

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Bc. Gabriela Boubínová

**Ovlivnění jaterního metabolismu ethanolu
dihydromyricetinem**
**Effect of dihydromyricetin on hepatic ethanol
metabolism**

Diplomová práce

Vedoucí práce: prof. RNDr. Petr Hodek, CSc.

Praha, 2020

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením prof. RNDr. Petra Hodka, CSc. a všechny použité prameny jsem řádně citovala. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání stejného nebo jiného akademického titulu.

V Praze dne

Podpis.....

Poděkování

Ráda bych poděkovala prof. RNDr. Petru Hodkovi, CSc. za trpělivost a ochotu při vedení diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat MUDr. Nikolině Kutinové-Canové, Ph.D. za její vstřícnost a pomoc při izolaci hepatocytů, a RNDr. Jaroslavu Mrázovi, CSc. za jeho rady a pomoc při odběru krevních vzorků. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat mé nejbližší spolupracovnici Mgr. Anetě Skotnicové za podporu a pomoc v průběhu experimentů i při sepisování práce.

Abstrakt

Dihydromyricetin (DHM) se řadí mezi přírodní flavonoidní látky, které mají pozitivní účinky na lidský organismus. v čínské tradiční medicíně byly rostliny obsahující tuto látku využívány jako terapie při jaterních onemocněních a pro zmírnění projevů alkoholové intoxikace. Mechanismus účinku DHM na metabolismus ethanolu není doposud zcela znám. Na modelu primárního hepatocytu potkana byly studovány účinky DHM při ethanolové intoxikaci. Pomocí dvou fluorescenčních sond DCFDA a DHR bylo prokázáno, že DHM v závislosti na koncentraci snižuje množství reaktivních forem kyslíku a dusíku v primárních hepatocytech. Hepatoprotektivní efekt DHM se ale neprojevil, když byl u buněk exponovaných alkoholem stanovována aktivita či množství enzymu alaninaminotransferasy (ALT) jako markeru poškození. Následně byl studován vliv DHM na metabolismus ethanolu *in vivo* na modelu potkana. Potkani byli jednorázově premedikováni buď ethanolem nebo ethanolem s DHM. Ze stanoveného množství ethanolu a acetaldehydu v krvi je patrné, že DHM neovlivňuje rychlost ani množství metabolizovaného ethanolu. Vliv DHM na metabolismus ethanolu byl sledován také při opakované premedikaci ethanolem. u skupiny premedikované DHM byla zjištěna zvýšená koncentrace ethanolu v krvi, což naznačuje zpomalení metabolismu alkoholu vlivem DHM. Získané výsledky tedy nepotvrdily předpokládaný pozitivní vliv DHM na rychlost odbourávání ethanolu. Játra potkanů po opakované premedikaci ethanolem byla použita pro přípravu cytosolárních frakcí, v nichž byl metodou Western blot s následnou imunodetekcí určován vliv DHM na množství alkoholdehydrogenasy (ADH). Na proteinové úrovni ADH nebyl efekt DHM prokázán.

Klíčová slova: hepatocyty, reaktivní formy kyslíku, jaterní enzymy, flavonoid

Abstract

Dihydromyricetin (DMH) is a natural flavonoid compound with positive effects on the human organism. In traditional Chinese medicine, plants containing DMH were used to treat liver diseases and to reduce alcohol intoxication. The effects of DMH on ethanol metabolism are not yet completely understood. Effects of DMH during alcohol intoxication were studied on primary hepatocytes of rats. DCFDA and DHR probes were used to prove that DMH (depending on concentration) reduces the number of reactive oxygen and nitrogen species in primary hepatocytes. However, the hepatoprotective effects of DMH were not achieved when presence of the alanine aminotransferase (ALT) was used to measure the damage of cells exposed to alcohol. Further, the effects of DMH on alcohol metabolism were studied *in vivo*. Rats were administered with single dose of ethanol or ethanol combined with DMH. Measured blood levels of ethanol and acetaldehyde show that DMH has no effects on the rate or levels of alcohol metabolism. The effects of DMH were also studied with repeated alcohol administration. In the group that was administered also DMH, increased blood levels of ethanol were measured. This points that DMH slow down the metabolic rate of ethanol. Obtained results did not prove any positive effects of DMH on alcohol metabolism. After repeated alcohol administration, liver tissue was used to prepare cytosol fractions. Presence of alcohol dehydrogenase (ADH) was measured using the Western blot method with immunodetection. No effects of DMH were detected on the ADH protein level.

Key words: hepatocytes, reactive oxygen species, liver enzymes, flavonoid

Obsah

Seznam zkratk.....	8
1 Teoretický úvod.....	10
1.1 Metabolismus ethanolu.....	10
1.1.1 Biotransformace ethanolu.....	12
1.1.2 Alkoholdehydrogenasová cesta	13
1.1.3 Katalasová cesta	16
1.1.4 Mikrosomální systém oxidace ethanolu	17
1.2 Účinek ethanolu na organismus.....	18
1.2.1 Akutní intoxikace	18
1.2.2 Chronická intoxikace a závislost na alkoholu	19
1.3 Ethanol a oxidační poškození.....	21
1.3.1 Vznik volných radikálů a jejich původ v organismu.....	22
1.3.2 Význam volných radikálů v organismu.....	23
1.4 Antioxidanty	24
1.5 Účast ethanolu na produkci volných radikálů.....	25
1.6 Flavonoidy a jejich role v organismu	26
1.6.1 Struktura flavonoidů.....	27
1.6.2 Metabolismus flavonoidů v lidském organismu.....	28
1.6.3 Biologická aktivita flavonoidů	29
1.7 Dihydromyricetin – reakce s biotransformačními enzymy a antioxidační účinky	32
2 Cíle diplomové práce.....	35
3 Materiál a metody	36
3.1 Použité přístroje	36
3.2 Použitý materiál a chemikálie	37
3.3 Metody.....	39
3.3.1 Premedikace potkanů před izolací primárních hepatocytů.....	39
3.3.2 Izolace hepatocytů	39
3.3.3 Stanovení životnosti hepatocytů a jejich celkového počtu v suspenzi	40
3.3.4 Kultivace hepatocytů	41

3.3.5	Zpracování vzorků.....	42
3.3.6	Stanovení životnosti hepatocytů pomocí MTT	42
3.3.7	Stanovení aktivity alaninaminotransferasy.....	43
3.3.8	Stanovení ALT metodou ELISA	43
3.3.9	Stanovení koncentrace proteinu v buňkách podle Lowryho	44
3.3.10	Stanovení množství reaktivních forem kyslíku a dusíku pomocí DCFDA	45
3.3.11	Stanovení množství reaktivních forem kyslíku a dusíku pomocí DHR	45
3.3.12	Vliv DHM na metabolismus EtOH v modelu potkana.....	46
3.3.13	Izolace cytosolární frakce z jaterní tkáně	47
3.3.14	Diskontinuální elektroforesa na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíranu sodného	47
3.3.15	Western blot s následnou imunodetekcí	48
4	Výsledky.....	50
4.1	Experimenty prováděné na modelu hepatocytu potkana.....	50
4.1.1	Izolace a kultivace primárních hepatocytů	50
4.1.2	Sledování hepatotoxického účinku ethanolu na primární hepatocyty	53
4.1.3	Vliv dihydromyricetinu na obsah ROS v hepatocytech	56
4.2	Vliv dihydromyricetinu na metabolismus ethanolu <i>in vivo</i>.....	58
4.2.1	Stanovení množství ethanolu a acetaldehydu v krvi potkana.....	59
4.2.2	Studium vlivu dihydromyricetinu na expresi alkoholdehydrogenasy v cytosolární jaterní frakci.....	62
5	Diskuze	63
6	Souhrn	68
	Seznam použité literatury:.....	69

Seznam zkratek

24-WP	24jamková destička („well plate“)
6-WP	6jamková destička („well plate“)
ADH	alkoholdehydrogenasa
ALDH	aldehyddehydrogenasa
ALT	alaninaminotransferasa
CYP	cytochrom P450
DCFDA	2',7'-dichlorofluorescin diacetát
DHM	dihydromyricetin
DHR	dihydrorhodamin 123
EGTA	ethylen glycol-bis(2-amino-ethylether)-N,N,N',N'-tetra octová kyselina
ELISA	„enzyme-linked immunosorbent assay“
EtOH	ethanol
GABA	kyselina γ -aminomáselná
HepG2	buňky jaterního karcinomu
HUVEC	lidské endotelové buňky získané z pupečnickové žíly
K_m	Michaelisova konstanta
LDH	laktátdehydrogenasa
LPS	lipopolysacharid
MEOS	mikrosomální systém oxidace
MTT	dimethylthiazolyldifenyl-tetrazolium bromid
NAD^+	nikotinamidadenindinukleotid (oxidovaná forma)
$NADH + H^+$	nikotinamidadenindinukleotid (redukována forma)

NADP ⁺	nikotinamidadenindinukleotidfosfát (oxidovaná forma)
NADPH	nikotinaminadenindinukletidfosfát (redukovaná forma)
PBS	fosfátem pufovaný isotonický roztok
PVDF	polyvinylidenfluoridová membrána
ROS	reaktivní formy kyslíku
RPM	otáček za minutu
RSN	reaktivní formy dusíku
SDS	dodecylsírán sodný
Tris/HCl	tris(hydroxymethyl)aminomethan hydrochlorid

1 Teoretický úvod

1.1 Metabolismus ethanolu

Etanol (EtOH) je bezbarvá, vysoce hořlavá kapalina s charakteristickou vůní, která je neomezeně mísitelná s vodou a většinou organických rozpouštědel. Tuto sloučeninu lze vyrobit čistě chemickým způsobem, např. hydrogenací ethenu (průmyslově nejvyužívanější syntetický způsob výroby), nebo daleko běžnější mikrobiologickou cestou – alkoholovou fermentací pomocí kvasinek kmenů *Saccharomyces cerevisiae* [1].

Ethanol je znám jako základní složka pro výrobu alkoholických nápojů. Mimo to má ještě celou řadu dalších využití. Ethanol je využíván jako biopalivo do spalovacích motorů nebo je přidáván do ostatních pohonných hmot pro zvýšení výkonu motoru. v medicíně a farmaceutické praxi slouží jako desinfekce či jako rozpouštědlo pro jiné farmaceuticky využívané preparáty. Významnou roli zastává také v kosmetickém průmyslu a v čistících prostředcích [2, 3].

Konzumace alkoholu je dlouhodobě vysoká. Evropský průměr spotřeby čistého EtOH na hlavu je podle světové zdravotnické organizace zhruba 9,8 litru za rok. v České republice je roční spotřeba oproti evropskému průměru vyšší a činí 14,4 litru čistého EtOH na hlavu [4].

EtOH je polární nenabitá sloučenina, která je dobře rozpustná ve vodě i v tucích. v těle se velmi rychle distribuje a téměř úplně vstřebává. Ethanol proniká skrze hematoencefalickou bariéru do mozku. Je to látka s narkotickými a anestetickými účinky podobně jako jiné těkavé látky např. diethylether či chloroform. Působí na všechny receptory na synapsích, k žádnému z nich se však neváže specifickou vazbou. Při nízké koncentraci v mozku způsobuje euforii, zároveň však dochází ke zpomalení reakcí na vnější podněty. Vyšší koncentrace mají tlumivé, anestetické až narkotické účinky. Důležitá role účinku EtOH je spojována s receptory kyseliny gama-aminomáselné (GABA). EtOH je schopen i bez přítomnosti GABA otevřít chloridové iontové kanály, které jsou GABA dependentní. Otevřením těchto kanálů je způsobena hyperpolarizace neuronů. Předpokládá se, že právě účinek na GABA receptory je zodpovědný za změny chování, které provází požití EtOH [5, 6]. EtOH se do organismu obvykle dostává požitím. Po požití je ethanol rychle absorbován do krve [7]. Jeho absorpce je možná v celé trávicí soustavě. Přibližně 20 % EtOH se resorbuje v žaludku, zbytek je resorbován z tenkého střeva [7–9]. Maximální koncentrace EtOH v krvi při jednorázovém podání je dosahováno za 30–60 minut. v praxi bývá konzumace alkoholických nápojů rozložena do různě dlouhých časových úseků a bývá prokládána jídlem. Koncentrace EtOH v krvi je závislá na několika

faktorech, na množství a druhu nápoje, složení potravy a objemu náplně žaludku, tělesné hmotnosti, popřípadě množství tělesné vody a tuku a rychlosti eliminace EtOH [7]. k nejrychlejší absorpci dochází u alkoholických nápojů s koncentrací EtOH mezi 15–30 % [10, 11]. Pokud je procentuální obsah EtOH v nápoji vyšší nebo nižší než toto rozmezí, absorpce je výrazně pomalejší [12]. Pomalejší absorpci u zředěnějších roztoků lze očekávat z důvodu malého koncentračního gradientu na povrchu sliznic a následnému zpomalení difuze skrz tkáň. v koncentracích 30–40 % nebo více může EtOH způsobit poškození povrchu sliznic, případně vyvolat krvácení žaludeční sliznice a paralyzovat hladké svalstvo [13, 14]. Tyto účinky brání postupu EtOH ke sliznici tenkého střeva, která má účinnější absorpční povrch [7].

