

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2012

Zuzana Neubertová

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A BIOCHEMICKÝCH VĚD

**Zapojení kyseliny lipoové do mechanismů ovlivňující
vznik a rozvoj aterosklerózy**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2012

Zuzana Neubertová

UNIVERSITY OF PARDUBICE
FACULTY OF CHEMICAL TECHNOLOGY
DEPARTMENT OF BIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL SCIENCES

**Involvement of lipoic acid to mechanisms which
influence formation and progress of atherosclerosis**

BACHELOR THESIS

2012

Zuzana Neubertová

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Zuzana Neubertová**
Osobní číslo: **C09376**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Klinická biologie a chemie**
Název tématu: **Zapojení kyseliny lipoové do mechanismů ovlivňujících vznik a rozvoj aterosklerózy**
Zadávající 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) Na základě informací z literatury uspořádejte nejnovější informace o klinickém významu kyseliny lipoové.
- 2) Pokuste se zpracovat dostupné informace o podstatě zapojení kyseliny lipoové do mechanismů ovlivňujících vznik a rozvoj aterosklerózy.
- 3) Věnujte pozornost také novinkám v metodice stanovení kyseliny v lidské plazmě (séru), včetně podmínek pro odběr, transport a uchování vzorku.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce:

Mgr. Pavla Žáková, Ph.D.

Katedra biologických a biochemických věd

Konzultant bakalářské práce:

Mgr. Soňa Bencová

Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce:

3. října 2011

Termín odevzdání bakalářské práce:

22. června 2012



prof. Ing. Petr Lošťák, DrSc.

děkan

L.S.



doc. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.

vedoucí katedry

V Pardubicích dne 23. února 2011

Prohlašuji:

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

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/200 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. autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

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

V Pardubicích dne:

.....

Zuzana Neubertová

Poděkování:

Zde bych chtěla poděkovat vedoucí své bakalářské práce Mgr. Pavle Žákové, Ph.D. za zadání zajímavého tématu a její odborné vedení a mé konzultantce Mgr. Soně Bencové za cenné rady a připomínky při psaní bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat své rodině za jejich podporu při mém studiu.

Souhrn

Kyselina lipoová je přírodně se vyskytující disulfidická sloučenina, rozpustná jak ve vodě, tak i v tucích. Její molekula je tvořena osmi uhlíkatým řetězcem mastné kyseliny a dvěma atomy síry v dithiolanovém kruhu, což jí umožňuje tvořit dva optické izomery. Jedná se o sloučeninu primárně syntetizovanou z mastných kyselin a přítomnou v několika mitochondriálních enzýmech.

V řadě studií a experimentálních výzkumů je kyselina lipoová studována zejména pro její silné antioxidační vlastnosti. Bylo prokázáno, že kyselina lipoová má úzký vztah k mnohým onemocněním. Hraje důležitou roli především v diabetu mellitu a ateroskleróze, kde má vliv na LDL částice a samotnou aterogenezi.

klíčová slova: kyselina lipoová, kyselina dihydrolipoová, antioxidační vlastnosti, HPLC, diabetes mellitus, ateroskleróza

Summary

Lipoic acid is in nature occurring disulfide compound, soluble both in water and in lipids. Its molecule consists of eight carbonaceous chain of fatty acid and two atoms of sulfur in dithiolan ring, which allows it to form two optical isomers. It is compound primarily synthesized from fatty acids and present in several mitochondrial enzymes.

In a series of studies and experimental research lipoic acid is studied mostly for its powerful antioxidant properties. It has been shown that lipoic acid is closely related to many diseases. It plays an important role, especially in diabetes mellitus and atherosclerosis, which affects the LDL particle itself and atherogenesis.

keywords: lipoic acid, dihydrolipoic acid, antioxidant properties, HPLC, diabetes mellitus, atherosclerosis

Obsah

Úvod.....	1
1. Kyselina lipoová	2
1.1 Zdroje LA.....	3
1.2 Bezpečnostní a toxické limity	4
2. Metabolické cesty kyseliny lipoové	5
3. Endogenní a suplementační koncentrace LA v plazmě	7
4. Funkce LA	8
4.1 Význam v bioenergetice.....	8
4.2 Antioxidační funkce	9
4.2.1 Funkce reaktivních forem kyslíku a dusíku	9
4.2.2 LA jako významný antioxidant	9
4.2.3 Antioxidační funkce LA	10
4.2.4 Vliv LA na ostatní antioxidanty.....	11
4.2.5 Chelatační vlastnosti LA	11
5. Možnosti stanovení LA.....	12
5.1 Plynová chromatografie	12
5.2 HPLC	13
5.3 Stanovení LA v lidské plazmě pomocí HPLC-ECD	13
5.3.1 Příprava vzorků k analýze	14
5.3.2 Analýza pomocí HPLC-ECD.....	14
5.4 Elektrochemické stanovení LA.....	14
5.5 Spektrofotometrické stanovení LA	15
6. Kyselina lipoová a onemocnění	16
6.1 Diabetes mellitus.....	16
6.1.1 Diabetes mellitus 1. typu	17

6.1.2 Diabetes mellitus 2. typu	17
6.1.3 Oxidační stres ve vztahu k diabetu mellitu	17
6.1.4 Inzulínová rezistence.....	19
6.1.5 LA a její role v diabetu	19
6.2 Komplikace diabetu.....	21
6.3 Diabetická polyneuropatie	21
6.3.1 Význam kyseliny lipoové	22
7. Ateroskleróza	23
7.1 Jednotlivá stádia aterogeneze.....	23
7.2 Role LDL částic v aterogenezi.....	25
7.3 Role LA v aterogenezi	25
7.4 LA ve vztahu k MMPs	26
7.5 Vztah LA k LDL částicím	27
8. Závěr	29
9. Seznam použité literatury	30

Seznam zkratek

Acetyl-CoA	acetyl koenzym A
AGE(s)	produkty pokročilé glykace
Akt/PKB	Akt/proteinkináza B
AMPK	AMP aktivovaná proteinkináza
CoA	koenzym A
CVD	kardiovaskulární choroby
DHLA	kyselina dihydrolipoová
DM	diabetes mellitus
DN	diabetická polyneuropatie
ECD	elektrochemická detekce
ECM	extracelulární matrix
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
FAD	flavinadenindinukleotid
FADH₂	redukováný flavinadenindinukleotid
GC	plynová chromatografie
GC-MS	plynová chromatografie s detekcí za pomoci hmotnostní spektrometrie
GLUT-4	glukózový přenašeč
GSH	glutathion
H₂SO₄	kyselina sírová
HBO	hyperbarická kyslíková terapie
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HPLC-UV	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s ultrafialovým detektorem

HPLC-ECD	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s elektrochemickou detekcí
IDDM	na inzulínu závislý diabetes mellitus
IS	vnitřní standard
LA	kyselina lipoová
LAM	lipoamid
LC/MS/MS	kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií
LDL	lipoprotein o nízké hustotě
MMPs	matrixové metaloproteinázy
MRI	magnetická rezonance
NAD	nikotinamidadeninukleotid
NADH	redukovaný nikotinamidadeninukleotid
NADPH	redukovaný nikotinamidadeninukleotidfosfát
NIDDM	na inzulínu nezávislý diabetes mellitus
NK-κB	nukleární faktor
NO[•]	reaktivní formy oxidu dusíku
OGTT	orální glukózový toleranční test
[•]OH	hydroxylový radikál
PI3-kináza	fosfatidylinositol-3-kináza
PPG	postprandiální glykémie
RNOS	reaktivní formy oxidu dusíku
ROS	reaktivní formy kyslíku
VSMCs	cévní buňky hladkého svalstv

Úvod

Kyselina lipoová je přírodně se vyskytující osmi uhlíkatá sloučenina, která se nachází jak v živočišných, tak i rostlinných buňkách. Jedná se sloučeninu obsahující dva atomy síry a jedno chirální centrum, díky čemuž je schopna tvořit dva izomery, R a S izomer. Kyselina lipoová je přítomna jako kofaktor řady mitochondriálních enzymatických komplexů. Je syntetizována jen v nepatrných koncentracích, a proto musí být přijímána především z potravy.

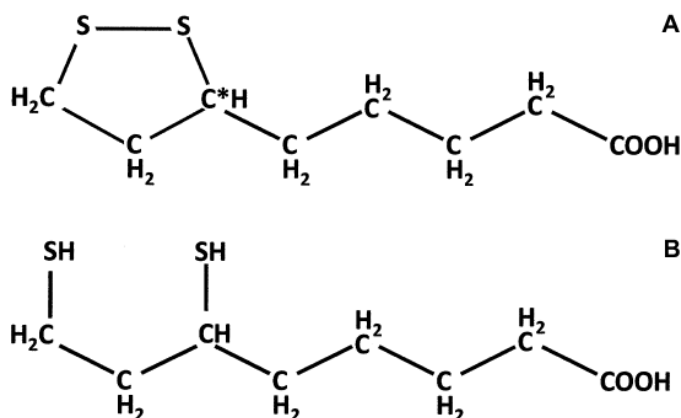
Ve své volné formě je kyselina lipoová silným antioxidantem, fungujícím jako „zhášec“ reaktivních forem kyslíku. V současné době je studována především pro tyto své antioxidační vlastnosti, které si ponechává ve své oxidované i redukované formě. V řadě klinických studií bylo zjištěno, že má vztah k nejrůznějším onemocněním, zejména k diabetu mellitu a jeho komplikacím, především k ateroskleróze.

Cílem této práce je shrnout dostupné a nejnovější informace o klinickém významu kyseliny lipoové se zaměřením na její antioxidační vlastnosti. V další části je cílem zpracovat dostupné informace o zapojení kyseliny lipoové do mechanismů ovlivňující vznik aterosklerózy. V neposlední řadě je věnována pozornost novinkám v metodice stanovení kyseliny lipoové v lidské plazmě.

1. Kyselina lipoová

Kyselina lipoová (LA) je přírodně se vyskytující sloučenina, kterou v roce 1951 poprvé izoloval z hovězích jater Lester Reed a kolektiv. Již v roce 1937 byla známa jako tzv. „růstový faktor brambor“, kterého využívaly některé bakterie ke svému růstu a vývoji [1]. Jedná se o sloučeninu, která se přirozeně nachází jak v živočišných, tak i rostlinných buňkách [2].

