causes damage of erythrocytes.

We have found that lipoic acid at the concentrations used in the treatment of diabetes does not damage the erythrocytes. At high concentrations that would be used against tumor cells, it causes a decrease in erythrocytes, which could lead to anemia.

## **KEYWORDS**

lipoic acid, erythrocytes, cytotoxicity, eryptosis, high-performance liquid chromatography



# OBSAH

<b>SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK .....</b>	<b>11</b>
<b>SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK.....</b>	<b>12</b>
<b>ÚVOD .....</b>	<b>13</b>
<b>1 TEORETICKÁ ČÁST.....</b>	<b>14</b>
1.1 KYSELINA LIPOOVÁ .....	14
1.1.1 Základní informace.....	14
1.1.2 Metabolismus kyseliny lipoové.....	16
1.1.3 Antioxidační vlastnosti kyseliny lipoové.....	17
1.1.4 Chelatační vlastnosti kyseliny lipoové .....	19
1.1.5 Účinek kyseliny lipoové na metabolismus glukózy .....	19
1.2 KYSELINA LIPOOVÁ A ERYTROCITY.....	22
1.2.1 Role erytrocytů v redukci kyseliny lipoové .....	22
1.2.2 Lidské erytrocyty jako testovací model terapeutického efektu kyseliny lipoové ....	23
1.2.3 Vliv kyseliny lipoové na eryptózu.....	25
1.2.4 Hladiny kyseliny lipoové v erytrocytech .....	27
1.3 STANOVENÍ KYSELINY LIPOOVÉ.....	28
1.3.1 Metody stanovení .....	28
1.3.2 Suplementace kyselinou lipoovou.....	29
1.3.3 Hladiny kyseliny lipoové v krevní plazmě .....	30
1.4 NEŽÁDOUCÍ ÚČINKY KYSELINY LIPOOVÉ .....	33
1.5 VLIV KYSELINY LIPOOVÉ NA DALŠÍ TYPY BUNĚK.....	34
1.5.1 Lymfocyty.....	34
1.5.2 Endoteliální buňky.....	34
1.5.3 Nádorové buňky .....	35
<b>2 CÍLE PRÁCE .....</b>	<b>37</b>
<b>3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....</b>	<b>38</b>

3.1 SEZNAM PŘÍSTROJŮ A POMŮCEK .....	38
3.2 SEZNAM CHEMIKÁLÍ .....	40
3.3 STANOVENÍ VIABILITY BUNĚK POMOCÍ TRYPANOVÉ MODŘI .....	41
3.3.1 Princip metody .....	41
3.3.2 Pracovní postup .....	41
3.4 PŘÍPRAVA KULTUR KREVNÍCH BUNĚK .....	42
3.4.1 ERYTROCITY .....	42
3.4.1.1 Použité roztoky .....	42
3.4.1.2 Pracovní postup .....	43
3.4.2 MONONUKLEÁRNÍ BUŇKY .....	45
3.4.2.1 Použité roztoky .....	45
3.4.2.2 Pracovní postup .....	45
3.5 STANOVENÍ KYSELINY LIPOOVÉ POMOCÍ HPLC/ED .....	47
3.5.1 Použité roztoky .....	47
3.5.2 Pracovní postup .....	48
<b>4 VÝSLEDKY .....</b>	<b>51</b>
4.1 VLIV DMSO NA ERYTROCITY .....	51
4.2 VLIV KYSELINY LIPOOVÉ NA ERYTROCITY .....	52
4.2.1 Vliv nízkých koncentrací kyseliny lipoové na viabilitu erytrocytů .....	52
4.2.2 Vliv nízkých koncentrací kyseliny lipoové na počet erytrocytů .....	53
4.2.3 Vliv vysokých koncentrací kyseliny lipoové na viabilitu erytrocytů .....	56
4.2.4 Vliv vysokých koncentrací kyseliny lipoové na počet erytrocytů .....	58
4.3 VLIV KYSELINY LIPOOVÉ NA MONONUKLEÁRNÍ BUŇKY .....	61
4.4 STANOVENÍ KYSELINY LIPOOVÉ V KREVNÍ PLAZMĚ .....	64
4.4.1 Kalibrace .....	64
4.4.2 Koncentrace kyseliny lipoové po suplementaci .....	65
<b>5 DISKUSE .....</b>	<b>67</b>

<b>6 ZÁVĚR .....</b>	<b>72</b>
<b>7 CITOVANÉ ZDROJE.....</b>	<b>73</b>

## SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1: Kyselina lipoová, dihydrolipoová a lipoyllysin .....	14
Obrázek 2: Nejčastější metabolity kyseliny lipoové .....	16
Obrázek 3: Hlavní cesty přeměny redoxního páru LA/DHLA .....	18
Obrázek 4: Schéma vychytávání glukózy transportérem GLUT4 .....	20
Obrázek 5: Shrnutí funkcí kyseliny lipoové .....	21
Obrázek 6: Schéma Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> ATPázy .....	24
Obrázek 7: Separace mononukleárních buněk pomocí Histopaque .....	46
Obrázek 8: Erytrocyty pozorované pod mikroskopem .....	56
Obrázek 9: Mononukleární buňky pozorované pod mikroskopem .....	63
Obrázek 10: Chromatografický záznam kalibračních standardů LA .....	64
Obrázek 11: Chromatografický záznam vzorků 1 hodinu po suplementaci 500 mg LA .....	66
Tabulka 1: Přehled metod stanovení a hladin kyseliny lipoové v lidské plazmě .....	32
Tabulka 2: Nastavení elektrochemického detektoru Coulochem III.....	50
Graf 1: Vliv rozpouštědla DMSO na viabilitu erytrocytů .....	51
Graf 2: Vliv nízkých koncentrací LA na viabilitu erytrocytů (24 hod.) .....	52
Graf 3: Vliv nízkých koncentrací LA na viabilitu erytrocytů (48 hod.) .....	53
Graf 4: Vliv nízkých koncentrací LA na počty erytrocytů (24 hod.) .....	54
Graf 5: Vliv nízkých koncentrací LA na počty erytrocytů (48 hod.) .....	55
Graf 6: Vliv vysokých koncentrací LA na viabilitu erytrocytů (24 hod.) .....	57
Graf 7: Vliv vysokých koncentrací LA na viabilitu erytrocytů (48 hod.) .....	58
Graf 8: Vliv vysokých koncentrací LA na počty erytrocytů (24 hod.) .....	59
Graf 9: Vliv vysokých koncentrací LA na počty erytrocytů (48 hod.) .....	60
Graf 10: Vliv LA na viabilitu mononukleárních buněk (24 hod.) .....	61
Graf 11: Vliv LA na počty mononukleárních buněk (24 hod.) .....	62
Graf 12: Kalibrační křivka kyseliny lipoové v koncentračním rozmezí 0 – 20 μmol/l.....	65

## SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

Acetyl-CoA	Acetylkoenzym A (z angl. Acetyl Coenzyme A)
ATP	Adenosintrifosfát (z angl. Adenosine Triphosphate)
DHLA	Dihydrolipoová kyselina (z angl. Dihydrolipoic Acid)
DMSO	Dimethylsulfoxid
ED	Elektrochemický detektor
EDTA	Kyselina ethylendiamintetraoctová (z angl. Ethylenediaminetetraacetic Acid)
FD	Fluorescenční detektor
GC	Plynová chromatografie (z angl. Gas Chromatography)
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z angl. High-Performance Liquid Chromatography)
LA	Lipoová kyselina (z angl. Lipoic Acid)
MS	Hmotnostní spektrometrie (z angl. Mass Spectrometry)
Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> ATPáza	Sodno-draselná pumpa
NAD <sup>+</sup> /NADH	Nikotinamidadenindinukleotid oxidovaná nebo redukováná forma
NADP <sup>+</sup> /NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidfosfát oxidovaná nebo redukováná forma
PBS	Fosfátový pufr (z angl. Phosphate Buffered Saline)
RNS	Reaktivní formy dusíku (z angl. Reactive Nitrogen Species)
ROS	Reaktivní formy kyslíku (z angl. Reactive Oxygen Species)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute médium
SPE	Extrakce pevnou fází (z angl. Solid-Phase Extraction)

## ÚVOD

Kyselina lipoová je přirozeně se vyskytující osmiuhlíkatá sloučenina, která ve své molekule obsahuje dva atomy síry a jedno chirální centrum. Může se vyskytovat v oxidované formě jako kyselina lipoová nebo v redukované formě, a to jako kyselina dihydrolipoová. Můžeme ji získat z potravy nebo ve formě potravinových doplňků.

Kyselina lipoová je významným antioxidačním činidlem a svými účinky chrání organismus před oxidačním stresem a dokáže obnovovat i hladiny jiných antioxidantů. Má výrazný vliv na metabolismus glukózy, a proto se podává diabetickým pacientům k prevenci diabetické neuropatie. Kromě diabetu se užívá jako podpůrné léčivo u mnoha dalších onemocnění. Protože má schopnost vyvolávat buněčnou apoptózu, zkoumá se i její vliv na rakovinné buněčné linie, aby mohla být případně využívána jako protinádorové léčivo.

Kyselina lipoová významně působí na buňky, které ji rychle vychytávají a redukují na kyselinu dihydrolipoovou za účasti různých enzymů. Výrazné působení kyseliny lipoové bylo zaznamenáno u krevních buněk, protože po suplementaci přechází kyselina lipoová rychle do krevní plazmy. U erytrocytů jsou dle některých studií určité koncentrace kyseliny lipoové schopné vyvolat i jejich programovanou buněčnou smrt – eryptózu.

Hlavním cílem této práce je prověřit účinky kyseliny lipoové na krevní buňky, především erytrocyty, a zjistit, jaké koncentrace kyseliny lipoové jsou pro ně již toxické. V návaznosti na výsledky předchozí diplomové práce potom zhodnotit, zda jsou zjištěné protinádorové koncentrace z hlediska vlivu na krevní buňky bezpečné. Dalším cílem bylo pokusit se změřit hladiny volné kyseliny lipoové v plazmě a erytrocytech po suplementaci dávkou běžnou při léčbě diabetu.

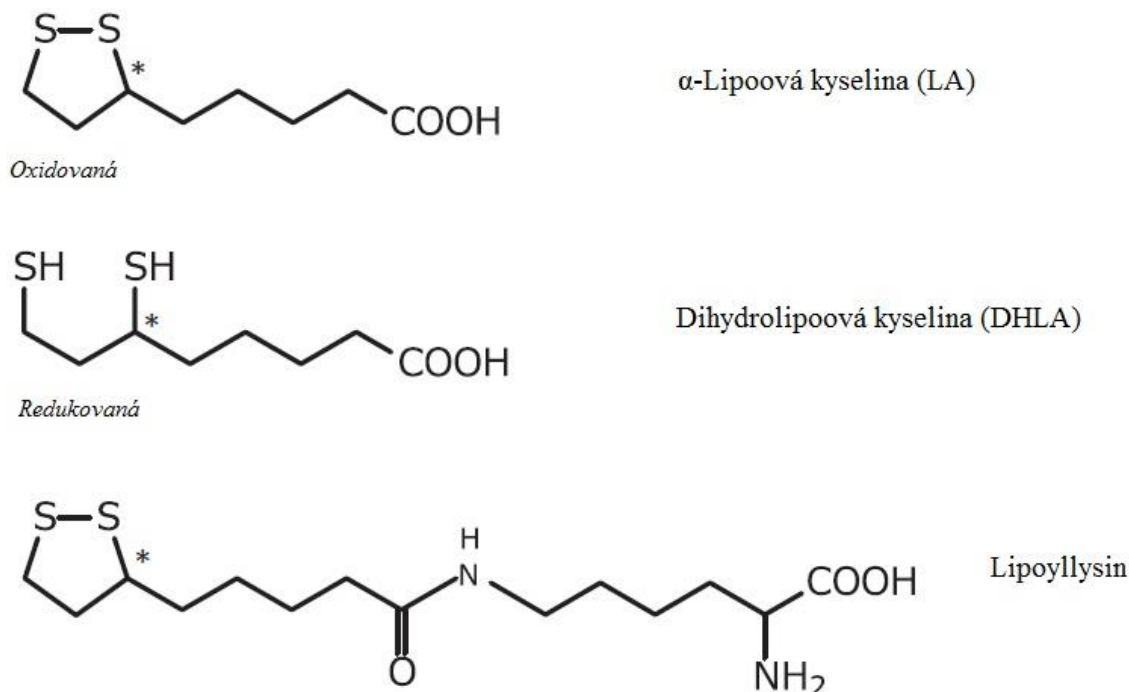
# 1 TEORETICKÁ ČÁST

## 1.1 KYSELINA LIPOOVÁ

### 1.1.1 Základní informace

Kyselina lipoová, nebo také thiooktová, je heterocyklická, osmiuhlíkatá sloučenina, která ve svém cyklu obsahuje dva atomy síry a jedno chirální centrum na uhlíku C3, díky němuž může tvořit dva optické izomery, R-lipoovou a S-lipoovou kyselinu. R-lipoová kyselina tvoří hlavní podíl biologicky aktivní formy kyseliny lipoové. Pro terapeutické účely se většinou využívá racemická směs S- a R-izomeru [1, 2].

Kyselina lipoová se může vyskytovat buď v oxidované formě jako kyselina  $\alpha$ -lipoová (nebo pouze lipoová, LA), nebo v redukované formě jako kyselina dihydrolipoová (DHLA), která obsahuje dvě thiolové skupiny -SH (obrázek 1). Především dihydrolipoová, ale částečně i lipoová kyselina, je významný antioxidant, který reaguje s reaktivními formami kyslíku. Kromě svých antioxidačních vlastností působí kyselina lipoová také antimutagenně a antikarcinogenně [1, 2].



**Obrázek 1:** Kyselina lipoová, dihydrolipoová a lipoyllysin [upraveno podle 2]

Kyselina lipoová je přítomna ve všech druzích eukaryotických i prokaryotických buněk. R-lipoovou kyselinu můžeme získat z rostlinných a živočišných tkání, kde se vyskytuje přirozeně, avšak ne příliš hojně. R-forma LA vzniká endogenně při oxidativní dekarboxylaci  $\alpha$ -ketokyselin. Detekována může být ve vazbě na proteiny, například ve formě lipoyllysinu (obrázek 1), volná bývá detekovatelná pouze po terapeutické aplikaci [1, 3, 4].

Člověk dokáže ve velmi malém množství syntetizovat LA *de novo* z mastných kyselin a cysteinu, který obsahuje síru. Je to však velmi malé množství, takže hlavním zdrojem LA musí být potrava. Nejvýznamnější rostlinné zdroje LA jsou špenát, brokolice a rajčata, ze živočišných tkání jsou nejbohatšími zdroji ledviny, játra a srdce. Pokud je LA přijímána v potravě, hromadí se v některých tkáních a pomocí mitochondriální dihydrolipoamiddehydrogenázy je její značná část převedena na DHLA. Mechanismy redukce LA jsou vysoce tkáňově specifické [1, 2, 3, 4].

Kyselina lipoová byla poprvé objevena po roce 1940 jako růstový faktor některých mikroorganismů a bylo také prokázáno, že ji mikroorganismy potřebují k oxidaci pyruvátu. Ale až v roce 1951 byla Lesterem Reedem a jeho kolegy prvně vyizolována z hovězích jater a následně chemicky identifikována jako 1,2-dithiolan-3-pentanová kyselina [5, 6].

V pevném skupenství je to relativně stabilní látka žluté barvy, ale má poměrně nízký bod tání, 47,5 °C. Pokud je rozpuštěna v neutrálním roztoku, tak při zahřátí nad bod tání nebo při vystavení světelnému záření polymeruje. Kyselina lipoová má jak hydrofilní, tak hydrofobní vlastnosti a je rozpustná ve vodě i v tucích [1, 2].

Vyskytuje se u rostlin a zvířat v buněčných membránách i v cytosolu. V mitochondriích byla nalezena vázaná na podjednotku E2 a působí zde jako koenzym pro mitochondriální bioenergetické enzymy, jako jsou pyruvátdehydrogenáza a  $\alpha$ -ketoglutarátdehydrogenáza. Je schopná prostupovat přes hematoencefalickou bariéru a její buněčný transport je pravděpodobně umožněn více různými systémy. Redukce LA na DHLA je v buňkách prováděna pomocí nikotinamidadeninukleotidfosfát (NADPH) řídících enzymů, thioredoxinreduktáz, lipoamiddehydrogenáz a glutathionreduktáz [1, 2, 3, 5].

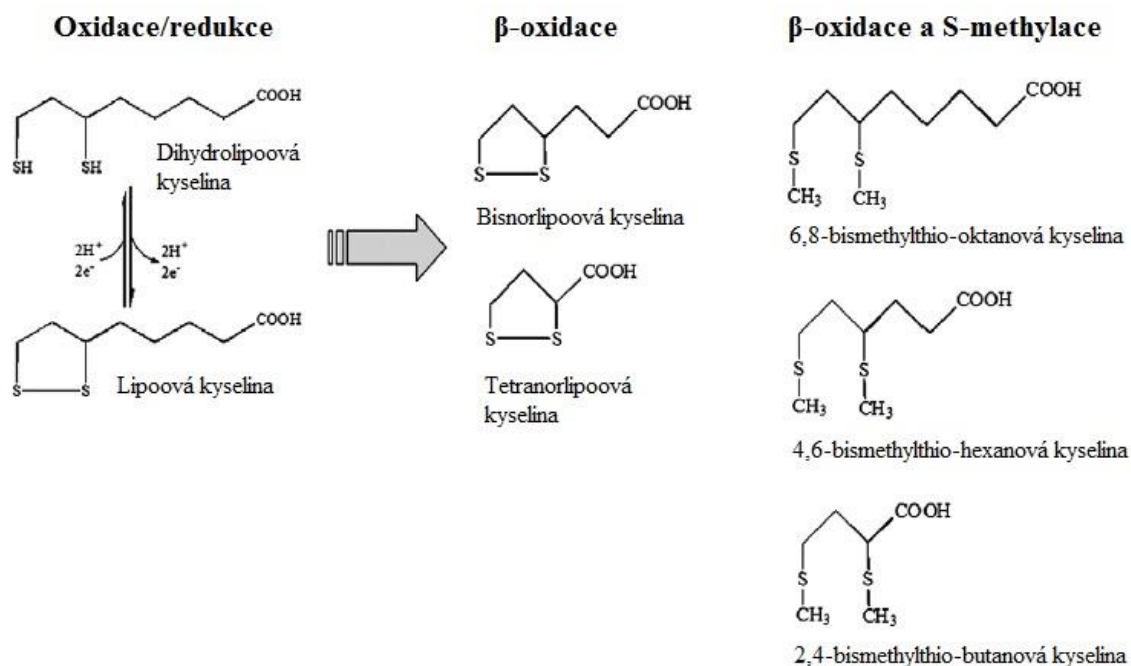
U lidí se LA podílí na tvorbě energie tím, že je součástí několika dehydrogenáz 2-oxokyselin. Amidovou vazbou je R-izomer LA vázán na lysinové zbytky multienzymového komplexu dehydrogenáz 2-oxokyselin a působí jako kofaktor. LA váže a přenáší acylové skupiny v rámci enzymového komplexu, přičemž se LA redukuje na DHLA, která je následně



reoxidována pomocí lipoamiddehydrogenáz. Při tomto procesu se tvoří ještě redukovaný nikotinamidadeninukleotid (NADH). LA a DHLA mohou působit jako redoxní pár přenášející elektrony ze substrátu dehydrogenázy na  $\text{NAD}^+$  [6, 7].

### 1.1.2 Metabolismus kyseliny lipoové

Je prokázáno, že metabolismus LA a DHLA je poměrně rychlý. Po požití proběhne transport z gastrointestinálního traktu do krevní plazmy, který je následován zhruba stejně rychlým clearance, čili očištěním plazmy od LA, což je způsobeno rychlým vychytáváním LA tkáněmi, glomerulární filtrací a vylučováním ledvinami. Orgány, které LA vychytávají a ve kterých se dočasně hromadí, jsou například játra, mozek, srdce a kosterní svaly. Primárně je LA metabolizována v játrech procesem mitochondriální  $\beta$ -oxidace. Bylo nalezeno celkem 12 jejích metabolitů. Cirkulující metabolity jsou podrobeny redukci 1,2-dithiolanového kruhu a následně probíhá S-methylace. Jako hlavní metabolity kyseliny lipoové byly stanoveny kyselina bisnorlipoová, kyselina tetranorlipoová, kyselina  $\beta$ -hydroxy-bisnorlipoová a bis-methylované merkaptoderiváty těchto sloučenin (obrázek 2). Všechny tyto metabolity jsou následně vylučovány převážně močí [1, 2, 7, 8].



**Obrázek 2:** Nejčastější metabolity kyseliny lipoové [upraveno podle 7]

### 1.1.3 Antioxidační vlastnosti kyseliny lipoové

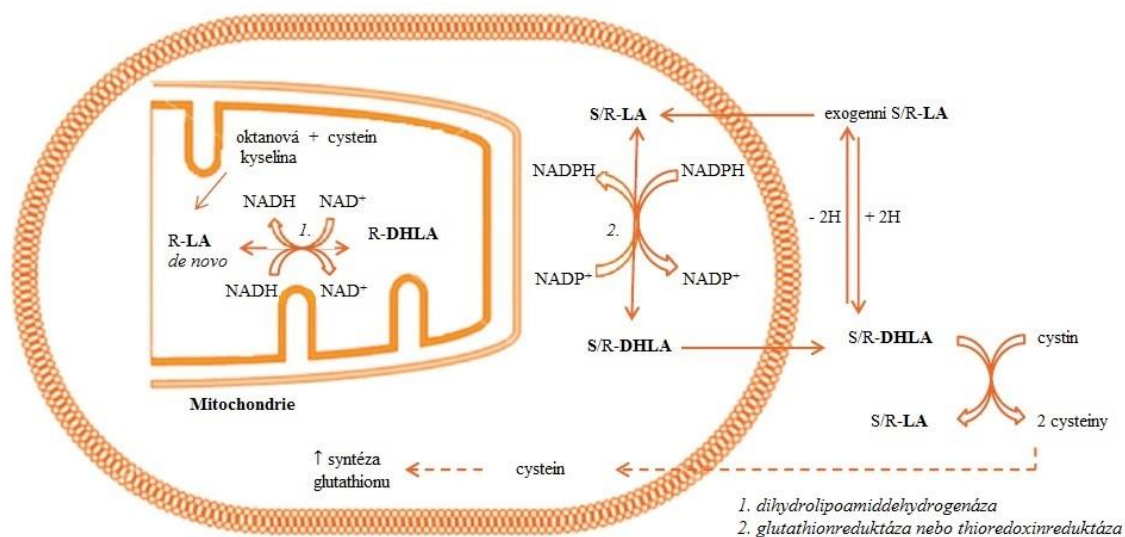
Všechny aerobní organismy ke svému přežití potřebují molekulární kyslík. Ten je během normálního metabolismu v mitochondriích, peroxisomech a různých enzymových systémech částečně redukován na superoxidový aniont a peroxid vodíku. Peroxid vodíku je sice slabší oxidační činidlo než superoxidový aniont, ale mohou se z něho pak tvořit reaktivnější a toxické metabolity kyslíku, jako jsou například kyselina chlorná a hydroxylový radikál. Tyto látky nazýváme reaktivní formy kyslíku (ROS). Reaktivní formy dusíku (RNS) jsou toxické oxidační látky, které vznikají z oxidu dusnatého při jeho zvýšené tvorbě. Některé z nich se tvoří reakcí radikálu oxidu dusnatého se superoxidovým aniontem nebo molekulárním kyslíkem. Jsou to například peroxyinitrit, nitroxyl a oxid dusičitý [8].