Z několika studií vyplývá, že tatáž dávka EtOH ve formě různých alkoholických nápojů způsobuje různé koncentrační křivky EtOH v krvi. Například pivo se vstřebává mnohem pomaleji než whisky nebo brandy [15]. Rozdíly v míře absorpce nejsou způsobeny pouze jejich rozdílnými obsahy EtOH. Bylo zjištěno, že rozředíme-li nápoje na tutéž koncentraci EtOH, bude gin absorbován rychleji než whisky a oba tyto destiláty výrazně pomaleji oproti sladkým a červeným vínům [11, 16]. Je pravděpodobné, že další složky, které alkoholické nápoje obsahují, mají schopnost ovlivňovat žaludeční motilitu nebo průtok krve žaludeční sliznicí, protože žádný z těchto nápojů se nevstřebává rychleji než čistý EtOH. Není zcela jasné, jaké látky jsou za tyto efekty zodpovědné. Obecně jsou připisovány různým bílkovinám, sacharidům, organickým kyselinám a solím a celkové pufrací kapacitě systému [7]. Běžně se předpokládá, že oxid uhličitý má pozitivní vliv na rychlost absorpce EtOH. Experimentální důkazy se však v tomto případě zcela neshodují [7, 16]. Klein (1951) pozoroval rychlejší vzestup hladiny EtOH v krvi u člověka po pití šampaňského oproti bílému vínu [16]. Haggard a kolektiv (1938) [11] naopak nezjistili žádné rozdíly v koncentračních křivkách EtOH v krvi při konzumaci ginu nebo whisky zředěnými sycenou vodou oproti ředění nesycenou vodou. Možným vysvětlením je, že oxid uhličitý zkracuje dobu vyprazdňování žaludku, a tím urychluje absorpci těch nápojů, které jsou obecně vstřebávány pomaleji (např. šampaňské vs. víno), zatímco v případě nápojů, které jsou obecně absorbovány rychle, je tento efekt zanedbatelný [7].

Distribuční prostor EtOH je 60 % tělesné hmotnosti u žen a 70 % tělesné hmotnosti u mužů. Obsah EtOH v alkoholických nápojích se obvykle udává v objemových procentech (viz tabulka 1, str. 12) [6]. Pro přepočítání na hmotnostní koncentraci je třeba počítat se specifickou hustotou EtOH, která činí přibližně 0,79 kg/l [17].

Tabulka 1: Množství EtOH obsaženého v jednotlivých druzích alkoholických nápojů. Převzato z: [17].

Pivo	5 vol. % = 5 ml/100 ml	40 g EtOH/litr
Bílé víno	11 vol. % = 11 ml/100 ml	87 g EtOH/litr
Červené víno	14 vol. % = 14 ml/100ml	111 g EtOH/litr
Destilát	40 vol. % = 40 ml/100 ml	320 g EtOH/litr

Většina EtOH je z těla odstraňována pomocí oxidačních procesů a současně je přibližně z 5–10 % vylučováno plícemi a močí. Zanedbatelné množství je pak vylučováno slinami, žlučí a potem. Obsah EtOH vydechovaného plícemi v nezměněné formě koreluje s hladinou EtOH v krvi, čehož využívá policie při testování konzumace EtOH u řidičů. v případě příležitostných pijáků je metabolizováno přibližně 100 mg EtOH/kg tělesné hmotnosti za hodinu u mužů a 80 mg EtOH/kg za hodinu u žen [17–19]. u chronických alkoholiků je rychlost eliminace závislá na stavu jaterních funkcí a celkovém zdravotním stavu. Enzymová aktivita systémů, které se podílejí na metabolismu EtOH, může být aktivována a odbourávání tak může být výrazně rychlejší [17, 20].

1.1.1 Biotransformace ethanolu

Biotransformací obecně míníme chemické přeměny xenobiotik či endogenních látek v živém organismu. Cílem organismu je zvýšit polaritu (hydrofilitu) látky za účelem jejího snadnějšího vylučování z organismu. Konečné stabilní produkty biotransformace jsou povětšinou méně toxické než původní transformovaná látka. Může ovšem docházet i ke zvýšení toxicity tzv. metabolickou aktivací. Za toxický účinek látky jsou často zodpovědné právě metabolické intermediáty, volné radikály či elektrofilní činidla, která vznikají během biotransformace. Biotransformační reakce tradičně dělíme do dvou fází. Mezi reakce první fáze patří oxidačně redukční reakce a hydrolytické přeměny. Reakce druhé fáze biotransformace se někdy nazývají také jako reakce konjugační. Dochází při nich ke konjugaci (slučování) s endogenními polárními látkami, mezi které patří např. sulfát, acetát, kyselina D-glukuronová či glutathion. Klíčovou úlohu v průběhu biotransformace mají biotransformační enzymy. Během konjugace dochází k reakci xenobiotika s hydrofilní endogenní látkou, která v příslušné reakci funguje jako další substrát. v případě první fáze biotransformace záleží na tom, zda je

konečným akceptorem elektronů vznikajících při oxidaci kyslík nebo oxidovaná forma nikotinamidadeninukleotidu (NAD^+ či NADP^+). Pokud je konečným akceptorem kyslík, řadí se dané enzymy mezi oxidasy. Nikotinamidadeninukleotid je konečným akceptorem pro enzymy, které nazýváme jako dehydrogenasy. Právě dehydrogenasa je zřejmě nejzásadnější enzym podílející se na detoxikaci EtOH v našem těle [5, 21, 22].

EtOH je v lidském těle metabolizován na acetaldehyd a ten dále na acetát. Transformace na aldehyd probíhá třemi cestami. Hlavní význam (75 %) má alkoholdehydrogenasová cesta. Další možnou cestou je inciducibilní mikrosomální EtOH oxidující systém (MEOS). Poslední a minoritní je oxidace EtOH za účasti peroxidu vodíku v přítomnosti enzymu katalasy [21].

1.1.2 Alkoholdehydrogenasová cesta

Alkoholdehydrogenasová cesta je hlavní dráhou metabolismu EtOH. Přeměna EtOH je katalyzována dvěma enzymy – alkoholdehydrogenasou a aldehyddehydrogenasou. Zahrnuje v prvním kroku přeměnu EtOH (tj. oxidaci) na acetaldehyd. v druhé reakci přeměnu acetaldehydu na acetát [23]. Cílem enzymů alkoholdehydrogenasové cesty je odbourávání EtOH buď přijatého v nápojích a potravě nebo také odbourávání EtOH produkovaného střevními bakteriemi. Mimo jiné se tyto enzymy také podílejí na metabolismu endogenních sterolů [1, 17].

Alkoholdehydrogenasa (ADH), systematicky alkohol: NAD^+ - oxidoreduktasa, E.C. 1.1.1.1 je cytosolický metaloenzym, který ve svém aktivním místě obsahuje kation zinku (Zn^{2+}), do jehož koordinační sféry se váže alkohol jakožto substrát. NAD^+ je jako kofaktor enzymu vázán v aktivním místě, kde je akceptorem elektronů a slouží zde jako oxidační činidlo [5, 17].

Alkoholdehydrogenas i aldehyddehydrogenas existuje několik druhů. Enzymy jsou kódovány různými geny a tyto geny se mohou vyskytovat v několika variantách. Právě těmito variabilitami v genetickém kódování enzymů je vysvětlována rozdílná schopnost metabolizovat alkohol u jednotlivých lidských etnik [24]. Lidé mají sedm genů, které kódují jednotlivé formy alkoholdehydrogenas. Tyto geny se označují: ADH1A, ADH1B, ADH1C, ADH4, ADH5, ADH6 a ADH7. Všechny tyto geny jsou uspořádány v jedné oblasti chromozomu.

Funkční enzym se skládá ze dvou podjednotek. Na základě podobnosti v sekvenci aminokyselinových řetězců a kinetických vlastností při oxidaci ethanolu jsou rozděleny do 5 tříd. Třídy se od sebe mimo kinetických vlastností navzájem liší strukturou, substrátovou specifitou nebo též lokalizací v lidském organismu [23].

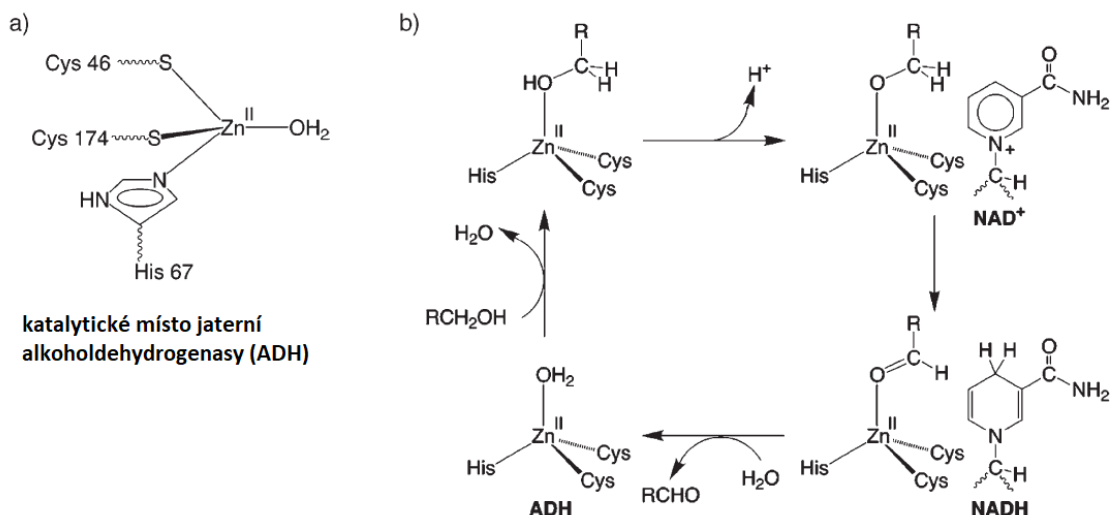
Na oxidaci EtOH v lidském těle se podílí enzymy třídy I, třídy II a pravděpodobně i třídy IV [22]. Třidu I reprezentují tři izoenzymy – α , β , γ , které se vyskytují ve formě homodimerů a heterodimerů [25]. Enzymy této třídy mají nízké hodnoty Michaelisovy konstanty (K_m) pro EtOH a jsou vysoce senzitivní na inhibice deriváty pyrazolu [22]. Vyskytují se v plicích, ledvinách, gastrointestinálním traktu (hlavně v žaludeční mukóze, lačnicku a kyčelníku) a v játrech. Právě v játrech se vyskytují velmi hojně a proto je předpokládáno, že hrají v metabolismu EtOH majoritní roli [26].

Enzymy třídy II jsou přítomny v gastrointestinálním traktu a v játrech. Oproti první třídě enzymů mají vyšší hodnotu K_m pro EtOH [22]. Alkoholdehydrogenasy třídy III se vyskytují ve všech tkáních. Jejich metabolická aktivita pro EtOH je velmi nízká, jsou v podstatě neaktivní, ale mohou metabolizovat alkoholy s dlouhým uhlíkovým řetězcem a omega mastné kyseliny [27].

Je uváděno, že ADH vyskytující se v žaludeční mukóze vykazuje mnohem vyšší aktivitu u mužů než u žen. u mužů je tento enzym schopen oxidovat až $\frac{1}{3}$ zkonsumovaného EtOH. u chronických alkoholiků nebo u pacientů trpících gastritidami způsobenými bakterií *Helicobacter pylori* úloha tohoto enzymu vzhledem k poškození mukózy výrazně klesá.

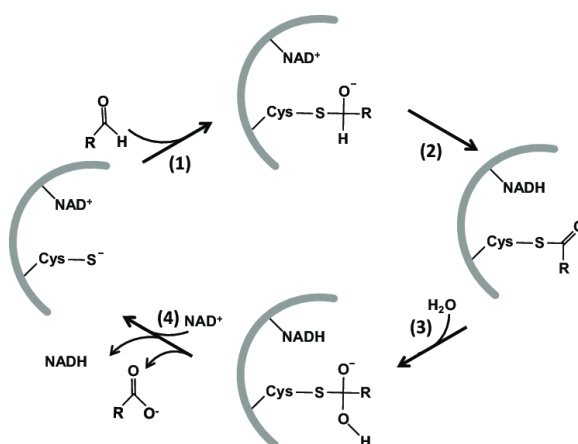
Jak již bylo naznačeno výše, mezi různými lidskými etniky existují různé polymorfní formy alkoholdehydrogenas. Tato skutečnost vysvětluje obecně známý fakt, že národy či etnické skupiny mají rozdílnou snášenlivost EtOH. Obecně známá je nízká tolerance EtOH u Asiatů nebo naopak poměrně vysoká snášenlivost EtOH u slovanských národů [28]. Alkoholdehydrogenasa může mimo EtOH katalyzovat i řadu redukčních reakcí při kterých z aldehydů a ketonů vznikají příslušné primární a sekundární alkoholy. ADH je schopna metabolické aktivace celé řady cizorodých látek, ze kterých vznikají pro tělo velmi nebezpečné sloučeniny, např. přeměna methanolu na formaldehyd či ethylenglykolu na glyoxal. Látka 4-methylpyrazol je schopná inhibovat aktivitu ADH a bývá pro tuto vlastnost používána jako antidotum při otravách methanolem nebo ethylenglykolem [5].