Kyselina lipoová, nazývaná 6,8-thioktanová nebo 6,8-dithioktanová kyselina, je osmi uhlíkatá sloučenina, obsahující dva atomy síry v dithiolanovém kruhu. V její struktuře se nachází jedno chirální centrum, což jí umožňuje tvořit dva optické izomery, R a S izomer. Přirozeně se vyskytující formou je pouze R-izomer, který je syntetizován endogenně, je schopen se vázat na bílkoviny a působit tak jako kofaktor v řadě biologických systémů [3].



Obr. 1 Chemická struktura LA (A) a DHHLA (B) (upraveno dle [9]).

Chemická reaktivita LA je dána přítomností dithiolanového kruhu. Kyselina lipoová a její redukovaná forma, kyselina dihydrolipoová (DHHLA), vytvářejí společně silný redoxní pár, jejichž standardní redoxní potenciál je - 0,32 V. Ve srovnání s ostatními monothioly podléhají snadněji oxidačně - redukčním reakcím, neboť standardní redoxní potenciál LA a DHHLA je negativnější. Díky této vlastnosti je schopna regenerovat ostatní endogenní antioxidanty. Tento fakt dělá z DHHLA jeden z nejsilnějších

přirozeně se vyskytujících antioxidantů [4]. Kyselina lipoová je považována za účinný přírodní antioxidant, významný svým protizánětlivým účinkem, a řadí se mezi neenzymové antioxidanty [5].

Běžné antioxidanty mohou být rozpustné buď ve vodě, nebo v tucích. Ve srovnání s nimi má LA jak hydrofilní, tak i hydrofobní vlastnosti, což je dáno její nízkou molekulovou hmotností ($M_r = 206$). Díky své rozpustnosti jak ve vodě, tak i v tucích, může LA vyvolat antioxidantní působení jednak v cytosolu, plazmatických membránách (vodné a lipidové prostředí buňky), tak i v séru a lipoproteinech (vodné a lipidové prostředí krve) [3].

Kyselina lipoová má nezastupitelnou úlohu v energetickém metabolismu. Je základním kofaktorem mitochondriálního dehydrogenázového komplexu α -keto kyselin, jako je např. pyruvát dehydrogenáza, α -ketoglutarát dehydrogenáza a dehydrogenáza α -keto kyselin s rozvětvenými řetězci. Kyselina lipoová zabezpečuje přenos acyl skupiny v enzymovém komplexu, přičemž během tohoto procesu se redukuje na DHLA, která se následně reoxiduje lipoamidovou dehydrogenázou za vzniku nikotinamidadeninukleotidu (NADH) [6].

1.1 Zdroje LA

Kyselina lipoová je syntetizována de novo z mastných kyselin a cysteinu jen ve velmi malém množství, které je nezbytné pro správnou funkci v energetickém metabolismu [7]. U lidí je syntetizována především v játrech, v menší míře pak v ostatních tkáních. Dále se LA získává z rostlinných i živočišných zdrojů. V potravinách se nachází pouze R izomer kyseliny lipoové ve vazbě k lysinovému zbytku, tedy ve formě lypoyllysinu.

V živočišných tkáních se nejvyšší koncentrace LA vyskytuje hlavně v srdci, játrech a ledvinách. V menším množství se může nacházet v mozku, plicích, slinivce břišní a slezině. Zatímco u rostlinných zdrojů se nejvyšší koncentrace LA vyskytují hlavně ve špenátu, brokolici, rajčatech a hrášku, jak je patrné v tabulce č. 1 [8].

Kyselina lipoová se snadno vstřebává ze stravy a následně se redukuje na svoji silnější antioxidantní formu, DHLA. Velmi často je LA

součástí doplňků stravy, kde se vyskytuje ve volné formě v koncentračním rozmezí 200 - 600 mg. Nejčastěji komerčně dostupným doplňkem je směs enantiomerů LA. Nedávné studie potvrdily, že R-enantiomer je považován za vhodnější součást doplňku, naproti tomu S-enantiomer může ve směsi zabránit polymeraci R-LA.

Pro léčebné účely se obvykle podává spíše R forma jako racemická směs R a S izomeru. Ve vodném roztoku obsahuje 200 mg LA zhruba 38% R formy a 28% S formy. Současné studie také poukazují na skutečnost, že při příjmu potravy se snižuje biologická dostupnost LA, proto se doporučuje, aby byla konzumována 30 minut před nebo 2 hodiny po jídle [7].

Tabulka 1. Průměrné množství lypoyllysinu* v potravinách	
Potraviny	Lypoyllysin (mg/g v sušině)
Hovězí ledviny	2.6
Hovězí srdce	1.5
Hovězí játra	0.9
Špenát	3.2
Brokolice	0.9
Rajče	0.6
Hrášek	0.4
Růžičková kapusta	0.4
Rýže	0.2
Žloutek	0.05

* Lypoyllysin × 0,62 = ALA

Tabulka č. 1 (upraveno dle [9])

1.2 Bezpečnostní a toxické limity

V současné době se stále častěji používá LA jako nutriční doplněk, a proto se objevují i otázky, týkající se její bezpečnosti a účinnosti. Na rozdíl od zvířat, u kterých byly již stanoveny bezpečnostní limity pro akutní perorální příjem LA, závisející na druhu zvířete, u lidí maximální možná dávka LA nebyla zatím stanovena.

Možné nepříznivé účinky LA na zdraví člověka byly zkoumány v řadě klinických studií. Nejvyšší aplikovaná suplementační koncentrace LA byla 2400 mg/den. Kyselina lipová byla podávána dobrovolníkům

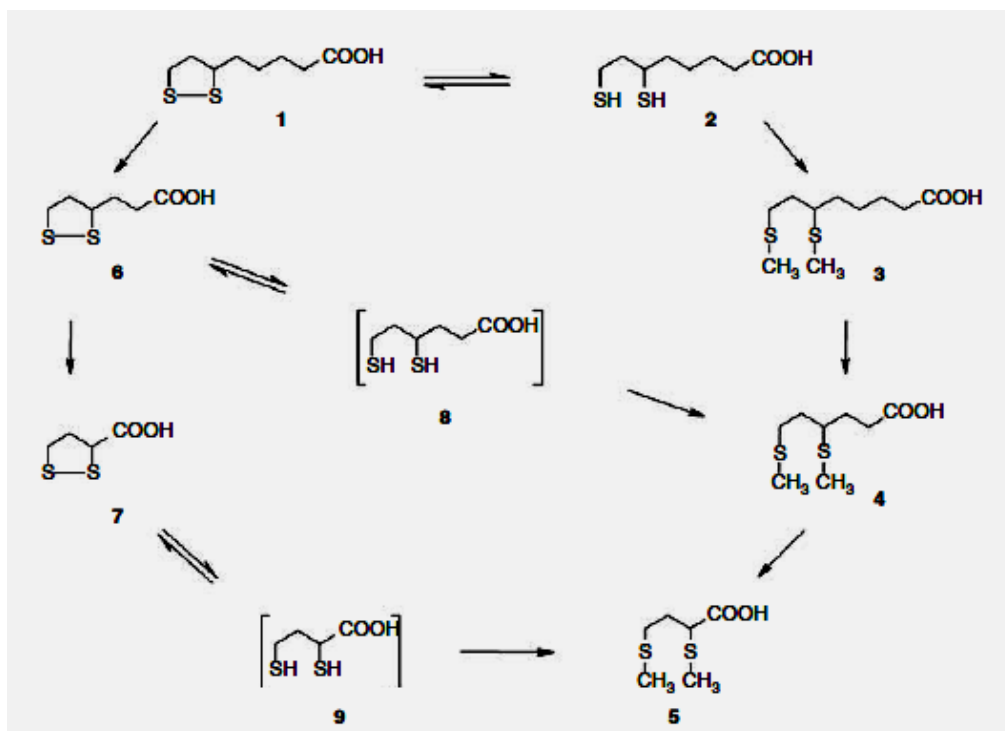
intravenózně v dávce 600 mg/den po dobu tří týdnů a perorálně v dávce 1800 mg po dobu šesti měsíců, přičemž nebyly zaznamenány žádné nežádoucí účinky v porovnání s placebem, které by vedly k poškození organismu [4].

2. Metabolické cesty kyseliny lipoové

Kyselina lipoová je de novo syntetizována primárně v játrech z osmi uhlíkaté kyseliny oktanové a aminokyseliny cysteinu [3]. Ačkoliv doposud nebyly zcela objasněny ani prozkoumány kompletní metabolické cesty LA, bylo zjištěno, že v jejím metabolismu hraje důležitou roli mitochondriální β -oxidace. Řada studií u zvířat a bakterií poukázala na to, že LA může být považována za produkt rozsáhlé již zmíněné β -oxidace.

Pro stanovení metabolitů LA byla vyvinuta radiometrická vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) a LC/MS/MS analýza. Pomocí těchto metod bylo u zvířat identifikováno celkem 12 metabolitů, které se označují M1 - M12, jak je vidět na obrázku č. 2. U lidí byly jako hlavní metabolické produkty identifikovány kyselina bisnorlipoová, kyselina tetranorlipoová a kyselina β -hydroxy-bisnorlipoová, což nám ukazuje obrázek č. 3.

Neposlední studie také potvrzují skutečnost, že vedle β -oxidace postranního řetězce a S-methylace dithiolanového kruhu, existují v metabolismu LA ještě další dvě metabolické cesty. První je oxidace methyl sulfidů na methyl sulfoxidy, které se vytváří u všech testovaných živočišných druhů, včetně člověka, ale nejvýrazněji se jejich tvorba projevuje u psů. Druhou metabolickou cestou je konjugace glycinu, která vytváří konkurenční metabolickou cestu k β -oxidaci převážně u myší, zatímco u lidí k této konjugaci nedochází [9].



Obr. 4 Předpokládané metabolické cesty LA a její hlavní metabolity. 1 - LA, 2 - DHLA, 3 - 6,8-bis(methylthio)oktanová kyselina, 4 - 4,6-bis(methylthio)hexanová kyselina, 5 - 2,4-bis(methylthio)butanová kyselina, 6 - bisnorlipoová kyselina, 7 - tetranorlipoová kyselina, 8 - 4,6-dimercapto-hexanová kyselina, 9 - 2,4-dimercapto-butánová kyselina (upraveno dle [10]).