Vysoké hladiny ROS a RNS mohou poškozovat buněčné makromolekuly, jako jsou lipidy, proteiny a DNA. Mohou se zapojovat do patogeneze a progresu chronických zánětlivých onemocnění, aterosklerózy, rakoviny, diabetu a procesu stárnutí. Proti účinkům volných radikálů působí antioxidační obranný systém, do kterého patří enzymatické lapače – superoxidodismutáza, kataláza, glutathionperoxidáza, a neenzymatické nízkomolekulární látky – glutathion a thioredoxin. Oxidační stres je tedy jakási nerovnováha mezi produkcí oxidačních činidel a antioxidační kapacitou buňky [8].

Kyselina lipoová a dihydrolipoová působí jako silný redoxní pár s redoxním potenciálem -320 mV. Tento potenciál má nižší hodnotu než redoxní potenciál páru glutathion a oxidovaný glutathion, který má hodnotu -240 mV. Z toho vyplývá, že DHLA je silnějším redukčním činidlem než glutathion a více chrání před oxidativním poškozením. Antioxidační účinky mají obě formy kyseliny lipoové, oxidovaná i redukovaná. Účinnější než ostatní antioxidanty je LA také proto, že na rozdíl od nich je rozpustná jak ve vodě, tak v tucích, což je její jedinečná vlastnost. Během zhasení volných radikálů není DHLA zničena, jak se tomu stává například u kyseliny askorbové, ale může být recyklována z LA. Díky všem těmto vlastnostem ji můžeme nazývat „univerzálním antioxidantem“ [2, 6].

Kyselina lipoová se využívá jako účinný terapeutický antioxidant. Po požití je snadno vstřebána do buněk a tkání a může zde působit ve vodném prostředí i v prostředí lipidových membrán, na rozdíl od vitamínu C, který projevuje své antioxidační vlastnosti pouze ve vodném prostředí, a vitamínu E, který naopak pouze v tucích. Dále má LA nízkou toxicitu a je také schopna interakce s jinými antioxidanty. Například endogenní antioxidanty jako je glutathion a vitamíny C a E je schopná regenerovat. Vitamín E může být regenerován

přímou cestou nebo nepřímo přes vitamín C nebo koenzym Q10, který je také zpětně redukován za účasti LA. U glutathionu navíc LA zvyšuje jeho intracelulární hodnoty tím, že indukuje vychytávání cysteinu (obrázek 3). Glutathion ke své syntéze totiž potřebuje síru, kterou obsahuje právě cystein. V extracelulárním prostoru DHLA redukuje cystin na cystein, který poté prostoupí do buněk a účastní se syntézy glutathionu [1, 8, 9].



**Obrázek 3:** Hlavní cesty přeměny redoxního páru LA/DHLA [upraveno podle 2]

LA může ve své oxidované i redukované formě přímo vychytávat a zhaset reaktivní formy kyslíku i dusíku. LA působí proti hydroxylovým radikálům, kyselině chlorné nebo singletovému kyslíku, DHLA má silnější antioxidační vlastnosti a působí proti peroxidovým a peroxylovým radikálům, čímž brání peroxidaci proteinů. Je zajímavé, že přímo na peroxid vodíku nepůsobí ani jedna forma LA. Suplementace kyselinou lipoovou snižuje oxidační stres a obnovuje snížené hladiny ostatních antioxidantů [1, 2, 8].

*In vitro* byly však nalezeny i prooxidační vlastnosti kyseliny lipoové. Nejspíše obě formy, LA i DHLA, reagují s volným nebo hemovým železem. DHLA při poměrně nízké koncentraci je schopna urychlit produkci na železu závislých hydroxylových radikálů a peroxidaci lipidů v lipozomech. Děje se to pravděpodobně proto, že redukuje  $Fe^{3+}$  ionty na  $Fe^{2+}$ . Tento prooxidační proces může být inhibován LA. Kromě redukčních účinků na ionty železa je DHLA schopná generovat i volné radikály obsahující síru, které mohou následně poškozovat určité proteiny. Je však možné, že tyto jednoelektronové redukce

přechodných kovů nastávají nepřímo při reakcích, kdy se DHLA podílí na recyklaci jiných antioxidantů, například kyseliny askorbové [8, 10].

#### 1.1.4 Chelatační vlastnosti kyseliny lipoové

Mezi další významné účinky kyseliny lipoové patří její chelatační vlastnosti. V roztocích tvoří stabilní komplexy s přechodnými kovy. Váže dvojmocné ionty toxických těžkých kovů *in vivo* i *in vitro*. Například při otravě kadmíem nebo rtuťí jim LA brání ve tvorbě volných radikálů. R-izomer a racemická směs LA jsou ve tvorbě chelátových komplexů účinnější než S-izomer [2, 9, 10].

Opět existuje rozdíl mezi oxidovanou a redukovanou formou kyseliny lipoové, LA tvoří stabilní komplexy přednostně s ionty  $Mn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$  a  $Fe^{2+}$ , ale  $Fe^{3+}$  vázat nemůže. DHLA naopak váže  $Fe^{2+}$  i  $Fe^{3+}$ , komplex s  $Fe^{3+}$  je výrazně stabilnější. Jako další chelatuje ještě  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$  a  $Hg^{2+}$ . DHLA pomáhá působit proti rozvoji Alzheimerovy choroby, když v mozku chelatuje ionty mědi a železa a tím snižuje poškození způsobované volnými radikály. DHLA obecně tvoří komplexy s přechodnými kovy v prostředích, kde se tyto kovy akumulují, a zmírňuje tak radikálové reakce jimi katalyzované [7, 8, 9, 10].

#### 1.1.5 Účinek kyseliny lipoové na metabolismus glukózy

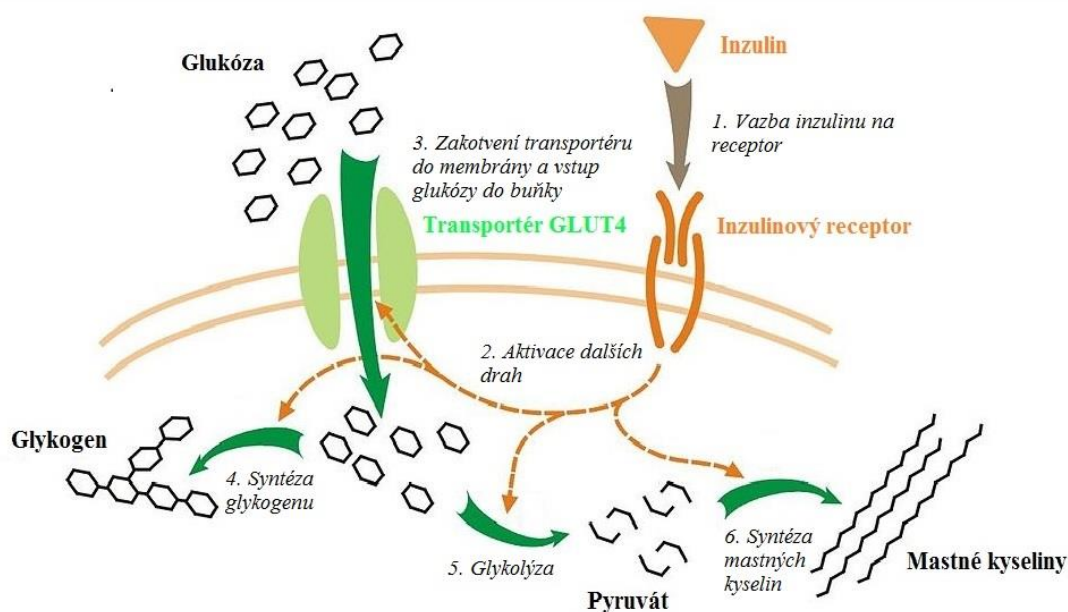
Při špatně léčeném diabetu dochází k hyperglykémii, která následně způsobuje oxidační stres, při němž dochází k nadměrnému uvolňování volných kyslíkových radikálů v mitochondriích. Volné kyslíkové radikály potom aktivují různé intracelulární cesty vedoucí k neuronálnímu a endoteliálnímu poškození [1].

Bylo také prokázáno, že nadměrný oxidační stres v endoteliálních buňkách zvyšuje úroveň prozánětlivých cytokinů, jako je interleukin- $1\beta$  a tumor nekrotizující faktor  $\alpha$ , a zprostředkovává tak degradaci inzulínových receptorů [1].

Kyselina lipoová má schopnost snižovat zvýšené hladiny glukózy u zvířecích modelů i u lidí s onemocněním *diabetes mellitus* druhého typu, kdy působí proti inzulínové rezistenci a zlepšuje metabolismus glukózy na perifériích. LA totiž zlepšuje vychytávání glukózy svalovými tkáněmi, oběma druhy – citlivými na inzulín i diabetickými inzulín-rezistentními

svalovými tkáněmi. Zvýšení příjmu glukózy je doprovázeno rychlou translokací glukózových transportérů GLUT4, nacházejících se v kosterním svalstvu, z vnitřní membrány do plazmatické membrány. Transportéry GLUT4 pak ve zvýšené míře vycytávají glukózu a snižují tím její koncentraci v krvi (obrázek 4) [1, 2, 6, 8].

Terapeuticky podávaná LA má podobné účinky jako inzulin, tudíž má za následek zvýšení fosforylace tyrosinu na inzulinovém receptoru. Ovlivnění inzulinových signálních drah tak může probíhat buď přímo, nebo nepřímo přes indukci intracelulárních ROS [2].



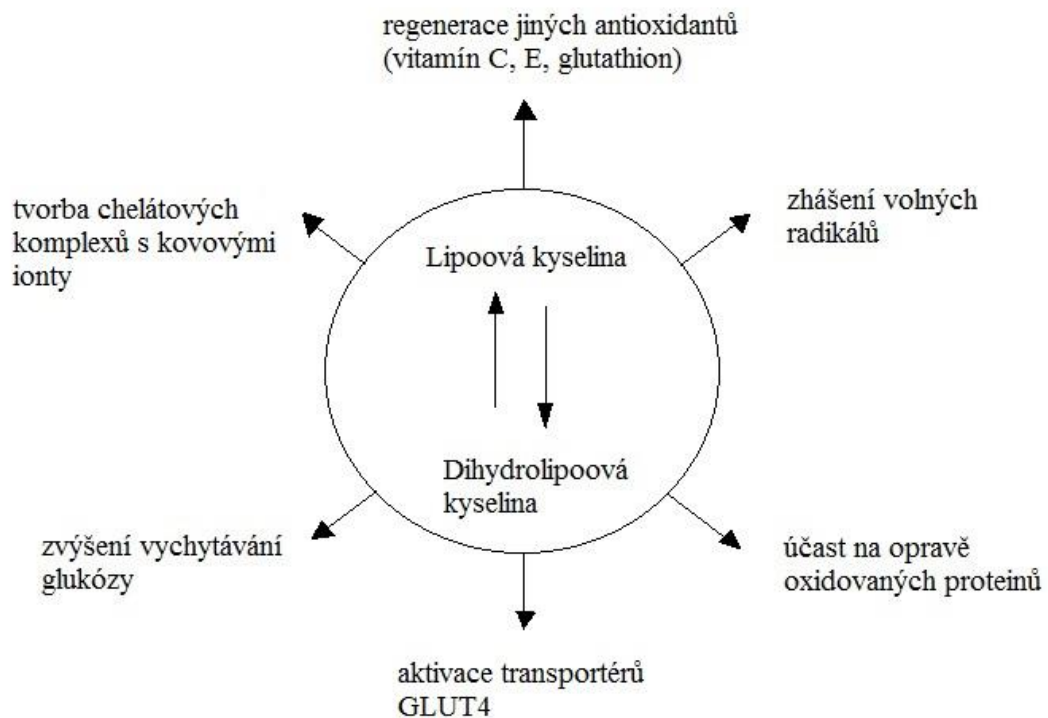
**Obrázek 4:** Schéma vycytávání glukózy transportérem GLUT4 po jeho aktivaci inzulinem [upraveno podle 11]

V kultuře buněk citlivých na inzulin, které byly kultivovány s 2,5 mmol/l LA, stimulovala LA snížení hladin glukózy aktivací inzulinové signální dráhy a následným vycytáváním glukózy. Existuje několik důkazů, že inzulinová signální dráha je senzitivní na intracelulární redoxní stav a že oxidace důležitých thiolových skupin nacházejících se v  $\beta$ -podjednotce inzulinového receptoru může zapříčinit zvýšení jeho vnitřní tyrosinkinázové aktivity a tím aktivovat inzulinovou signální dráhu. Kyselina lipová je schopná vyvolat změnu intracelulárního redoxního stavu buňky a pravděpodobně by mohla působit i na oxidaci důležitých thiolových skupin, což je podle některých studií jeden z možných způsobů, jak LA reguluje vycytávání glukózy [8].

Kyselina lipoová má také vliv na acetylkoenzym A (acetyl-CoA) a koenzym A, protože je schopná je redukovat. Redukcí dojde ke snížení přísunu acetyl-CoA do citrátového cyklu a následnému snížení tvorby kyseliny citrónové. Kyselina citrónová působí jako inhibitor fosfofruktokinázy, která se podílí na glykolýze. Ve výsledku pak snížení acetyl-CoA působí stimulačně na proces glykolýzy. Navíc nízké koncentrace acetyl-CoA vedou i k inhibici glukoneogeneze, protože acetyl-CoA neaktivuje enzym pyruvátkarboxylázu [6].

Díky tomu, že kyselina lipoová zvyšuje využití glukózy a zlepšuje glykemickou kontrolu, má také klíčovou úlohu v detoxikačních mechanismech, které se odehrávají v játrech. Kyselinu lipoovou můžeme kvůli jejím účinkům, které napodobují účinky inzulínu, nazývat jako inzulín-mimetické činidlo [1, 2].

Různé možnosti působení redoxního páru LA a DHLA v organismu jsou shrnuty na obrázku 5.



**Obrázek 5:** Shrnutí funkcí kyseliny lipoové [upraveno podle 6]

## 1.2 KYSELINA LIPOOVÁ A ERYTROCITY

### 1.2.1 Role erytrocytů v redukci kyseliny lipoové

Po orálním podání se kyselina lipoová dostává do krevního řečiště, kde může působit na erytrocyty, lymfocyty, trombocyty a další složky krve. Erytrocyty přijímají a redukují exogenní LA na DHLA pomocí glukózového metabolismu. Vzniklá DHLA je uvolněna zpět do extracelulárního prostoru. Redukce je závislá na přítomnosti glukózy, když však byla LA testována pouze s glukózou bez přítomnosti erytrocytů, redukce nenastala [2, 12].

Kromě metabolismu glukózy je redukce ještě závislá na přítomnosti NADPH, nikoliv však NADH – jeho množství není redukcí nijak ovlivněno. NADPH se získává z pentózového cyklu. Tato závislost byla prokázána testováním erytrocytů člověka s geneticky podmíněným deficitem glukóza-6-fosfátdehydrogenázy. Deficit glukóza-6-fosfátdehydrogenázy následně způsobuje nedostatečnou tvorbu NADPH. Erytrocyty s touto poruchou nebyly schopné redukovat kyselinu lipoovou. Protože erytrocyty nemohou tvořit NADPH z 2-deoxy-D-glukózy, nemůže být glukóza 2-deoxy-D-glukózou nahrazena [12, 13].

Dalšími látkami, které inhibují redukci LA na DHLA, jsou dehydroepiandrosteron, specifický inhibitor glukóza-6-fosfátdehydrogenázy, a mitomycin C, membránově propustný inhibitor flavoproteinreduktáz. Naopak katalyzována může být redukce exogenní LA glutathionreduktázou a flavoproteindehydrogenázou. Zajímavým zjištěním je, že pokud je v systému bez buněk LA inkubována s glutathionreduktázou, vyizolovanou z lidských erytrocytů, k redukci LA na DHLA dochází. Lipoamiddehydrogenáza redukuje LA mnohem účinněji než glutathionreduktáza, ačkoliv se v erytrocytech nachází pouze v nízkých koncentracích, protože erytrocyty již neobsahují mitochondrie. Lipoamiddehydrogenáza je velmi specifická pro R-izomer LA [12, 13].

Jiné studie tvrdí, že pokud jsou v krvi přítomny oba izomery LA v asi stejně nízké koncentraci, je S-izoforma redukována asi o 40 – 50 % efektivněji než R-forma. Tento rozdíl bude pravděpodobně způsoben tím, že na redukci se podílí různé enzymy. Kromě glutathionreduktázy a lipoamiddehydrogenázy to může být ještě thioredoxinreduktáza. Pokud je tedy rychleji redukován S-izomer LA, je to z důvodu působení glutathionreduktázy [2, 13].

DHLA je schopná se zpět reoxidovat na LA. Při inkubaci erytrocytů a LA dosáhne množství DHLA ustáleného stavu asi po 2 hodinách a dále už se její množství nezvyšuje

z důvodu spontánní zpětné oxidace na LA. Volný hemoglobin však dokáže DHLA velmi rychle reoxidovat také, takže je obtížné příčinu reoxidace blíže určit. Je prokázáno, že exogenní DHLA jako významné redukční činidlo brání oxidačnímu poškození membrán a také lipoproteinů o nízké hustotě. Dále spolupracuje s vitamínem E při ochraně srdce před ischemickým poškozením, brání peroxidaci lipidů a spotřebě vitamínu E. Obě formy, LA i DHLA, chrání erythrocyty proti hemolýze indukované peroxylovými radikály. Příjem exogenní LA a její redukce na DHLA za působení erythrocytů může přispět k ochraně lidského krevního řečiště před oxidačním poškozením [2, 12, 13].

### **1.2.2 Lidské erythrocyty jako testovací model terapeutického efektu kyseliny lipoové**

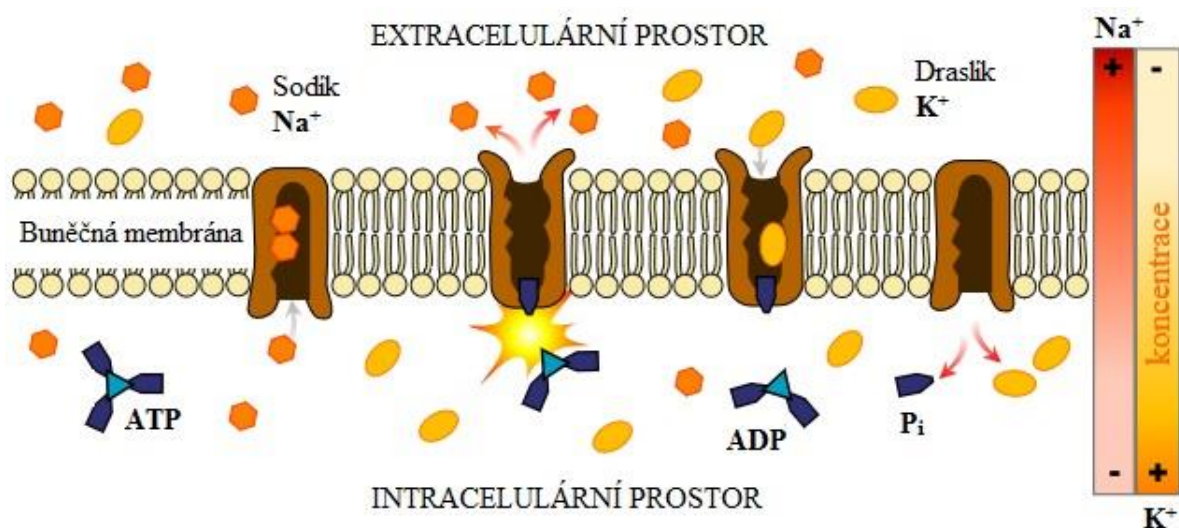
Kyselina lipoová je již dlouhou dobu využívána při léčbě různých onemocnění. Nejprve byla podávána pacientům s cirhózou jater, diabetickou polyneuropatií, při otravách jedovatými houbami a při intoxikacích těžkými kovy. Dnes se využívá jako pomocné léčivo u velkého množství onemocnění, jako jsou diabetes, kardiovaskulární, neurodegenerativní a autoimunitní onemocnění. Dále je také podávána při rakovině a AIDS [1, 4].

Kyselina lipoová se terapeuticky podává při diabetu jako prevence diabetické neuropatie. Při diabetické neuropatii jsou postižena nervová vlákna, což může vést k poruchám citlivosti, parestézii a bolestivosti, nejčastěji dolních končetin. Z těchto příznaků se pak může vyvinout syndrom diabetické nohy, který často končí až amputací [14, 15].

Jako jeden z faktorů, který přispívá k rozvoji diabetické neuropatie, byla stanovena nedostatečná aktivita sodno-draselné pumpy ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPázy), která je nezbytná pro normální fungování svalové a nervové tkáně (obrázek 6). Jako modelový systém k testování vlivu LA na aktivitu  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPázy za zvýšených hladin glukózy byly zvoleny lidské erythrocyty. Přidané vysoké koncentrace glukózy mají za účel simulovat stav, který vzniká v krvi při diabetu. V těchto testech bylo zjištěno, že kyselina lipoová má schopnost snižovat peroxidaci a glykosylaci lipidů a zvyšovat aktivitu  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPázy a  $\text{Ca}^{2+}$  ATPázy u červených krvinek, které jsou vystaveny vyšším koncentracím glukózy. Glukóza má tedy schopnost snižovat aktivitu  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPázy a  $\text{Ca}^{2+}$  ATPázy v membránách erythrocytů a LA je schopná toto snížení výrazně blokovat [14, 15, 16].



Vysoké koncentrace glukózy v krvi mohou kromě inhibice ATPáz vést i k oxidačnímu stresu kvůli produkci kyslíkových radikálů z autooxidace glukózy a glykace proteinů. Kromě toho, že LA stimuluje spotřebu glukózy červenými krvinkami, tak ještě snižuje hladiny glykovaného hemoglobinu v erythrocytech. Při neenzymatické glykaci hemoglobinu hrají určitou roli peroxidované lipidy, jejichž hladiny LA snižuje a tím částečně inhibuje glykaci hemoglobinu. Tyto účinky LA však byly zaznamenány pouze u erythrocytů, na které působily vysoké koncentrace glukózy. U normálních erythrocytů nebylo tolik změn detekováno, ale stimulace spotřeby glukózy samozřejmě nastala. Z tohoto zjištění vyplývá, že by LA mohla být potenciálně schopná zpomalit či inhibovat rozvoj diabetické neuropatie [14, 16].