Mimo dehydrogenace primárních a sekundárních alkoholů se také podílí na metabolismu katecholaminů a steroidních hormonů [29]. Mechanismus oxidace je znázorněn na obrázku 1, str. 15.



Obrázek 1: a) Katalytické místo jaterní alkoholdehydrogenasy; b) Mechanismus oxidace a redukce pomocí alkoholdehydrogenasy. Převzato a upraveno z: [30].

Aldehyddehydrogenasa (ALDH), systematicky aldehyd: NAD^+ - oxidoreduktasa, E.C. 1.2.1.3, se nachází nejen v cytosolu, ale také membránách endoplasmatického retikula a mitochondrií. Jejím úkolem je oxidace aldehydicke skupiny na karboxylovou kyselinu. v aktivním místě je karbonyl navázán na thiolovou skupinu cysteinu. v následujícím kroku je oxidován pomocí NAD^+ nebo NADP^+ , který slouží jako kofaktor tohoto enzymu. Vzniká thioester, který je dále hydrolyzován, přičemž je uvolněna příslušná karboxylová kyselina a obnovena volná thiolová skupina cysteinu. Aldehyddehydrogenasa má tedy dvě funkce – oxidativní a hydrolytickou [5, 17, 31]. Katalytický mechanismus aldehyddehydrogenasy je znázorněn na obrázku 2.



Obrázek 2: Mechanismus oxidace aldehydů na karboxylové kyseliny aldehyddehydrogenasou. Převzato a upraveno z: [32].

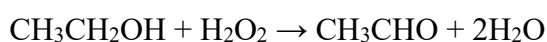
Nejdůležitější formy enzymu, které se podílejí na oxidaci acetaldehydu, jsou cytosolární ALDH1 a mitochondriální ALDH2. ALDH1 je velmi senzitivní na disulfiram. Disulfiram je látka selektivně inhibující přeměnu acetaldehydu na kyselinu octovou. Dochází tak k nahromadění acetaldehydu v organismu, což způsobuje fyziologické obtíže. Této vlastnosti bylo využíváno při léčbě závislosti na alkoholu, kdy bylo pacientům podáváno léčivo antabus (účinná látka disulfiram) [22, 33]. Negativní zážitek spojený s konzumací alkoholu měl mít značný vliv při léčbě závislosti na alkoholu. Podobné vlastnosti jako disulfiram má také toxin obsažený v houbě hnojník inkoustový, latinsky *Coprinus atramentaria*, který se nazývá coprin. Coprin, chemicky N-5-(1-hydroxycyklopropyl)-L-glutamin je v těle nestabilní a je enzymatickou hydrolýzou přeměňován na 1-aminocyklopropanol a cyklopropanon [34]. Obě tyto látky jsou schopné inhibovat ALDH [35].

Při alkoholdehydrogenasové i aldehyddehydrogenasové reakci vznikají ekvimolární množství redukované formy nikotinamidadeninukleotidu ($\text{NADH} + \text{H}^+$). Na vstupu do dýchacího řetězce, kde je tento koenzym znovu oxidován, soutěží s redukčními ekvivalenty dehydrogenace jiných substrátů, čímž mohou zpoždovat jejich zpracování. Dochází například ke snížení aktivity citrátového cyklu, snížení odbourávání mastných kyselin pomocí beta-oxidace. Pokud je zvýšené množství $\text{NADH} + \text{H}^+$ oproti NAD^+ dochází ke zvýšení produkce laktátu, což může vést k metabolické acidóze organismu [36].

ADH působí také v tlustém střevě, kde je EtOH produkován střevní mukózou a přítomnými symbiotickými bakteriemi. v tlustém střevě je aktivita ALDH nízká, což vede k hromadění acetaldehydu ve střevě. Acetaldehyd může přispívat ke gastroenterologickým obtížím, které způsobuje chronický alkoholismus – tvorba polypů a nádorů tlustého střeva [17, 22].

1.1.3 Katalasová cesta

Katalasa, systematicky H_2O_2 : H_2O_2 oxidoreduktasa, je enzym, bez kterého probíhá oxidace EtOH nejpomaleji. Enzym obsahuje porfyrinový skelet s iontem železa (Fe^{3+}) jakožto centrálním atomem. Je to tedy enzym hemového typu a nalezneme ho v peroxisomech. Produktem reakce je acetaldehyd [37, 38]. Reakce probíhá dle následujícího schématu:



1.1.4 Mikrosomální systém oxidace ethanolu

Menší podíl EtOH je metabolizován tzv. mikrosomálním systémem oxidace EtOH. Tento systém můžeme nalézt v endoplazmatickém retikulu jaterních nebo plicních buněk, dále u buněk mozkových a kožních. Produktem reakce je opět acetaldehyd. Koenzymem reakce je NADP⁺.

Objev MEOS přinesl obrovský vědecký posun v oblasti výzkumu jaterních onemocnění způsobených konzumací alkoholu. Po mnoho dekad se věřilo, že alkoholdehydrogenasová cesta s minoritním příspěvkem katalasy je jediný možný způsob odbourávání alkoholu. Alkoholdehydrogenasová cesta oxiduje EtOH za pomoci redukce NAD⁺ na NADH. Nicméně ne všechny efekty, které konzumace EtOH způsobuje, bylo možné vysvětlit na základě této cesty [39]. Hlavní fakt, který nebylo možné vysvětlit jako proces způsobený aktivitou ADH či katalasou, byla zvýšená schopnost odbourávat alkohol u chronických alkoholiků. Ve vzorcích lidské krve bylo prokázáno, že ADH není inducibilní [40]. Toto zjištění vedlo k hypotéze, že existuje ještě další systém, který se podílí na detoxikaci EtOH. Hypotézu potvrdily také výsledky pozorování výzkumné skupiny Remmera a Merkera [41], kteří se zabývali pozorováním proliferace hladkého endoplazmatického retikula po podání různých xenobiotik včetně EtOH. Výsledkem bylo zjištění, že proliferace hladkého endoplazmatického retikula pozorovaná po podání příslušného xenobiotika, byla vždy spojena s nárůstem aktivity enzymu, který příslušné xenobiotikum metabolizuje, a který je lokalizován na příslušných proliferujících se membránách [39, 40].

V roce 1968 byl potvrzen objev nové metabolické cesty EtOH (u lidí i u potkanů), která je lokalizovaná v endoplazmatickém retikulu [42]. Mikrosomální systém oxidace ethanolu je závislý na cytochromu P450 (CYP), čímž je odlišný od ADH a katalasy. Na základě nové nomenklatury byl cytochrom P450, který je inducibilní EtOH nazván CYP2E1 [43]. Označení MEOS bylo zachováno, protože se ukázalo, že i jiné cytochromy P450 a stejně tak i hydroxylové radikály jsou schopné ovlivňovat metabolismus EtOH. u člověka byla vazba na metabolismus prokázána také u CYP1A2 a CYP3A4. Pokud porovnáme oxidační schopnosti CYP2E1 s CYP1A2 nebo CYP3A4, CYP2E1 má téměř dvojnásobnou aktivitu. Na základě tohoto zjištění by se dalo tvrdit, že CYP2E1 má tedy majoritní roli v oxidaci EtOH v lidských jaterních mikrosomech. Pokud ovšem uvažujeme součtovou aktivitu CYP1A2 a CYP3A4 je jejich aktivita srovnatelná s aktivitou CYP2E1. z tohoto důvodu jsou tyto enzymy také významně zapojeny do patofyziologie spojené s metabolismem EtOH [39].

V případě detoxifikace EtOH hraje CYP2E1 dvojí roli. Navzdory skutečnosti, že při nízkých koncentracích EtOH má ADH výrazně vyšší kapacitu pro oxidaci EtOH než MEOS, je to právě MEOS a zejména CYP2E1, který je zodpovědný za metabolickou adaptaci na vysoké koncentrace EtOH, které jsou běžné u chronických alkoholiků [39].

Předpokládá se, že CYP2E1, vzhledem ke své schopnosti produkovat reaktivní formy kyslíku, jako jsou například superoxidové anion radikály, hraje klíčovou roli v patogenezi jaterních onemocnění způsobených EtOH. Cílem volných radikálů jsou především membránové lipidy. Poškození biologických membrán vede k celé řadě dalších metabolických obtíží. Mimoto zvýšená tvorba reaktivních forem kyslíku může přispět k toxicitě EtOH prostřednictvím radikálově navozené inaktivace určitých enzymů [44].

Dále je CYP2E1 zodpovědný za vznik vysoce hepatotoxických sloučenin v důsledku metabolické aktivace řady xenobiotik. Příkladem takové látky je tetrachlormethan, který je přeměňován pravděpodobně na trichlormethylový radikál. Toxicita tetrachlormethanu je umocněna, pokud před podáním tetrachlormethanu předcházela premedikace EtOH [45]. Je dokázáno, že premedikace EtOH navýšila aktivitu mikrosomálních enzymů s nízkou K_m metabolizujících benzen a zároveň zvýšila hemopoetickou toxicitu benzenu [46]. Existuje také souvislost mezi nadužíváním EtOH a zvýšeným výskytem rakoviny horních zažívacích a dýchacích cest [39]. Na tomto procesu má pravděpodobně právě podíl ethanolem vyvolaná aktivace prekarcinogenů a karcinogenů pomocí cytochromů P450.

Neopominutelným jevem je EtOH způsobená indukce CYP2E1 v Kupfferových buňkách. Indukcí dochází k nárůstu intracelulární hladiny acetaldehydu. Ukázalo se, že CYP2E1 v Kupfferových buňkách produkuje pravděpodobně mnohem větší množství acetaldehydu než CYP2E1 v hepatocytech. u myši bylo dokonce prokázáno, že inhibitory cytochromu P450 v Kupfferových buňkách snižují metabolismus EtOH více než o 50 %, zatímco inhibitory ADH a katalasy jej snížily pouze o méně než 10 % [47].

1.2 Účinek ethanolu na organismus

1.2.1 Akutní intoxikace

Ethanol působí při vyšších dávkách podobně jako jiná narkotika. Mírné dávky mohou vyvolávat motorické a psychické oživení. u některých osob dochází po určité dávce EtOH ke ztrátě zábran a mohou se tak chovat velmi agresivně či manicky [6]. Smrtelné dávky EtOH se pohybují kolem 3–5 promile. k prodlužování reakční doby dochází již při 0,5 ‰, kdy jsou v krvi pozorovány změny u 20-30 % jedinců [6, 48]. Užívání některých druhů psychofarmak,

hypnotik nebo některých antihistaminik může výrazně zvýšit účinky EtOH. Další nebezpečnou vlastností pro člověka je, že EtOH rozšiřuje cévy v důsledku inhibice termoregulačního centra. Rozšíření cév má za následek tepelné ztráty organismu. Intoxikovaným osobám hrozí riziko podchlazení i při teplotách výrazně přesahujících 0 °C.

Akutní intoxikace zasahuje do obou hlavních metabolických drah EtOH. Oba systémy produkují acetaldehyd, který je vysoce toxickou a velmi reaktivní látkou. Jeho nadbytek spojený s intoxikací EtOH způsobuje – zvracení, bolest hlavy, dýchavičnost, tachykardie či zarudnutí kůže [6, 48].

Laktátová acidosa vznikající při reoxidaci NAD^+ ovlivňuje vylučování kyseliny močové v ledvinách, které je vlivem acidosis sníženo. Úbytek pyruvátu spotřebovávaného na reoxidaci NAD^+ následně snižuje glukoneogenezi, což vede k hypoglykémii.

Acetaldehyd může být přeměněn na acetát, jenž je játry využíván pro syntézu acetyl-CoA. Nadbytek acetyl-CoA, který vznikne v důsledku konzumace EtOH, zvyšuje rychlost syntézy mastných kyselin a podmiňuje tak alkoholickou jaterní steatosu [49]. Dále acetaldehyd díky své reaktivitě podporuje vznik volných radikálů, které jsou zodpovědné za peroxidaci lipidů buněčných membrán či DNA. Při lipidové peroxidaci se tvoří toxické produkty jako např. malondialdehyd a 4-hydroxynonenal [50].