3. Endogenní a suplementační koncentrace LA v plazmě

Stanovení plazmatické hladiny LA je poměrně obtížné, jelikož její endogenní hladiny jsou velmi nízké a navíc dosud nebyla nalezena žádná vědecká práce či studie, která by se danou problematikou konkrétně zabývala. Referenční rozmezí pro LA a DHLA byly stanoveny Teichertem a Preissem, a to v koncentračním rozmezí 4 - 121 nmol/ pro LA a 158 - 696 nmol/l pro DHLA [11].

Kyselina lipoová je podávána jako jednorázová tableta (od 50 do 600 mg) a je zcela vstřebána po 30 až 60 minutách. Bylo prokázáno, že ve formě vodného roztoku je vstřebání efektivnější, než když je aplikována ve formě želatiny [7]. V jedné z dalších studií bylo zjištěno, že po perorálním podání 50 mg nebo 600 mg racemické směsi LA, jsou koncentrace R-LA v plazmě dvakrát vyšší než koncentrace S-LA.

Respektive se plazmatické hladiny R-LA po podání 50 mg pohybují okolo 135,45 ng/ml, kdežto u S-LA jsou hodnoty poloviční (67,83 ng/ml). Po podání 600 mg LA jsou plazmatické koncentrace R-LA 1812,32 ng/ml a S-LA 978,20 ng/ml [12].

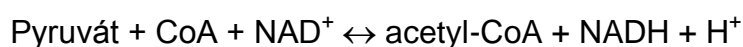
4. Funkce LA

4.1 Význam v bioenergetice

Kyselina lipoová hraje významnou a nezastupitelnou roli v energetickém metabolismu, jelikož je základním kofaktorem řady mitochondriálních enzymatických komplexů. Produkce energie je primárně závislá na těchto komplexech, které jsou schopny využívat různé substráty k redukci NAD^+ a FAD na NADH a FADH_2 . Tyto molekuly jsou schopné poskytovat elektrony do mitochondriálního elektronového řetězce. Kyselina lipoová je přítomna ve vázané lypoyllysinové formě v mitochondriálních proteinech, které hrají ústřední roli v oxidativním metabolismu. Kyselina lipoová je přirozeně se vyskytující kofaktor v pěti mitochondriálních proteinech, jako je pyruvát dehydrogenázový komplex, α -ketoglutarát dehydrogenázový komplex a dehydrogenáza rozvětvených α -keto kyselin. Dále se mezi tyto proteiny řadí protein X pyruvát dehydrogenázového komplexu a protein H systému glycinového štěpení. Začlenění LA do těchto bílkovin je vždy do ϵ -amino skupin konkrétního lysinového zbytku amidovou vazbou pomocí enzymů lypoyltransferáz I a II.

Mitochondriální proteiny hrají důležitou roli v celé řadě procesů a reakcí probíhajících v eukaryotických buňkách, kde katalyzují oxidativní dekarboxylaci různých 2 - oxokyselin v glykolýze, Krebsově cyklu nebo metabolismu rozvětvených aminokyselin.

Kyselina lipoová je významným kofaktorem pyruvát dehydrogenázového komplexu a katalyzuje celkovou reakci:



Mechanismus reakce je mnohem složitější než naznačuje souhrnná reakce [13].

4.2 Antioxidační funkce

4.2.1 Funkce reaktivních forem kyslíku a dusíku

Molekulární kyslík je nezbytný pro přežití všech aerobních organismů. Částečně redukované metabolity molekulárního kyslíku, jako je superoxidový aniont a peroxid vodíku, vznikají jako meziprodukty v metabolismu mitochondrií a peroxysomů, a také činností řady enzymatických komplexů jako je cytochrom P-450, lysoxygenáza a xantin oxidáza. I přesto, že peroxid vodíku je slabší oxidační činidlo než superoxidový aniont, tak oba slouží jako meziprodukty při tvorbě reaktivnějších a toxičtějších metabolitů, např. kyseliny chlorné, která vzniká působením myeloperoxidázy nebo hydroxylového radikálu ($\cdot\text{OH}$). Tyto částečně redukované metabolity molekulárního kyslíku se označují jako reaktivní formy kyslíku (ROS). Pokud je oxid dusnatý (NO^{\bullet}) produkován ve vysokých koncentracích, uplatňuje se jako zdroj vysoce toxických oxidantů (peroxynitrid nebo nitroxyl), které vznikají reakcí NO^{\bullet} se superoxidovým aniontem nebo molekulárním kyslíkem. Souhrnně se tyto oxidanty nazývají reaktivní formy oxidu dusíku (RNOS).

Hlavní využití ROS a RNOS je v imunologické obranyschopnosti, při níž jsou produkovány makrofágy a neutrofilové. Využívají se především k odstranění cizorodých částic a fagocytovaných mikrobů. Jejich hladina v organismu musí být regulována např. antioxidanty, neboť vysoké hladiny ROS a RNOS mohou poškozovat buněčné makromolekuly, jako jsou lipidy, bílkoviny a DNA. Nadprodukce ROS a RNOS je zahrnuta v patogenezi a progresi stavů, souvisejících s oxidačním stresem, jako je ateroskleróza, diabetes mellitus nebo chronická zánětlivá onemocnění [14].

4.2.2 LA jako významný antioxidant

Kyselina lipoová ve své oxidované i redukované formě může fungovat jako silný redoxní pár. In vitro byly zkoumány antioxidační účinky DHLA a LA na základě jejich interakcí s peroxylovými radikály, které jsou nezbytné pro zahájení lipoperoxidace, s chromanoxylovými radikály vitamínu E a s askorbylovými radikály vitamínu C. Na základě těchto

studií, bylo prokázáno, že DHLA je účinným „zhášečem“ peroxylových radikálů ve vodné fázi a v liposomech nebo mikrosomálních membránách v lipidech. Kyselina dihydrolipoová má schopnost recyklovat askorbylové radikály a redukuje dehydroaskorbát, který se vytváří během oxidace askorbátu chromanoxyllovými radikály. Výsledkem této interakce je askorbátem zprostředkovaná DHLA-dependentní redukce chromanoxyllových radikálů vitamínu E, tedy recyklace tohoto vitamínu.

V buňkách je redukce LA na její silnější antioxidační formu regulována metabolickými cestami buňky. Po 24 hodinové inkubaci linie lidských T-buněk s LA (0,5 mM) došlo ke snížení buněčných NADH a NADPH hladin, poměru NADH/NAD⁺ a laktát/pyruvát a naopak zvýšení příjmu glukózy. Pokles poměru NADH/NAD⁺ po inkubaci s LA poukazuje na přímý vliv LA u onemocnění spojená s metabolickými poruchami, např. diabetes mellitus, ischemicko-reperfúzní onemocnění, kde jsou redukční (vysoký poměr NADH/NAD⁺) a oxidační (nadbytek ROS) nerovnováhy považovány za hlavní faktor přispívající k metabolickým poruchám.

V živých buňkách se redukce LA na DHLA uskutečňuje prostřednictvím enzymatických procesů. Bylo identifikováno několik enzymatických systémů k redukcí LA na DHLA. V mitochondriích, NADH-dependentní dihydrolipoamidová dehydrogenáza vykazuje specifitu k R-izomeru, kdežto NADPH-dependentní cytosolická glutathion reduktáza vykazuje specifitu k S-izomeru LA. Mechanismy redukce α -lipoátu jsou vysoce tkáňové specifické a účinky exogenně dodávaného α -lipoátu jsou určeny tkáňovou glutathionreduktázovou a dihydrolipoamid dehydrogenázovou aktivitou [13].

4.2.3 Antioxidační funkce LA

Kyselina lipoová a její redukovaná forma tvoří redoxní pár o standardním redoxním potenciálu – 0,325 V. Řada studií dokazuje, že je DHLA silnější antioxidant než L-askorbová kyselina a další biologicky významné thiolové sloučeniny. Vzhledem k nízkému redoxnímu potenciálu DHLA/LA, může DHLA snadno redukovat širokou škálu oxidovaných metabolitů a in vivo může redukovat nízkomolekulární antioxidanty, jako je např. cystein, koenzym Q10, vitamín C a vitamín E. Kyselina lipoová je

schopna odstraňovat různé ROS a zhášet volné radikály, především hydroxylový radikál. Zatímco DHLA snadno reaguje s peroxylovými a hydroxylovými radikály nebo kyselinou chlornou [15].

4.2.4 Vliv LA na ostatní antioxidanty

V současnosti existuje mnoho důkazů o tom, že LA může mít nepřímý vliv na udržení buněčného antioxidačního stavu, např. zvyšováním syntézy endogenních nízkomolekulárních antioxidantů nebo antioxidačních enzymů. Tyto studie poukazují na to, že LA může nepřímo zvyšovat hladinu endogenního askorbátu tím, že vyvolává jeho příjem z krevní plazmy. Packer a kolektiv poukázali na to, že DHLA redukuje cystin na cystein, přičemž LA může zvyšovat hladinu buněčného cysteinu zvýšením příjmu cystinu z plazmy [4].

4.2.5 Chelatační vlastnosti LA

Naše tělo obsahuje přechodné prvky (např. železo, měď), které podporují tvorbu jednoho z nejvíce reaktivních ROS, hydroxylového radikálu. V našem těle se nachází pouze malá množství volných kovů. In vivo jsou tyto kovy vázány převážně s proteiny, aby se zabránilo jejich oxidaci a následnému oxidačnímu poškození lipoproteinů, polynenasycených mastných kyselin, polypeptidů a nukleových bází. Po vyvázání z vazby na bílkoviny jsou rychle oxidovány peroxidem vodíku. Je potvrzeno, že železo je hlavním kovovým iontem, který je zodpovědný za tvorbu $\cdot\text{OH}$ in vivo [15].