**Obrázek 6:** Schéma  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPázy [upraveno podle 17]

Při působení některých xenobiotických chemikálií dochází k rychlé oxidaci hemoglobinu a vzniká toxický methemoglobin, který není schopný transportovat kyslík. To nastává kvůli změně oxidačního stavu molekuly železa. Tělo takto rychle vytvořený methemoglobin není schopné samo odbourat, a proto byl testován i vliv kyseliny lipoové, dihydrolipoové a jiných antioxidantů na methemoglobin. U LA nebyly nalezeny vůbec žádné pozitivní účinky, u DHLA ale alespoň částečné ano. DHLA je schopná zpomalit tvorbu methemoglobinu, ale jakmile je již methemoglobin vytvořený, tak při jeho odbourávání účinná není [18].

### 1.2.3 Vliv kyseliny lipoové na eryptózu

Jako eryptózu označujeme samovolnou, programovanou smrt erytrocytů. Celý proces je podobný apoptóze, programované buněčné smrti jaderných buněk. Erytrocyty se smršťují, jejich membrána mění tvar, tvoří různé záhyby a fosfolipidy se z ní postupně vysouvají na buněčný povrch. Proces eryptózy je regulován řadou kináz, například cyklickou guanosinmonofosfát dependentní proteinkinázou typu I, adenosinmonofosfát aktivovanou kinázou a Janusovou kinázou 3 [19, 20].

Vlastní eryptóza bývá spuštěna zvýšenou cytosolickou aktivitou iontů  $\text{Ca}^{2+}$ , které do buňky mohou vstoupit přes  $\text{Ca}^{2+}$  propustné kationtové kanály aktivované prostaglandinem  $\text{E}_2$ . Ionty  $\text{Ca}^{2+}$  aktivují cysteinovou endopeptidázu calpain, což je enzym, který degraduje proteiny v cytoskeletu a způsobí tak následnou ztrátu normálního tvaru buněčné membrány. Dalším působením  $\text{Ca}^{2+}$  jsou z krvinek vylučovány ionty  $\text{K}^+$  a  $\text{Cl}^-$ . Ztráta intracelulárního  $\text{KCl}$  je následována uvolněním vody, která je potřebná k udržení tvaru buňky, a erytrocyty se tudíž smrští [19, 20].

Citlivost buněčných membrán na působení  $\text{Ca}^{2+}$  je zesílena ještě ceramidem, který stimuluje eryptózu podobně. Ceramid může být vylučován ze sfingomyelinu buněčné membrány enzymem sfingomyelinázou, kterou mohou produkovat buď přímo erytrocyty, nebo je uvolněná v plazmě a působí zvenčí. Rozpadlé erytrocyty jsou rychle odstraňovány z cirkulující krve tím, že jsou pohlcovány a degradovány pomocí makrofágů.  $\text{Ca}^{2+}$  indukovaná eryptóza ke svému průběhu nepotřebuje aktivaci kaspáz, které jsou potřebné při apoptóze. Eryptóza může být vyvolána osmotickým šokem, oxidačním stresem a jím způsobeným poškozením membrány, hypertermií, ohromným množstvím malých molekul, anebo úbytkem energie, který je alespoň částečně ovlivněn aktivací proteinkinázy C [19, 20].

Silně inhibovat eryptózu může oxid dusnatý, který způsobuje částečnou rezistenci erytrocytů na eryptotické podněty vyvolané ionty  $\text{Ca}^{2+}$ . Dále eryptózu inhibují katecholaminy a řada dalších látek. Erythropoetin ji částečně inhibuje tím, že brání prostupu  $\text{Ca}^{2+}$  přes kationtové kanály. Ale pokud jsou erytrocyty vystaveny vysokým koncentracím erythropoetinu, jsou potom naopak na eryptotické podněty obzvláště citlivé. Pokud probíhá zrychlená eryptóza, která se vyskytuje u mnoha onemocnění, bývá kompenzována zvýšenou erythropoézou. Pokud není tato kompenzace dostatečná, může se vyvinout závažná anémie. Jiný problém může nastat, když eryptotické erytrocyty adherují k cévním stěnám, aktivují srážení krve a poškodí tak mikrocirkulaci [19].

Kyselina lipoová má antioxidační i oxidační aktivitu, díky níž je schopná vyvolávat apoptózu u mnoha druhů buněk. Apoptózu indukuje tím, že vyvolává vznik oxidačního stresu a následnou aktivaci kaspáz. Kvůli svým proapoptickým účinkům byla LA navržena jako možná látka k léčbě rakoviny, aby vyvolávala apoptózu jaderných nádorových buněk. Vystala však zásadní otázka, totiž pokud LA dokáže aktivovat apoptózu, tak jestli nestimuluje také vznik eryptózy u erytrocytů [21].

Studie Bhavsara a kolektivu ukázala, že kyselina lipoová je skutečně schopná eryptózu aktivovat. Je však zajímavé, že při oxidačním stresu je naopak schopná proti eryptóze působit [21].

LA má schopnost v cytosolu stimulovat zvýšení koncentrace iontů  $\text{Ca}^{2+}$ , které jsou hlavním spouštěčem eryptózy. Erytrocyty se následně začnou v důsledku iontových změn smršťovat a odhalovat fosfatidylserin na povrchu buněk. Fosfatidylserin označuje buňky, které mají být pohlceny makrofágy. Statisticky významné koncentrace LA, kdy byla po 48 hodinové inkubaci zaznamenána výrazná změna ve velikosti buněk – erytrocyty se zmenšily, byly již 20  $\mu\text{mol/l}$  a vyšší. Červené krvinky ale reagují smrštěním i na vyčerpání hladin glukózy v kultivačním médiu, což při 48 hodinové inkubaci běžně nastává. Bylo však prokázáno, že LA má schopnost tento efekt zesílit a k významnému zesílení dochází právě přítomností LA již o koncentraci 20  $\mu\text{mol/l}$  a více [21].

LA je také schopná zvyšovat tvorbu ceramidu a snižovat koncentraci adenosin trifosfátu (ATP) v erytrocytech. Po 48 hodinové inkubaci LA o koncentraci 50  $\mu\text{mol/l}$  významně zvýšila tvorbu ceramidu. Statisticky významný pokles buněčného ATP nastal při inkubaci s LA o koncentraci 75  $\mu\text{mol/l}$  po dobu 48 hodin. V důsledku spotřeby buněčné energie krvínek ztrátou ATP se eryptóza může také aktivovat [21].

V závislosti na těchto výsledcích by se dle autorů studie mělo zvážit, při kterých onemocněních může být kyselina lipoová terapeuticky podávána. Účinky LA na eryptózu jsou slabé a u zdravých jedinců se mohou projevit pouze při jejích poměrně vysokých dávkách. Avšak některými onemocněními nebo podáváním některých druhů xenobiotik by mohl být tento účinek zesílen. Určitě by se tedy její podávání mělo zvážit u pacientů, kteří trpí vážnými hematologickými onemocněními, která rovněž způsobují pokles erytrocytů. Dále také u podávání proeryptotických xenobiotik. U těchto stavů by následně mohla vzniknout těžká anémie [21].

#### 1.2.4 Hladiny kyseliny lipoové v erytrocytech

Kyselina lipoová je často podávána k terapeutickým účelům, z tohoto důvodu by mělo být objasněno, jak moc a za jakou dobu je LA po perorálním, případně i intravenózním, podání distribuována v krevní plazmě a také v erytrocytech, mimo jiné také jaké množství exogenní LA prochází skrz erytrocytární membránu.

Amenta a kol. ve své studii sledovali distribuci kyseliny lipoové po perorálním podání 600 mg LA v různých tabletových formách. Průměrné maximální koncentrace kyseliny lipoové v plazmě se v této studii pohybovaly v rozmezí 1266,2 – 2290,5 ng/g. Koncentrace stanovené v erytrocytech byly oproti tomu výrazně nižší, pohybovaly se v rozmezí 45,1 – 66,5 ng/g. Časy, kdy koncentrace LA dostáhla maxima, byly v erytrocytech přímo úměrné časům v plazmě, což je poměrně překvapivé zjištění. Jejich průměrné hodnoty se pohybovaly od 34 do 180 minut, ale s tím, že hodnota 34 minut byla u přípravku se zvýšenou mírou vstřebávání a 180 minut naopak u léčiva s prodlouženým uvolňováním. U klasických forem LA to bylo asi 1 až 1,5 hodiny. Tato studie ukazuje, že kinetika LA je mnohem výraznější v krevní plazmě než v buňkách [22].

## 1.3 STANOVENÍ KYSELINY LIPOOVÉ

### 1.3.1 Metody stanovení

Po podání kyseliny lipoové se dají stanovit její suplementované hladiny v krevní plazmě i ve tkáních. Existuje pouze málo jednoduchých a spolehlivých metod, kterými by se dala LA a DHLA přesně kvantifikovat. LA může být stanovena mikrobiologickou technikou, kdy se vlastní stanovení provádí po hydrolyze amidové vazby lipoyllysinu. V dřívější době tento hydrolytický krok obsahovaly všechny metody stanovení LA. Mikrobiologické stanovení je namáhavé a časově náročné kvůli kultivaci bakteriálních kmenů, ale je zato i velice citlivé. Kolorimetrické metody analýzy se, stejně jako mikrobiologické, provádějí po hydrolyze lipoyllysinu. Nejsou tak náročné, ale nejsou ani tak citlivé a specifické, tudíž se při nich nedá rozlišit LA a DHLA [4, 10].

Spektrofotometricky je možné kyselinu lipoovou stanovit díky vlastnosti DHLA, která má schopnost redukovat Ellmanovo činidlo, čili kyselinu 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoovou. Tato látka se po redukcí změní na jasně žlutý aniont, který se dá dobře kvantifikovat. Další metodou, která může být využita, je specifická enzymová imunoanalýza. Tato imunoanalytická metoda sice nevyžaduje hydrolyzu vzorků, ale opět není příliš citlivá. Navíc je časově náročná kvůli přípravě anti-LA protilátek [10, 13].

Slibnou možností by mohla být kapilární elektroforéza s ultrafialovou detekcí, která vykazuje vysokou účinnost separace kyseliny lipoové. Musí být ale ještě otestována na biologických vzorcích [10, 23].

Stejně jako kolorimetrické metody, ani plynová chromatografie (GC) a plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií (GC/MS) nedokáží rozlišit LA a DHLA, čímž je ztížena identifikace rozdílů biologické aktivity oxidované a redukované formy LA. Ale i přes tuto nevýhodu jsou obě tyto metody velice selektivní a citlivé. Plynová chromatografie s plamenovým fotometrickým detektorem je pro stanovení LA mnohem citlivější než s plamenovým ionizačním detektorem. Metodami, které jsou na GC založeny, se v biologických vzorcích nejlépe stanoví LA ve vazbě na proteiny. Před vlastní analýzou probíhá derivatizace vzorků. Tyto metody jsou pravděpodobně nejvhodnější pro stanovení celkového množství LA ve vzorku. GC/MS je vysoce účinná k identifikaci i ke kvantifikaci LA, její nevýhodou však je, že vyžaduje náročné a nákladné vybavení laboratoře [10, 23].

LA i DHLA mohou být obě stanoveny elektrochemicky, protože dobře reagují na elektrický potenciál. Při tomto stanovení nemůže analýza celkové LA ve vzorku proběhnout, pokud je LA vázaná na proteiny, proto musí být předtím opět hydrolyzována, a to kyselou, bazickou nebo enzymatickou hydrolýzou, nejlépe za nepřístupu kyslíku, aby nedošlo k poškození molekul LA a oxidaci DHLA [10, 23].

Dnes nejběžněji užívanou metodou k analýze volné kyseliny lipoové je vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) s elektrochemickou detekcí (ED), při které zreaguje až 100 % analytu v biologických vzorcích. Tato metoda je selektivní i citlivá a dají se při ní stanovit obě volné formy LA bez předchozí nutnosti derivatizace. Pomocí HPLC s ultrafialovou nebo fluorescenční detekcí (FD) se však ani LA ani DHLA stanovit nedají, protože v sobě neobsahují dostatečně silný chromofor. FD se dá využít pouze po předchozí derivatizaci LA fluorescenčním činidlem, potom je tato metoda dostatečně citlivá. Citlivost a selektivita všech analýz je samozřejmě ovlivněna například také složením mobilní fáze, typem použitého analyzátoru a materiálem elektrody [10, 23].

### **1.3.2 Supplementace kyselinou lipoovou**

Dostupné potravinové doplňky obsahují obvykle dávky 50 – 600 mg LA. Terapeuticky se kyselina lipoová perorálně užívá nejčastěji v dávkách od 200 do 600 mg, což je asi 1000x vyšší hodnota, než je možné získat z potravy. Kyselina lipoová přijímaná v potravě je vázaná na bílkoviny, na rozdíl od toho je LA přijímaná v potravinových doplňcích volná. Biologická dostupnost racemické směsi LA je nejčastěji stanovována po podání jedné dávky LA. Doba absorpce LA do krevní plazmy bývá obvykle 0,5 – 1 hodina. Kvůli krátkému biologickému poločasu nedochází ani po opakovaném perorálním podání LA k jejímu hromadění v krevní plazmě [7, 24, 25].

Bylo také zkoumáno, jestli je nějaký rozdíl mezi dostupností S-lipoové a R-lipoové kyseliny. Pokud byla racemická směs LA podávána intravenózně, nebyly v plazmě nalezeny rozdíly mezi koncentrací S- a R-izomeru LA. Po perorálním podání však rozdíly nalezeny byly, hodnoty R-LA byly výrazně vyšší. Další zajímavé informace jsou, že z vodného roztoku je LA absorbována efektivněji než z lékové formy a že současný příjem potravy snižuje její biologickou dostupnost. Proto je doporučováno, aby byla užívána alespoň 30 minut až 1 hodinu před jídlem, nebo 2 hodiny po jídle. LA podávaná intravenózně má samozřejmě

vyšší biologickou dostupnost než LA podávaná v tabletové formě, což je pravděpodobně způsobeno vysokým jaterním first-pass efektem, kdy je značná část LA před vstupem do krve odbourána v játrech [7, 24, 25].

### 1.3.3 Hladiny kyseliny lipoové v krevní plazmě

Hladiny kyseliny lipoové v krevní plazmě se u suplementovaných i nesuplementovaných lidí ve studiích různých autorů značně liší. Singh a Jialal uvádějí, že při léčbě diabetu se nejběžněji užívá 300 – 600 mg LA denně. Pokud pacienti pouze chtějí podpořit svou antioxidační aktivitu, stačí dávky 20 – 50 mg denně. U zdravých jedinců se dle některých autorů endogenní koncentrace kyseliny lipoové pohybují v rozmezí 1 – 25 ng/ml, což v přepočtu odpovídá asi koncentracím 4,85 – 121,18 nmol/l, a kyseliny dihydrolipoové mezi 33 – 145 ng/ml, což odpovídá asi 159,96 – 702,86 nmol/l [24].

Rochette a kol. ve svém článku shrnují, že nejčastěji podávané terapeutické dávky racemické LA jsou od 200 do 1800 mg denně a její biologický poločas je kolem 30 minut. Endogenní koncentrace LA v plazmě pak uvádějí mezi 15 – 20  $\mu\text{mol/l}$  [2].

Teichert a kol. ve své studii testovali 9 zdravých dobrovolníků, kterým byla perorálně podávána jedna dávka 600 mg racemické směsi kyseliny lipoové po dobu 4 dnů. První den vystoupala koncentrace v plazmě na svou maximální hodnotu průměrně za 30 minut. Její hodnota pak byla  $36,19 \pm 10,35 \mu\text{mol/l}$ . Čtvrtý den podávání LA dosáhla koncentrace maxima již za 20 minut a její průměrné maximální hodnoty byly  $31,45 \pm 8,20 \mu\text{mol/l}$ . Metodou stanovení byla HPLC/ED [26].

Moini a kol. shrnují výsledky jiných studií, které uvádějí po jednorázovém perorálním podání 200 mg LA hodnotu  $3,1 \pm 1,5 \mu\text{mol/l}$  a po podání 600 mg LA  $13,7 \pm 8,2 \mu\text{mol/l}$ . U intravenózního podání 200 mg LA byla stanovena její následná koncentrace v plazmě  $40,3 \pm 11,3 \mu\text{mol/l}$ . Průměrný biologický poločas vždy odpovídal opět zhruba 30 minutám. U diabetických pacientů byly dokonce nalezeny hladiny 100 – 200  $\mu\text{mol/l}$  po intravenózním podání 600 mg LA [8].

Carlson a kol. ve své studii měřili plazmatické koncentrace R-lipoové kyseliny, která byla perorálně podána 12 dobrovolníkům ve formě její sodné soli. Měření koncentrací LA opět probíhalo metodou HPLC/ED. Po podání 600 mg R-LA byly naměřeny nejvyšší

plazmatické koncentrace v průměru za 14 minut. Průměrné koncentrace v plazmě byly  $16 \pm 6,32 \mu\text{g/ml}$ , což odpovídá asi koncentracím  $77,56 \pm 30,63 \mu\text{mol/l}$ . Na základě svých výzkumů dospěl kolektiv autorů k závěru, že není vhodné k terapeutickým účelům používat pouze R-izomer LA, ale je opravdu vhodnější podávat její racemickou směs. Samostatně podávaná R-LA je méně biologicky dostupná než R-LA obsažená v racemické směsi. Ve formě sodné soli je ale naopak mnohem biologicky dostupnější než v racemické směsi. Autoři proto také usuzují, že S-LA může vykonávat funkci kompetitivního inhibitoru při absorpci R-LA [27].

Na základě několika studií současných autorů pak bylo v této práci ještě shrnutí terapeutických účinků kyseliny lipoové. Terapeutické účinky 600 mg racemické směsi LA jsou aktivovány maximální plazmatickou koncentrací odpovídající  $4 - 5 \mu\text{g/ml}$  (to je asi  $20 - 25 \mu\text{mol/l}$ ), významnějších terapeutických výsledků se dá dosáhnout při koncentraci přírodního R-LA izomeru v plazmě o hodnotách  $10 - 20 \mu\text{g/ml}$  (v přepočtu je to asi  $50 - 100 \mu\text{mol/l}$ ). Horní hranice plazmatické koncentrace LA, kdy se její dávka dá ještě považovat za terapeutickou, pak byla autory stanovena asi na  $50 \mu\text{g/ml}$  (čemuž odpovídá hodnota  $250 \mu\text{mol/l}$ ) [27].

Chen a kol. využili spojení technik HPLC/MS s ionizací elektrosprejem. Stanovovali hladiny LA v krevní plazmě 10 zdravých dárců po perorální suplementaci jednou dávkou 600 mg LA. Koncentrace dosáhly svého maxima v průměru za 65 minut a jejich hodnota byla průměrně  $3,31 \pm 0,87 \mu\text{g/ml}$ . Tato hodnota v přepočtu odpovídá koncentraci  $16 \pm 4,2 \mu\text{mol/l}$  [28].

Širší přehled hladin kyseliny lipoové v krevní plazmě s metodami stanovení je znázorněn v tabulce 1.



**Tabulka 1:** Přehled metod stanovení a hladin kyseliny lipoové v lidské plazmě

Metoda	Detekce	LOD/LOQ (nmol/l)	Hladiny	Suplementace	Ref.
HPLC	FD	2,4/-	-	-	29
HPLC	ED	-/22,0	< 4,9 nmol/l	-	30
HPLC	ED	4,9/-	4,9 – 121,0 nmol/l	-	31
HPLC	ED	2,4/14,5	143,0 – 197,0 nmol/l	-	32
HPLC	ED	1,0 /4,8	-	-	33
-	-	-	4,0 – 100,0 nmol/l	-	34
HPLC	MS/MS	-/119	nedetekováno	-	35
Spektrofotometrie	-	-	48,0 ± 28,9 µmol/l (M, F kuřáci) 69,0 ± 21,0 µmol/l (M, F nekuřáci)	-	36
HPLC	FD	30,0/100,0	M: 2,23 ± 0,9 µmol/l	120 mg, p.o.	37
HPLC	MS	9,7/24,2	12,6 – 21,8 µmol/l	600 mg, p.o.	28
HPLC	MS	-/921,5	M, F: 33,3 ± 6,3 µmol/l	Rac, 600 mg, p.o.	38,39
HPLC	FD	9,69/72,71	M: 9,5 – 22,9 F: 13,2 – 25,0 µmol/l M: 11,4 – 26,3 F: 11,4 – 26,9 µmol/l M: 7,7 – 17,4 F: 12,3 – 21,2 µmol/l	R; 200 mg, p.o. R; 300 mg, p.o. R; 600 mg, p.o.	40
HPLC	FD	9,69/72,71	M: 4,8 – 11,3 F: 7,0 – 12,5 µmol/l M: 5,5 – 13,5 F: 6,0 – 14,3 µmol/l M: 3,8 – 8,6 F: 6,1 – 10,8 µmol/l	S; 200 mg, p.o. S; 300 mg, p.o. S; 600 mg, p.o.	40
HPLC	ED	-/4,9	M, F: 3,1 ± 1,5 µmol/l M, F: 13,8 ± 7,2 µmol/l M, F: 40,3 ± 11,3 µmol/l M, F: 100 – 200 µmol/l	Rac, 200 mg, p.o. Rac, 600 mg, p.o. Rac, 200 mg, i.v. Rac, 600 mg i.v.	8

*LOD* – mez detekce; *LOQ* – mez stanovitelnosti; *Rac* – racemická směs; *p.o.* – perorálně; *i.v.* – intravenózně; *M* – muži; *F* – ženy

## 1.4 NEŽÁDOUCÍ ÚČINKY KYSELINY LIPOOVÉ

Žádné nežádoucí účinky způsobené kyselinou lipoovou nebyly při klinických studiích zaznamenány ani při perorálním podávání dávek do 2400 mg/den. Perorální podávání 1800 mg LA (rozděleno na 3 dávky po 600mg) denně po dobu půl roku také žádné nežádoucí účinky nezaznamenalo, stejně jako intravenózní podávání 600 mg LA po dobu tří týdnů (ve srovnání s placebem). Z toho se dá usuzovat, že podávání středních dávek LA by mělo být bezpečné. Při léčbě diabetu se jako bezpečné považuje užívání 600 mg LA denně [7].

Určitá bezpečnostní opatření pro podávání LA však kvůli studiím na potkanech vydána byla. Starším potkanům byla podávána intraperitoneálně racemická směs LA odpovídající asi 100 mg/kg denně po dobu 2 týdnů. Tyto vysoké chronické dávky LA vyvolávaly u potkanů peroxidaci plazmatických lipidů a oxidační poškození proteinů v krevní plazmě i ve tkáních (např. v srdci a mozku). U člověka by tyto hodnoty odpovídaly dávčám 5 – 10 g/den. Dále byl vliv vysokých dávek LA testován Vigilem a kol. u šesti opic rodu makak rhesus. Po intravenózním podání 90 – 100 mg/kg kyseliny lipoové byla zaznamenána smrt tří ze šesti makaků. Po smrti u nich byly nalezeny rozsáhlé nekrózy velkých svalů, srdce, ledvin a hlavně jater. Vysoké koncentrace LA tedy mohou vyvolávat stejné účinky, kterým nízké dávky LA pomáhají zabránit [7, 41].

Při *in vitro* studii na imortalizovaných lidských buňkách proximálního tubulu ledvin HK-2 bylo prokázáno, že již koncentrace 250  $\mu\text{mol/l}$  LA po 48 hodinové inkubaci snižuje proliferaci HK-2 buněk. Koncentrace 500  $\mu\text{mol/l}$  dokonce HK-2 buňky usmrtí už po 24 hodinách. Z těchto výsledků vyplývá, že na ledviny by mohly mít negativní vliv již poměrně nízké koncentrace LA [42].