Aduktý acetaldehydu s DNA jsou tvořeny buď ve formě Schiffových bazí nebo mechanismem Michaelovy adice. v případě Schiffových bazí reaguje atom uhlíku karbonylové skupiny s volnou aminovou skupinou DNA nebo lysinovým zbytkem. Během Michaelovy adice dochází k tvorbě dvojné vazby mezi β -uhlíkem karbonylu a nukleofilní skupinou na DNA [51].

Ethanol, jakožto polární rozpouštědlo, ovlivňuje fluiditu membrán, čímž může být ovlivněn přenos akčního potenciálu. Působení na neurony v mozku je narušeno od jiných drog nespécifické a postihuje všechna jeho centra. Dochází také k poruše funkce transportu látek přes membránu či receptorových funkcí. Poruchy těchto procesů bývají označovány jako základ nervových a psychických projevů alkoholové intoxikace [52, 53].

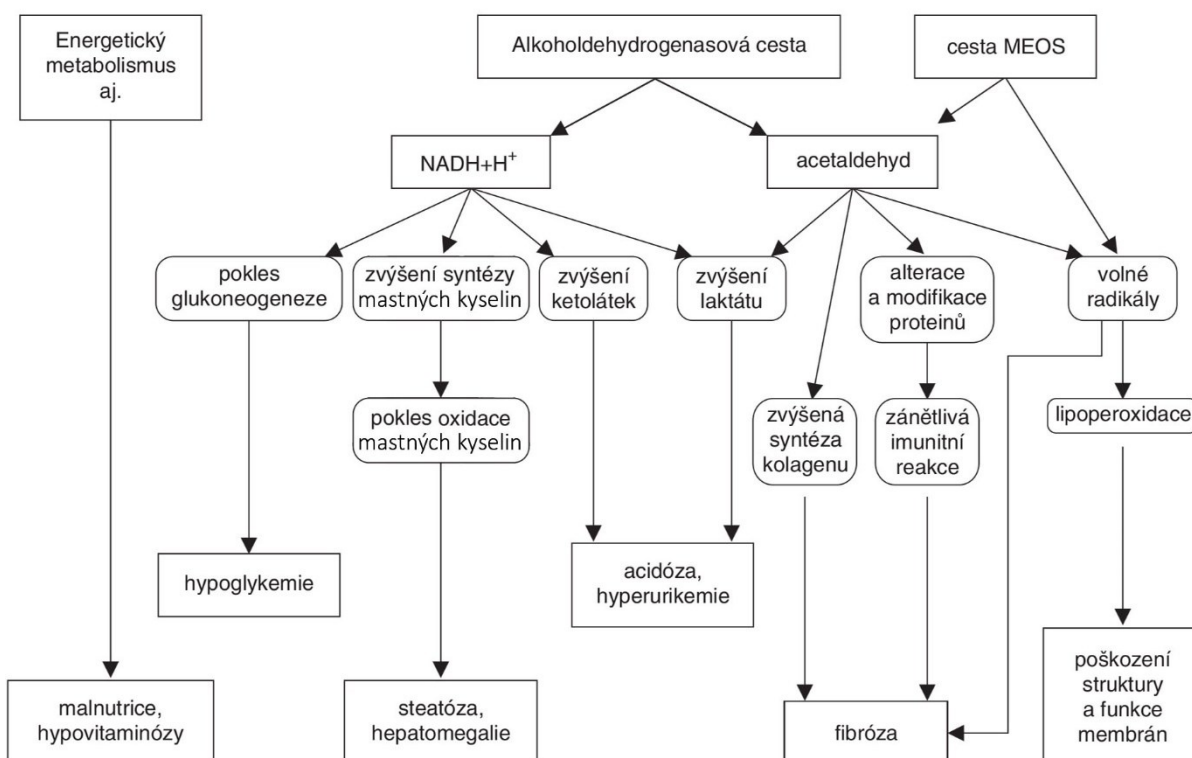
1.2.2 Chronická intoxikace a závislost na alkoholu

Při pravidelné konzumaci EtOH se snižuje citlivost centrálního nervového systému a celkově jeho farmakologický účinek. Prerušování pravidelné konzumace EtOH vyvolává u závislých jedinců somatické abstinenční příznaky, které mohou být až život ohrožující (např. *delirium tremens*). Studie nasvědčují, že incidence alkoholiků se v naší společnosti pohybuje mezi 2–3 % [6, 48].

Chronická konzumace alkoholu dlouhodobě zvyšuje hladinu acetyl-CoA a NADH + H⁺. Následky zvýšených hodnot těchto látek byly popsány v rámci kapitoly o akutní intoxikaci. v důsledku zvýšené syntézy mastných kyselin se vytváří nadbytek triacylglycerolů. Nedochozí totiž k inkorporaci triacylglycerolů do molekul lipoproteinů, protože aktivita lipoproteinlipasy, která je za tento jev zodpovědná, je inhibována [17].

Při chronické konzumaci EtOH mohou být zásadně poškozeny imunitní mechanismy organismu. Acetaldehyd má schopnost vázat se na bílkoviny, čímž může měnit strukturu epitopů, které začnou být imunitními mechanismy rozpoznávány jako cizorodé a dochází tak k navozené imunitní reakci. Je uváděno, že u 72 % pacientů postižených nějakou z alkoholových jaterních poruch, je v séru možné nalézt protilátky proti poškozeným hepatocytům. Alkoholici jsou postiženi polyklonální IgA-hypergamaglobulinemií. Přítomnost těchto protilátek může poukazovat na závažnost choroby [54].

Chroničtí alkoholici trpí často nedostatkem vitamínů a minoritních složek potravy. Acetaldehyd narušuje metabolismus retinolu, což zapříčiňuje nedostatek vitamínu A. Alkohol energeticky saturuje potřeby organismu, alkoholici tedy příliš nepřijímají potravu, a tak nutričně strádají [55, 56]. Schématické shrnutí hlavních metabolických efektů ethanolu je uvedeno na obrázku 3, str. 21.



Obrázek 3: Schématické shrnutí hlavních metabolických efektů ethanolu. Převzato a upraveno z: [17].

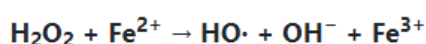
1.3 Ethanol a oxidační poškození

Oxidační poškození buněk je způsobováno volnými radikály, což jsou molekuly, v jejichž atomární struktuře se vyskytují nepárové elektrony ve vnějších slupkách elektronového obalu. Právě přítomnost nepárových elektronů způsobuje jejich nestabilitu a vysokou reaktivitu. Mají krátkou dobu života a nespecificky reagují s mastnými kyselinami, aminokyselinami, peptidy či nukleovými kyselinami. Dělíme je na reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species, ROS) a reaktivní formy dusíku (reactive nitrogen species, RNS). Mezi nejvýznamnější zástupce radikálů či látek, které je poskytují (sami o sobě nejsou radikály) patří superoxidový anion radikál, hydroxylový radikál, hydroperoxylový radikál, alkoxylový radikál, peroxid vodíku, singletový kyslík, oxid dusnatý a peroxyinitrit [57, 58]. Lidské tělo má obranné mechanismy, které mají za úkol udržovat hladiny reaktivních forem v bezpečných mezích. Pokud dojde k přetížení těchto mechanismů, vzniká tzv. oxidační stres.

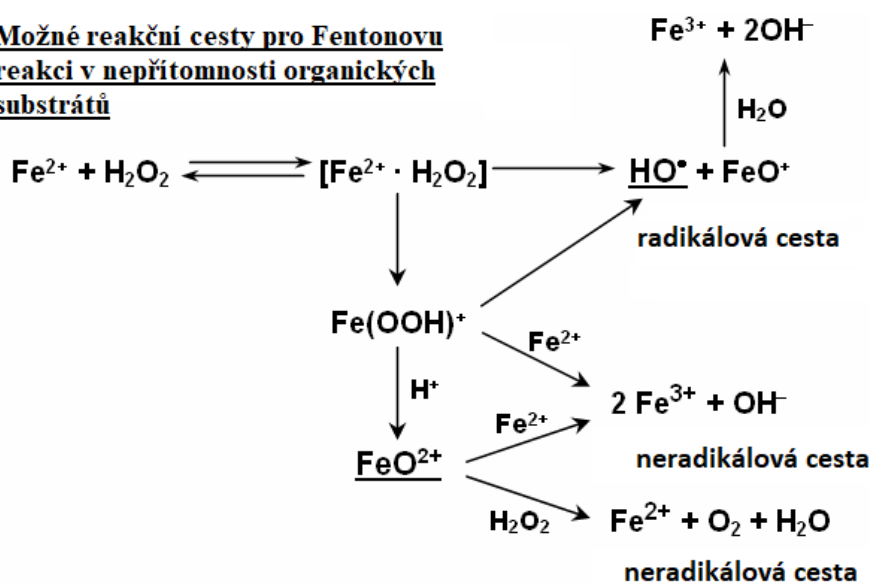
1.3.1 Vznik volných radikálů a jejich původ v organismu

Volné radikály i další ROS a RNS vznikají v průběhu mnoha metabolických procesů v lidském těle [58]. v buňkách probíhá tvorba volných radikálů nepřetržitě. Na jejich tvorbě se podílejí jak enzymové, tak neenzymové reakce. Mezi enzymové reakce, které slouží jako zdroj volných radikálů patří enzymy, které se účastní respirace, fagocytosy, syntézy prostaglandinů a enzymy systému cytochromu P450 [59]. Mezi zdroje interně generovaných radikálů patří: mitochondrie, xantinoxidasa, peroxisomy, zánětlivé reakce či ischemie [60]. Superoxidový anion radikál je generován prostřednictvím několika oxidasových systémů. Ihned po vytvoření se podílí na reakcích, které vedou k tvorbě dalších ROS a RNS, např. peroxid vodíku, hydroxylový radikál či peroxynitrit. Nejreaktivnějším volným radikálem vznikajícím *in vivo* je hydroxylový radikál. Je tvořen reakcí superoxid anionového radikálu s peroxidem vodíku v přítomnosti Fe^{2+} nebo Cu^+ , které slouží v reakci jako katalyzátor [58]. Tato reakce se nazývá Fentonova reakce a její schéma je znázorněno na obrázku 4.

a) Fentonova reakce



b) Možné reakční cesty pro Fentonovu reakci v nepřítomnosti organických substrátů



Obrázek 4: a) Fentonova reakce; b) Možné reakční cesty pro Fentonovu reakci v nepřítomnosti organických substrátů. Převzato a upraveno z: [61].

Volné radikály mohou být také produkovány prostřednictvím neenzymových reakcí kyslíku s organickými sloučeninami. Neopominutelným zdrojem volných radikálů je i ionizační záření. Exogenní ROS/RNS jsou produktem znečištění životního prostředí, především vody a vzduchu. Jako další vlivy, které přispívají k tvorbě volných radikálů v lidském těle, je nezbytné uvést: cigaretový kouř, konzumace alkoholických nápojů, kationty těžkých kovů (Cd, Hg, Pb), některé léky a průmyslové chemikálie. Po proniknutí těchto látek do těla dochází k jejich rozkladu či metabolismu, přičemž vznikají volné radikály [58].

1.3.2 Význam volných radikálů v organismu

Při nízkých až středních koncentracích jsou ROS a RNS pro tělo velmi prospěšné. Neutrofilů, makrofágů a monocytů uvolňují volné radikály při eliminaci patogenních mikroorganismů. Tento proces je součástí důležitého obranného mechanismu organismu proti infekcím. Význam tohoto procesu můžeme pozorovat u pacientů s granulocitním onemocněním. Tito pacienti mají poškozený membránově vázaný systém NADPH oxidasy, který se projevuje neschopností produkovat superoxidový anion radikál, což se projevuje vleklými infekcemi [58]. ROS a RNS jsou nezbytné pro řadu buněčných signálních drah. Klíčové úlohy mají např. v signálních kaskádách fibroblastů, endoteliálních buňkách, buňkách tvořících hladkou svalovinu cév či tkáň štítné žlázy. Příkladem může být oxid dusnatý, který slouží jako intercelulární posel pro modulaci krevního tlaku, trombózy a nervové aktivity. Oxid dusnatý funguje také jako nespecifická obrana hostitele při boji proti patogenům. Volné radikály hrají roli v průběhu mitotických procesů [58, 60].