Kyselina lipoová i dihydrolipoová mají kovové chelatační vlastnosti jak in vivo, tak in vitro. Kyselina lipoová vytváří chelatační komplexy převážně s Cu^{2+} , Zn^{2+} a Pb^{2+} , ale nemůže vytvářet komplexy s Fe^{3+} . Zatímco DHLA je schopna vytvářet komplexy s Cu^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} , Fe^{3+} i Hg^{2+} . Bylo prokázáno, že DHLA může zabránit Cu(II)-zprostředkované oxidaci LDL in vitro [7].

5. Možnosti stanovení LA

Vzhledem k rozsáhlé a multidisciplinární roli LA v lidském zdraví, je potřeba k jejímu stanovení rychlé a spolehlivé analytické metody, kterou lze aplikovat ve standardním výzkumu a klinických laboratořích, a to i pro současné stanovení její redukované formy. Její stanovení je využitelné v biochemických i farmakokinetických studiích, souvisejících zejména s její homeostatickou a antioxidační funkcí v organismu [16].

V minulých letech bylo zveřejněno několik studií zabývajících se chromatografickou analýzou celkové, volné a vázané LA v různých biologických vzorcích. Přesto je v současné době nedostatek informací pro stanovení LA a DHLA [17].

V praxi se zpravidla provádí dva typy stanovení, jednak se jedná o stanovení LA v komerčně dodávaných doplňcích stravy, a v druhém případě se provádí stanovení v lidské plazmě a moči [18].

5.1 Plynová chromatografie

Plynová chromatografie (GC) je nejčastěji využívána metoda k analýze převážně těkavých sloučenin, hlavně díky své jednoduchosti, vysoké rozlišovací schopnosti, vysoké citlivosti a nízkým pořizovacím nákladům. Plynová chromatografie je jednou z nejvyužívanějších technik pro stanovení LA a látek od ní odvozených. Kyselina lipoová se v lidském organismu nachází ve velmi malých koncentracích, a proto je nutné ji derivatizací převést na těkavou sloučeninu.

V některých studiích se uvádí, že je možné oddělit a přímo stanovit LA a lipoamid (LAM) bez derivatizace za použití GC s plamenovou ionizační detekcí. Kataoka a kolektiv objevili senzitivní a citlivou metodu pro stanovení LA s využitím GC s plamenovou fotometrickou detekcí, která se běžně používá ke stanovení proteinově vázané formy LA po kyselé nebo zásadité hydrolyze. Metoda plynové chromatografie s detekcí za pomoci hmotnostní spektrometrie (GC-MS) je jedním z nejlepších identifikačních systémů, především díky své senzitivitě a citlivosti, ale vyžaduje přeměnu látek na těkavé sloučeniny ještě před analýzou [19].

5.2 HPLC

Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC) se řadí mezi nejčastěji využívané separační metody, sloužící především k dělení netěkavých a polárních látek. Mezi její výhody patří zejména vysoká účinnost a dobrá opakovatelnost. Tato metoda je vhodná pro stanovení LA zejména díky své vysoké citlivosti, specifičnosti a nenáročnosti na přípravu vzorku. Vysokoučinná kapalinová chromatografie je založena na separaci látek na základě jejich distribuce mezi stacionární a mobilní fází. Během separace může docházet k celé řadě interakcí, především se jedná o interakce látek s mobilní fází nebo interakci mobilní fáze se stacionární fází [20].

Pro stanovení LA, DHLA a od nich odvozených sloučenin, se nejčastěji využívá právě HPLC s nejrůznějšími typy detekčních systémů. Využívá se např. hmotnostní, ultrafialový, fluorescenční a elektrochemický detektor.

Vysokoučinná kapalinová chromatografie s ultrafialovým detektorem (HPLC-UV) se ke stanovení LA využívá jen zřídka, což je způsobeno především tím, že ve struktuře LA není v dostatečné míře zastoupen silný chromofor a její detekční limity jsou tak vysoké. Naopak metoda HPLC s fluorescenční detekcí se využívá jako vhodná metoda pro stanovení LA v biologických vzorcích, ale její nevýhodou je zdlouhavá derivatizace a náročnější příprava vzorků. V současnosti se často využívá metoda HPLC s elektrochemickou detekcí (HPLC-ECD). Stanovení za pomoci této metody je vysoce citlivé a nenáročné na přípravu vzorku a náklady spojené s vybavením standardní laboratoře [21].

5.3 Stanovení LA v lidské plazmě pomocí HPLC-ECD

Vysokoučinná kapalinová chromatografie s elektrochemickou detekcí pro stanovení LA a DHLA je rychlá, jednoduchá, selektivní a snadno opakovatelná metoda. Tato metoda byla úspěšně použita při stanovení LA v lidské plazmě a může být aplikována i při jejím vyšetření v biologických vzorcích, stejně tak jako ve farmakokinetických studiích. Tato metoda může sloužit k vyhodnocení oxidačního stresu během měření

plazmatické koncentrace LA u zdravých jedinců a pacientů trpících diabetem mellitem a kardiovaskulárními onemocněními [16].

5.3.1 Příprava vzorků k analýze

Před vlastním měřením je nutné vzorek upravit, jelikož může obsahovat interferující látky, které mohou rušit vlastní stanovení. K úpravě vzorku se používá extrakce látky a deproteinace. Pro přípravu vzorku LA se využívají dva typy extrakcí, extrakce kapalina-kapalina a extrakce na pevné fázi [21].

5.3.2 Analýza pomocí HPLC-ECD

Při stanovení LA v lidské plazmě pomocí HPLC-ECD se před samotnou analýzou připravují vzorky plazmy a standardních roztoků. Metoda HPLC-ECD pro stanovení LA a DHLA v lidské plazmě může využívat jako vnitřního standardu např. naproxen sodný (IS). Mobilní fáze je tvořena ve většině případů acetonitrilem a 0,05 M fosfátovým pufrům v různém poměru, kdy je dosahováno nejlepší citlivosti a nejlepšího rozlišení jednotlivých píků kalibrační křivky. K extrakci LA z plazmy se může využít např. dichlormethan. Separace pomocí HPLC je založena na interakci mobilní fáze se stacionární fází. Při kvalitativní analýze LA v lidské plazmě se porovnávají retenční časy LA ve vzorcích a standardech, naměřených za standardních podmínek. Při kvantitativní analýze LA v lidské plazmě se využívá metoda kalibrační křivky [16].

5.4 Elektrochemické stanovení LA

Další z možných metod využitelných pro stanovení LA je elektrochemické stanovení. Z možných elektrochemických metod se využívá hlavně coulometrické a voltametrické stanovení LA.

Při coulometrickém stanovení se využívají jako titrační činidla jód, bróm a chlor. Při titraci jejich standardních roztoků se zjišťují stechiometrické poměry, ve kterých reaguje LA s příslušnými titračními činidly, které jsou 1:5 pro Cl_2 , 1:2 pro Br_2 a 1:2 pro I_2 .

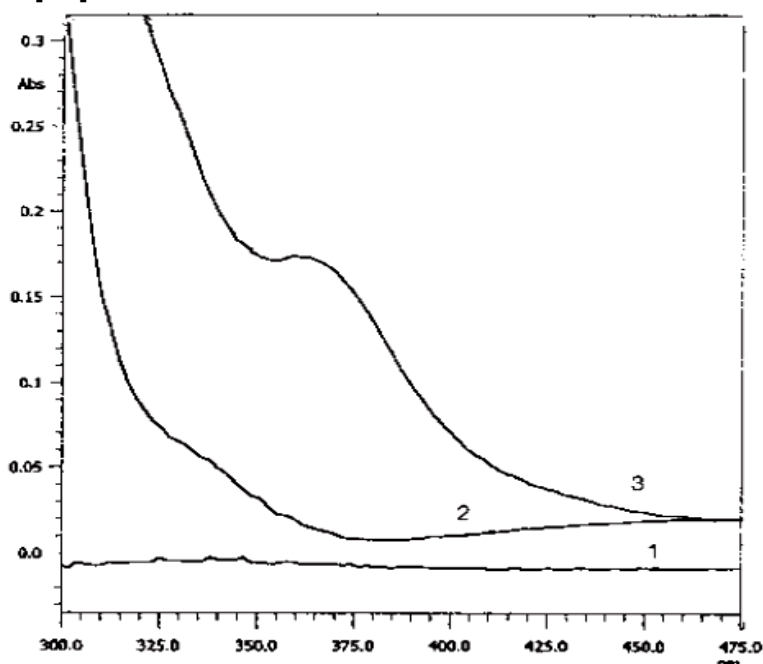
Při voltametrickém stanovení LA se využívají především platina, grafit a skleněná elektroda v 0,05 M roztoku H_2SO_4 . Během tohoto

stanovení se sleduje, zda dochází ke vzniku charakteristických vln. Na voltametrickém záznamu u platiny a grafitu ke vzniku vln nedochází, kdežto u skleněné elektrody můžeme na záznamu pozorovat viditelný pík při napětí 0,72 V. Z daných voltametrických záznamů vyplývá, že proud se zvyšuje lineárně se zvyšující se koncentrací LA v rozmezí od 1.15×10^{-5} do 1.73×10^{-4} M. Detekční limit pro LA byl následně stanoven na 5.75×10^{-6} M [22].

5.5 Spektrofotometrické stanovení LA

Při spektrofotometrickém stanovení LA se využívá Britton-Robinsonův pufr v rozmezí pH hodnot 2 – 6, ve kterém se stanovuje barevný komplex, který tvoří LA a palladium(II)chlorid. Absorpční spektra roztoku obsahujícího ve vodě rozpustný barevný komplex se stanovují v rozmezí vlnových délek 300-500 nm. Při vlnové délce 365 nm vykazuje komplex výrazné absorpční maximum.

Na vytvoření barevného komplexu má zásadní vliv reakční čas, přičemž k jeho vytvoření dochází nejdříve za 10 minut a jeho zbarvení zůstává stabilní po dobu 4 hodin. Nejlepší výsledky bylo dosaženo při pH 2,2 a při daném pH se vyhodnocuje i kalibrační křivka zobrazená na obrázku č. 5 [23].



Obr. 5 Kalibrační křivka ukazující absorpční spektra LA (1), palladium(II)chloridu (2) a barevného komplexu (3) (upraveno dle [23])

6. Kyselina lipoová a onemocnění

Kyselina lipoová má příznivé účinky v mnoha patologických stavech, spojených se zvýšenou hladinou ROS, včetně diabetu mellitu a ischemicko-perifúzního onemocnění. Kyselina lipoová se využívá v léčbě akutního selhání ledvin, stejně tak jako v léčbě onemocnění jater [24].