## 1.5 VLIV KYSELINY LIPOOVÉ NA DALŠÍ TYPY BUNĚK

### 1.5.1 Lymfocyty

U T-lymfocytů je jejich proliferace a buněčná smrt regulována intracelulárními thioley (např. cystein, glutathion). Při oxidačním stresu se však tyto thioley mění na disulfidy. Bylo prokázáno, že lidé nakažení virem HIV mají snížené plazmatické a leukocytární hladiny glutathionu i cysteinu. Konkrétně určité druhy T-lymfocytů mají deficit glutathionu. Pokud jsou tyto hladiny obnoveny, mohou podpořit účinek zánětlivých cytokinů a inhibovat rozvoj HIV u akutních i chronických infekcí. Deficit glutathionu u HIV pozitivních lidí pravděpodobně nastává v důsledku oxidačního stresu, při kterém se glutathion spotřebovává a navíc nemůže být syntetizován z cysteinu, protože toho je také nedostatek. Již dříve bylo prokázáno, že hladiny 100  $\mu\text{mol/l}$  kyseliny lipoové dokáží zvýšit hladiny glutathionu u kultivovaných T-buněk. Testování vždy probíhalo u Jurkat T-buněk a u lymfocytů z periferní krve [43].

Sen a kol. prokázali, že dokonce i koncentrace 10  $\mu\text{mol/l}$  kyseliny lipoové nebo jejich derivátů dokáže zvýšit buněčné hladiny glutathionu. Inkubace s T-buňkami probíhala po dobu 18 hodin. S rostoucími koncentracemi LA se postupně zvyšovala i hladina glutathionu až do koncentrace 100  $\mu\text{mol/l}$ , přičemž bylo prokázáno, že další zvyšování koncentrací LA nemělo již na hladiny glutathionu vliv. LA také dokáže zvýšit obsah dalších buněčných thiolů již za 18 hodin. Mnohem výraznější účinek byl prokázán při 16 týdenní kultivaci T-buněk. Pokud byly buňky kultivovány s vysokými koncentracemi LA (2 a 5  $\text{mmol/l}$ ), docházelo k jejich smršťování a byly u nich nalezeny i snížené hladiny glutathionu a dalších thiolů a docházelo také k fragmentaci DNA. U takto poškozených buněk pak následovala apoptóza [43].

Z těchto informací vyplývá, že kyselina lipoová by díky svému antioxidačnímu působení mohla mít pozitivní vliv například při infekci virem HIV, a to již v poměrně nízkých koncentracích [43].

### 1.5.2 Endoteliální buňky

U mnoha onemocnění, která jsou spojena s oxidačním stresem, je často nějakým způsobem poškozen i cévní endotel. Proto se Jones a kol. rozhodli testovat působení kyseliny

lipoové, jako silného antioxidantu, na lidské endoteliální buňky. Konkrétně byla použita buněčná linie EA.hy926, která byla vyizolována z pupečnickové žíly a vykazuje charakteristiky endotelových buněk. Tyto buňky dokáží LA rychle vstřebávat a redukovat ji na DHLA, kterou poté ve většinovém množství uvolní do kultivačního média. V médiu je pak udržována stálá koncentrace DHLA i po dobu 18 až 24 hodin [44].

Redukce LA řízená thioredoxinreduktázou aktivuje pentózový cyklus a spotřebu NADPH. Endoteliální buňky dokáží využít i NADH, ale tato redukce LA probíhající v mitochondriích je pak méně účinná. Touto vlastností se endoteliální buňky liší od erytrocytů, které postrádají mitochondrie a využívají pouze NADPH, a neutrofilních buněk, které zase využívají k redukcí LA pouze NADH. Koncentrace LA vyšší než 0,5 a 1 mmol/l vyvolávají i u těchto buněk oxidační stres, při kterém dochází k vyčerpání hladin glutathionu. Chování endoteliálních buněk v prostředí LA je podobné jako u erytrocytů, nádorových buněčných linií a fibroblastů. Kyselina lipoová v nízkých koncentracích má schopnost zvyšovat intracelulární hladiny glutathionu, celkovou antioxidační ochranu a zlepšovat funkčnost endoteliálních buněk [44].

### **1.5.3 Nádorové buňky**

Účinky kyseliny lipoové a jejích derivátů byly testovány na různých rakovinných buněčných liniích, například plic, vaječníků, děložního čípku, prostaty, jater a dalších. Uvažuje se o jejím protirakovinném působení, protože LA je schopná indukovat apoptózu u mnoha typů buněk. Indukce apoptózy u nádorových linií byla nalezena u buněčných linií jater, hltnu a leukemických linií a to v koncentracích LA kolem 5 mmol/l po dlouhodobé expozici. Zástava růstu buněčných linií byla zaznamenána u nádorů hlavy a krku při koncentracích LA do 10 mmol/l. Protinádorové působení LA je tudíž závislé a dávce a době expozice [45].

U lidských buněk rakoviny tlustého střeva HT-29 byly zaznamenán efekt LA i DHLA na indukcí apoptózy již při koncentracích 250  $\mu\text{mol/l}$  a u plicních epitelálních buněk H-460 byl snížen jejich růst dokonce při 24 hodinové kultivaci se 100  $\mu\text{mol/l}$  LA. Kyselina lipoová má vliv i na metastazování. U buněk rakoviny prsu bylo objeveno, že v koncentracích 250  $\mu\text{mol/l}$  a vyšších dokáže LA blokovat invazivitu a tvorbu metastáz. Yoo a kol. ve své studii testovali vliv LA na buněčnou linii HCT116 a ověřili tak, že u buněk rakoviny tlustého

střeva působí LA už při nižších koncentracích, z čehož plyne její potenciální terapeutický význam. U této buněčné linie po 48 hodinové inkubaci indukovala LA o koncentraci 50  $\mu\text{mol/l}$  zástavu buněčného cyklu a při koncentracích 100  $\mu\text{mol/l}$  a vyšších dokonce i apoptózu. Nižší dávky LA také zvýšily citlivost buněk HCT116 na jiné mechanismy vyvolávající apoptózu [45, 46, 47].

U většiny buněčných linií však účinky LA nastávají až při vyšších koncentracích v  $\text{mmol/l}$ . Kyselina lipoová má silnější cytotoxické účinky než kyselina dihydrolipoová. I u některých jejích derivátů byly prokázány protinádorové účinky ve vyšších koncentracích. Některé substituenty dokonce výrazně zvyšují účinnost LA. Přesné mechanismy účinku LA a jejích derivátů na apoptózu nejsou známy, ale určitě dochází k působení LA na mitochondrie, což je velice výhodný mechanismus. Mezi další výhody využití LA patří, že nemá mutagenní vlastnosti [45, 46].

Podle posledních studií se předpokládá, že především deriváty kyseliny lipoové nebo i samotná kyselina lipoová kombinována s jinými léčivými látkami vykazují slibný charakter při léčbě rakoviny, především by mohla být využívána u terapie rakoviny střev, kde jsou účinné i nižší dávky LA [46, 47].

Kyselina lipoová je i v nižších koncentracích schopná zvýšit cytotoxicitu některých současných cytostatik, což by mohlo vést k efektivnější léčbě, zmírnění nežádoucích účinků a také ke snížení rezistence na léčbu. Použití samostatné LA pravděpodobně není úplně ideální variantou, protože k protinádorovému působení je většinou potřeba vyšších koncentrací LA. Vyšší dávky LA by zase naopak mohly vést k nežádoucím účinkům a vyvolání apoptózy nejen u nádorových, ale i u zdravých buněk, nebo způsobit poškození buněk ledvin. Také by mohlo dojít k nekrotickému poškození dalších orgánů, jak bylo prokázáno například ve studii Vigila a kol. na makacích [41, 42, 46].

## 2 CÍLE PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo pokusit se určit cytotoxicitu kyseliny lipoové pomocí testu vylučování trypanové modři, konkrétně zjistit, jaké koncentrace kyseliny lipoové již působí negativně či letálně na erythrocyty a mononukleární buňky vyizolované z periferní krve. Dalším cílem bylo pokusit se pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s elektrochemickou detekcí stanovit koncentrace kyseliny lipoové v krevní plazmě a v erythrocytech po perorální suplementaci kyselinou lipoovou.

## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 SEZNAM PŘÍSTROJŮ A POMŮCEK

Analytická cela model 5010 (ESA, USA)  
Analytické váhy LB-1050/2 (Laberte, Maďarsko)  
Automatické pipety (Biohit, Finsko)  
Centrifuga Eppendorf 5417R (Eppendorf, Německo)  
Centrifuga Eppendorf 5804R (Eppendorf, Německo)  
Centrifuga Hermle Z300K (Hermle Labortechnik GmbH, Německo)  
Centrifuga Sorvall TC6 (DuPont, USA)  
Dávkovací ventil Rheodyne 9725i (Rheodyne, USA)  
Digestoř Merci (Merci s.r.o., Česká republika)  
Elektrochemický detektor Coulochem III (ESA, USA)  
Filtlační aparatura (Supelco, USA)  
Hlubokomrazicí box MDF-U3086S (SANYO Electric Co., Ltd, Japonsko)  
Chromatografická kolona LiChroCart 254 x 4 mm, Purospher Star (RP-18e), 5 µm (Merck, Německo)  
Kádinky, odměrné válce, zkumavky, lahve, tyčinky, lodičky, lžičky  
Koncentrátor vzorků se zahříváním Termovap (ECOM spol. s r.o., Česká republika)  
Kultivační destičky Cell Culture Plate 3512 (CoStar Group, USA)  
Lednice Liebherr (Liebherr, Německo)  
Microsoft Office Excel 2010 (Microsoft, USA)  
Mikroskop Eclipse 80i (Nikon, Japonsko)  
Mikroskop Eclipse E200 (Nikon, Japonsko)  
Mikrostríkačka Hamilton 710, 100 µl (Hamilton Bonaduz A.G., Švýcarsko)  
Mikrozkumavky Eppendorf (Eppendorf, Německo)  
Multidávkovač Multipette Plus + Plastové nástavce Combitips Plus (Eppendorf, Německo)  
Nylonové filtry, porozita 0,45 µm (Supelco, USA)  
Odběrové zkumavky Vacuette 9 ml (Greiner Bio-One, Rakousko)  
Ochranná cela model 5020 (ESA, USA)  
Pasteurovy pipety  
pH metr HI 8314 (Hanna Instruments, Itálie)  
pH papírky Tritest L, pH 1-11 (Macherey-Nagel, Německo)

Plastové špičky pro automatické pipety (Neptune Scientific, USA)  
Plastové zkumavky (Schoeller Instruments, Česká republika)  
Předkolona LiChroCart 4 x 4 mm, Purospher Star (RP-18e), 5 µm (Merck, Německo)  
Předvážky Kern 440-35A (KERN & SOHN GmbH, Německo)  
Přístroj na výrobu ultračisté vody Smart2Pure (TKA, Německo)  
SPE kolonky Discovery DSC-PH (Supelco, USA)  
Software QuickCalcs (GraphPad Software, USA)  
Termoblok Isotemp 145D (Fisher Scientific<sup>TM</sup>, USA)  
Termostat Memmert (Memmert GmbH + Co. KG, Německo)  
Třepačka Reax Top (Heidolph, Německo)  
Ultrazvuková vana K12 (Kraintek s.r.o., Slovensko)  
Vakuová aparatura na SPE analýzu Visiprep<sup>TM</sup> (Supelco, USA)  
Vyhodnocovací software Clarity (Data Apex, Česká republika)  
Vysokotlaké analytické čerpadlo LC-10AD VP (Shimadzu, Japonsko)



### 3.2 SEZNAM CHEMIKÁLIÍ

- 2-propanol pro HPLC ( $\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$ , Mr = 60,10) (Merck, Německo)
- Acetonitril pro HPLC ( $\text{CH}_3\text{CN}$ , Mr = 41,05) (Merck, Německo)
- Dihydrogenfosforečnan sodný ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , Mr = 119,98) (Sigma-Aldrich, USA)
- Dimethylsulfoxid (DMSO) ( $\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$ , 99,8%, Mr = 78,13) (Carl Roth GmbH + Co. KG, Německo)
- Dusík 4,6 ( $\text{N}_2$ , Mr = 28,01) (Linde Gas, Česká republika)
- Histopaque<sup>®</sup>-1077 ( $\rho = 1,077 \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) (Sigma-Aldrich, USA)
- Hydroxid sodný ( $\text{NaOH}$ , Mr = 40) (Sigma-Aldrich, USA)
- Chlorid sodný ( $\text{NaCl}$ , Mr = 58,44) (Sigma-Aldrich, USA)
- Kyselina lipoová ( $\text{C}_8\text{H}_{14}\text{O}_2\text{S}_2$ , Mr = 206,3) (Sigma-Aldrich, USA)
- Kyselina chlorovodíková ( $\text{HCl}$ , 37 %, Mr = 36,46) (Sigma-Aldrich, USA)
- Kyselina fosforečná ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ , 85%, Mr = 98) (Sigma-Aldrich, USA)
- Methanol pro HPLC ( $\text{CH}_3\text{OH}$ , Mr = 32,04) (Merck, Německo)
- Fosfátový pufr (PBS) 10X (pH = 7,4) (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Penicilin (Life Technologies, USA)
- Ringerův roztok – tablety (Sigma-Aldrich, USA)
- Roswell Park Memorial Institute (RPMI) médium 1640 (Life Technologies, USA)
- Streptomycin (Life Technologies, USA)
- Trypanová modř (0,4%) (Life Technologies, USA)
- Ultračistá voda ( $\gamma = 0,055 \mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$ )

## 3.3 STANOVENÍ VIABILITY BUNĚK POMOCÍ TRYPANOVÉ MODŘI

### 3.3.1 Princip metody

Viabilita, nebo také životaschopnost buněk, znázorňuje počet živých buněk v testovaném vzorku. Ke stanovení viability buněk se velice často používá metoda vylučování trypanové modři. Tato metoda je založena na tom, že živé buňky mají nepoškozené buněčné membrány a tudíž do nich barvivo nemůže prostoupit. A pokud by se do nich barvivo částečně dostalo, dokáže ho aktivním transportem opět z buňky vyloučit. Mrtvé buňky mají naopak membrány nefunkční a poškozené, tudíž do sebe absorbují barvivo z okolí. Tyto buňky se potom dají od živých dobře odlišit, protože mají výrazně modrou barvu. Viabilita buněk po smíchání s trypanovou modří by měla být vyhodnocena nejdéle do 15 minut, aby nenastala smrt buněk v důsledku toxického působení trypanové modři. Touto metodou není možné odlišit, zda nastala buněčná smrt v důsledku apoptózy nebo nekrózy [48].

### 3.3.2 Pracovní postup

Ke stanovení viability buněk bylo ze vzorku odebráno 10  $\mu$ l buněčné suspenze a na parafilmu smícháno s 10  $\mu$ l trypanové modři, barvivo se nechalo působit 1 – 2 minuty. 10  $\mu$ l suspenze bylo nadávkováno do Bürkerovy komůrky a pod mikroskopem (fázový kontrast, zvětšení 400x) byl ve 25 polích Bürkerovy komůrky hodnocen počet živých/mrtvých buněk. Viabilita buněk byla stanovena podle rovnice:

$$viabilita [\%] = \frac{\text{počet živých buněk} \cdot 100}{\text{celkový počet buněk}}$$

## **3.4 PŘÍPRAVA KULTUR KREVNÍCH BUNĚK**

### **3.4.1 ERYTROCITY**

#### **3.4.1.1 Použité roztoky**

##### **ZÁSOBNÍ ROZTOK 10 mmol/l KYSELINY LIPOOVÉ V DMSO**

10,32 mg kyseliny lipoové bylo rozpuštěno v 5 ml DMSO a rozpipetováno do mikrozkušavek Eppendorf a uchováváno v mrazáku při -80 °C.

##### **ZÁSOBNÍ ROZTOK 100 mmol/l KYSELINY LIPOOVÉ V DMSO**

10,32 mg kyseliny lipoové bylo rozpuštěno v 500 µl DMSO a uchováváno při -80 °C.

##### **ZÁSOBNÍ ROZTOK 150 mmol/l KYSELINY LIPOOVÉ V DMSO**

30,94 mg kyseliny lipoové bylo rozpuštěno v 1 ml DMSO a uchováváno při -80 °C.

##### **ZÁSOBNÍ ROZTOK 200 mmol/l KYSELINY LIPOOVÉ V DMSO**

41,26 mg kyseliny lipoové bylo rozpuštěno v 1 ml DMSO a uchováváno při -80 °C.

##### **ZÁSOBNÍ ROZTOK 250 mmol/l KYSELINY LIPOOVÉ V DMSO**

51,57 mg kyseliny lipoové bylo rozpuštěno v 1 ml DMSO a uchováváno při -80 °C.

##### **ROZTOK PUFRU PBS**

PBS pufr byl naředěn 10x. K 10 ml pufru bylo přidáno 90 ml ultračisté vody.

## **RINGERŮV ROZTOK**

1 tableta k přípravě Ringerova roztoku byla rozpuštěna v 500 ml ultračisté vody.

### **3.4.1.2 Pracovní postup**

#### **ZPRACOVÁNÍ ERYTROCYTŮ**

Dobrovolnému dárci bylo odebráno 9 ml žilní krve do zkumavky Vacuette, která obsahovala jako protisrážlivé činidlo kyselinu ethylendiamintetraoctovou (EDTA). Krev byla ve zkumavce promíchána a stočena 7 minut při 21 °C a 750 otáčkách za minutu. Supernatant byl odsán do odpadu a krvinky byly promyty 4 ml PBS a opět stočeny. Promytí proběhlo 3x a po posledním promytí byl odsán supernatant a byl stanoven počet erytrocytů v krvi.

Erytrocyty byly následně naředěny Ringerovým roztokem a dávkovány do 12-ti jamkových kultivačních destiček. Počet erytrocytů v jednotlivých jamkách odpovídal 50 000 000 buněk/ml. Do každé jamky bylo nadávkováno celkem 2,5 ml suspenze erytrocytů a přidáno 2,5 µl naředěného zásobního roztoku kyseliny lipoové tak, aby v každé jamce byla maximální koncentrace DMSO 0,1%. Do kontroly bylo přidáno 2,5 µl DMSO.

Byly připraveny 2 kultivační destičky se stejnými koncentracemi přídavek LA – jedna byla použita na pokus po 24 hodinách, druhá po 48 hodinách, aby se předešlo zbytečnému zasahování do vzorků. Všechny vzorky byly připraveny v triplicátu. Kultivační destičky byly vloženy do termostatu a uchovávány při 37 °C.

Po 24 nebo 48 hodinách byla z termostatu vyjmuta jedna kultivační destička a byla stanovena viabilita erytrocytů. Výsledky byly zpracovány v programu Microsoft Office Excel 2010. Byly vyhotoveny sloupcové grafy průměrných hodnot viability a počtů buněk s chybovými úsečkami, které znázorňují směrodatnou odchylku. Nepárový t-test s 5% hladinou významnosti byl vytvořen pomocí softwaru GraphPad QuickCalcs.

## TESTOVÁNÍ VLIVU DMSO

Byl proveden pokus s různými koncentracemi DMSO, abychom zjistili, jaká koncentrace DMSO by mohla být pro erythrocyty již toxická. Testované koncentrace byly 0,1%, 0,2% a 0,3% DMSO.

Dobrovolnému dárci bylo odebráno 9 ml žilní krve do zkumavky Vacuette s obsahem EDTA. Krev byla po promíchání stočena 7 minut při 21 °C a 750 otáčkách za minutu. Supernatant byl odsán do odpadu a krvinky byly promyty 4 ml PBS a opět stočeny. Promytí proběhlo 3x. Po posledním promytí byl odsán supernatant a byl stanoven počet erythrocytů v krvi.

Erythrocyty byly naředěny Ringerovým roztokem a dávkovány do 12-ti jamkové kultivační destičky tak, aby počet erythrocytů v jednotlivých jamkách odpovídal 50 000 000 buněk/ml. Do každé jamky bylo nadávkováno celkem 2,5 ml suspenze erythrocytů a přidán DMSO, aby koncentrace v jamkách odpovídaly 0,1%, 0,2% a 0,3% DMSO. Do kontroly bylo přidáno 7,5  $\mu$ l Ringerova roztoku. Všechny vzorky byly připraveny v triplikátu. Kultivační destička byla vložena do termostatu inkubována 24 hodin při 37 °C.

Po 24 hodinách byla kultivační destička vyjmuta a byla stanovena viabilita erythrocytů. Výsledky byly zpracovány v programu Microsoft Office Excel 2010. Byly vyhotoveny sloupcové grafy průměrných hodnot viability s chybovými úsečkami, které znázorňují směrodatnou odchylku. Nepárový t-test s 5% hladinou významnosti byl vytvořen pomocí softwaru GraphPad QuickCalcs.

## **3.4.2 MONONUKLEÁRNÍ BUŇKY**

### **3.4.2.1 Použité roztoky**

#### **HISTOPAQUE®-1077**

Použitý bez další úpravy.

#### **ROZTOK PUFRU PBS**

PBS pufr byl naředěn 10x, k 10 ml pufru bylo přidáno 90 ml ultračisté vody.

#### **ZÁSOBNÍ ROZTOK KYSELINY LIPOOVÉ V DMSO**

Byly použity stejné zásobní roztoky LA jako u erytrocytů.

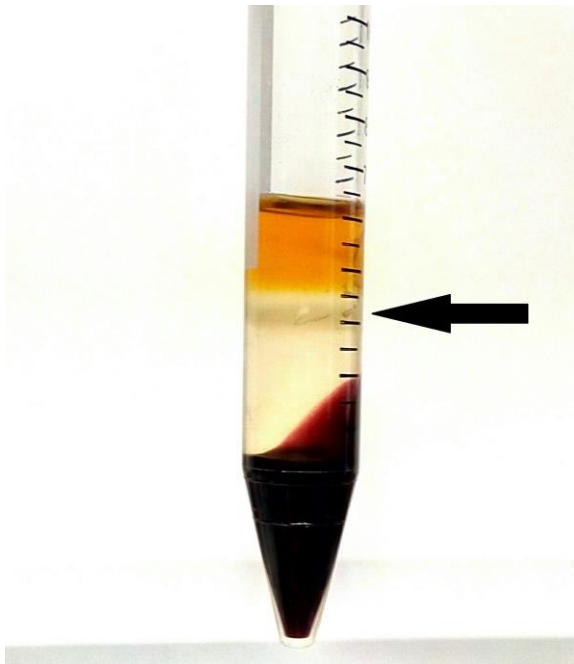
### **3.4.2.2 Pracovní postup**

Dobrovolnému dárci bylo odebráno 9 ml žilní krve do zkumavky Vacuette s obsahem EDTA. Do plastových zkumavek o objemu 15 ml byly napipetovány vždy 3 ml Histopaque a opatrně převrstveny 3 ml krve. Zkumavky byly centrifugovány za pokojové teploty při 500 otáčkách po dobu 30 minut. Po centrifugaci byla Pasteurovou pipetou opatrně odebrána vrstva lymfocytů a monocytů, která se nacházela na rozhraní Histopaque a plazmy (viditelné na obrázku 7). Buňky byly přeneseny do nové zkumavky, promyty 10 ml PBS pufru a stočeny při 250 otáčkách 10 minut. Supernatant byl odebrán do odpadu a následovala další dvě promytí 5 ml PBS za stejných podmínek. Po odebrání supernatantu byly buňky resuspendovány v 1 ml PBS a spojeny do jedné zkumavky. Při práci jsme se řídili postupem přiloženým k produktu Histopaque®-1077 [49].