Pokud je produkce volných radikálů v organismu vysoká, dochází k vzniku oxidačního stresu. Oxidační stres je škodlivý proces, při kterém může docházet k vážnému poškození buněčných membrán, proteinů, lipidů, lipoproteinů, DNA a RNA [62, 63]. Buněčné membrány mohou být poškozeny například hydroxylovým radikálem a nadbytkem peroxynitritu. Tento proces, který se nazývá peroxidace lipidů vede k tvorbě malondialdehydu a konjugovaných dienových sloučenin, jež jsou cytotoxické a mutagenní. Malondialdehyd je karcinogenní látka, která způsobuje zesílení nukleových kyselin a proteinů. Peroxidace lipidů je řetězovou reakcí, tedy jakmile je zahájena, začne se šířit velmi rychle a ovlivňuje tak velké množství lipidových molekul. Proteiny mohou být také poškozeny vlivem ROS a RNS. Poškození vede ke změnám ve struktuře proteinů a ztrátě enzymové aktivity. Vlivem oxidačního poškození DNA dochází ke vzniku mutací [55].

1.4 Antioxidanty

Organismy si v průběhu evoluce vytvořily antioxidační obranu, která je chrání před toxickými vlivy volných radikálů [64]. v lidském organismu je několik systémů, které působí proti oxidačnímu stresu skrze produkci antioxidantů, které jsou buď endogenního původu nebo externě dodávané prostřednictvím potravy. Antioxidanty jsou sloučeniny nebo enzymové systémy, které působí dvěma způsoby. Prvním z nich je zabránění tvorby volných radikálů, druhou možností je reakce se vzniklými volnými radikály za účelem jejich inaktivace [58]. Endogenní antioxidační sloučeniny jsou např. glutathion, případně další sloučeniny obsahující thiolovou skupinu, bilirubin, kyselina močová, albumin a další sérové bílkoviny. Hlavní antioxidační enzymové systémy, které se přímo podílejí na neutralizaci ROS a RNS jsou: superoxiddismutasa, katalasa, glutathionperoxidasa a glutathionreduktasa [55, 56, 58]. Superoxiddismutasa je enzym, který tvoří první linii obrany proti volným radikálům. Katalyzuje redukci superoxidového anion radikálu na peroxid vodíku. Peroxid vodíku vzniklý touto reakcí je dále přeměňován na vodu pomocí enzymu katalasa nebo glutathionperoxidasa. Glutathionperoxidasa je enzym, který ve své struktuře obsahuje atom selenu. Působením glutathionperoxidasy dochází k oxidaci glutathionu. Glutathionreduktasa následně redukuje oxidovaný glutathion vzniklý předchozí reakcí. Redukce probíhá za spotřeby NADPH [60].

Exogenní antioxidanty jsou sloučeniny, které si organismus neumí vyprodukovat a musí být dodávány prostřednictvím potravy. Významnými exogenními antioxidanty jsou: vitamín E, vitamín C, karotenoidy, kationty selenu, manganu a zinku, flavonoidy, omega-3 a omega-6 mastné kyseliny aj. [65].

Při neutralizaci volného radikálu se antioxidant sám oxiduje. z tohoto důvodu musí být zdroje antioxidantů v těle nepřetržitě doplňovány. Žádný antioxidant není univerzální, některé antioxidanty jsou vůči určitým volným radikálům neefektivní. Za určitých okolností může antioxidant generovat volné radikály, a tím přispívat k oxidačnímu stresu [65].

Antioxidant zasahuje do průběhu řetězových radikálových reakcí. Mezi antioxidanty působící při radikálových reakcích patří např. vitamín C, vitamín E nebo karotenoidy. Tyto látky působí až po iniciaci reakce. Ovšem enzymy jako superoxiddismutasa, katalasa či glutathionperoxidasa mohou výrazně zpomalit iniciační fázi řetězové reakce, a tím omezit množství reagujících radikálů. Děje se tak prostřednictvím vycytávání radikálů v iniciační fázi nebo stabilizací iontů přechodných kovů jako je měď a železo, které jsou v nestabilizovaném stavu také schopné produkovat radikály [58].

1.5 Účast ethanolu na produkci volných radikálů

Již v sedmdesátých letech se předpokládalo, že EtOH může ovlivnit antioxidační rovnováhu jaterních buněk [56]. v současné době je možné díky pokročilým technologickým postupům studovat přímé zapojení volných radikálů do metabolismu ethanolu a uvažovat tak o jejich roli v patogenezi tkáňových změn [55]. Použitím elektronové spinové rezonanční spektroskopie s vhodnou iontovou pastí, která je schopná zachytit vysoce reaktivní volné radikály, bylo možné detekovat hydroxyethylový radikál v jaterních mikrosomech potkana [66, 67].

Později stejní autoři prokázali, že většina volných radikálů vzniklých v souvislosti s metabolismem ethanolu, vznikla prostřednictvím činnosti cytochrom P450 dependentních monooxygenas. Pouze minoritní část vznikajících volných radikálů lze přičíst přímé reakci ethanolu s hydroxylovými radikály vznikajícími degradací peroxidu vodíku [66, 67]. Důležitost cytochromu P450 v produkci volných radikálů v souvislosti s konzumací ethanolu byla následně prokázána i v lidských játrech [68]. Hydroxyethylový radikál společně s volnými radikály produkovanými enzymy cytochromu P450 po indukci ethanolem, se zdají být spouštěčem oxidativního poškození v případě chronické alkoholové intoxikace [69].

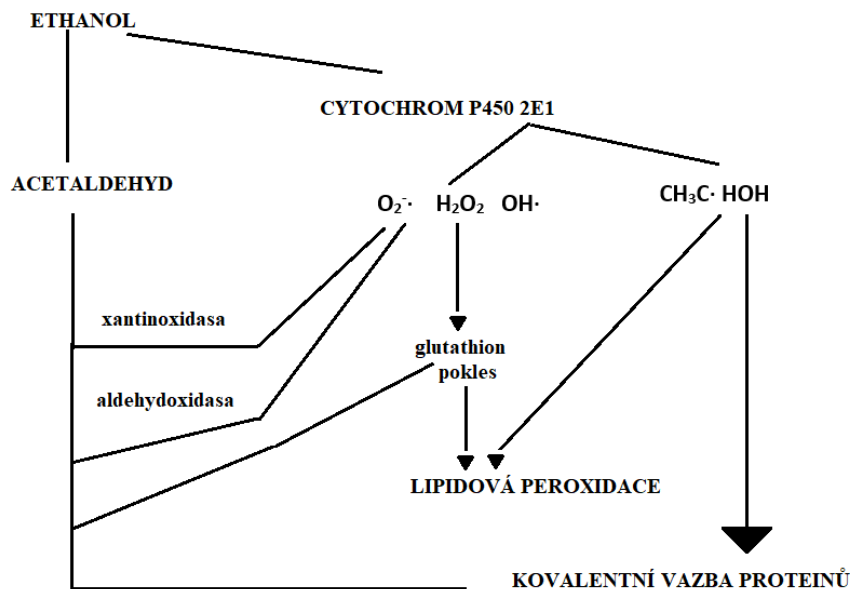
Zásadní význam v produkci reaktivních forem kyslíku má především CYP2E1 [56]. v případě akutní intoxikace ethanolem dochází k vzniku superoxid aniontového radikálu, který je produktem odbourávání nadbytečného acetaldehydu v jaterním cytosolu enzymy xantinoxidasa či aldehydoxidasa [69].

Pravděpodobně nejsledovanější mechanismus oxidačního poškození v souvislosti s jaterními onemocněními způsobenými nadměrnou konzumací ethanolu je lipidová peroxidace [55]. Stanovení markerů lipidové peroxidace je konvenčně využívána metoda pro sledování míry jaterního poškození u pacientů s jaterní chorobou způsobenou chronickou nadměrnou konzumací alkoholických nápojů [55]. Dříve využívané stanovení malonaldehydu v krevní plasmě pomocí kolorimetrické metody využívající kyselinu thiobarbiturovou se dnes ukazuje jako velmi nespolehlivé [70, 71].

Jako specifická metoda se ukázalo fluorescenční stanovení aduktu 4-hydroxynonenalu. Touto technikou bylo možné ukázat, že oxidační poškození jater je brzkým příznakem alkoholismu. Ve skupině testovaných silných alkoholiků byl zaznamenán výrazný nárůst hladiny tohoto markeru u všech pacientů s neporušenou jaterní funkcí [55].

Mimo prokázání úlohy ethanolu při peroxidaci lipidů či tvorbě hydroxyethylového radikálu a dalších reaktivních forem kyslíku je pravděpodobné, že ethanol v souvislosti

s předešlými ději výrazně ovlivňuje hladinu glutathionu v játrech. Experimentálně bylo toto potvrzeno v pokusech s ethanolem *in vitro* i *in vivo* [55]. Vazba mezi jednotlivými ději je znázorněna na obrázku 5.



Obrázek 5: Reakce volných radikálů v játrech při intoxikaci ethanolem a pravděpodobný vliv na jaterní poškození. Převzato a upraveno z: [55].

1.6 Flavonoidy a jejich role v organismu

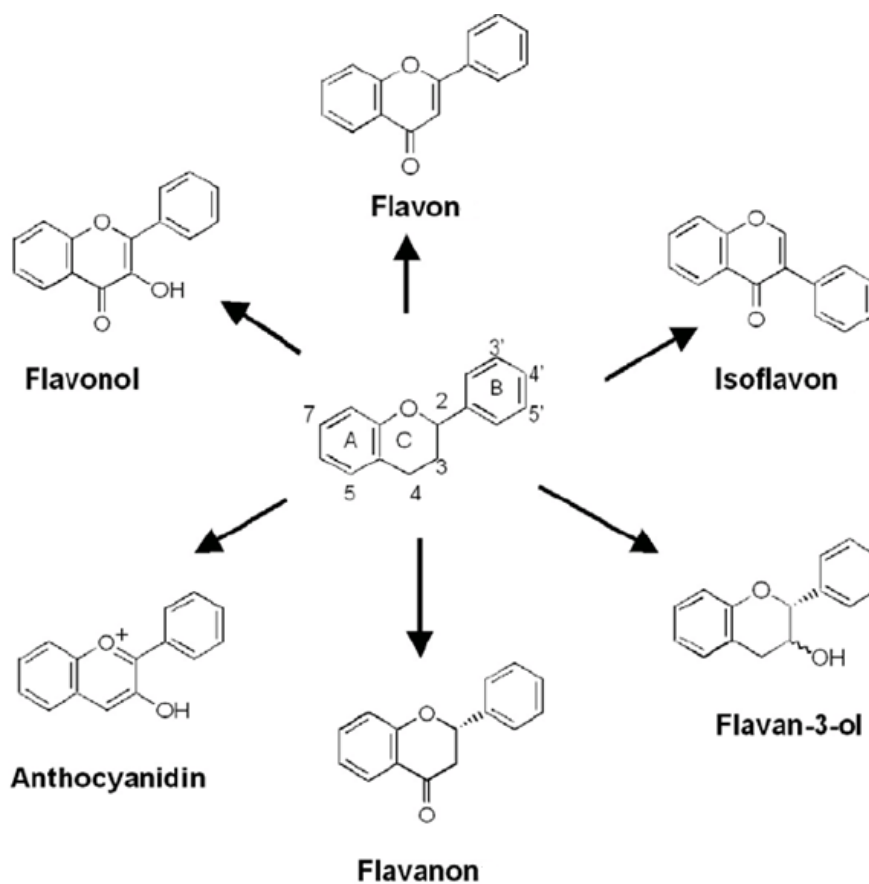
Flavonoidy jsou hydroxylované fenolické fytochemikálie, které můžeme nalézt téměř ve všech částech vyšších rostlin. Velké množství flavonoidů se vyskytuje v listech, květech a kůře. Významný je také výskyt v ovoci (především ve slupkách) nebo semenech [72, 73].

Využití fytochemikálií v rostlinách je velmi široké. v květech vyšších rostlin jsou flavonoidy zodpovědné za barvu květů, která může působit buď jako atraktant pro opylovače (anthokyaniny) nebo může hmyz naopak odpuzovat (proanthokyanidiny) [74, 75]. Rostliny si tyto látky vytváří také v souvislosti s mikrobiálními a virovými infekcemi či jako obranu proti predátorům [76]. v rostlinných tkáních vystavených abiotickému či biotickému stresu zastávají roli sekundárního antioxidačního systému. Ovlivňují také regulaci auxinu, který se řadí mezi růstové faktory rostlin [76]. v rostlinách jsou syntetizovány fenylpropanoidovou dráhou, která vychází z fenylalaninu, který následně podléhá deaminaci za vzniku kyseliny skořicové za katalýzy enzymu fenylalaninamoniaklyasa. Kyselina skořicová je přeměňována dalšími enzymovými reakcemi, jejichž konečným produktem je příslušný flavonoid [77].

Lidé ani zvířata nejsou schopni tyto látky syntetizovat a musí je přijímat s potravou. Nejhojněji zastoupenými flavonoidy v potravě jsou flavonoly. Obecně jsou flavonoidy v potravě zodpovědné za chuť, prevenci lipidové peroxidace a za ochranu vitamínů a enzymů [77].