6.1 Diabetes mellitus

Diabetes mellitus (DM) je komplexní metabolická porucha, která se projevuje zejména v metabolismu sacharidů, ale velmi výrazně zasahuje i do metabolismu lipidů. Je to onemocnění, které se projevuje absolutním nebo relativním nedostatkem inzulínu, jehož následkem je hyperglykémie, tedy zvýšení hladiny glukózy v krvi, která může být doprovázena glykosurií. Diabetes mellitus není jednotné onemocnění a lze ho rozdělit do několika typů: typ 1 a typ 2 - dle závislosti na inzulínu, gestační diabetes a různé specifické typy diabetu [25].

Pro DM je diagnostická hladina glykémie nalačno nad 7 mmol/l a náhodná glykémie nad 11 mmol/l. Dalším důležitým faktorem je hladina glykémie ve 2. hodině při orálním glukózovém tolerančním testu (OGTT) nad 11 mmol/l. Pokud hladina glukózy jednoznačně neurčuje diagnózu diabetu mellitu (rozmezí hodnot 5,7 – 7 mmol/l), je nutné provést OGTT s podáním 75 g glukózy ve vodném roztoku za standardních podmínek. Rozhodující je hladina glykémie ve 2. hodině po podání, kdy hladina glykémie do 7,8 mmol/l představuje normální glukózovou toleranci, hodnota 7,8 – 11 mmol/l porušenou glukózovou toleranci a hodnota nad 11 mmol/l diabetes mellitus [26].

V současné době jsou za velmi významná kritéria kompenzace diabetu považována nejen hladina glykémie na lačno a glykovaný hemoglobin HbA_{1c}, ale i glykémie po jídle (postprandiální glykémie). Postprandiální glykémie (PPG) je ovlivněna obsahem sacharidů v jídle a jejich kvalitou, glykemickým indexem potravy apod. Vysoká hladina PPG je považována za nezávislý rizikový faktor kardiovaskulárních onemocnění [25].

6.1.1 Diabetes mellitus 1. typu

Pro diabetes mellitus 1. typu, který se označuje jako na inzulínu závislý diabetes mellitus (IDDM), je typický absolutní nedostatek inzulínu, který je způsoben postupným zánikem β -buněk Langerhansových ostrůvků. Nejčastěji je příčinou zániku těchto buněk autoimunitní reakce, tj. tvorba protilátek proti vlastním tkáním, která je ve většině případů vyvolána předcházející virovou infekcí spolu s určitou vrozenou náchylností. Zpočátku IDDM probíhá bez příznaků, ale pouze do té doby, dokud nedojde k vyčerpání funkčních rezerv slinivky břišní, což je přibližně po ztrátě 90 % β -buněk, kdy dochází k manifestaci diabetu. Postupně poté dochází k definitivnímu zániku tvorby inzulínu. Tento typ diabetu se vyskytuje především v dětství a dospívání, proto je znám pod pojmem „juvenilní“. Po 30. roce věku jeho výskyt klesá. Pacienti s IDDM jsou zcela závislí na intravenózním příjmu inzulínu spolu s dietními a režimovými opatřeními [27].

6.1.2 Diabetes mellitus 2. typu

Diabetes mellitus 2. typu, který se označuje jako na inzulínu nezávislý diabetes mellitus (NIDDM), je charakterizován inzulínovou rezistencí (necitlivostí k inzulínu) a zpočátku i nadbytkem inzulínu jako kompenzační reakcí slinivky na jeho snížený účinek. Tento typ diabetu se projevuje zejména po 40. roce života. V dalším průběhu onemocnění množství vlastního inzulínu postupně klesá. Diabetes mellitus 2. typu je považován za civilizační onemocnění a tvoří více než 80-90 % všech nemocných s diabetem mellitem. U pacientů s NIDDM se v léčbě využívá dietních a režimových opatření s cílem normalizace hmotnosti a inzulínové rezistence[27].

6.1.3 Oxidační stres ve vztahu k diabetu mellitu

Diabetes mellitus a jeho komplikace jsou silně spojeny se zvýšeným oxidačním stresem. Oxidační stres vzniká přítomností nadbytečných ROS a může být způsoben porušením rovnováhy mezi vznikem a odstraňováním ROS. Reaktivní formy kyslíku mohou poškodit

proteiny, lipidy, DNA a mohou měnit strukturu organismu a jeho funkci. Oxidační stres může způsobit poškození tkáně nebo buněčnou smrt prostřednictvím dvou mechanismů, nekrózou a apoptózou. Oxidační stres hraje významnou úlohu v zánětu, zrychluje stárnutí a přispívá k rozvoji degenerativních onemocnění, jako je ateroskleróza, diabetes, rakovina apod. [28].

Mnohé studie prokázaly, že diabetes mellitus je silně spojen se zvýšenou tvorbou volných radikálů a snížením antioxidačního potenciálu, což vede k oxidačnímu poškození buněčných komponent. Přímý průkaz oxidačního stresu se provádí měřením markerů, jako jsou plazmatické a tkáňové hladiny nitrotyrosinu a superoxidových radikálů. Zdroje oxidačního stresu jsou rozmanité, včetně neenzymatických, enzymatických a mitochondriálních drah.

Mezi neenzymatické zdroje se řadí hyperglykémie, která přímo zvyšuje hladinu ROS [24]. Hyperglykémie je primárním mediátorem aterosklerózy u IDDM, přičemž intenzivní léčba inzulinem má významný vliv na sérovou hladinu lipidů. Účinky hyperglykémie jsou ve většině případů nevratné a vedou k postupné buněčné dysfunkci. Jedním z důležitých mechanismů zodpovědných za vznik aterosklerózy v diabetu je neenzymatická reakce mezi glukózou a proteiny nebo lipoproteiny ve stěně cév. Glukóza se velmi snadno kovalentně váže na aminoskupiny proteinů. Reakce se nazývá glykace a produktem je tzv. Schiffova báze, která se následně přeskupuje na stabilnější Amadoriho produkt, který se následně přeměňuje na tzv. AGE(s) produkty, tedy tzv. „konečné produkty pokročilé glykace“ [28]. Glukóza a AGE(s) se mohou oxidovat kyslíkem a podléhat tak tzv. autooxidaci, při které dochází ke vzniku superoxidu a dalších ROS. Glykace je doprovázena glykoxidací a oxidačním stresem [29].

Mezi další neenzymatické zdroje patří mitochondriální dýchací řetězec. Při oxidativní fosforylaci se přenášejí elektrony z NADH a FADH₂, prostřednictvím čtyř komplexů ve vnitřní mitochondriální membráně na kyslík a vznikající ATP.

Buňky mají vyvinutý složitý antioxidační systém, který zajišťuje ochranu buněk a orgánů proti poškození volnými radikály. Mezi

nejúčinnější enzymatické antioxidanty patří glutathion peroxidáza, kataláza a superoxid dismutáza. Mezi neenzymatické antioxidanty pak patří vitamin E a vitamín C. Každý z těchto antioxidantů může reagovat s reaktivními oxidanty, přičemž dochází ke vzniku méně reaktivních látek [24].

6.1.4 Inzulínová rezistence

Inzulínová rezistence je charakteristická pro diabetes mellitus 2. typu (NIDDM). Pacienti s NIDDM vykazují dva defekty. Prvním defektem je snížená odpověď periferních tkání k inzulínu, tj. inzulínová rezistence, a druhým defektem je porucha β -buněk vyrovnávat inzulínovou rezistenci zvýšením inzulínové sekrece [12]. Diabetes mellitus 2. typu je multifaktoriální stav, pro který je typická snížená schopnost inzulínu stimulovat transport glukózy do kosterního svalu. Tato inzulínová rezistence kosterního svalstva k transportu glukózy je často doprovázena řadou metabolických abnormalit, včetně hypertenze, hyperinzulinémie, dyslipidémie, aterosklerózy a centrální obezity [30].

„Obezni Zucker krysa“ je typický zvířecí model představující těžkou inzulínovou rezistenci kosterního svalu. V izolované kosterní tkáni z těchto zvířat dochází ke zhoršení translokace proteinu GLUT-4 a snížení glukózové transportní aktivity. Léčba svalových preparátů těchto zvířat kyselinou lipoovou zvyšuje glukózovou transportní aktivitu a zlepšuje účinky inzulínu na kosterní svalstvo a příjem glukózy z myokardu, což je spojeno s lepší glukózovou tolerancí u těchto zvířat [12].

6.1.5 LA a její role v diabetu

Kyselina lipoová má potenciální využití ve všech aspektech patologie diabetu mellitu. Jednou z významných funkcí LA je exprese AMP-aktivované proteinkinázy (AMPK) v hypotalamu a periferních tkáních. Komplex AMPK funguje jako energetický senzor a je aktivován při vyčerpání zásob energie v buňkách, přičemž stoupá poměr AMP/ADP. AMP-aktivovaná proteinkináza má vliv na transkripci specifických genů podílejících se na energetickém metabolismu.

In vivo a in vitro studie poukázaly na to, že aktivace AMPK vede ke snížení hladiny glukózy produkované játry. Foretz a kolektiv prokázali, že zvýšená exprese jaterních AMPK vede k mírné hypoglykémii u normálních myší a zabraňuje hyperglykémii u myší trpící diabetem mellitem. Tento hypoglykemický účinek aktivace AMPK je doprovázen sníženou regulací glukoneogenetické genové exprese a sníženou produkcí glukózy v hepatocytech. Aktivace AMPK v kosterní svaly, hlavní regulátor buněčného energetického metabolismu, zvyšuje vychytávání glukózy a oxidaci mastných kyselin. AMP aktivovaná proteinkináza stimuluje kaskádu proteinových fosforylací, což má za následek translokaci glukózových přenašečů (GLUT-4) do plazmatické membrány inzulín nezávislým způsobem a zvyšuje expresi genu GLUT-4.