Mononukleární buňky byly dávkovány do 12-ti jamkové kultivační destičky s RPMI médiem tak, aby počet buněk v jamkách byl 362 500 buněk/jamku. V každé jamce bylo 2,5 ml buněčné suspenze, ke které bylo následně přidáno 2,5  $\mu$ l naředěného zásobního roztoku kyseliny lipové. Všechny koncentrace byly připraveny v triplikátu. Do kontroly bylo dávkováno 2,5  $\mu$ l DMSO a do všech jamek bylo přidáno ještě 50  $\mu$ g penicilinu

a 50  $\mu\text{g}$  streptomycinu, aby se zabránilo bakteriální infekci. Po promíchání všech jamek byla kultivační destička vložena na 24 hodin do termostatu s 5%  $\text{CO}_2$  při teplotě 37  $^\circ\text{C}$ .

Po 24 hodinách byla kultivační destička vyjmuta a byla stanovena viabilita mononukleárních buněk. Výsledky byly opět zpracovány v programu Microsoft Office Excel 2010. Byly vyhotoveny sloupcové grafy průměrných hodnot viability a počtů buněk s chybovými úsečkami, které znázorňují směrodatnou odchylku. Nepárový t-test s 5% hladinou významnosti byl vytvořen pomocí softwaru GraphPad QuickCals.



**Obrázek 7:** Separace mononukleárních buněk pomocí Histopaque. Šipka označuje vrstvu mononukleárních buněk.

### **3.5 STANOVENÍ KYSELINY LIPOOVÉ POMOCÍ HPLC/ED**

#### **3.5.1 Použité roztoky**

##### **ZÁSOBNÍ ROZTOK 25 mmol/l KYSELINY LIPOOVÉ**

Bylo naváženo 0,5158 g kyseliny lipoové a rozpuštěno ve 100 ml ultračisté vody. Zásobní roztok byl rozpipetován do mikrozskumavek Eppendorf a uchováván při -80 °C.

##### **MOBILNÍ FÁZE (20 mmol/l NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> : ACETONITRIL v poměru 65 : 35)**

Mobilní fáze byla připravena rozpuštěním 2,3996 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> v 650 ml ultračisté vody. Po rozpuštění bylo přidáno 350 ml acetonitrilu a po promíchání bylo upraveno pH na hodnotu 2,82 pomocí 85% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. Následovala filtrace mobilní fáze přes nylonový filtr o velikosti pórů 0,45 μm a odvzdušnění na ultrazvukové lázni po dobu 30 minut.

##### **PROPLACHOVACÍ ROZTOK 2-PROPANOL : METHANOL (1 : 4)**

Proplachovací roztok byl připraven smícháním 100 ml 2-propanolu a 400 ml methanolu. Následovala filtrace přes nylonový filtr o velikosti pórů 0,45 μm a odvzdušnění na ultrazvukové lázni po dobu 30 minut.

##### **PROPLACHOVACÍ ROZTOK ACETONITRIL : ULTRAČISTÁ VODA (1 : 1)**

Proplachovací roztok byl připraven smícháním 500 ml acetonitrilu a 500 ml ultračisté vody. Poté byl přefiltrován přes nylonový filtr o velikosti pórů 0,45 μm a odvzdušněn na ultrazvuku.

##### **ROZTOK NA ROZPOUŠTĚNÍ ODPARKU**

Roztok na rozpouštění odparku byl připraven ve stejném poměru acetonitril : voda jako mobilní fáze. Bylo smícháno 3,5 ml acetonitrilu a 6,5 ml ultračisté vody.



## **ROZTOK NA PROPLACHOVÁNÍ DÁVKOVACÍHO VENTILU**

Roztok na proplachování dávkovacího ventilu byl připraven smícháním 3,5 ml acetonitrilu a 6,5 ml ultračisté vody.

## **FYZIOLOGICKÝ ROZTOK NaCl (0,9 %)**

Fyziologický roztok byl připraven rozpuštěním 0,9 g NaCl ve 100 ml ultračisté vody.

## **ROZTOK 2,0 mol/l HCl**

Do odměrné baňky bylo napipetováno 16,42 ml 37% HCl a doplněno do 100 ml redestilovanou vodou.

## **ROZTOK 0,05 mol/l NaOH**

Bylo naváženo 0,2 g NaOH a rozpuštěno ve 100 ml ultračisté vody.

### **3.5.2 Pracovní postup**

#### **ZPRACOVÁNÍ KALIBRAČNÍCH STANDARDŮ PLAZMY**

Dobrovolnému dárci bylo odebráno do zkumavky Vacuette s obsahem EDTA 9 ml žilní krve, která byla okamžitě stočena na centrifuze při 2000 otáčkách za minutu a 10 °C po dobu 15 minut. Vrstva plazmy byla odebrána a rozpipetována do mikrozkuvek Eppendorf po 450 µl na přípravu kalibračních standardů. Ke vzorkům plazmy bylo přidáno vždy 50 µl různě naředěného zásobního 25 mmol/l roztoku kyseliny lipoové. Do nulové koncentrace bylo k plazmě přidáno 50 µl ultračisté vody. Multidávkočtem bylo do všech mikrozkuvek nadávkováno 250 µl vychlazeného acetonitrilu a následovalo promíchání na třepačce po dobu 2 minut. Poté byly vzorky uloženy na 20 minut do lednice, aby proběhla deproteinace. Následovalo stočení na centrifuze při 15000 otáčkách za minutu a 4 °C po dobu 10 minut. 450 µl supernatantu bylo odebráno do nových mikrozkuvek, okyseleno 20 µl kyseliny chlorovodíkové o koncentraci 2 mol/l a poté následovala extrakce pevnou fází (SPE).

Na SPE fenolových kolonkách byl nastaven průtok 3 ml/min a kolonky byly nejprve solvatovány 3 ml methanolu, nasyceny 3 ml ultračisté vody a až pak bylo dávkováno 450 µl deproteinované a okyselené plazmy. Kolonky se následně promyly 5 ml ultračisté vody a 5 minut se nechaly sušit. Vzorky byly eluovány 1 ml methanolu do mikrozkušavek Eppendorf a zakoncentrovány odpařením dusíkem 4,6 při 40 °C.

Před chromatografickou analýzou byly odparky uchovávány v mrazáku při -80 °C a k vlastní analýze byly rozpuštěny ve 100 µl roztoku acetonitril : voda v poměru 35 : 65. Do kapalinového chromatografu bylo dávkováno vždy 10 µl vzorku.

### **ZPRACOVÁNÍ VZORKŮ PLAZMY**

Do zkumavky Vacuette s obsahem EDTA bylo odebráno 9 ml žilní krve dárce po suplementaci 500 mg racemické směsi kyseliny lipoové v tabletové formě. Odběr proběhl 1 hodinu po konzumaci tablet. Vzorky plazmy byly zpracovány stejným způsobem jako kalibrační standardy, s jediným rozdílem, že místo 50 µl roztoku kyseliny lipoové bylo ke 450 µl plazmy přidáno 50 µl ultračisté vody.

### **ZPRACOVÁNÍ ERYTROCYTÁRNÍCH LYZÁTŮ**

Dobrovolnému nesuplementovanému dárce a dárce po suplementaci 500 mg racemické směsi kyseliny lipoové v tabletové formě (1 hodina po konzumaci) bylo odebráno 9 ml žilní krve do zkumavek Vacuette s obsahem EDTA. Do plastových zkumavek bylo odebráno vždy 500 µl plné krve, ke které byly přidány 2 ml 0,9% fyziologického roztoku NaCl. Po promíchání byly zkumavky stočeny při 1500 otáčkách za minutu při laboratorní teplotě po dobu 3 minut. Supernatant byl odsán do odpadu a erytrocyty byly promyty dalšími 2 ml fyziologického roztoku a stočeny. Promytí proběhlo celkem 4x a po posledním odsátí supernatantu bylo k erytrocytům přidáno 500 µl vychlazené ultračisté vody. Vzorky byly podobu 10 minut ponechány v lednici, aby mohla proběhnout hemolýza. Hemolyzáty byly poté rozpipetovány do mikrozkušavek Eppendorf a uchovávány do dalšího zpracování v mrazáku při -80 °C.

Další zpracování erytrocytárních lyzátů před chromatografickou analýzou probíhalo stejným způsobem jako u vzorků plazmy.

## CHROMATOGRAFICKÁ ANALÝZA

Systém HPLC/ED byl tvořen vysokotlakým analytickým čerpadlem LC-10 AD, dávkovacím ventilem Rheodyne 9725i, předkolonou LiChroCart 4 x 4 mm, Purospher Star (RP-18e), chromatografickou kolonou LiChroCart 254 x 4 mm, Purospher Star (RP-18e) a elektrochemickým detektorem Coulochem III. Nastavení analytické a ochranné cely elektrochemického detektoru Coulochem III je zobrazeno v tabulce 2.

**Tabulka 2:** Nastavení elektrochemického detektoru Coulochem III

	Ochranná cela	Analytická cela	
		Kanál 1	Kanál 2
<b>Měřicí mód</b>	DC mód		
<b>Napětí [mV]</b>	+ 750	+ 450	+ 590
<b>Citlivost</b>		10 $\mu$ A	2 $\mu$ A
<b>Výstupní napětí [mV]</b>		1	1
<b>Filtr [s]</b>		5	5

Před vlastní analýzou byl systém HPLC/ED promýván nejprve proplachovacím roztokem 2-propanol : methanol v poměru 1 : 4 po dobu 30 minut a následně dalších 30 minut proplachovacím roztokem acetonitril : ultračistá voda v poměru 1 : 1.

Po promytí byla do systému zapojena mobilní fáze a její průtok byl nastaven na 1 ml/min a teplota byla nastavena na 37 °C. Po ustálení detektoru byla zahájena analýza vzorku. Ten byl do systému dávkován pomocí mikrostříkačky Hamilton 710. Vzorku bylo dávkováno do dávkovacího ventilu Rheodyne 9725i vždy 10  $\mu$ l. Ke zpracování elektrochemického signálu byl využit vyhodnocovací software Clarity.

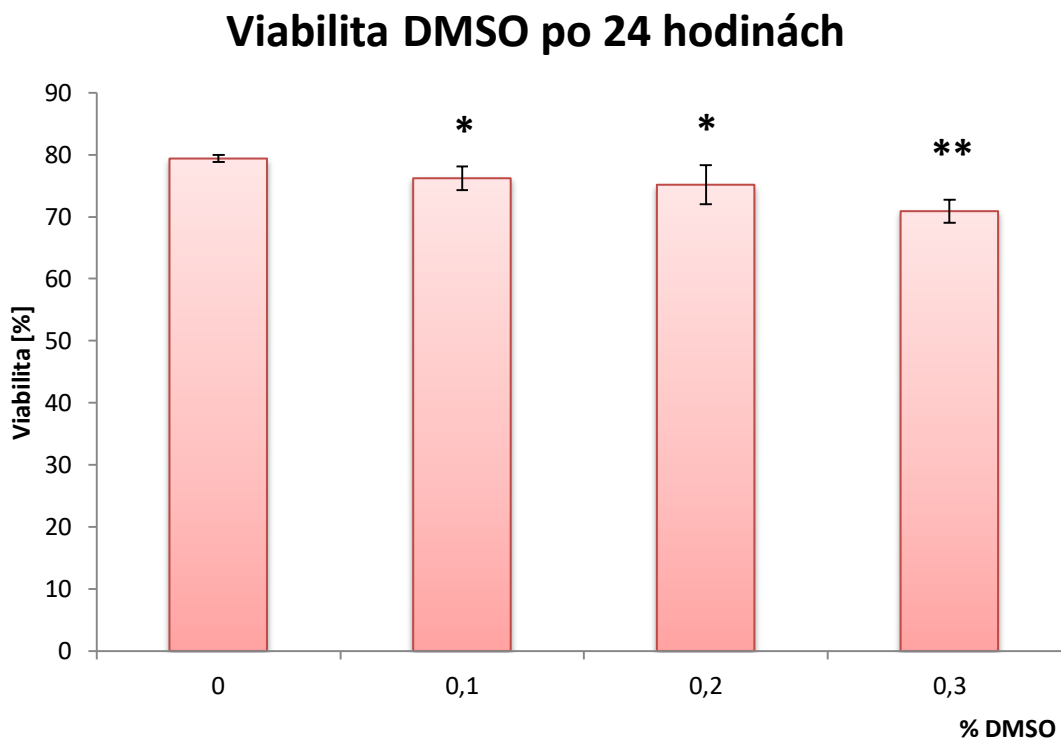
Obsah LA v jednotlivých vzorcích byl stanoven metodou kalibrační křivky. Kalibrační standardy byly proměřeny pomocí HPLC/ED a poté byla v programu Microsoft Office Excel 2010 vytvořena kalibrační závislost plochy chromatografického píku na koncentraci LA.

## 4 VÝSLEDKY

### 4.1 VLIV DMSO NA ERYTROCITY

Zásobní roztoky kyseliny lipoové pro testování viability erytrocytů byly připraveny rozpuštěním kyseliny lipoové v DMSO. Před samotným testováním vlivu kyseliny lipoové na erytrocyty bylo potřeba otestovat, zda nemá cytotoxický vliv na erytrocyty i rozpouštědlo. Do kultivačních destiček byl k suspenzi erytrocytů nadávkován DMSO v koncentracích 0,1%, 0,2% a 0,3%. Jako kontrola byl použit přírůstek Ringerova roztoku. Inkubace probíhala 24 hodin při 37 °C.

**Graf 1:** Vliv rozpouštědla DMSO na viabilitu erytrocytů. Graf znázorňuje aritmetický průměr měření se směrodatnými odchylkami, symbol \* označuje výsledky na hranici statistické významnosti, symbol \*\* označuje statisticky významný rozdíl oproti kontrole ( $p \leq 0,05$ ), nepárový t-test.



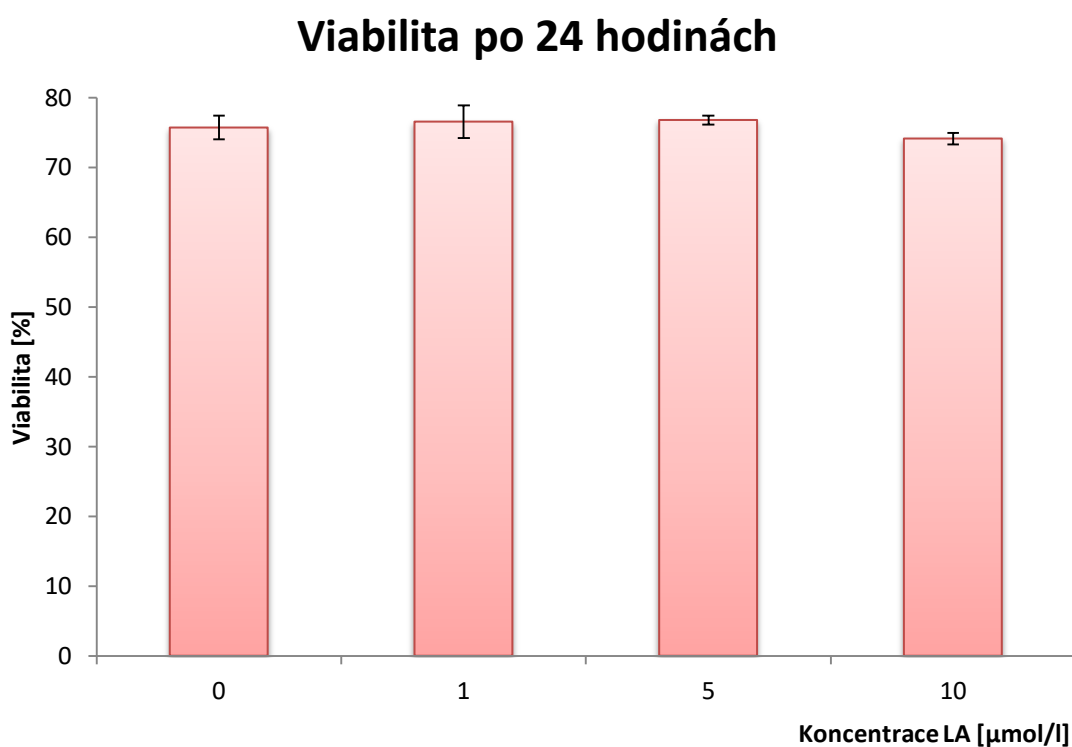
Pomocí tohoto experimentu bylo zjištěno, že po 24 hodinové inkubaci nastal statisticky významný pokles viability erytrocytů, ke kterým byl přidán 0,3% DMSO. U 0,1% a 0,2% DMSO byl pokles viability na hranici statistické významnosti (viz graf 1).

## 4.2 VLIV KYSELINY LIPOOVÉ NA ERYTROCITY

### 4.2.1 Vliv nízkých koncentrací kyseliny lipové na viabilitu erytrocytů

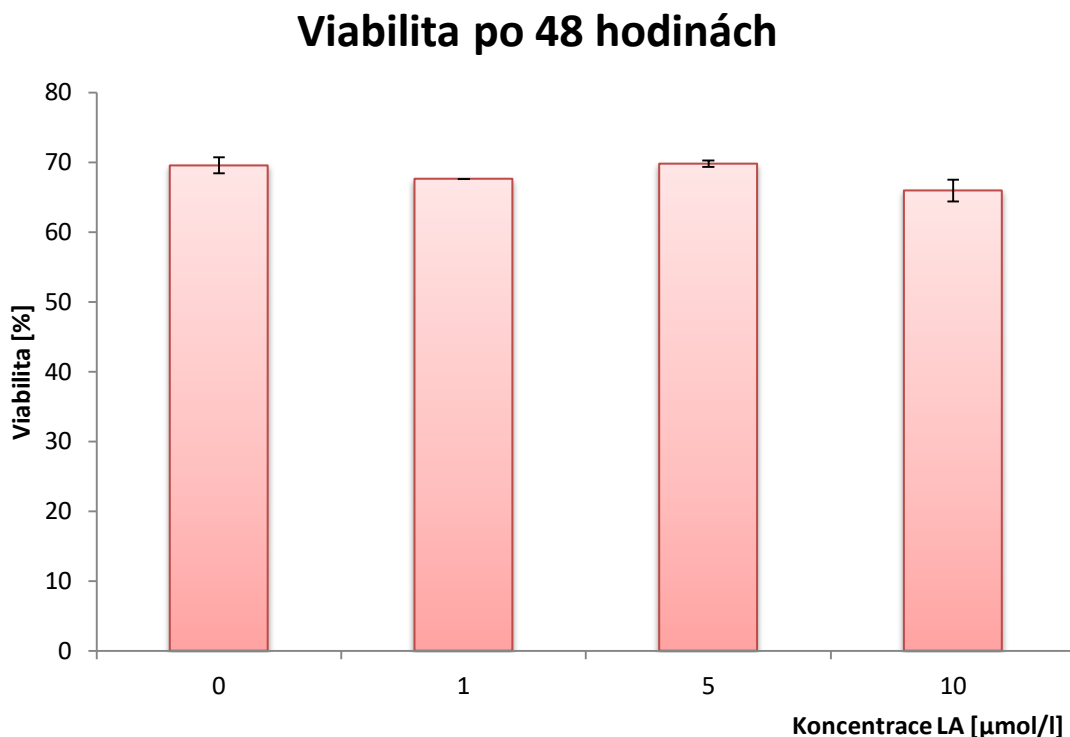
Nejprve byl testován vliv nízkých koncentrací kyseliny lipové na viabilitu erytrocytů po 24 a 48 hodinové inkubaci. Použité koncentrace LA byly 1  $\mu\text{mol/l}$ , 5  $\mu\text{mol/l}$  a 10  $\mu\text{mol/l}$ . Jako kontrola byl použit 0,1% DMSO. Hodnoty viability erytrocytů po 24 a 48 hodinové inkubaci jsou znázorněny v grafech 2 a 3.

**Graf 2:** Vliv nízkých koncentrací kyseliny lipové na viabilitu erytrocytů po 24 hodinové inkubaci. Graf znázorňuje aritmetický průměr měření se směrodatnými odchylkami, symbol \* označuje výsledky na hranici statistické významnosti, symbol \*\* označuje statisticky významný rozdíl oproti kontrole ( $p \leq 0,05$ ), nepárový t-test.



Po 24 hodinové inkubaci nezpůsobila kyselina lipová v žádné z testovaných koncentrací statisticky významný rozdíl ve viabilitě erytrocytů v porovnání s kontrolou (viz graf 2).

**Graf 3:** Vliv nízkých koncentrací kyseliny lipoové na viabilitu erytrocytů po 48 hodinové inkubaci. Graf znázorňuje aritmetický průměr měření se směrodatnými odchylkami, symbol \* označuje výsledky na hranici statistické významnosti, symbol \*\* označuje statisticky významný rozdíl oproti kontrole ( $p \leq 0,05$ ), nepárový t-test.

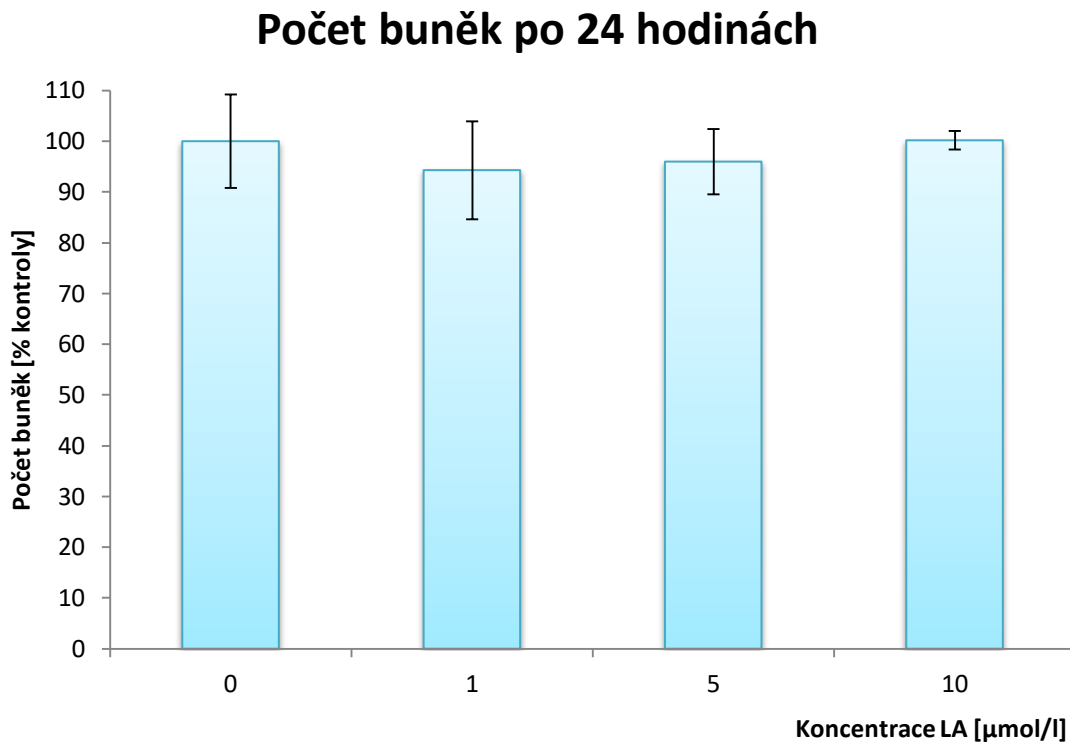


Ani po 48 hodinové inkubaci nezpůsobila kyselina lipoová v žádné z testovaných koncentrací statisticky významný rozdíl ve viabilitě erytrocytů v porovnání s kontrolou (viz graf 3).