1.6.1 Struktura flavonoidů

Flavonoidy mají skelet složený z patnácti atomů uhlíku. Skelet obsahuje dva benzenové kruhy, které jsou spojené prostřednictvím heterocyklického pyranového kruhu (viz obrázek 6).



Obrázek 6: Základní struktury flavonoidů. Převzato a upraveno z: [78].

Dle struktury je řadíme do různých tříd jako jsou flavony (např. flavon, apigenin, leteolin), flavonoly (např. myricetin, kvercetin, kaempferol), flavanony (např. flavanon, hesperetin, naringetin) a další. Jednotlivé třídy se od sebe liší stupněm oxidace a způsobem substituce pyranového kruhu. Látky v jednotlivých třídách se potom liší druhem a polohou substituentů na benzenových kruzích. Flavonoidy se vyskytují ve formě aglykonů, glykosidů a methylovaných derivátů. Aktivita těchto látek se odvíjí od jejich struktury, stupně

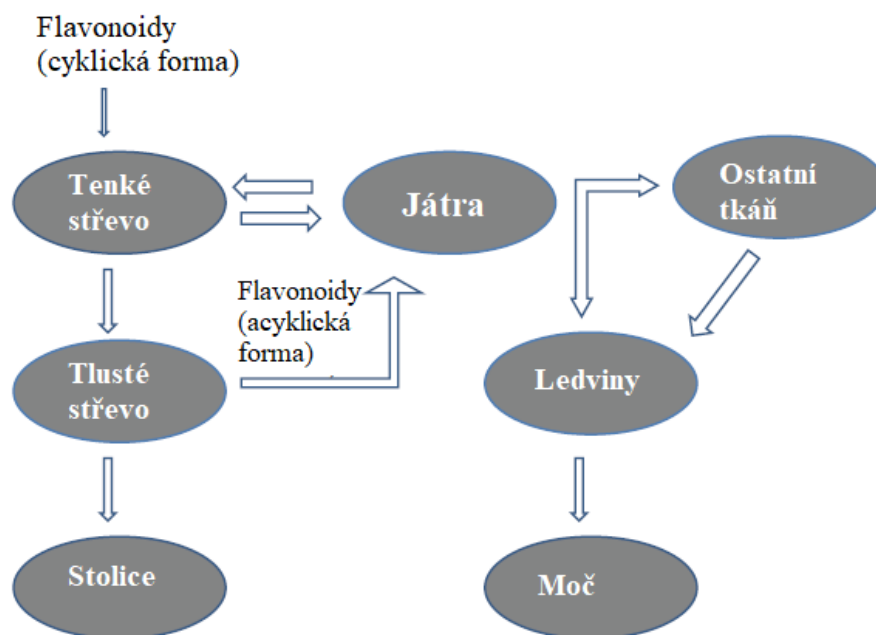
hydroxylace, druhu substituentů a konjugátů. Hydroxylové skupiny zprostředkovávají antioxidační vlastnosti flavonoidů [79].

V přírodě jsou hydroxylové skupiny nejběžněji substituovány ve formě methyletherů a acetylésterů. u glykosidů je glykosidická vazba nejčastěji lokalizována na třetím nebo sedmém uhlíku sacharidu, kterým může být L-rhamnosa, D-glukosa, glukorhamnosa, galaktosa nebo arabinosa [79, 80].

1.6.2 Metabolismus flavonoidů v lidském organismu

Absorpce flavonoidů v organismu je závislá na jejich molekulové hmotnosti, struktuře, lipofilitě, rozpustnosti a hodnotě jejich disociační konstanty. Absorpce probíhá buď v tenkém nebo v tlustém střevě. Vliv na vstřebávání má také fakt, zda je daný flavonoid ve formě glykosidu či aglykonu. Aglykony jsou snadněji vstřebávány v tenkém střevě. Glykosidy musí být před absorpcí nejprve přeměněny do aglykonové formy [81].

Hydrofilní glykosidy flavonoidů jako např. kvercetin jsou přes membránu buněk tenkého střeva transportovány pomocí Na^+ dependentních glukosových transportérů, tzv. SGLT1 [81]. Alternativním mechanismem absorpce glykosidů je jejich hydrolýza pomocí enzymů laktasaplorizinhydrolasy a β -glukosidasy, které jsou lokalizovány na vnější stěně membrány tenkého střeva [82]. Po absorpci dochází v játrech ke glukuronidaci, sulfataci nebo methylaci nebo ve střevech k mikrobiální degradaci na menší fenolické sloučeniny, které jsou následně vyloučeny z těla močí či stolicí [77, 83]. Schématické znázornění metabolických procesů v lidském organismu viz obrázek 7, str. 29.



Obrázek 7: Orgány zapojené do metabolismu flavonoidů. Převzato a upraveno z: [77].

1.6.3 Biologická aktivita flavonoidů

Antioxidační aktivita

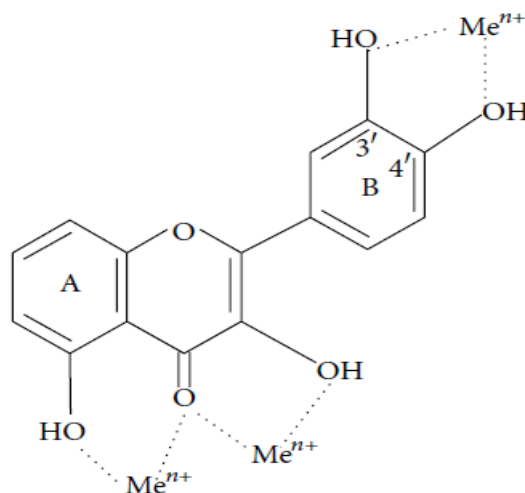
Flavonoidy vykazují celou řadu biologických aktivit. Jejich antioxidační schopnosti jsou ovšem hlavní společnou a nejvíce popisovanou vlastností [77]. Antioxidační vlastnosti flavonoidů závisí na poloze funkčních skupin, stejně tak i schopnost zhášení volných radikálů a chelatace iontů kovů [84, 85].

Z hlediska zhášení ROS a RNS má zásadní vliv především konfigurace hydroxylových skupin na kruhu B (obrázek 6, str. 27). Kruh B poskytuje volným radikálům atom vodíku a elektron, a tím dochází k jejich stabilizaci. Vznikají stabilnější flavonoidové radikálové struktury [86]. Mechanismy antioxidačního působení zahrnují: potlačení tvorby ROS/RNS inhibicí patřičných enzymů nebo chelataci stopových prvků, které jsou do produkce volných radikálů zapojeny; zhášení radikálů; „upregulaci“ a ochranu přirozených antioxidačních mechanismů [77, 87]. Některé flavonoidy kombinují oba tyto mechanismy dohromady. Flavonoidy inhibují enzymy zodpovědné za generaci ROS/RNS (činnost mikrosomální monoxygenasy, glutathion S-transferasy nebo NADH-oxidasy) [88].

Flavonoidy chrání také lipidy před oxidačním poškozením [77]. Volné ionty kovů zvyšují tvorbu ROS, protože jsou schopné redukovat peroxid vodíku za vzniku vysoce reaktivního hydroxylového radikálu. Flavonoidy díky nižšímu redoxnímu potenciálu mohou

redukovat vysoce oxidující volné radikály, mezi které patří superoxidový anion radikál, peroxylový radikál či hydroxylový radikál [87].

Například kvercetin je známý zejména svou schopností stabilizovat ionty železa pomocí tvorby chelátů. Ionty stopových kovů se váží na specifických pozicích, které jsou odlišné od těch pro ionty železa [89]. Vazebná místa pro ionty stopových kovů jsou znázorněna na obrázku 8.



Obrázek 8: Znázornění vazebných míst pro ionty stopových kovů na základní flavonoidní struktuře. Me^{n+} značí ionty kovů. Převzato a upraveno z: [77].

Pokud je v molekule flavonoidu přítomná 3',4'-katecholová skupina činí, to z něj neúčinnější lapače peroxidových radikálů, superoxidanion radikálů a peroxyinitritových radikálů. Poloha katecholové skupiny je znázorněna též v obr. 8 [84]. Epikatechin a rutin se díky přítomnosti katecholové skupiny ve struktuře řadí mezi silné lapače radikálů a inhibitory lipidové peroxidace *in vitro* [90]. Při oxidaci kruhu B u flavonoidů, které mají katecholovou skupinu, se vytváří poměrně stabilní orthosemichinonový radikál, který je velmi silným lapačem volných radikálů [91]. Konjugací mezi kruhy a a B dochází ke vzniku rezonančního efektu aromatického jádra, který se podílí na stabilizaci flavonoidového radikálu [77].

Také výskyt, poloha, struktura a celkový počet cukerných zbytků hraje důležitou roli v antioxidační aktivitě flavonoidů. Aglykony jsou účinnějšími antioxidanty než jejich odpovídající glykosidy [81, 92].

Stupeň polymerace má vliv na antioxidační schopnosti jednotlivých flavonoidů. Se zvyšujícím se stupněm polymerace se zvyšuje účinnost například u prokyanidinů, které jsou řazeny mezi nejsilnější antioxidanty vůbec. Dimery a trimery prokyanidinů mají vyšší účinnost vychytávat superoxidové anionradikály než monomery. Tetramery prokyanidinů vykazují vyšší

aktivitu vůči peroxynitritovým radikálům a superoxid anionradikálům než trimery. Signifikantně největší schopnost vychytávat superoxid anionradikály mají heptamery a hexamery prokyanidinů [77].

Další aktivita flavonoidů manifestující se v lidském organismu

Flavonoidy mají řadu pozitivních účinků na lidský organismus. Flavonoidy působí hepatoprotektivně, mají antibakteriální a antivirové účinky, podílejí se na protizánětlivých procesech v lidském organismu a mají také protirakovinné účinky.

U řady flavonoidů, např. katechin, apigenin, kvercetin či rutin byla prokázána jejich hepatoprotektivita. Anthokyany jsou důkladně studovány v souvislosti s jejich pozitivním vlivem na průběh chronických jaterních onemocnění [77].

Silymarin obsažený v semenech a „mléku“ rostliny ostropestřec mariánský se skládá ze tří strukturních podjednotek: silybinin, silydianine a silychristine. Bylo prokázáno, že silymarin stimuluje aktivitu DNA-dependentní RNA polymerasy 1 a následně pak biosyntézu RNA a proteinů, což má za následek proliferaci a regeneraci jaterních buněk. k regeneraci buněk dochází ovšem pouze u poškozených jater. Silymarin se klinicky využívá pro léčbu jaterní cirhosisy, ischemických poškození jater a poškození způsobenými toxiny hub či paracetamolem [77, 93]. Je všeobecně známé, že rostliny si flavonoidy vytváří jako ochranu proti mikrobiálním patogenům, není proto překvapující, že byla u řady z nich prokázána obdobná aktivita v lidském organismu. Mezi takovéto flavonoidy můžeme zařadit např. apigenin, galangin, flavony a flavonové glykosidy [77].

Jedním z mechanismů antibakteriálního působení je tvorba komplexu s proteiny. z toho vyplývá, že jejich antimikrobiální působení může být spojeno se schopností inaktivovat mikrobiální adhesiny nebo působit na některé bakteriální enzymy. Lipofilní flavonoidy mohou také poškozovat membrány mikroorganismů [94]. Antibakteriální působení těmito mechanismy bylo *in vitro* prokázáno např. u *Vibrio cholerae* a *Streptococcus mutans*. u *Vibrio cholerae* došlo prostřednictvím katechinů k inaktivaci cholera toxinu a v případě *S. mutans* k inhibici glukosyltransferasy [77].

Záněť je normální biologický proces, který tělo vytváří jako odpověď při poranění tkáně, infekci mikrobiálními patogeny nebo při podráždění chemikáliemi. Zánětlivé procesy jsou iniciovány uvolněním mediátorů na místě poškození a migrací buněk zodpovědných za imunitní odpověď. Tento proces je následován uvolněním buněk zánětu, ROS, RSN a cytokinů s protizánětlivou funkcí za účelem eliminovat patogeny a obnovit poškozené tkáně [77].

Určité druhy flavonoidů signifikantně ovlivňují funkce lidského imunitního systému a protizánětlivé procesy [79]. Mezi takové flavonoidy lze zařadit hesperidin, apigenin, letuolin

či kvercetin. Tyto flavonoidy se účastní především protizánětlivých reakcí, obzvláště pak ovlivňují aktivitu tyrosin a serin-threonin proteinkinasy [79].