Inzulínová citlivost se zlepšuje v důsledku snížení akumulace triglyceridů kosterními svaly. K tomu dochází v důsledku fosforylace AMPK. Akumulace triglyceridů v kosterním svaly přispívá k inzulínové rezistenci u obezity a diabetu mellitu 2. typu. Lee a kolektiv poukázali na to, že u obézních potkanů, kteří jsou náchylní k diabetu, se snižuje hladina svalové AMPK. Při podání LA těmto krysám bylo zjištěno, že dochází ke zvýšení hladiny inzulínu, přičemž tato zvýšená hladina inzulínu stimuluje odstraňování glukózy z celého těla a také z kosterních svalů. Kyselina lipová také zvyšuje oxidaci mastných kyselin a stimuluje AMPK v kosterním svaly [24].

V několika studiích byl studován účinek LA na inzulínovou signalizaci a transport glukózy do buněčných membrán. Přímý stimulační účinek LA na aktivní transport glukózy byl prokázán u L₆ myocytů. Tento stimulační účinek LA se mnohem výrazněji projevuje u R-enantiomeru. Celkový stimulační účinek LA na aktivní transport glukózy je závislý na aktivaci fosfatidylinositol-3-kinázy (PI3-kináza) a Akt/proteinkinázy B (Akt/PKB), stejně jako zvýšená translokace GLUT-4 na plazmatické membráně [30].

Další aplikace LA při léčbě diabetu souvisí s její schopností inhibovat glykační reakce. Ačkoliv bylo objasněno několik mechanismů pro patofyziologii chronických diabetických komplikací, je za základní a zároveň nejdůležitější mechanismus považována glykace bílkovin.

Kyselina lipoová může chránit albumin před glykací, což naznačuje, že preventivní účinek je nezávislý na jeho redoxním stavu. V mnoha studiích bylo prokázáno, že LA chrání také LDL částice před glykací.

Řada dalších klinických studií prokázala, že léčba za použití LA vykazuje prospěšný účinek na glukózový metabolismus u pacientů s DM 2. typu. Jacob a kolektiv dokázali, že LA suplementace zvyšuje inzulínem zprostředkované odstranění glukózy u DM 2. typu. Konrad a kolektiv provedli studii, při které bylo použito perorálního podávání LA hubeným a obézním pacientům trpícím NIDDM. Léčba výrazně zvýšila inzulínovou citlivost při intravenózním OGTT u hubených osob a významně zvýšila glukózovou účinnost a snížila redukci sérových hladin laktátu a pyruvátu během OGTT u obou typů osob trpících DM 2. typu [30].

6.2 Komplikace diabetu

Diabetes mellitus je častá metabolická porucha, která může vést k závažnému poškození orgánů a ke vzniku komplikací, postihující především cévní systém. Pacienti trpící diabetem mají dvakrát až osmkrát vyšší riziko rozvoje ischemické choroby srdeční ve srovnání se zdravými jedinci. Diabetes mellitus je ve většině případů doprovázen zvýšenou tvorbou ROS a volných radikálů nebo sníženou antioxidační obranou [29].

Komplikace diabetu se dělí na makroangiopatie (ateroskleróza) a mikroangiopatie (retinopatie, nefropatie, neuropatie) [28]. Cévní komplikace jsou jedny z nejzávažnějších komplikací diabetu, které určují kvalitu života. Diabetická retinopatie a neuropatie jsou typické komplikace, ale v neposlední době se prokázalo, že cévní komplikace mohou mít vliv i na srdce a přispět tak k rozvoji diabetické neuropatie blokující průtok krve [30].

6.3 Diabetická polyneuropatie

Diabetická polyneuropatie (DN) je jednou z nejčastějších komplikací diabetu, vyskytující se ve 20 až 80 % případů. Nejčastějším typem neuropatie je převážně senzitivní-motorická polyneuropatie a autonomní polyneuropatie. K rozvoji DN dochází jednak u pacientů trpících IDDM a NIDDM, tak i u pacientů, u kterých je diagnostikována porucha

glukózové tolerance. Diabetická polyneuropatie může postihnout kteroukoliv část periferního nervového systému, a proto se prezentuje různými klinickými projevy [31].

Patogeneze DN je multifaktoriální, přičemž důležitou roli hraje vaskulární i metabolický faktor. Diabetická polyneuropatie se spojuje s rizikovými faktory, které jsou typické pro ostatní mikro i makrovaskulární komplikace. K těmto faktorům patří hypertenzní nemoc, dyslipidémie, kouření a obezita. Kromě nedostatečné kompenzace diabetu je škodlivé i kolísání glykémie během dne. Senzitivně-motorická polyneuropatie je charakteristická pálivými a řezavými bolestmi nohou, které se projevují většinou v klidu [32].

6.3.1 Význam kyseliny lipoové

U experimentálních zvířecích modelů léčba LA zlepšovala jednak nervový průtok krve, tak i nervovou vodivost. Kyselina lipoová byla poprvé použita v Německu jako terapeutický prostředek k léčbě diabetické polyneuropatie, i přesto, že nebyl k dispozici dostatek informací, týkajících se příčin vzniku tohoto onemocnění. V nejrůznějších klinických studiích se hodnotila účinnost léčby LA v diabetem indukovaných neuropatických stavech. Můžeme zmínit např. ALADIN (Alpha Lipoic Acid in Diabetic Neuropathy), ORPIL (Oral Pilot) a SYDNEY (Symptomatic Diabetic Neuropathy).

Řada klinických studií se zabývá zkoumáním účinků LA na neuropatii. V jedné ze studií byla pacientům s DM 2. typu intravenózně aplikována LA ve třech různých dávkách (100, 600 a 1200 mg/den). Výsledky potvrdily, že při podávání vyšších dávek LA (600 a 1200 mg/den) docházelo k významnému potlačení bolesti a výraznému zlepšení klinických příznaků vyvolávajících neuropatii. V další ze studií byla LA aplikována v dávkách 600 nebo 1200 mg/den po dobu 3 týdnů a následně v dávce 1800 mg/den po dobu 6 měsíců. Navzdory určitým nesrovnalostem se prokázalo, že LA má pozitivní účinky, především ve vysokých dávkách, jak na periferní, tak i autonomní neuropatii, spojenou s DM [3].

7. Ateroskleróza

Ateroskleróza neboli kornatění tepen se řadí mezi degenerativní onemocnění cév, vyvíjející se velmi pomalu. Toto onemocnění je charakteristické ukládáním tukových částic a vápenatých sloučenin do stěny cév, v důsledku čehož se vytvářejí usazeniny, tzv. aterosklerotické pláty. Tento proces vede především ke ztrátě pružnosti cév, omezení průtoku krve a v konečné fázi až k jejich uzávěru. Dle místa postižení se ateroskleróza nejčastěji projevuje jako angina pectoris, srdeční infarkt, cévní mozková příhoda nebo ischemická choroba dolních končetin.

Za základní příčinu aterosklerotického procesu je považována vysoká hladina LDL cholesterolu v krvi, jeho ukládání do cévní stěny a poškození oxidačním stresem. Z novějších studií vyplývá, že možnou příčinou rozvoje aterosklerózy může být i vysoká hladina homocysteinu, látky bílkovinné povahy obsažené hlavně v mase, masných a mléčných výrobcích. Při rozvoji aterosklerózy a jejich komplikací hrají významnou roli tzv. rizikové faktory, které lze rozdělit do dvou skupin, a to na ovlivnitelné a neovlivnitelné (tab. 2) [33].

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

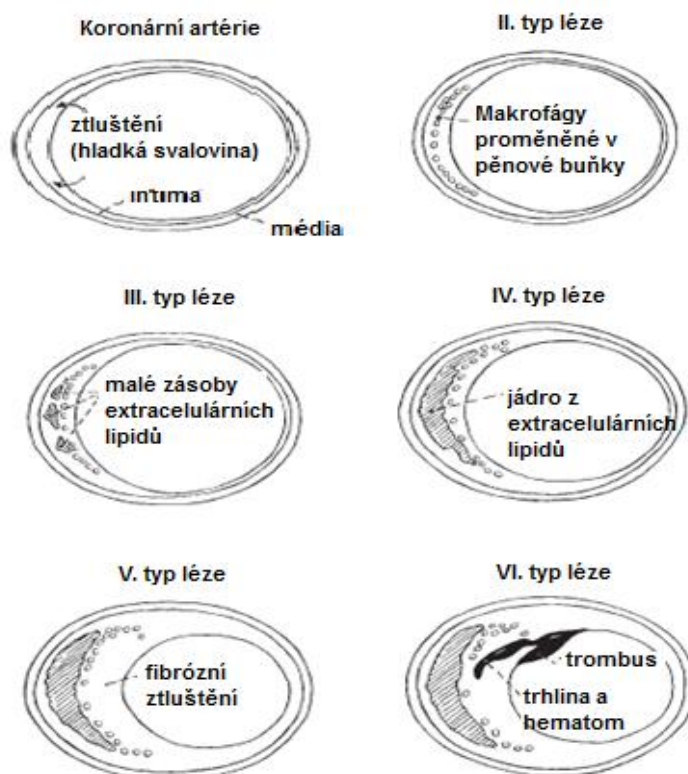
Tabulka č. 2 Rizikové faktory rozvoje aterosklerózy (upraveno dle [33])

7.1 Jednotlivá stádia aterogeneze

Ateroskleróza se histologicky projevuje ve formě arteriálních lézí, které se označují plaky. Rozlišujeme šest hlavních typů lézí, které popisují časné a zralé fáze tohoto onemocnění. Pro lézi I. typu je charakteristický zvýšený počet makrofágů v intimě, což zapříčiňuje její ztloustnutí.

Makrofágy jsou vyplněné tukovými buňkami a vznikají tzv. pěnové buňky. Při nahromadění pěnových buněk se I. typ léze přeměňuje na II. typ léze, který je známý jako tzv. „tukový proužek“. Pokračujícím hromaděním pěnových buněk, které obsahují akumulované lipidy, a jejich nekrozou může dojít ke vzniku III. typu léze, tzv. preaterómu, který může obsahovat malé množství extracelulárních lipidů. Zmíněné tři typy léze se řadí mezi časné fáze.