#### 4.2.2 Vliv nízkých koncentrací kyseliny lipoové na počet erytrocytů

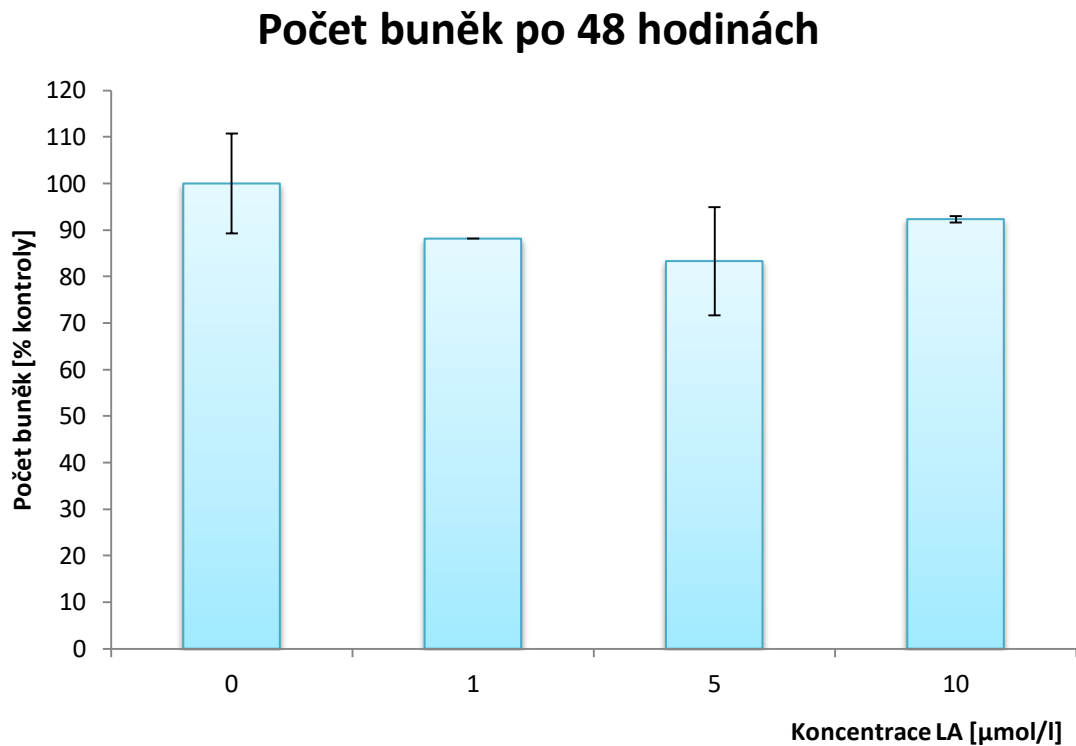
Společně s viabilitou byly statisticky vyhodnoceny i změny v počtech buněk po 24 a 48 hodinové inkubaci s 1  $\mu\text{mol/l}$ , 5  $\mu\text{mol/l}$  a 10  $\mu\text{mol/l}$  kyselinou lipoovou. Počty jednotlivých buněk byly vyhodnoceny jako procento kontroly a jsou zobrazeny v grafech 4 a 5.

**Graf 4:** Vliv nízkých koncentrací kyseliny lipoové na počty erytrocytů po 24 hodinové inkubaci. Graf znázorňuje aritmetický průměr měření se směrodatnými odchylkami, symbol \* označuje výsledky na hranici statistické významnosti, symbol \*\* označuje statisticky významný rozdíl oproti kontrole ( $p \leq 0,05$ ), nepárový t-test.



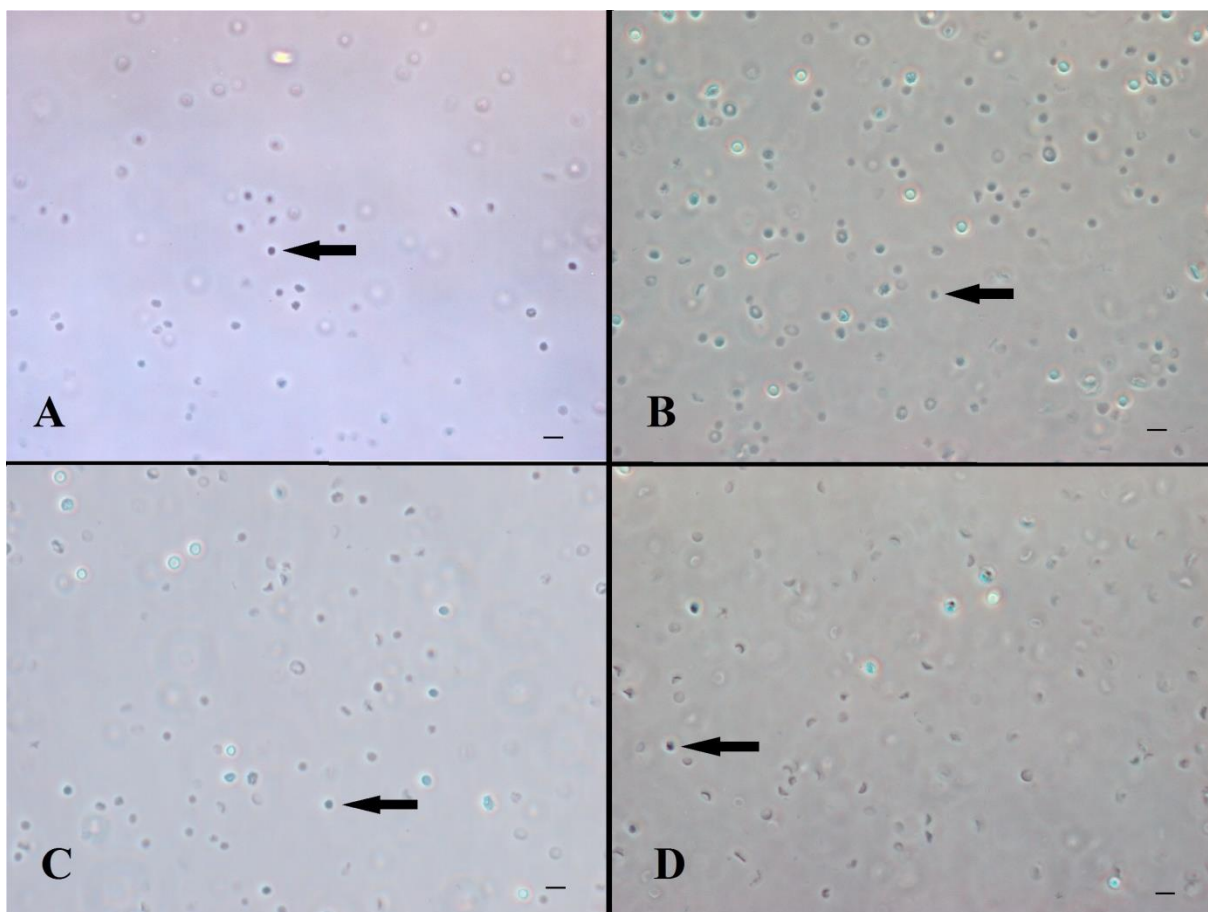
Nízké koncentrace kyseliny lipoové neměly statisticky významný vliv ani na změny počtů erytrocytů po 24 hodinové inkubaci oproti kontrole (viz graf 4).

**Graf 5:** Vliv nízkých koncentrací kyseliny lipoové na počty erytrocytů po 48 hodinové inkubaci. Graf znázorňuje aritmetický průměr měření se směrodatnými odchylkami, symbol \* označuje výsledky na hranici statistické významnosti, symbol \*\* označuje statisticky významný rozdíl oproti kontrole ( $p \leq 0,05$ ), nepárový t-test.



Ani jedna z testovaných nízkých koncentrací kyseliny lipoové neměla statisticky významný vliv na změny počtů buněk oproti kontrole po 48 hodinové inkubaci (viz graf 5).



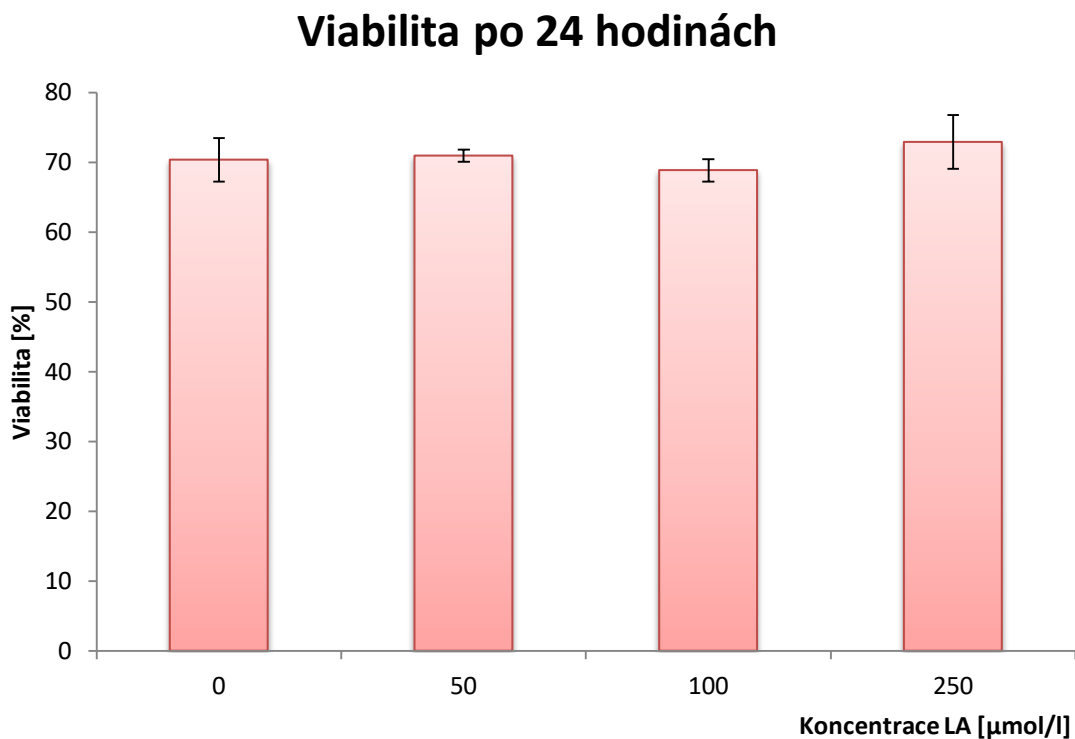


**Obrázek 8:** Erythrocyty pozorované pod mikroskopem. Měřítka je 10  $\mu\text{m}$ . Šipky označují mrtvé buňky. **A:** Kontrola – 0,1% DMSO; **B:** Kyselina lipoová 1  $\mu\text{mol/l}$ ; **C:** Kyselina lipoová 5  $\mu\text{mol/l}$ ; **D:** Kyselina lipoová 10  $\mu\text{mol/l}$ .

#### 4.2.3 Vliv vysokých koncentrací kyseliny lipoové na viabilitu erytrocytů

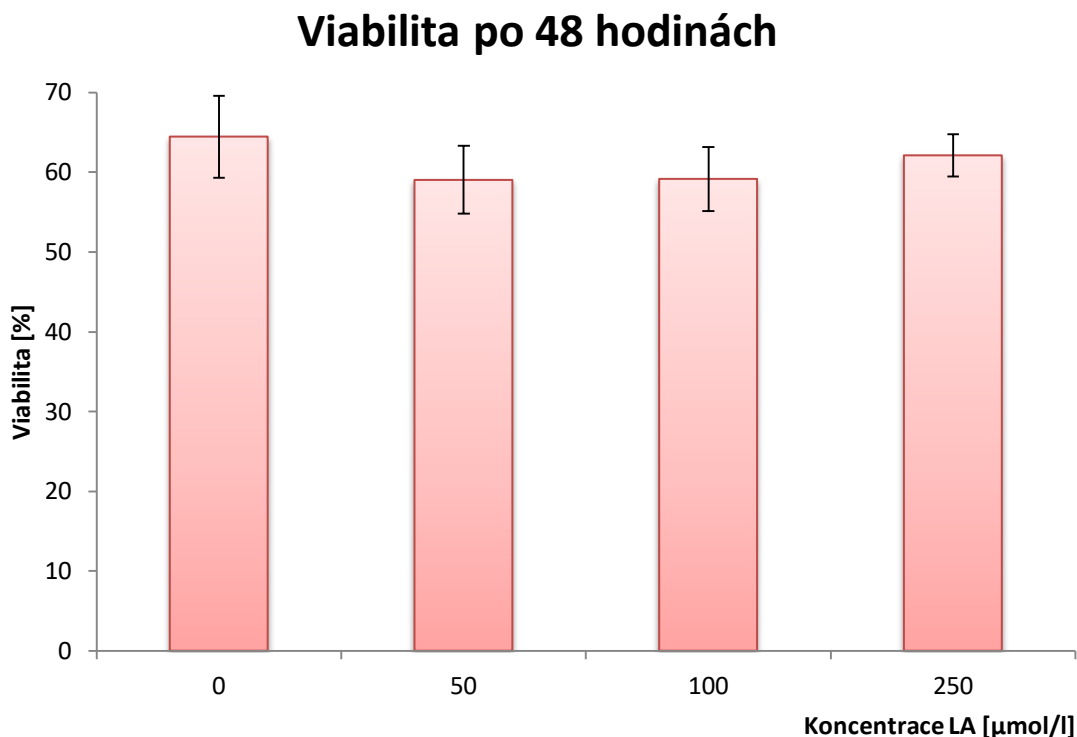
Po otestování vlivu nízkých koncentrací kyseliny lipoové na erythrocyty byl testován vliv vysokých koncentrací LA. Jako vysoké koncentrace byly zvoleny koncentrace 50  $\mu\text{mol/l}$ , 100  $\mu\text{mol/l}$  a 250  $\mu\text{mol/l}$ . Inkubace erythrocytů s kyselinou lipoovou probíhala vždy po dobu 24 a 48 hodin. Jako kontrola byl použit 0,1% DMSO. Vliv vysokých koncentrací kyseliny lipoové na viabilitu erythrocytů je zobrazen v grafech 6 a 7.

**Graf 6:** Vliv vysokých koncentrací kyseliny lipoové na viabilitu erytrocytů po 24 hodinové inkubaci. Graf znázorňuje aritmetický průměr měření se směrodatnými odchylkami, symbol \* označuje výsledky na hranici statistické významnosti, symbol \*\* označuje statisticky významný rozdíl oproti kontrole ( $p \leq 0,05$ ), nepárový t-test.



Kyselina lipoová v ani jedné z testovaných vysokých koncentrací nezpůsobila statisticky významný rozdíl ve viabilitě erytrocytů oproti kontrole po 24 hodinové inkubaci (viz graf 6).

**Graf 7:** Vliv vysokých koncentrací kyseliny lipoové na viabilitu erytrocytů po 48 hodinové inkubaci. Graf znázorňuje aritmetický průměr měření se směrodatnými odchylkami, symbol \* označuje výsledky na hranici statistické významnosti, symbol \*\* označuje statisticky významný rozdíl oproti kontrole ( $p \leq 0,05$ ), nepárový t-test.

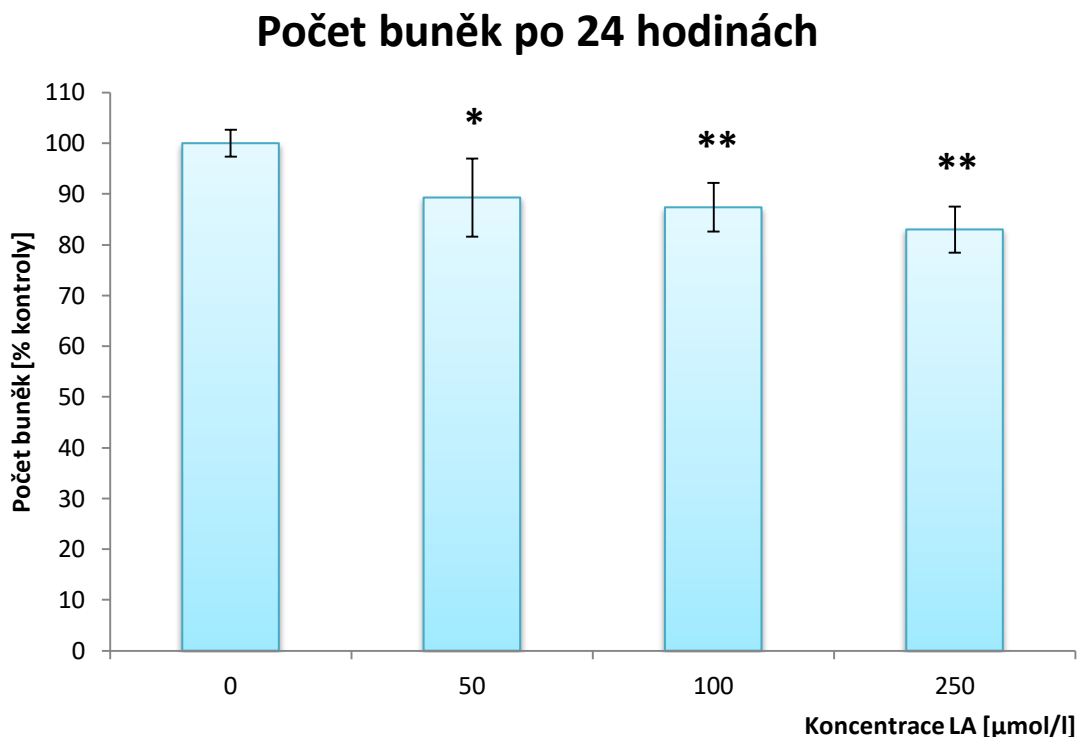


Vysoké koncentrace kyseliny lipoové po 48 hodinové inkubaci také nezpůsobily statisticky významné změny ve viabilitě erytrocytů oproti kontrole (viz graf 7).

#### 4.2.4 Vliv vysokých koncentrací kyseliny lipoové na počet erytrocytů

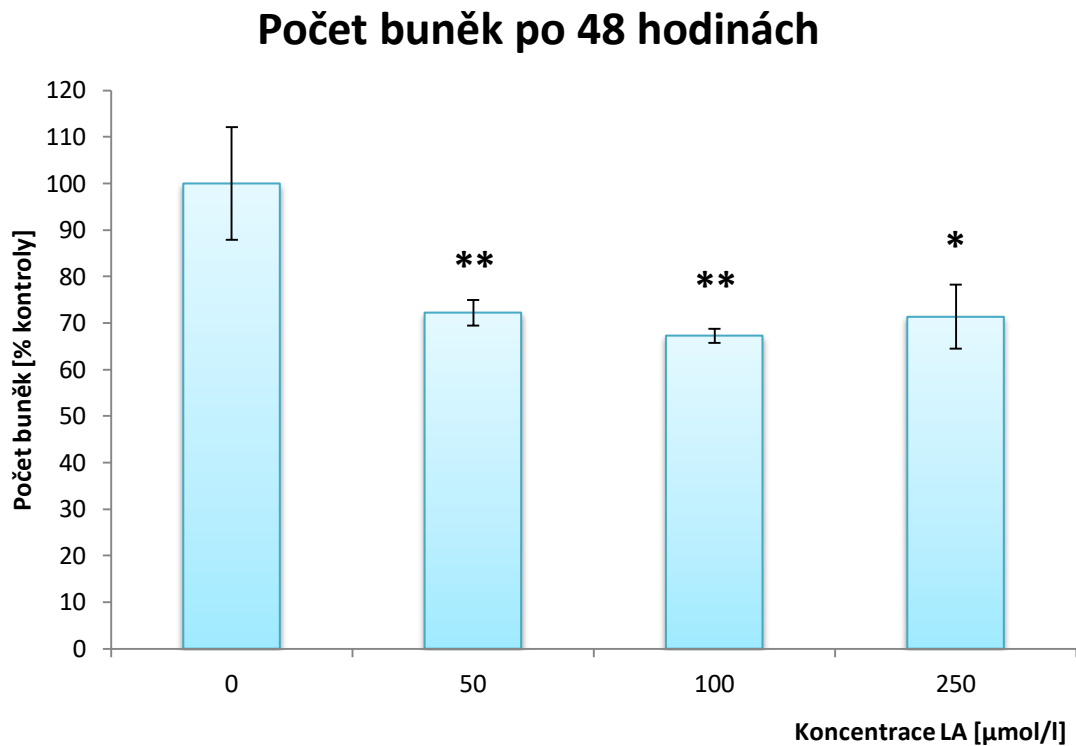
Stejně jako u nízkých koncentrací byly i u vysokých koncentrací kyseliny lipoové společně s viabilitou statisticky vyhodnoceny i změny v počtech buněk po ovlivnění kyselinou lipoovou o koncentracích 50  $\mu\text{mol/l}$ , 100  $\mu\text{mol/l}$  a 250  $\mu\text{mol/l}$ . Počty buněk byly opět hodnoceny po 24 a 48 hodinové inkubaci. Počty jednotlivých buněk byly vyhodnoceny jako procento kontroly a jsou zobrazeny v grafech 8 a 9.

**Graf 8:** Vliv vysokých koncentrací kyseliny lipoové na počty erytrocytů po 24 hodinové inkubaci. Graf znázorňuje aritmetický průměr měření se směrodatnými odchylkami, symbol \* označuje výsledky na hranici statistické významnosti, symbol \*\* označuje statisticky významný rozdíl oproti kontrole ( $p \leq 0,05$ ), nepárový t-test.



U vysokých koncentrací kyseliny lipoové již byl zaznamenán statisticky významný vliv na změnu počtu erytrocytů po 24 hodinové inkubaci u jednotlivých koncentrací kyseliny lipoové. Koncentrace 50  $\mu\text{mol/l}$  způsobila úbytek buněk, který byl na hranici statistické významnosti (hodnoceno na 5% hladině významnosti). Koncentrace 100 a 250  $\mu\text{mol/l}$  způsobily statisticky významný pokles počtu buněk oproti kontrole (viz graf 8).

**Graf 9:** Vliv vysokých koncentrací kyseliny lipoové na počty erytrocytů po 48 hodinové inkubaci. Graf znázorňuje aritmetický průměr měření se směrodatnými odchylkami, symbol \* označuje výsledky na hranici statistické významnosti, symbol \*\* označuje statisticky významný rozdíl oproti kontrole ( $p \leq 0,05$ ), nepárový t-test.