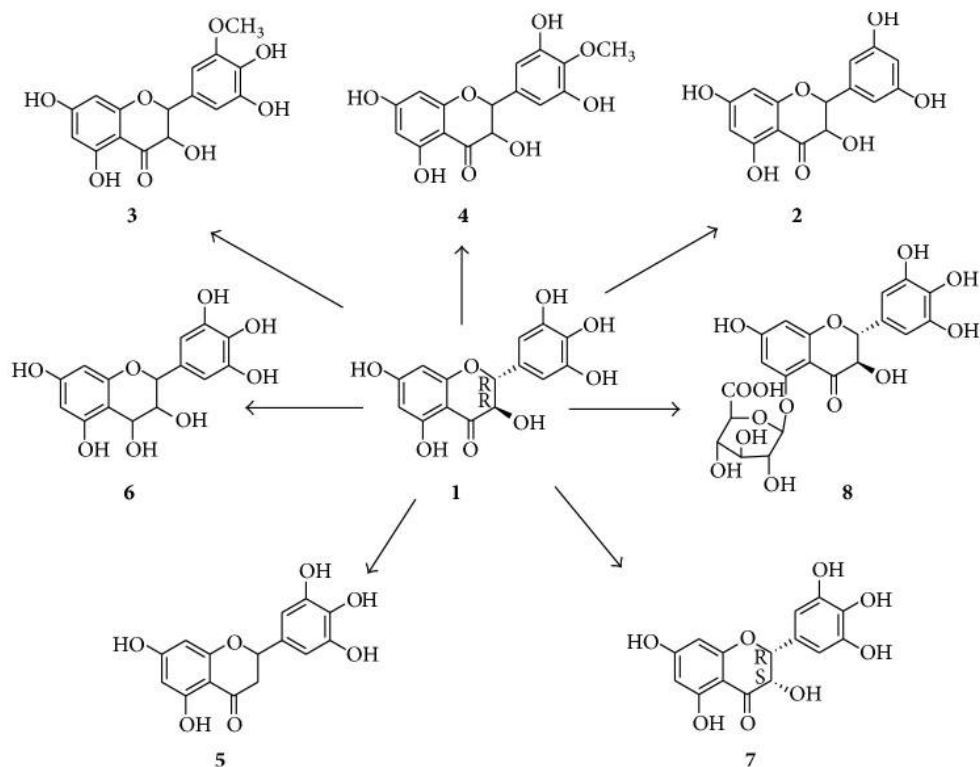
Z hlediska protirakovinných účinků je nezbytné zmínit především: „downregulaci“ tumor supresorového genu p53, zastavení buněčného cyklu, inhibice tyrosinkinasy, inhibice proteinů teplotního šoku, ovlivnění vazebné kapacity estrogenového receptoru a inhibice exprese Ras proteinů, které jsou řazeny mezi protoonkogeny [77].

1.7 Dihydromyricetin – reakce s biotransformačními enzymy a antioxidační účinky

Dihydromyricetin (DHM), někdy také nazývaný ampelopsin, je flavonoid řadící se mezi flavonoly. Vyskytuje se přirozeně ve velkém množství ve dvou asijských rostlinách. Jednou z těchto rostlin je *Hovenia dulcis*, česky dužistopka sladká, která je v čínském lékopisu vedena jako osvědčený lék proti kocovině. Přirozený výskyt této rostliny sahá od Japonska, Koreje a východní Číny až k Himalájím. Je to strom, který dorůstá do výšky 10 metrů. Zdužnatělé stopky plodů tohoto stromu se suší a pro svou sladkou chuť podobnou rozinkám jsou hojně konzumovány. Ve východní Asii je *H. dulcis* používána v tradičním bylinném lékařství především k léčbě jaterních onemocnění způsobených konzumací alkoholu [95].

Druhou rostlinou, která obsahuje dihydromyricetin je *Ampelopsis grossedentata*. i tato rostlina je hojně využívána v tradiční čínské medicíně, a to především při léčbě horeček, kašle a bolestech hrtanu a hltanu. Dále pak při žloutence a dalších jaterních onemocněních. Dihydromyricetin je v této rostlině hojně zastoupen, jeho obsah v listech se pohybuje kolem 20–30 % jejich suché hmotnosti [96]. Dihydromyricetin má špatnou biologickou dostupnost, což významně omezuje jeho potenciální klinické aplikace [97]. Nízkou biologickou dostupnost potvrzují farmakokinetické faktory – hodnota maximální koncentrace, kterou může daná látka nabýt v daném prostoru (c_{max}) a biologický poločas eliminace dané látky ($t_{1/2}$). Hodnoty pro DHM při perorálním podání činí: c_{max} ($21,63 \pm 3,62$ ng/ml) a $t_{1/2}$ ($3,70 \pm 0,99$ h) [98].

Omezenou biologickou dostupnost dihydromyricetinu však můžeme také částečně přičíst jeho nízké stabilitě. Dihydromyricetin se působením světelného záření, pepsinu a pankreatinových enzymů rozkládá. Metabolity DHM vznikají obdobnými reakcemi jako u jiných flavonoidů, hydrolýzou, štěpením kruhu či redukčními reakcemi [99]. Dihydromyricetin je u potkanů přeměňován na sedm metabolitů. Jejich struktura je znázorněna na obrázku 9, str. 33 [100].



Obrázek 9: Struktura dihydromyricetinu (1) a jeho metabolitů (2–8). 5,7,3',5'-tetrahydroxyflavanonol (2), 5,7,4',5'-tetrahydroxy-3'-methoxyflavon (3), 5,7,3',5'-tetrahydroxy-4'-methoxyflavon (4), 5,7,3',4',5'-pentahydroxyflavanon (5), 3,4,5,7,3',4',5'-heptahydroxyflavan (6), (2R,3S)-5,7,3',4',5'-pentahydroxyflavanonol (7), a dihydromyricetin-O-5-β-D-glukuronid (8). Převzato z: [97].

Mimo obecně popisovaných vlastností flavonoidů je dihydromyricetin schopen zmírnit zánět či zvýšit odbourávání cholesterolu a inhibovat tak vznik aterosklerózy. Vykazuje také silné kardioprotektivní účinky, snižuje hladinu glukosy v krvi, a tím pozitivně ovlivňuje inzulínovou rezistenci a tlumí kardiopatie při diabetu. Zásadní význam má také při jaterních onemocněních, a to jak způsobených alkoholem, tak při nealkoholových jaterních chorobách. Pozitivní efekty byly pozorovány i při akutním jaterním selhání. Kromě toho byl prokázán protektivní efekt vůči Alzheimerově chorobě, Parkinsonově nemoci či při fetálním alkoholovém syndromu. Nezbytné je také poukázat na protirakovinné účinky dihydromyricetinu [97].

Jak již bylo výše zmíněno, extrakty z *Hovenia dulcis* jsou komerčně využívány pro zmírnění průběhu kocoviny a pozitivnímu působení na játra poškozená konzumací EtOH. Bylo prokázáno, že DHM potencuje GABA_A receptory, a tím snižuje účinky EtOH na tyto receptory. u experimentálních potkanů došlo prostřednictvím DHM ke snížení intoxikace EtOH a ke zmírnění alkoholového abstinenciho syndromu [101].

Dále bylo zjištěno, že DHM redukuje v játrech akumulaci lipidů vznikajících v důsledku intoxikace ethanolem. Hepatoprotektivní účinky DHM mohou být spojeny se schopností DHM chránit buňky proti reaktivním formám kyslíku a zánětlivým reakcím organismu [102]. Bylo prokázáno, že DHM snižuje množství ROS prostřednictvím regulačních mechanismů a schopnosti lapat volné radikály. Tyto studie probíhaly na lidských endotelových buňkách získaných z pupečnickové žíly (HUVEC) a buňkách jaterního karcinomu (HepG2) [102, 103].

Ukázalo se, že DHM *in vitro* ochraňuje buňky HUVEC před oxidačním stresem skrz změny v mitochondriálních apoptických drahách prostřednictvím proapoptických proteinů Bcl-2 a Bax a aktivací kaspasy-9 a kaspasy-3. Zároveň DHM také indukuje autofagii a redukuje lipogenezi a akumulaci lipidů [102, 104]. Tato data společně popisují DHM jako doplněk stravy, který pomáhá redukovat následky oxidačního poškození a metabolismu lipidů, čímž podporuje zdravý stav jater. Hepatoprotektivní mechanismy DHM nejsou dosud zcela pochopeny, protože k pokusům byly většinou použity buněčné linie HepG2, které postrádají funkční enzymy schopné oxidačně metabolizovat EtOH [103].

Nejnovější studie [103] potvrzuje hypotézu, že suplementace DHM zlepšuje metabolismus EtOH a redukuje lipidovou disregulaci způsobenou konzumací EtOH. Bylo prokázáno, že DHM signifikantně zvyšuje aktivitu a expresi alkoholdehydrogenasy a aldehyddehydrogenasy na modelu izolovaných hepatoblastomních buněk *in vivo* [103]. v myším modelu byla při suplementaci DHM prokázána signifikantní redukce exprese cytochromu CYP2E1 [103]. Studie dále popisuje potlačení tvorby intracelulárních ROS v souvislosti se zvýšenou expresí katalasy *in vitro* na modelu HepG2 buněk [103].

2 Cíle diplomové práce

Cílem předkládané diplomové práce bylo určení vlivu dihydromyricetinu na metabolismus ethanolu ve vztahu k reaktivním formám kyslíku a dusíku za podmínek *in vitro* a *in vivo*. Pro dosažení tohoto cíle bylo třeba splnit následující dílčí úkoly:

- izolovat hepatocyty z potkanů, premedikovat potkany ethanolom, optimalizovat jejich kultivační podmínky a následně určit míru poškození hepatocytů působením EtOH a DHM,
- stanovit množství reaktivních forem kyslíku a dusíku v hepatocytech,
- sledovat vliv DHM na metabolismus EtOH na potkaním modelu za podmínek jednorázového podání a opakovaného podání EtOH,
- určit vliv DHM na expresi ADH v jaterních cytosolárních vzorcích metodou Western blot s následnou imunodetekcí.

3 Materiál a metody

3.1 Použité přístroje

Analytické váhy

Discovery, Ohaus Corp. (USA)

Automatické pipety

Reference 2, Eppendorf (Německo); Nichipet EX, Nichiryo (Japonsko)

Aparatura pro elektroforézu

Mini-PROTEAN® Tetra Cel, Bio-Rad (USA)

Blotovací systém

Fastblot B43, Biometra (Německo)

Centrifugy

Centrifuge 5418, Eppendorf (Německo); Spectrafuge Mini Centrifuge C1301B, Labnet International, Inc. (USA); ROTOFIX 32, Hettich (Německo); Sigma 2K15, Sigma (Německo); Allegra X-30, Beckman Coulter (USA); Z383K, Hermle Labortechnik GmbH (Německo); Optima XPN-90 Ultracentrifuge; Beckman Coulter (USA)

Čtečka mikrotitračních destiček

Infinite® 200 PRO, Tecan Trading AG (Švýcarsko); Sunrise™, Tecan Trading AG (Švýcarsko)

Homogenizátor

T 10 basic ULTRA-TURRAX®; IKA®-Werke GmbH & Co. KG (Německo)

Inkubátory

SANOY CO₂ incubator, SANYO (Japonsko); Mini Dry Bath – BS-MINIB-100I, BioMaker (Čína);

Laboratorní třepačka

Vortex Genius 3, IKA-Werke GmbH & Co. KG (Německo), SHO-2D, Witeg (Německo)

Laminární box

HeraSafe HS18 (Heraeus, Německo)

Magnetická míchačka

Monotherm, Variomag (Německo)

Mikrostríkačka

MICROLITER Syringe 802RN, Hamilton (Švýcarsko); MICROLITER Syringe 702RN, Hamilton (Švýcarsko)

Mikroskop

Leica DM IL LED, Leica Microsystems (Německo); LABOVAL 3, Carl Zeiss Jena (Německo)

pH metr

HI 2211 pH/ORP, HANNA Instruments (Česká republika)

Předvážky

KERN EW 600-2M, Kern & Sohn GmbH (Německo)

Spektrofotometr

Cary 60 UV-Vis, Agilent Technologies (USA)

Stavebnicové čerpadlo

Stavebnicové čerpadlo SC4, Vývojové dílny ČSAV (Česká republika)

Vodní lázeň

EL 20R (Kavalier, Česká republika), TW8 Water Bath (Julabo, Německo)

Zdroj pro elektroforézu

PowerPac Basic, Bio-Rad (USA)

3.2 Použitý materiál a chemikálie

APIChem (Čína)

Dihydromyricetin

BIOLOGIX Research Company (Čína)

Stěrka na tkáňové kultury (Cell Scraper)

B.Braun Medical s.r.o. (Česká republika)

aqua pro injectione

Bio-Rad (USA)

TGX™ FastCast™ Acrylamide Kit 10%, peroxidisíran amonný, Immun-Blot® polyvinylidenfluoridová (PVDF) membrána, Precision Plus Protein™ Dual Color Standards

Cayman Chemical (USA)

Dihydrorhodamine 123 (DHR)