Mezi rozvíjející se fáze patří následující dva typy lézí, IV. a V. typ léze. Tyto léze jsou charakteristické výraznými oblastmi extracelulárních lipidů, tvořící lipidové jádro. Typ IV. léze se vyznačuje jako aterom a je pro něj charakteristická tenká přepážka mezi lipidovým jádrem a arteriálním lumen. Typ V. léze vykazuje fibrózní ztlustění této struktury, označované jako tzv. „čepička léze“. Zralou fází představuje VI. typ léze, pro kterou je charakteristické krvácení do plátu, kalcifikace nekrotických hmot a přítomnost trombóz. Tokem krve dochází k ruptuře nestabilního plaku, ke krvácení do plaku a následnému vzniku trombóz, uzávěru cévy a ischemii. Tyto příznaky se nejčastěji projevují u koronárních tepen, v tepnách mozku a dolních končetin [34].



Obr č. 6 Jednotlivá stádia aterogeneze (upraveno dle [34])

7.2 Role LDL částic v aterogenezi

V rozvoji endoteliální dysfunkce a dalších procesů aterosklerotické léze hrají významnou úlohu aterogenní lipoproteiny. K nejvýznamnějším patří lipoproteiny o nízké hustotě (LDL částice), které jsou modifikovány oxidací, glykosylací nebo acetylací. Oxidace LDL částic probíhá částečně v plazmě, ale zejména po jejich průniku do subendoteliálního prostoru. Jejich oxidace není za fyziologických podmínek výrazná a oxidované LDL částice jsou v malé míře odstraňovány makrofágy cévní stěny. Při zvýšené produkci oxidovaných LDL částic kapacita makrofágů pro jejich vychytávání nestačí a následně se tyto částice hromadí a zapříčiňují toxické poškození okolních struktur.

Škodlivé působení oxidovaných LDL částic má dvě hlavní složky. Oxidované LDL částice jednak přímo působí toxicky na struktury okolní intimy, a jednak mají stimulační účinky na zánětlivou aktivitu plátu. Přímým účinkem na endotel způsobují LDL částice endoteliální dysfunkci, celkové zvýšení propustnosti a exprese cytoadhezivních a prokoagulačních molekul. Oxidované LDL částice také vyvolávají poruchu tkáňových makrofágů tím, že přímo působí na monocyty. Vazba modifikovaných LDL částic na receptory makrofágů vyvolá aktivaci a produkci řady cytokinů, které udržují zánětlivou reakci v subendoteliálním prostoru a prohlubují endoteliální dysfunkci [35].

7.3 Role LA v aterogenezi

Kyselina lipoová svým účinkem blokuje oxidativní poškození lipoproteinů, proto může působit proti aterogenezi vyvolané oxidativním stresem. V nedávných studiích bylo dokázáno, že LA přímo inhibuje nukleární faktor NF- κ B v lidských T buňkách. Po přesunu do jádra stimuluje NF- κ B transkripci genů spojených s imunitní a zánětlivou odpovědí. Počátečním krokem tvorby aterosklerotické léze je adheze cirkulujících monocytů k endotelu a jejich následná migrace do arteriální intimy. Cévní a endotelové buňky produkují adhezivní a chemotaktické molekuly. Počátečním krokem k tvorbě aterosklerotické léze je adheze cirkulujících monocytů k endotelu a jejich následná migrace do arteriální

intimy. Převážně v časných fázích aterogeneze má proto velký význam zabránění tvorby těchto adhezivních a chemotaktických molekul inhibicí NF- κ B prostřednictvím LA. Kyselina lipová může snížit celkovou přilnavost monocytů a jejich ukládání do cévní stěny, a tím tak inhibovat průběh aterogeneze.

V buňkách LA inhibuje chemotaktickou aktivitu endotelinu-1, peptidu s chemotaktickými vlastnostmi, jehož hladiny jsou zvýšeny u pacientů trpících aterosklerózou a hyperlipidemií, čímž snižuje monocytární migrace. Kromě toho může LA nepřímo inaktivovat NF- κ B regenerací vitamínu E. Boscoboinic a kolektiv prokázali, že α -tokoferol inhibuje činnost proteinkinázy C, která se podílí na aktivaci NF- κ B [14].

Současné studie mají k dispozici několik poznatků, týkající se významné úlohy LA v léčbě lidské aterosklerózy, kde se LA běžně podává ve formě potravinových doplňků v nízkých dávkách. Kyselina lipová snižuje svým účinkem zátěž aterosklerotického plátu během 12 - ti týdenního užívání, přičemž viditelné změny jsou zaznamenány již po 6 týdnech. V souvislosti se snížením zátěže aterosklerotického plátu dochází k výraznému zlepšení cévní funkce. Kyselina lipová také redukuje NADPH oxidázu závislou na kyslíkových radikálech a zabraňuje aktivaci NF- κ B, zprostředkovávající zánětlivé reakce, čímž vytváří molekulární základ pro své anti-sklerotické účinky. Protizánětlivé účinky LA inhibují klíčové adhezivní a chemokinové molekuly zapojené do mechanismů T lymfocytů v rámci aterosklerotických plátů.

Zhang a kolektiv prokázali pomocí MRI skenování, že během 6 - ti týdenní dietní suplementace došlo k významnému potlačení rozvoje aterosklerotické léze u pozorovaných králíků [36].

7.4 LA ve vztahu k MMPs

Vznik a rozvoj aterosklerózy je ovlivněn interakcí mnoha faktorů, zahrnující poruchy metabolismů lipidů, změny v expresi růstových faktorů, cytokinů a vazoregulačních faktorů. Významnou úlohu má extracelulární matrix (ECM), především při vzniku aterosklerotických plátů, v jejich progresi a následném rozpadu. Matrixové metaloproteinázy (MMPs) jsou proteolytické enzymy, zajišťující fyziologickou remodelaci ECM. Vytváří

skupinu 23 strukturně příbuzných enzymů patřící do zinek dependentních endopeptidáz. Matrixové metaloproteinázy se účastní řady fyziologických procesů, při kterých dochází k poškození pojivové tkáně a zánětlivým či degenerativním procesům. Hrají významnou úlohu v procesu aterogeneze. Uvnitř aterosklerotických plátů byla prokázána zvýšená aktivita některých typů MMPs (MMP-1, MMP-3 a MMP-13) vzhledem k hodnotám MMPs u normální arteriální stěny [37].

V řadě klinických studií bylo prokázáno, že kyselina lipoová může ovlivňovat migraci cévních buněk hladkého svalstva (VSMCs) a expresi MMP-9 vyvolanou vysokou hladinou glukózy a stimulací TNF faktoru [38]. Výsledky dalších vědeckých studií ukazují, že LA po suplementaci značně potlačuje MMP-3 a MMP-9 expresi. Analýza pomocí microarray technologie dokládá, že MMP-2 a MMP-9 exprese může být upravena pomocí hyperbarické kyslíkové terapie (HBO) buď to samostatně, nebo v kombinaci s LA, přičemž denní perorální podání LA urychluje hojení při použití HBO terapie [39].

7.5 Vztah LA k LDL částicím

Již v předchozích studiích bylo potvrzeno, že existuje spojitost mezi zvýšenou hladinou cholesterolu (hypercholesterolémií) a výskytem kardiovaskulárních chorob (CVD). Zvýšená plazmatická koncentrace lipoproteinu o nízké hustotě (LDL) souvisela s náchylností k rozvoji aterosklerózy. Oxidační modifikace LDL částic hraje významnou roli při aktivaci zánětlivých procesů, které vedou ke vzniku aterosklerotických plaků v intimě tepny.

Hypercholesterolémie a oxidační stres hrají důležitou roli v rozvoji aterosklerózy. Zulkhairi a kolektiv zkoumaly ochranné účinky LA na zvířatech trpících hypercholesterolémií. Výzkum byl prováděn na bílých králících populace Nového Zélandu (NZW), kteří byly rozděleny do tří skupin. První skupinu tvořila kontrolní skupina (N), která byla krmena běžnou stravou. Druhou skupinu tvořila skupina králíků s vyvolanou hypercholesterolémií (HCD), kteří byly krmeni 100g / kus/ den stravou s vysokým obsahem cholesterolu a třetí skupinu tvořila skupina králíků léčených LA (ALA), která se krmila 100 g / kus / den stravou s obsahem

cholesterolu se současným podáním 4,2 g / kg / den LA. Studie byla prováděna po dobu deseti týdnů a zjišťoval se při ní lipidový profil a index mikrosomální lipoperoxidace. Výsledky studie ukázaly, že ve skupině ALA došlo k významnému poklesu hladiny celkového cholesterolu, LDL částic a indexu lipoperoxidace ve srovnání s HCD skupinou. Navíc také došlo k inhibici tvorby aterosklerotického plaku ve skupině ALA, což poukazuje na to, že LA má v menší míře hypolipidemické účinky [40].

8. Závěr

Cílem této práce bylo zpracovat nejnovější informace o klinickém významu kyseliny lipoové, pokusit se zpracovat informace o podstatě jejího zapojení do mechanismů ovlivňujících vznik a rozvoj aterosklerózy. Dále v této práci byla věnována pozornost metodikám možnosti stanovení kyseliny lipoové, především tedy jejímu stanovení v lidské plazmě.

Kyselina lipoová je přírodně se vyskytující disulfidická sloučenina, rozpustná ve vodě i v tucích. Jedná se sloučeninu syntetizovanou primárně de novo z mastných kyselin. Kyselina lipoová je významným antioxidantem, mající vztah k nejrůznějším onemocněním, převážně k diabetu mellitu a ateroskleróze, kde má vliv na LDL částice a významnou úlohu hraje také v aterogenezi.

V současnosti existuje několik metod vhodných ke stanovení LA, avšak nejčastěji využívanou metodou je vysokoúčinná kapalinová chromatografie. V neposledních studiích se velká pozornost věnuje metodice stanovení LA v lidské plazmě pomocí HPLC-ECD.