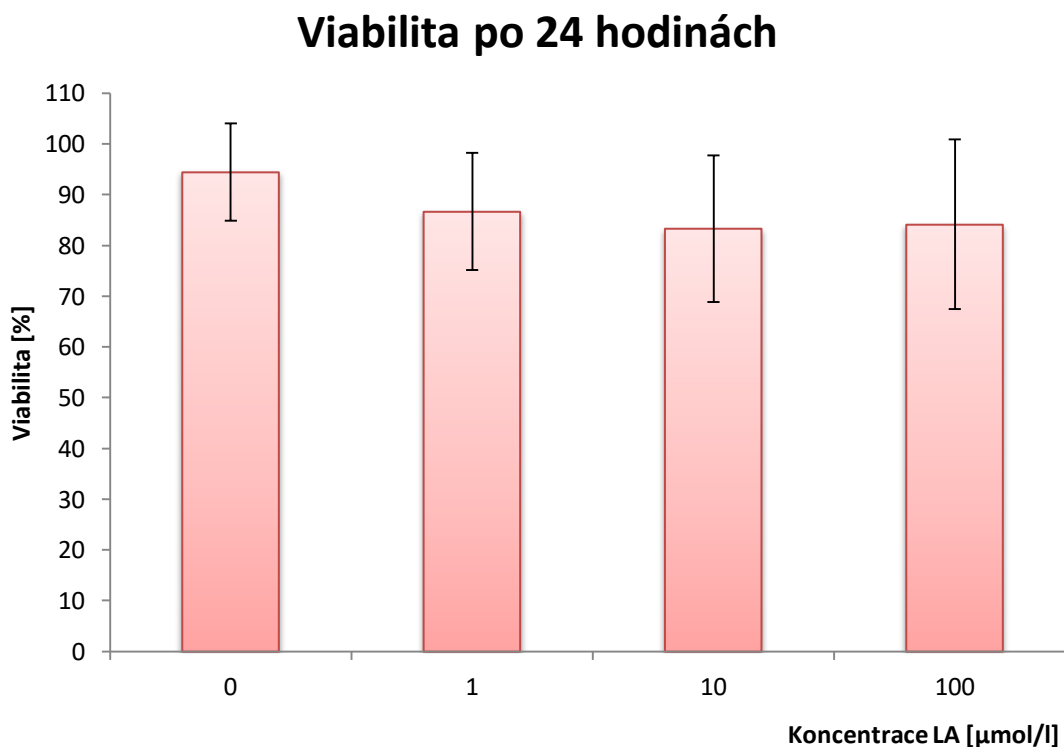


Po 48 hodinové inkubaci byl zaznamenán statisticky významný úbytek erytrocytů již při koncentraci 50  $\mu\text{mol/l}$  kyseliny lipoové. Koncentrace 50 a 100  $\mu\text{mol/l}$  způsobily statisticky významný rozdíl v počtu erytrocytů oproti kontrole. Koncentrace 250  $\mu\text{mol/l}$  se nacházela na hranici statistické významnosti, pravděpodobně z důvodu větší směrodatné odchylky (viz graf 9).

### 4.3 VLIV KYSELINY LIPOOVÉ NA MONONUKLEÁRNÍ BUŇKY

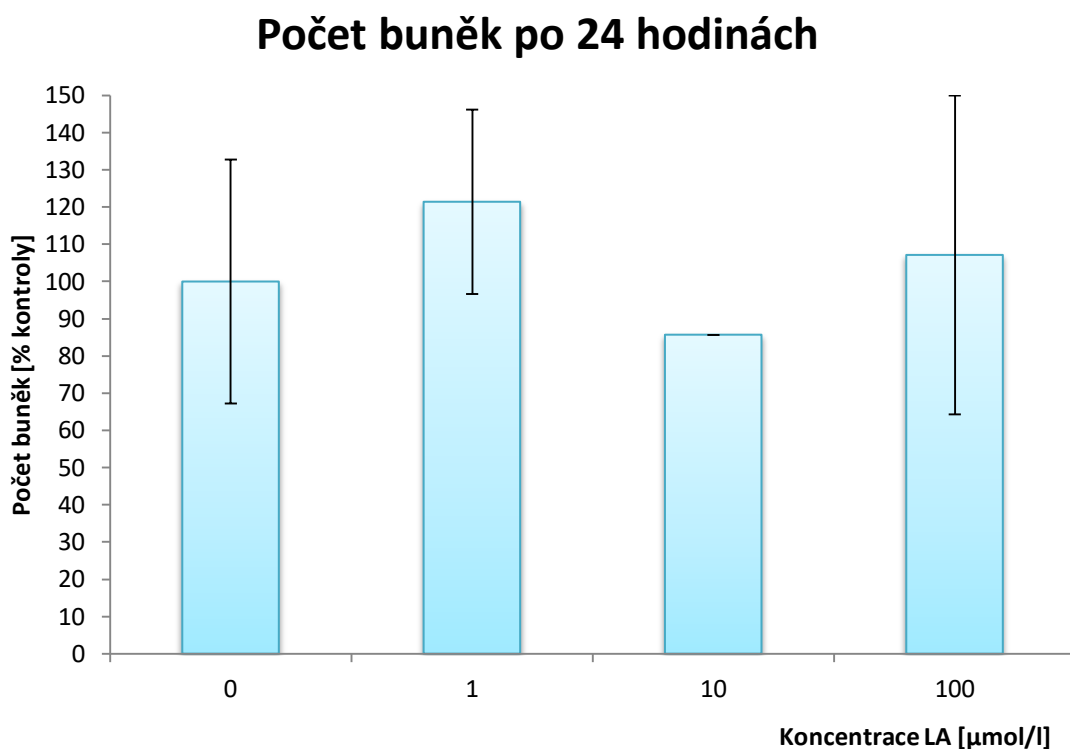
Dále byl testován vliv kyseliny lipoové na mononukleární buňky izolované z periferní krve. Vyizolované mononukleární buňky byly resuspendovány v RPMI médiu a byla k nim přidána kyselina lipoová o koncentracích 1, 10 a 100  $\mu\text{mol/l}$ , aby se otestoval vliv nízkých i vyšších koncentrací zároveň. Jako kontrola byl použit 0,1% DMSO. Výsledky viability a počtů mononukleárních buněk po 24 hodinové inkubaci jsou zobrazeny v grafech 10 a 11. Počty jednotlivých buněk byly hodnoceny jako procento kontroly.

**Graf 10:** Vliv kyseliny lipoové na viabilitu mononukleárních buněk po 24 hodinové inkubaci. Graf znázorňuje aritmetický průměr měření se směrodatnými odchylkami, symbol \* označuje výsledky na hranici statistické významnosti, symbol \*\* označuje statisticky významný rozdíl oproti kontrole ( $p \leq 0,05$ ), nepárový t-test.

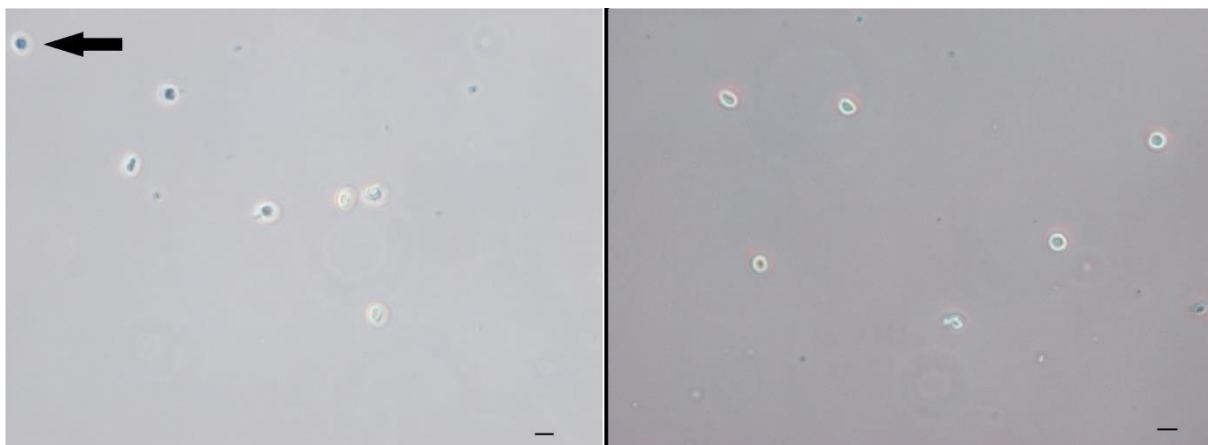


Kyselina lipoová v žádné z testovaných koncentrací neměla statisticky významný vliv na viabilitu mononukleárních buněk z periferní krve. Výsledky byly hodnoceny oproti kontrole po 24 hodinové inkubaci (viz graf 10).

**Graf 11:** Vliv kyseliny lipoové na počty mononukleárních buněk po 24 hodinové inkubaci. Graf znázorňuje aritmetický průměr měření se směrodatnými odchylkami, symbol \* označuje výsledky na hranici statistické významnosti, symbol \*\* označuje statisticky významný rozdíl oproti kontrole ( $p \leq 0,05$ ), nepárový t-test.



Hodnocené koncentrace kyseliny lipoové nezpůsobily statisticky významné rozdíly v počtech mononukleárních buněk z periferní krve. Inkubace probíhala 24 hodin a výsledky byly hodnocené oproti kontrole. Velké směrodatné odchylky jsou způsobené nízkým celkovým počtem mononukleárních buněk.



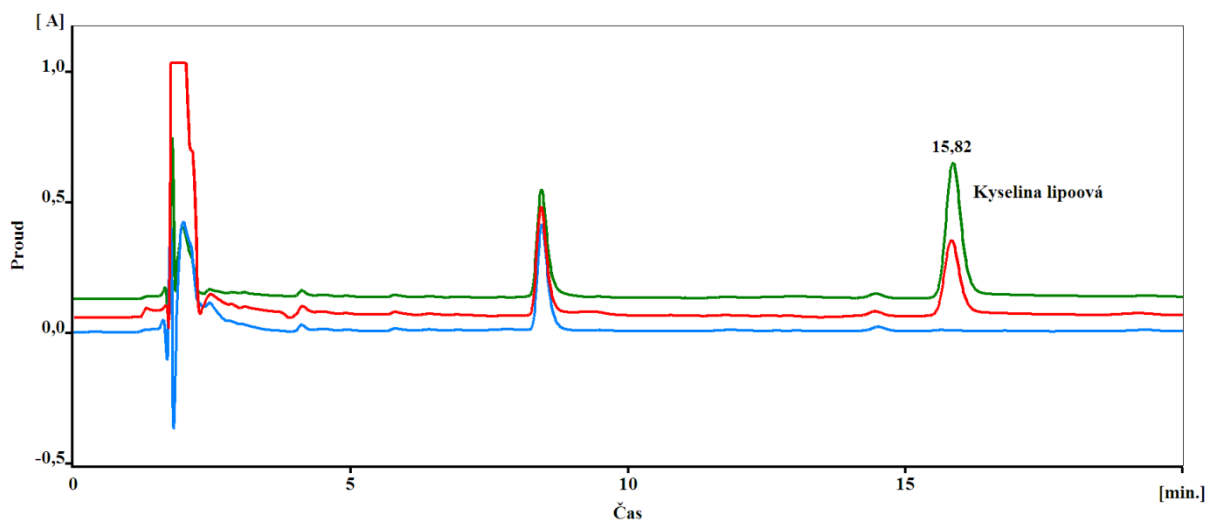
**Obrázek 9:** Mononukleární buňky pozorované pod mikroskopem. Měřítka je 10  $\mu\text{m}$ . Šipka označuje mrtvou buňku.



## 4.4 STANOVENÍ KYSELINY LIPOOVÉ V KREVNÍ PLAZMĚ

### 4.4.1 Kalibrace

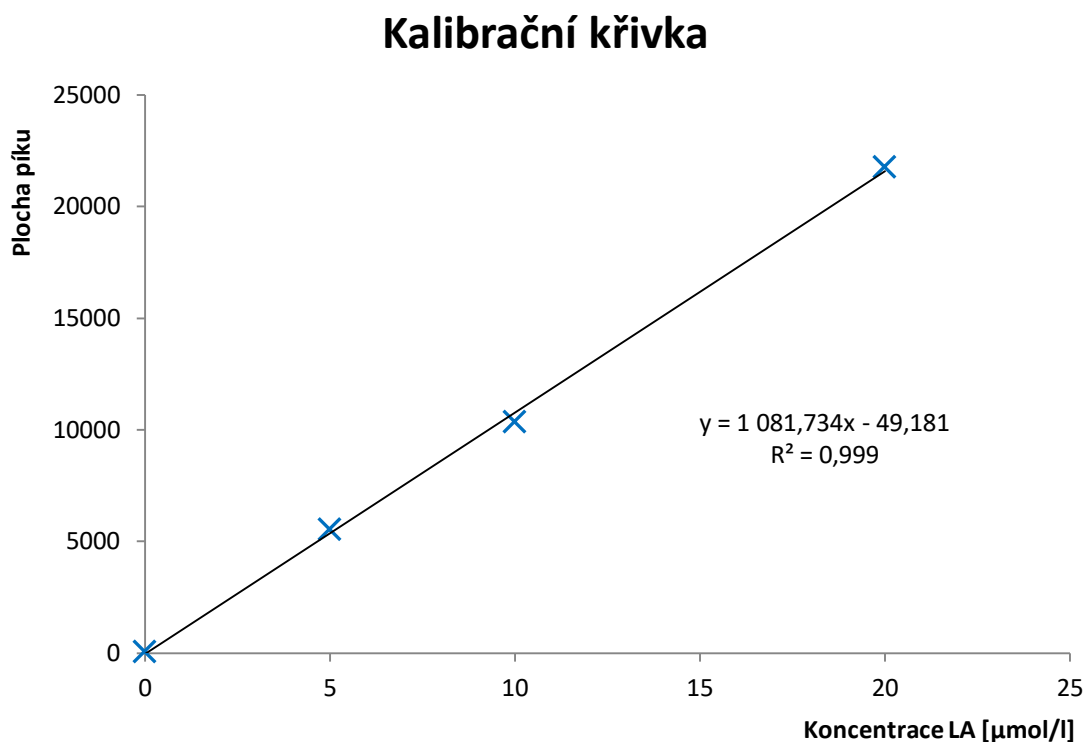
Pro stanovení hladin LA v krevní plazmě po suplementaci byla pomocí přídavek LA do plazmy nesuplementovaného dobrovolného dárce zhotovena kalibrační křivka. Koncentrační rozmezí kalibračních standardů bylo 0 – 20  $\mu\text{mol/l}$  LA. Jednotlivé standardy byly proměřeny metodou HPLC/ED při nastavení citlivosti detektoru 2  $\mu\text{A}$ . Chromatografické záznamy kalibračních standardů jsou zobrazeny na obrázku 10.



**Obrázek 10:** Chromatografický záznam kalibračních standardů LA (citlivost 2  $\mu\text{A}$ ). **Modrý chromatogram:** 0  $\mu\text{mol/l}$  LA. **Červený chromatogram:** 5  $\mu\text{mol/l}$  LA. **Zelený chromatogram:** 10  $\mu\text{mol/l}$  LA.

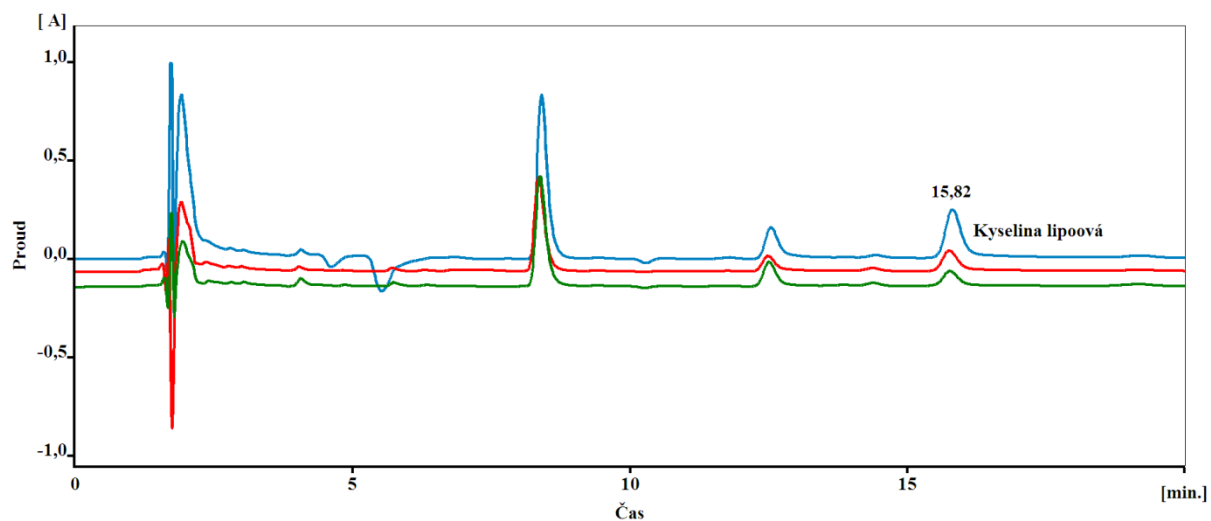
Kalibrační křivka byla vynesena jako závislost plochy chromatografického píku na koncentracích jednotlivých kalibračních standardů LA. Kalibrační křivka je lineární v celém svém rozsahu a je zobrazena v grafu 12.

**Graf 12:** Kalibrační křivka kyseliny lipoové v koncentračním rozmezí 0 – 20  $\mu\text{mol/l}$ .



#### 4.4.2 Koncentrace kyseliny lipoové po suplementaci

Vzorky plazmy byly odebrané 1 hodinu po suplementaci 500 mg racemické směsi LA třem dobrovolným dárcům (2 ženy, 1 muž). Koncentrace LA v jednotlivých vzorcích byla vypočítána z rovnice regrese kalibrační křivky. Jednotlivé chromatografické záznamy suplementovaných vzorků jsou zobrazeny na obrázku 11. Ve vzorku 1 (zelená) byla stanovena koncentrace LA 1,4239  $\mu\text{mol/l}$ , ve vzorku 2 (červená) 1,9232  $\mu\text{mol/l}$  a ve vzorku 3 (modrá) 4,734  $\mu\text{mol/l}$ . Vzorky byly proměřeny metodou HPLC/ED při nastavení citlivosti detektoru 2  $\mu\text{A}$ .



**Obrázek 11:** Chromatografický záznam vzorků 1 hodinu po suplementaci 500 mg LA (citlivost 2  $\mu\text{A}$ ). **Zelený chromatogram:** Vzorek 1 o koncentraci 1,4239  $\mu\text{mol/l}$ . **Červený chromatogram:** Vzorek 2 o koncentraci 1,9232  $\mu\text{mol/l}$ . **Modrý chromatogram:** Vzorek 3 o koncentraci 4,734  $\mu\text{mol/l}$ .

## 5 DISKUSE

Kyselina lipoová je látka s rozsáhlým terapeutickým potenciálem. Díky mnohým svým vlastnostem je dnes využívána při léčbě některých onemocnění, nejčastěji je to při terapii diabetu. Její možný potenciál však spočívá také v léčbě rakoviny.

Touto prací chceme navázat na diplomovou práci z roku 2015 (Stanovení kyseliny lipoové v erytrocytech a její vliv na proliferaci *in vitro*), ve které byl testován vliv kyseliny lipoové na zástavu proliferace a vyvolání apoptózy u buněčných linií adenokarcinomu prsu MCF-7 a SK-BR-3 a adenokarcinomu plic A549. Dále také na imortalizované buňky proximálního tubulu ledvin HK-2, které byly zvoleny jako model lidských ledvin. U buněk MFC-7 bylo zaznamenáno snížení proliferace buněk po 48 hodinové kultivaci se 100, 250 a 500  $\mu\text{mol/l}$  LA. Proliferace buněk SK-BR-3 byla snížena až po 40 hodinové kultivaci s 500  $\mu\text{mol/l}$  LA. U buněk A549 nebyl zaznamenán vliv LA na snížení proliferace v žádné z testovaných koncentrací ani po 72 hodinové kultivaci. Při testování vlivu LA na imortalizované buňky HK-2 způsobila LA o koncentraci 250  $\mu\text{mol/l}$  po 48 hodinovém působení snížení proliferaci HK-2 buněk. Při kultivaci s koncentrací LA 500  $\mu\text{mol/l}$  došlo po 24 hodinách k usmrcení těchto buněk [42].

Vzhledem ke zjištění, že LA působí cytotoxicky na buňky ledvin, jsme chtěli v této práci otestovat také vliv LA na erytrocyty a mononukleární buňky izolované z periferní krve. Chtěli jsme především ověřit, zda je LA schopná působit cytotoxicky, jak se píše ve studii Bhavsara a kol., která nám byla jedinou dostupnou literaturou zabývající se touto problematikou [21].

Před vlastním testováním vlivu LA na viabilitu erytrocytů jsme museli otestovat vliv rozpouštědla, kterým byl DMSO. K erytrocytům byl přidán 0,1%, 0,2% a 0,3% DMSO a proběhla inkubace v termostatu při 37 °C po dobu 24 hodin. 0,3% DMSO způsobil statisticky významný pokles viability erytrocytů oproti kontrole po 24 hodinách. 0,1% a 0,2% DMSO způsobil pokles viability na hranici statistické významnosti. Z tohoto důvodu jsme k dalším pokusům zvolili koncentraci DMSO 0,1%, aby se co nejvíce zamezilo výraznějšímu vlivu rozpouštědla na viabilitu erytrocytů.

Námi testované nízké koncentrace LA, které odpovídaly 1, 5 a 10  $\mu\text{mol/l}$ , nezpůsobily ani po 48 hodinové inkubaci statisticky významné změny ve viabilitě ani počtu erytrocytů oproti kontrole. Tyto koncentrace přibližně odpovídají literárně podloženým nižším

až středním hodnotám LA, které byly stanoveny v krevní plazmě po perorální suplementaci 200 – 600 mg racemické směsi LA. Tyto dávky se běžně užívají při terapii diabetu. Plazmatické hodnoty LA se v publikacích různých autorů velmi liší, což je dobře viditelné v tabulce 1.

Jako vysoké koncentrace LA jsme zvolili koncentrace 50, 100 a 250  $\mu\text{mol/l}$ . Vyšší koncentrace zásobních roztoků nebylo možné připravit kvůli špatné rozpustnosti LA, která se sice v DMSO rozpustila, ale poté vypadla z Ringerova roztoku v podobě sraženiny. Proto nejvyšší koncentrace LA, kterou jsme mohli dávkovat do kultivačních destiček, byla 250  $\mu\text{mol/l}$ . Rozpustnost kyseliny lipoové by se dala zvýšit jejím rozpuštěním v ethanolu, ale bohužel ethanol má na erytrocyty toxický vliv a snižoval by jejich viabilitu.