9. Seznam použité literatury

1. VALIANNOU, N., EVANGELOPOULOS, A., KOUTALAS, P., Alpha - Lipoic Acid and Diabetic Neuropathy. *The Review of Diabetic Studies*, Vol 6, No 4: 230-236, November 2009
2. BAI SI-WEI, CHEN CUI-YING, JI JUN, XIE QING-MEI, SUN BAO-LI, XUE CHUN-YI, CAO YONG-CHANG, MA JING-YUN, BI YING-ZUO. Inhibition effect of Alpha-Lipoic acid on Propagation of influenza a virus in MDCK cells. *Pakistan Veterinary Journal*, 2011, ISSN: 0253-8318 (PRINT), 2074-7764
3. SINGH, U., JIALAL, I., Alpha-lipoic acid supplementation and diabetes. *Nutr Rev.* November 2008, 66 (11), 646-657
4. SHAY, K.T., MOREAU, R.F., SMITH A.R., HAGEN, T.N. Alpha-lipoic acid as a dietary supplement: Molecular mechanisms and therapeutic potential. *Biochim Biophys Acta*, October 2009, 1790(10): 1149-1160
5. RYBKA, J. *Diabetes mellitus – komplikace a přidružená onemocnění: diagnostické a léčebné postupy.* 2007, 1199, ISBN: 978-80-247-1671-8
6. PARKER, L., CADENAS, E. Lipoic acid: energy metabolism and redox regulation of transcription and cell signaling. *J Clin Biochem Nutr*, January 2011, 48 (1): 26-32
7. GORACA, A., HUK-KOLEGA, H., PIECHOTA, A., KLENIEWSKA, P., CIEJKA, E., SKIBSKA, E. Lipoic acid – biological activity and therapeutic potential. *Pharmacological Report*, 2011, 63, 849-858, ISSN: 1734-1140

8. GHIBU, S., PhD, RICHARD, C., MD, VERGELY, C. PharmD, PhD, ZELLER, M., PhD, COTTIN, Y., MD, PhD AND ROCHETTE, L., PharmD, PhD Antioxidant Properties of an Endogenous Thiol: Alpha-lipoic Acid, Useful in the Prevention of Cardiovascular Diseases. *J Cardiovasc Pharmacol*TM, November 2009, Vol. 54, No. 5
9. SCHUPKE, H., HEMPEL, R., PETER, G., HERMANN, R., WESSEL, K., ENGEL, J., KRONBACH, T. New metabolic pathway of α -lipoic acid. *Drug Metabolism and Disposition*, 2001, Vol. 29, No. 6, DMD 29: 855-862
10. PATEL, S. M., PACKER, L. *Lipoic acid: Energy Production, Antioxidant Activity and Health Effects*. March 17, 2008, 556, ISBN-10: 1420045377, ISBN-13: 978-1420045376
11. TEICHERT, J., HERMANN, R., RUUS, P., PREISS, R. Plasma Kinetics, Metabolism, and Urinary Excretion of Alpha-Lipoic Acid following Oral Administration in Healthy Volunteers. *J Clin Pharmacol*, 2003, 43, 1257-1267
12. [online]. [citace duben 2012]. Dostupný z www: <http://www.thorne.com/altmedrev/.fulltext/11/3/232.pdf>
13. CADENAS, E., PARKER, L. *Handbook of Antioxidants: Second Edition Revise and Expanded*. TIROSH, O., ROY, S., PARKER, L. Lipoic Acid: Cellular Metabolism, Antioxidant Activity, and Clinical Relevance, 2002, s. 473 - 487, Dekker, New York, ISBN: 0-8247-0547-5.
14. MOINI, H., PACKER, L., SARIS, N.-E. L. Antioxidant and prooxidant Activities of α -Lipoic Acid and Dihydrolipoic Acid. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2002, 182, 84-90

15. CADENAS, E., PACKER, L. *Handbook of Antioxidants: Second Edition Revise and Expanded*. MOREAU, R., ZHANG, W-J., HAGEN T. M. Cellular Effects of Lipoic Acid and Its Role in Aging., 2002, s. 489 - 510, Dekker, New York, ISBN: 0-8247-0547-5.
16. KHAN, A., IQBAL, Z., WATSON, G. D., KHAN, A., KHAN, I., MUHAMMAD, N., MUHAMMAD, S., NASIB, H. S., IQBAL, N., FAIZ-ERREHMAN, KASHIF, M. Simultaneous determination of lipoic acid (LA) and dihydrolipoic acid (DHLLA) in human plasma using high-performance liquid chromatography coupled with electrochemical detection. *Journal of chromatography B*, 879 (2011), 1725-1731
17. KHAN, M. I., IQBAL, Z., AHMAD, L., SHAH, Y., NAZIR, S., KHAN, A., NAZIR, F. Simultaneous Determination of the Endogenous Free α -Lipoic Acid and Dihydrolipoic acid in Human Plasma and Erythrocytes by RP-HPLC with Electrochemical Detection. *Chromatographia* (2011), 73:929-939, DOI 10.1007/s10337-011-1997-3
18. INOUE, T., SUDO, M., YOSHIDA, H., TODOROKI, K., NOHTA, H., YAMAGUCHI, M. Liquid chromatographic determination of polythiols based on pre-column excimer fluorescence derivatization and its application to α -lipoic acid analysis. *Journal of Chromatography A*, 1216 (2009) 7564-7569
19. KATAOKA, H., Chromatographic analysis of lipoic acid and related compounds. *Journal of Chromatography B*, 1998, 717, 247-262
20. [online]. [citace duben 2012]. Dostupný z www: <http://web.natur.cuni.cz/~tesarove/hplc.pdf>

21. KHAN, A., KHAN, M. I., IQBAL, Z., SHAH, Y., WATSON, D. G. 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*, 878 (2010) 2782-2788
22. ZIYATDINOVA, G. K., BUDNIKOV, G. K., POGOREL'TSEV, V. I. Electrochemical Determination of Lipoic Acid. *Journal of Analytical Chemistry*, 2004, Vol. 59, No. 3, pp – 288-290
23. KORIĆANAC, Z., TANASKOVIĆ, S., ČAKAR, M., JOVANOVIĆ, T. Spectrophotometric determination of thiotic (α -lipoic) acid in water and pharmaceutical preparations. *J.Serb.Chem.Soc.* 72 (1) 29-35 (2007), JSCS-3531
24. GOLBIDI, S., BADRAN, M., LAHER, I. Diabetes and alpha lipoic acid. *Frontiers in Pharmacology*. November 2011, Vol. 2, article 69
25. GROFOVÁ, Z. *Nutriční podpora: praktický rádce pro sestry*. Grada, 2007, 237, ISBN: 978-80-247-1868
26. SOUČEK, M. A KOLEKTIV. *Vnitřní lékařství pro stomatology*. Grada, 2005, 380, ISBN: 80-247-1367-5
27. [online]. [citace květen 2012]. Dostupný z [www:http://www.diabetesmelitus.cz/WebSite/Images/dialog/Dialog4.pdf](http://www.diabetesmelitus.cz/WebSite/Images/dialog/Dialog4.pdf)
28. ADLY, A. A. M., Oxidative stress and Diseases: An Updated Review. *Research Journal of Immunology* 3 (2), 2010, 129-145, ISSN 1994-7909
29. ŠTÍPEK, S. a kol. *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a nemoci*. Praha: Grada Publishing, 2000. ISBN 80-7169-704-4.

30. CADENAS, E., PACKER, L. *Handbook of antioxidants. Second Edition Revise and Expanded*. HENRIKSEN, E. J. Therapeutic Effects of Lipoic Acid on Hyperglycemia and Insulin Resistance., 2002, s. 535 - 547, Dekker, New York, ISBN: 0-8247-0547-5.
31. [online]. [citace květen 2012]. Dostupný z www: http://www.solen.sk/index.php?page=pdf_view&pdf_id=2272&magazine_id=3
32. [online]. [citace květen 2012]. Dostupný z www: <http://www.diab.cz/dokumenty/diabneur.pdf>
33. [online]. [citace květen 2012]. Dostupný z www: <http://www.zdraviprokazdeho.cz/doc/ateroskleroza.pdf>
34. STOCKER, R., KEANEY, J. F. Role of oxidative modification in Atherosclerosis. *Physiol Rev*, 2004, No. 84, s. 1381 - 1479. ISSN 0031 9333.35.
35. [online]. [citace červen 2012]. Dostupný z www: http://www.kardiologickeforum.cz/pdf/kf_06_03_04.pdf
36. YING, Z., KHERADA, N., FARRAR, B., KAMPFRATH, T., CHUNG, Y., SIMONETTI, O., DEIULIIS, J., DESIKAN, R., KHAN, B., VILLAMENA, F., SUN, Q., PARTHASARATHY, S., RAJAGOPALAN, S. Lipoic acid effects of established atherosclerosis. *Life Sci*, January 16 (2010), 86 (3-4) : 95-102. doi: 10.1016/j.lfs.2009.11.009.
37. KUKAČKA, J., ZIKMUNDOVÁ, K., KOTAŠKA, K., HALAČOVÁ, M., VAJTR, D., PRŮŠA, R. PAPP-A a matrixové metaloproteinázy 3 a 9 u pacientů se smíšenou dislipoproteinémií. *Klin.Biochem.Metab.*, 15 (36), 2007, No. 2, p. 85-88

38. HYE-SOON, K., HYE-JIN, K., KEUN-GYU, P., YOON-NYUN, K., TAEG-KYU, K., JOONG-YEOL, P., KI-UP, L. α -Lipoic acid inhibits matrix metalloproteinase-9 expression by inhibiting NF- κ B transcriptional activity. *Experimental and molecular medicine*, February 2007, Vol. 39, No. 1, 106-113,
39. ALLEVA, R., TOMASETTI, M., SARTINI, D., EMANUELLI, M., NASOLE, E., DI DONATO, F., BORGHI, B., SANTARELLI, L., NEUZIL, J. α -Lipoic Acid Modulates Extracellular Matrix and Angiogenesis Gene Expression in Non-Healing Wounds Treated with Hyperbaric Oxygen Therapy. *Mol Med* March-April 2008, 14 (3-4) 175-183
40. ZULKHAIRI, A., ZAITON, Z., JAMALUDDIN, M., AZRINA, A., HASNAH, B., MOHD, B., MOHD, M., KHAIRUL, O., ZANARIYAH, A. Lipid Lowering Effect of Antioxidant Alpha-Lipoic acid in Experimental Atherosclerosis. *J.Clin.Biochem.Nutr.*, September 2008, 43, 88-94