Žádná z testovaných vysokých koncentrací LA nezpůsobila statisticky významné změny ve viabilitě erytrocytů. Na počty buněk už ale významně působila. Už po 24 hodinové inkubaci nastaly u koncentrace 50  $\mu\text{mol/l}$  LA změny v počtu buněk na hranici statistické významnosti. U koncentrací 100 a 250  $\mu\text{mol/l}$  LA byl pokles počtů buněk oproti kontrole statisticky významný (hodnoceno na 5% hladině významnosti). Po 48 hodinové inkubaci byl statisticky významný pokles počtů buněk u koncentrací 50 a 100  $\mu\text{mol/l}$  LA. U koncentrace 250  $\mu\text{mol/l}$  LA byl pokles na hranici statistické významnosti, což pravděpodobně nastalo z důvodu velké směrodatné odchylky. Z našich výsledků vyplývá, že by podávání takto vysokých dávek LA mohlo po úbytku erytrocytů vyvolat vznik anémie.

V dostupné literatuře jsme našli pouze studii autorů Bhavsara a kol., kteří testovali vliv LA na eryptózu. My jsme v našem experimentu sledovali viabilitu a změny v počtu buněk. Bhavsar a kol. se zaměřili na sledování jiných parametrů. Sledovali například zvyšování hladin cytosolického  $\text{Ca}^{2+}$  a ceramidu, pokles ATP, množství fosfatidylserinu na buněčném povrchu a změnu velikosti buněk. Většinu těchto parametrů stanovovali na základě průtokové cytometrie. Statisticky významné změny v této studii byly po 48 hodinové inkubaci takovéto: zmenšení erytrocytů nastalo již při inkubaci s LA o koncentraci 20  $\mu\text{mol/l}$ , hladiny ceramidu vzrostly po působení 50  $\mu\text{mol/l}$  LA a pokles buněčného ATP nastal při inkubaci se 75  $\mu\text{mol/l}$  LA [21].

Výsledky našeho experimentu korespondují se studií Bhavsara a kol. Podle našich výsledků sice nemá LA do koncentrace 250  $\mu\text{mol/l}$  vliv na viabilitu erytrocytů ani po 48 hodinové inkubaci. Tento výsledek nemůžeme porovnat s žádnou studií, protože se nám nepodařilo žádnou takovou v literatuře nalézt. Zjistili jsme však, že na počet buněk

mají vliv koncentrace 50  $\mu\text{mol/l}$  LA a vyšší už po 24 hodinách. Koncentrace 10  $\mu\text{mol/l}$  a nižší žádné změny nezpůsobily.

Z těchto výsledků vyplývá, že vyšší koncentrace kyseliny lipoové, které by mohly mít potenciální protirakovinné působení, by mohly mít neblahý vliv na erytrocyty ještě v nižších koncentracích než na ledviny, pro které byla stanovena cytotoxická dávka 250  $\mu\text{mol/l}$ .

Také jsme chtěli otestovat, zda má LA vliv i na mononukleární buňky (lymfocyty a monocyty) izolované z periferní krve. Mononukleární buňky byly inkubovány s LA o koncentracích 1, 10 a 100  $\mu\text{mol/l}$ . Žádná z těchto koncentrací neměla po 24 hodinové inkubaci statisticky významný vliv na viabilitu ani na počet buněk oproti kontrole. Mononukleární buňky se hodnotily hůře než erytrocyty, protože jich bylo pomocí Histopaque vyizolováno pouze malé množství. Z tohoto důvodu jsou ve výsledcích i velké směrodatné odchylky. Výsledky jsou uvedeny pouze po 24 hodinové inkubaci, protože kvůli velmi nízkému počtu buněk byly výsledky po 48 hodinách nehodnotitelné. Sen a kol. ve své studii uvádějí, že LA v rozmezí koncentrací 10 – 100  $\mu\text{mol/l}$  má na T-lymfocyty pozitivní vliv. Svým působením LA pomáhá T-buňkám zvyšovat hladiny glutathionu a tím i antioxidační ochranu. Cytotoxické působení LA na tyto buňky nastalo podle jejich studie až při koncentracích od 2  $\text{mmol/l}$ . Výsledky našeho experimentu, kdy jsme neprokázali žádný neblahý vliv LA do koncentrace 100  $\mu\text{mol/l}$  na mononukleární buňky, tak mohou výsledky studie Sena a kol. spíše potvrdit [43].

Dalším cílem našeho experimentu bylo pokusit se stanovit koncentraci LA po suplementaci v krevní plazmě a v erytrocytech metodou HPLC/ED. Stanovení hladin LA v erytrocytech by mohlo mít význam pro lepší pochopení jejího cytotoxického působení, které je podle našich výsledků LA schopná vyvolat. Stanovení hladin LA v krevní plazmě po perorální suplementaci nám zase může pomoci zorientovat se v množství rozličných informací o suplementovaných hladinách LA, které se nacházejí v odborné literatuře, a získat bližší představu o vztahu mezi podaným množstvím LA a plazmatickou koncentrací. Pro náš experiment jsme zvolili dávku 500 mg LA. Tato dávka se blíží dávce 600 mg LA, která se běžně užívá při léčbě diabetu. Podle dostupné literatury, ve které doba dosažení maximální plazmatické koncentrace pohybuje nejčastěji od 0,5 do 1,5 hodiny, jsme zvolili dobu odběru po 1 hodině od suplementace.

Vliv na hladiny LA po suplementaci má mnoho faktorů. Jedním z nich je, jaká forma LA je požívána, jestli je to R-LA, S-LA nebo racemická směs. V našem pokusu to bylo

500 mg racemické směsi LA. Dále má vliv také současné přijímání potravy. LA by se měla užívat 0,5 – 1 hodinu před jídlem nebo 2 hodiny po jídle. Tyto podmínky jsme v našem experimentu také dodrželi [24, 25].

Metoda HPLC/ED pro stanovení LA v lidských erythrocytech byla zavedena v předchozí diplomové práci. Citlivost detektoru byla při tomto stanovení nastavena na 100 nA. Mez detekce této metody má hodnotu 15,7 nmol/l [42]. Pokusili jsme se stanovit koncentraci LA v erythrocytárních lyzátech 1 hodinu po suplementaci LA. Tato hodnota se ale nacházela pod mezí detekce a nebyli jsme schopni ji zaznamenat ani jednou. Zkoušeli jsme v mobilní fázi měnit i poměr pufr : acetonitril, abychom zpomalili analýzu a pokusili se oddělit větší množství píků, ale ani tak jsme žádnou hladinu LA v erythrocytech nedetekovali. Amenta a kol. ve své studii uvádí, že po suplementaci 600 mg racemické směsi LA v erythrocytech stanovili metodou HPLC/MS s ionizací elektrosprejem koncentrace LA 45,1 – 66,5 ng/g v časovém rozmezí 34 – 180 minut od požití LA. Tyto hodnoty jsou přibližně 30x nižší, než hodnoty, které tato studie uvádí pro krevní plazmu (1266,2 – 2290,5 ng/g LA) [22].

Koncentrace kyseliny lipoové v krevní plazmě 1 hodinu po suplementaci 500 mg LA jsme vyhodnotili po proměření vzorků na HPLC/ED metodou kalibrační křivky. Citlivost detektoru jsme při tomto stanovení nastavili na 2  $\mu$ A. Jako kalibrační body jsme zvolili koncentrace 0, 5, 10 a 20  $\mu$ mol/l LA. Vyšší hodnoty kalibračních bodů jsme nakonec nemohli využít, protože ED je sice velmi citlivý, ale pouze v malém koncentračním rozsahu, tudíž linearitu vykazoval pouze do 20  $\mu$ mol/l. Hladiny volné LA jsme stanovili v plazmě tří dobrovolných dárců (2 ženy a 1 muž). Ve vzorku 1 (muž) byla stanovena koncentrace LA 1,4239  $\mu$ mol/l, ve vzorku 2 (žena) koncentrace 1,9232  $\mu$ mol/l a ve vzorku 3 (žena) koncentrace 4,734  $\mu$ mol/l. V porovnání s literaturou tyto hodnoty dosahují spíše nižších a středních hodnot, které byly publikovány. Nejvyšší hodnoty po perorální suplementaci 600 mg racemické směsi LA uvádí Teichert a kol. Metodou HPLC/ED naměřili koncentrace  $36,19 \pm 10,35$   $\mu$ mol/l po 30 minutách od suplementace [26]. Ostatní zdroje ale většinou udávají maximální naměřené hodnoty po suplementaci kolem 20  $\mu$ mol/l (viz tabulka 1).

Z těchto našich naměřených koncentrací LA v plazmě usuzujeme, že by terapeutické dávky LA, které se podávají diabetikům, neměly ohrožovat ledviny, mononukleární buňky ani erythrocyty. Aby bylo možné se vůbec přiblížit koncentracím LA v plazmě, které mají protinádorový účinek, musely by se jí podávat vysoké dávky. Pravděpodobně by LA musela

být podávána intravenózně, aby se zvýšila její biologická dostupnost. Takto vysoké koncentrace by však už působily toxicky na ledviny a vyvolaly by i erytózu červených krvinek. Proto si myslíme, že terapeutický potenciál kyseliny lipoové v terapii rakoviny spočívá spíše v její kombinaci s jinými cytostatiky, kdy by stačilo použít nižší koncentrace. Případně ještě při léčbě rakoviny tlustého střeva, kde bylo zaznamenáno, že na zástavu buněčného cyklu působí již koncentrace 50  $\mu\text{mol/l}$ , ačkoliv podle našich výsledků už i při této koncentraci nastává významný pokles počtu erytrocytů [47].



## 6 ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo pokusit se určit cytotoxicitu kyseliny lipoové u erytrocytů a mononukleárních buněk. U erytrocytů jsme v našem experimentu stanovili jako cytotoxickou koncentraci 50  $\mu\text{mol/l}$  kyseliny lipoové. Při působení této koncentrace se už významně snížil počet erytrocytů ve vzorcích.

Koncentrace kyseliny lipoové v krevní plazmě po suplementaci 500 mg LA u tří dobrovolných dárců jsme stanovili metodou HPLC/ED. Výsledky nám vyšly srovnatelné s hodnotami, které jsou dostupné v literatuře. Na základě hladin LA v krevní plazmě po suplementaci a stanovené cytotoxické koncentraci LA usuzujeme, že dávky LA, které se terapeuticky podávají diabetikům, by neměly negativně působit na viabilitu ani počet erytrocytů a mononukleárních buněk a neměly by poškozovat ani ledviny. Vyšší koncentrace LA, které vykazují protinádorový potenciál, způsobují úbytek erytrocytů a mohou vést k poškození ledvinných buněk, případně v koncentracích  $\text{mmol/l}$  i mononukleárních a dalších buněk.

Z těchto našich výsledků vyplývá, že kyselina lipoová se v léčbě rakoviny nedá využívat jako samostatné léčivo. Její vlastnosti by se však měly dát dobře uplatnit v kombinaci s jinými léčivými přípravky.

## 7 CITOVANÉ ZDROJE

- [1] GORAÇA, A., H. HUK-KOLEGA, A. PIECHOTA, P. KLENIEWSKA, E. CIEJKA a B. SKIBSKA. Lipoic acid – biological activity and therapeutic potential. *Pharmacological Reports*. 2011, **63**(4), 849-858.
- [2] ROCHETTE, L., S. GHIBU, A. MURESAN a C. VERGELY. Alpha-lipoic acid: molecular mechanisms and therapeutic potential in diabetes. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 2015, **93**(12), 1021-1027.
- [3] ROZHODNUTÍ\_revize\_thioktová\_kyselina\_SUKLS79787\_2015. In: *Státní úřad pro kontrolu léčiv* [online]. 2015, [cit. 2017-03-19]. Dostupné z: [http://www.sukl.cz/modules/procedures/audit\\_det.php?code=0084379&tab=determination](http://www.sukl.cz/modules/procedures/audit_det.php?code=0084379&tab=determination)
- [4] BIEWENGA, G. P., G. R. M. M. HAENEN a A. BAST. The pharmacology of the antioxidant lipoic acid. *General Pharmacology: The Vascular System*. 1997, **29**(3), 315-331.
- [5] PACKER, L. a E. CADENAS. Lipoic acid: energy metabolism and redox regulation of transcription and cell signaling. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*. 2010, **48**(1), 26-32.
- [6] KRÄMER, K., P.-P. HOPPE a L. PACKER. *Nutraceuticals in health and disease prevention*. New York: M. Dekker, c2001. ISBN 08-247-0492-4.
- [7] SHAY, K. P., R. F. MOREAU, E. J. SMITH, A. R. SMITH a T. M. HAGEN. Alpha-lipoic acid as a dietary supplement: Molecular mechanisms and therapeutic potential. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – General Subjects*. 2009, **1790**(10), 1149-1160.
- [8] MOINI, H., L. PACKER a N.-E. L. SARIS. Antioxidant and Prooxidant Activities of  $\alpha$ -Lipoic Acid and Dihydrolipoic Acid. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2002, **182**(1), 84-90.
- [9] ISLAM, M. T. Antioxidant activities of dithiol alpha-lipoic acid. *Bangladesh Journal of Medical Science*. 2009, **8**(3), 6-11.
- [10] NAVARI-IZZO, F., M. F. QUARTACCI a C. SGHERRI. Lipoic acid: a unique antioxidant in the detoxification of activated oxygen species. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2002, **40**(6-8), 463-470.

- [11] Schéma: Insulin glucose metabolism. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. [cit. 2017-05-02]. Dostupné z: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Insulin\\_glucose\\_metabolism.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Insulin_glucose_metabolism.jpg)
- [12] CONSTANTINESCU, A., U. PICK, G. J. HANDELMAN, N. HARAMAKI, D. HAN, M. PODDA, H. J. TRITSCHLER a L. PACKER. Reduction and transport of lipoic acid by human erythrocytes. *Biochemical Pharmacology*. 1995, **50**(2), 253-261.
- [13] MAY, J. M., Z.-ch. QU a D. J. NELSON. Uptake and reduction of  $\alpha$ -lipoic acid by human erythrocytes. *Clinical Biochemistry* . 2007, **40**(15), 1135-1142.
- [14] JAIN, S. K. a G. LIM. Lipoic acid decreases lipid peroxidation and protein glycosylation and increases (Na K)- and Ca -ATPase activities in high glucose-treated human erythrocytes. *Free Radical Biology and Medicine*. 2000, **29**(11), 1122-1128.
- [15] STRACKE, H. Patogenetická terapia diabetickej neuropatie: Nové chápanie možností benfotiamínu a alfa-lipoovej kyseliny. *Súčasná Klinická Prax*. 2008, -(2), 8–11.
- [16] SELVARAJ, N., Z. BOBBY a V. SATHIYAPRIYA. Effect of lipid peroxides and antioxidants on glycation of hemoglobin: An in vitro study on human erythrocytes. *Clinica Chimica Acta*. 2006, **366**(1-2), 190-195.
- [17] Schéma: Sodno-draselná pumpa. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. [cit. 2017-04-22]. Dostupné z: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Scheme\\_sodium-potassium\\_pump-cs.svg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Scheme_sodium-potassium_pump-cs.svg)
- [18] COLEMAN, M. D. a C. T. TAYLOR. Effects of dihydrolipoic acid (DHLA),  $\alpha$ -lipoic acid, N-acetyl cysteine and ascorbate on xenobiotic-mediated methaemoglobin formation in human erythrocytes in vitro. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2003, **14**(3), 121-127.
- [19] LANG, F. a S. M. QADRI. Mechanisms and Significance of Eryptosis, the Suicidal Death of Erythrocytes. *Blood Purification*. 2012, **33**(1-3), 125-130.
- [20] LANG, F., E. GULBINS, P. A. LANG, D. ZAPPULLA a M. FÖLLER. Ceramide in Suicidal Death of Erythrocytes. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2010, **26**(1), 21-28.

- [21] BHAVSAR, S. K., D. BOBBALA, N. T. XUAN, M. FÖLLER a F. LANG. Stimulation of suicidal erythrocyte death by  $\alpha$ -lipoic acid. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2010, **26**(6), 859-868.
- [22] AMENTA, F., E. TRAINI, D. TOMASSONI a F. MIGNINI. Pharmacokinetics of Different Formulations of Tioctic (Alpha-Lipoic) Acid in Healthy Volunteers. *Clinical and Experimental Hypertension*. 2009, **30**(8), 767-775.
- Corrigendum. *Clinical and Experimental Hypertension*. 2009, **31**(1), 92-92.
- [23] KATAOKA, H. Chromatographic analysis of lipoic acid and related compounds. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 1998, **717**(1-2), 247-262.
- [24] SINGH, U. a I. JIALAL. Retracted: Alpha-lipoic acid supplementation and diabetes. *Nutrition Reviews*. 2008, **66**(11), 646-657.
- [25] PACKER, L., K. KRAEMER a G. RIMBACH. Molecular aspects of lipoic acid in the prevention of diabetes complications. *Nutrition*. 2001, **17**(10), 888-895.
- [26] TEICHERT, J., R. HERMANN, P. RUUS a R. PREISS. Plasma Kinetics, Metabolism, and Urinary Excretion of Alpha-Lipoic Acid following Oral Administration in Healthy Volunteers. *The Journal of Clinical Pharmacology*. 2003, **43**(11), 1257-1267.
- [27] CARLSON, D. A., A. R. SMITH, S. J. FISCHER, K. L. YOUNG a L. PACKER. The Plasma Pharmacokinetics of R-(+)-Lipoic Acid Administered as Sodium R-(+)-Lipoate to Healthy Human Subjects. *Alternative Medicine Review*. 2007, **12**(4), 343-351.
- [28] CHEN, J., W. JIANG, J. CAI, W. TAO, X. GAO a X. JIANG. Quantification of lipoic acid in plasma by high-performance liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*. 2005, **824**(1-2), 249-257.
- [29] HAJ-YEHIA, A. I., P. ASSAF, T. NASSAR a J. KATZHENDLER. Determination of lipoic acid and dihydrolipoic acid in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection. *Journal of Chromatography A*. 2000, **870**(1-2), 381-388.
- [30] TEICHERT, J. a R. PREISS. High-performance liquid chromatographic assay for  $\alpha$ -lipoic acid and five of its metabolites in human plasma and urine. *Journal of Chromatography B*. 2002, **769**(2), 269-281.

- [31] TEICHERT, J. a R. PREISS. HPLC-methods for determination of lipoic acid and its reduced form in human plasma. *International Journal of Clinical Pharmacology, Therapy and Toxicology*. 1992, **30**(11), 511–512.
- [32] KHAN, A., Z. IQBAL, D. G. WATSON, et al. Simultaneous determination of lipoic acid (LA) and dihydrolipoic acid (DHLA) in human plasma using high-performance liquid chromatography coupled with electrochemical detection. *Journal of Chromatography B*. 2011, **879**(20), 1725-1731.
- [33] KHAN, A., M. I. KHAN, Z. IQBAL, L. AHMAD, Y. SHAH a D. G. WATSON. Determination of lipoic acid in human plasma by HPLC-ECD using liquid–liquid and solid-phase extraction: Method development, validation and optimization of experimental parameters. *Journal of Chromatography B*. 2010, **878**(28), 2782-2788.
- [34] ROCHETTE, L., S. GHIBU, C. RICHARD, M. ZELLER, Y. COTTIN a C. VERGELY. Direct and indirect antioxidant properties of  $\alpha$ -lipoic acid and therapeutic potential. *Molecular Nutrition*. 2013, **57**(1), 114-125.
- [35] MONTERO, O., M. RAMÍREZ, A. SÁNCHEZ-GUIJO a C. GONZÁLEZ. Determination of lipoic acid, Trolox methyl ether and tocopherols in human plasma by liquid-chromatography and ion-trap tandem mass spectrometry. *Biomedical Chromatography*. 2012, **26**(10), 1228-1233.
- [36] SHARMA, S., M. KAUR, M. L. SUHALKA a Ch. SHRIVASTAV. Correlation of  $\alpha$  - Lipoic Acid and S. Glutathione Level with Free Radical Excess in Tobacco Consumers. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 2016, **10**(4), 1-4.
- [37] SATOH, S., T. TOYO'OKA, T. FUKUSHIMA a S. INAGAKI. Simultaneous determination of  $\alpha$ -lipoic acid and its reduced form by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography B*. 2007, **854**(1-2), 109-115.
- [38] MIGNINI, F., V. NAPOLIONI, G. REGGIARDO, R. FASANI a P. FERRARI. Single dose bioavailability and pharmacokinetic study of a innovative formulation of  $\alpha$ -lipoic acid (ALA600) in healthy volunteers. *Minerva Medica*. 2011, **102**(6), 475-482.
- [39] MIGNINI, F., V. STRECCIONI, D. TOMASSONI, E. TRAINI a F. AMENTA. Comparative Crossover, Randomized, Open-Label Bioequivalence Study on the

Bioequivalence of Two Formulations of Thioctic Acid in Healthy Volunteers. *Clinical and Experimental Hypertension*. 2009, **29**(8), 575-586.

[40] HERMANN, R., J. MUNGO, P. J. CNOTA a D. ZIEGLER. Enantiomer-selective pharmacokinetics, oral bioavailability, and sex effects of various alpha-lipoic acid dosage forms. *Clinical Pharmacology: Advances and Applications*. 2014, **6**(-), 195-204.

[41] VIGIL, M., B. M. BERKSON a A. P. GARCIA. Adverse Effects of High doses of Intravenous Alpha Lipoic Acid on Liver Mitochondria. *Global Advances in Health and Medicine*. 2014, **3**(1), 25-27.

[42] PAŘÍZKOVÁ, K. *Stanovení kyseliny lipoové v erytrocytech a její vliv na proliferaci in vitro*. Pardubice, 2015. Diplomová práce. Univerzita Pardubice.

[43] SEN, Ch. K., S. ROY, D. HAN a L. PACKER. Regulation of Cellular Thiols in Human Lymphocytes by  $\alpha$ -Lipoic Acid: A Flow Cytometric Analysis. *Free Radical Biology and Medicine*. 1997, **22**(7), 1241-1257.

[44] JONES, W., X. LI, Z.-ch. QU, L. PERRIOTT, R. R. WHITESELL a J. M. MAY. Uptake, recycling, and antioxidant actions of  $\alpha$ -lipoic acid in endothelial cells. *Free Radical Biology and Medicine*. 2002, **33**(1), 83-93.

[45] ZHANG, S.-J., Q.-F. GE, D.-W. GUO, W.-X. HU a H.-Z. LIU. Synthesis and anticancer evaluation of  $\alpha$ -lipoic acid derivatives. *Bioorganic*. 2010, **20**(10), 3078-3083.

[46] DÖRSAM, B. a J. FAHRER. The disulfide compound  $\alpha$ -lipoic acid and its derivatives: A novel class of anticancer agents targeting mitochondria. *Cancer Letters*. 2016, **371**(1), 12-19.

[47] YOO, T.-H., J.-H. LEE, H.-S. CHUN a S.-G. CHI.  $\alpha$ -Lipoic acid prevents p53 degradation in colon cancer cells by blocking NF- $\kappa$ B induction of RPS6KA4. *Anti-Cancer Drugs*. 2013, **24**(-), 555-565.

[48] LOUIS, K. S. a A. C. SIEGEL. Cell Viability Analysis Using Trypan Blue: Manual and Automated Methods. *Mammalian Cell Viability: Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. 2011, **740**(-), 7-12.

[49] Histopaque<sup>®</sup>-1077: Product Information. In: *Sigma-Aldrich* [online]. [cit. 2017-03-03]. Dostupné z: [http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Product\\_Information\\_Sheet/1/10771pis.pdf](http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/1/10771pis.pdf)