Gibco® by life technologies™ (USA)

fetální hovězí sérum, L-glutamin

Fluka (Švýcarsko)

dodecylsírán sodný (SDS), tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris/HCl), 2-merkapt ethanol, tokoferol

Lachema Brno (Česká republika)

ethanol, glycerol, kyselina octová, methanol, vinan sodnodraselný, kyselina chlorovodíková, bromfenolová modř

Lach-ner (Česká republika)

pentahydrát síranu měďnatého, dihydrogenfosforečnan draselný, dihydrogenfosforečnan sodný, bezvodý uhličitan sodný, hydrogenfosforečnan draselný, hydrogenfosforečnan sodný, glycin, hydrogenuhličitan sodný, chlorid sodný, chlorid draselný

Mlékárna Pragolaktos, a.s. (Česká republika)

trvanlivé mléko 0,5%

PENTA s.r.o. (Česká republika)

ethanol (96%), hydroxid sodný, Folin-Ciocalteu roztok, chlorid draselný, dihydrogenfosforečnan draselný, síran hořečnatý, chlorid sodný

ROCHE s.r.o., Diagnostic Division (Německo)

kolagen z potkaních ocásků

Serva (Německo)

N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin, Coomassie brilliant blue R-250, Triton X-100

Schoeller Pharma (Česká republika)

Mikrotitrační destičky (Nunclon™ Multidishes)

Sigma-Aldrich (USA)

2',7'- dichlorofluorescein diacetát (DCFDA), dimethylsulfoxid, Dulbecco's fosfátový pufr, dimethylthiazolyldifenyl-tetrazolium bromid (MTT), lipopolysacharid z *E.coli*, ethylenglycol-bis(2-amino-ethylether)-N,N,N',N'-tetraoctová kyselina (EGTA), glukosa, hovězí sérový albumin, chlorid sodný (0,9%), chlorid vápenatý, insulin, penicilin-streptomycin, SigmaFast tablety, trypanová modř, William's E medium, tert-butylhydroperoxid, rekombinantní koňská alkoholdehydrogenasa, difosforečnan tetrasodný

Whatman (USA)

filtrační papír číslo 3

Zentiva Group, a.s. (Nizozemsko)

albumin, heparin, kolagenasa produkovaná bakterií *Clostridium histolyticum*

3.3 Metody

3.3.1 Premedikace potkanů před izolací primárních hepatocytů

Pro izolaci hepatocytů byli jako pokusná zvířata použiti dospělí potkaní samci kmene Wistar. Staří jednotlivých zvířat bylo v rozmezí 7-12 týdnů. Hmotnost zvířat byla 300-400 gramů. Chov zvířat probíhal v akreditovaném zařízení Farmakologického ústavu 1. LF UK. Chov zvířat probíhal za standardních laboratorních podmínek (volný přístup k vodě i potravě, laboratorní teplota, světelný režim po 12 hodinách). Pro účely pokusu byly vytvořeny 2 skupiny zvířat po dvou jedincích v každé skupině. Potkanům byla čtyři dny před izolací podána gavážní dávka 9,7 ml 40% ethanolu na kilogram tělesné váhy. Dva dny před izolací byl 20% ethanol ve vodě pro zvířata jediným pitným zdrojem. Kontrolní skupině bylo namísto ethanolu podáno gavážní 9,7 ml roztoku fosfátového pufru (PBS) na kilogram tělesné váhy. Potrava byla oběma skupinám odebrána 18 hodin před provedením izolace hepatocytů.

Práce s pokusnými zvířaty proběhla v souladu s vyhláškou Ministerstva zemědělství č. 311/1997 Sb., o chovu a využití pokusných zvířat a byla schválena Odbornou komisí pro práci s pokusnými zvířaty 1. LF UK.

3.3.2 Izolace hepatocytů

Hepatocyty byly izolovány pomocí standardní dvoufázové kolagenasové perfuze [105] s malými modifikacemi podle [106].

Experiment byl prováděn ve spolupráci s Mgr. Anetou Skotnicovou.

Pro izolaci byly připraveny následující roztoky:

Roztok I: 1,4M NaCl; 53,7mM KCl; 8,1mM MgSO₄; 3,4mM Na₂HPO₄.12H₂O; 4,4mM KH₂PO₄

Roztok II: 1,2M NaCl; 48,3mM KCl; 9,6mM KH₂PO₄; 12,0mM MgSO₄

Pracovní roztok A: 26,1mM NaHCO₃; 0,5mM EGTA; 11% (v/v) roztok I

Pracovní roztok B: 26,1mM NaHCO₃; 4,0mM CaCl₂.; 11% (v/v) roztok I

Pracovní roztok C (Krebs-Henseleitův pufr): 23,8mM NaHCO₃; 4,5mM glukosa; 11% (v/v) roztok II

Pracovní roztoky byly následně upraveny probubláním karbogenem (95% O₂ + 5% CO₂) po 7 minut. Hodnota pH byla následně poupravena na 7,4. Vodní lázeň (EL 20R) byla vytemperována na 37 °C. Do kádinky bylo připraveno 250 ml pracovního roztoku A. Kádinka byla umístěna do lázně. k 150 ml pracovního roztoku B bylo přidáno 50 mg kolagenasy. v 75 ml pracovního roztoku C bylo rozpuštěno 1,0 g albuminu. Před samotnou izolací byl potkan uspán etherovou anestezií ve skleněném zvonu a následně přemístěn na polystyrenovou podložku, na které probíhala operace a zafixován. Potkanovi byla k čumáku umístěna kádinka s vatou navlhčenou etherem, která sloužila k udržování anestezie. Anestezie byla regulována pomocí vzdálenosti kádinky od čenichu potkana. Potkanovi byla následně rozstřížena břišní dutina. Střeva byla odhrnuta na pravou stranu ven z břišní dutiny. Orgány byly omyty gázou, která byla namočená ve fyziologickém roztoku. Do *vena cava* bylo aplikováno 0,2 ml heparinu. *Vena portae* byla zhruba v délce 1 cm očištěna od tuku. Pod žílou byly v tomto úseku pomocí pinzety provléknuty dvě nitě, kdy horní nit byla upevněna uzlem, zatímco spodní nit nebyla zcela utažena. Poté byla žíla nastřížena očními nůžkami a do žíly byla zasunuta kanyla. Následně byla utáhnutá spodní nit za účelem fixování kanyly. Kanyla byla napojena na perfuzní aparaturu. Perfuzní aparaturou byly játra s pomocí stavebnicového čerpadla (SC4) napuštěny pracovním roztokem. v okamžiku, kdy došlo ke zvětšení a změně barvy jater, byl uzavřen přívod roztoku A. Játra byla následně odstřížena a vyjmuta z břišní dutiny potkana a omyta fyziologickým roztokem. v kádince s roztokem a umístěné ve vodní lázni byla játra omývána další 3,5 minuty. Dále byla játra promývána pracovním roztokem B po dobu 16 minut. v posledním kroku byly hepatocyty krouživým pohybem uvolněny do plastové kádinky, která obsahovala 30 ml Krebs-Hensleitova pufru. Vzniklá suspenze byla přenesena do plastových zkumavek pomocí plastového trychtýře vyloženého mulem. Centrifugace probíhala při 400 otáčkách za minutu (RPM) na přístroji Sigma 2K15 po 3 minuty. Supernatant byl odsán a buňky resuspendovány v 5 ml pracovního roztoku C. Druhá centrifugace resuspendovaných buněk probíhala za stejných podmínek. Po této centrifugaci byl odebrán supernatant a buňky byly přemístěny do jedné zkumavky.

3.3.3 Stanovení životnosti hepatocytů a jejich celkového počtu v suspenzi

Pro stanovení životnosti hepatocytů byla suspenze buněk vhodně zředěna pracovním roztokem C. Na podložní sklíčko bylo napipetováno 10 µl suspenze buněk a 10 µl 0,4% roztoku trypanové modři. Při zvětšení 25x0,5 byly pod mikroskopem (LABOVAL 3) počítány živé a mrtvé buňky v šestnácti až dvaceti náhodně vybraných polích. Mrtvé či poškozené buňky jsou

trypanovou modří barveny namodro. Výsledná životnost buněk je uváděna jako procentuální poměr počtu živých buněk k celkovému počtu buněk vybraných k hodnocení.

Pro určení počtu buněk byla použita Bürkerova komůrka. Suspenze izolovaných buněk byla nejprve 100x naředěna pracovním roztokem C. Do Bürkerovy komůrky bylo pipetováno 20 μ l takto zředěné suspenze. Pod mikroskopem (LABOVAL 3) byly při zvětšení 12x5 počítány buňky v pěti a pěti čtvercích po šestnácti okénkách. Výsledný počet buněk udává počet buněk v milionech na mililitr.

3.3.4 Kultivace hepatocytů

Kompletní medium: William's E medium obsahující 100 IU/ml penicilin; 10 mg/ml streptomycin; 1 μ M insulin; 0,2M glutamin; 5% (v/v) fetální hovězí sérum

Pro kultivaci hepatocytů byly použity sterilní dvacetičtyřjamkové (24-WP) a šestijamkové (6-WP) mikrotitrační destičky. Veškerá manipulace s destičkami a chemikáliemi probíhala před kultivací i během kultivace za sterilních podmínek v laminárním boxu (HeraSafe HS18). Před samotnou kultivací buněk je nezbytné, aby byl na povrch všech kultivačních destiček rovnoměrně potažen kolagen. Roztok kolagenu byl připraven rozpuštěním lyofilizovaného kolagenu v 20mM kyselině octové tak, aby výsledná koncentrace roztoku činila 1,8 mg/ml. Do každé z jamek na 24-WP bylo dávkováno 200 μ l a do 6-WP 800 μ l pracovního roztoku kolagenu. Roztok kolagenu byl v jamkách ponechán minimálně 15 minut. Po uplynutí této doby byl kolagen odsán a jamky byly pro neutralizaci pH promyty fyziologickým roztokem. Do 24-WP bylo pipetováno 0,5 ml a do 6-WP 2 ml fyziologického roztoku. Fyziologický roztok byl z destiček odsán těsně před nanesením hepatocytů, aby bylo zabráněno vyschnutí jamek.

Na základě vypočtených hodnot životnosti hepatocytů (viz kapitola 3.3.3, str.40) byly buňky před nanesením na mikrotitrační destičky naředěny zhruba na denzitu 666 667 hepatocytů na 1,0 ml kompletního media. Naředěné hepatocyty byly nanášeny v konečném objemu 0,3 ml na 24-WP (zhruba 200 000 buněk na jamku) a 1,5 ml na 6-WP (přibližně 1 milion buněk na jamku). Při nanášení buněk na plotny byl kladen důraz na pravidelné promíchávání suspenze, aby nedocházelo k nežádoucímu usazování hepatocytů na dně zkumavky. Hepatocyty byly následně kultivovány 3 hodiny za standardních kultivačních podmínek v inkubátoru (SANYO CO₂) při teplotě 37 °C, 95% vlhkosti a 5% CO₂. Neuchycené hepatocyty byly odsány a poté bylo přidáno 0,3 ml do 24-WP a 1,5 ml do 6-WP kompletního

media temperovaného na 37 °C. Po výměně media byly destičky v inkubátoru kultivovány za standardních podmínek přibližně 21 hodin.

Následně bylo medium odsáno a k buňkám bylo přidáno 0,3 ml do 24-WP a 1,5 ml do 6-WP pracovních roztoků s příslušnými testovanými látkami. Pro přípravu pracovních roztoků bylo použito medium bez fetálního hovězího séra. Jako testované látky byly použity: ethanol ve výsledné koncentraci 300 mM, LPS (lipopolysacharid) o koncentraci 15 µg/ml a dihydromyricetin rozpuštěný v ethanolu o výsledných koncentracích 1, 10, 50, 100 a 1000 µM. v důsledku vypařování ethanolu bylo po sedmi hodinách kultivace k hepatocytům kultivovaným s ethanolovým roztokem přidáno 72 µl do 6-WP a 14,4 µl do 24-WP 300 mM ethanolu. Inkubace všech hepatocytů probíhala 22-23 hodin při teplotě 37 °C a 5% CO₂.

3.3.5 Zpracování vzorků

Hepatocyty z 24-WP byly ihned použity pro další stanovení (viz kapitola 3.3.6, str. 42; 3.3.10, str. 45 a 3.3.11, str. 45). Šestijamkové destičky s hepatocyty byly po celou dobu zpracovávání vzorků udržovány při 4 °C. Nejprve bylo z každé jamky odebráno medium do mikrozkuumavek pro další biochemické analýzy (viz kapitola 3.3.7, str. 43 a 3.3.8, str.43). Po odebrání media byly buňky promyty 2 ml fosfátového pufru (4 °C). Následně bylo do jamek pipetováno 200 µl ledového fosfátového pufru, ve kterém byly hepatocyty uvolněny ze dna jamky pomocí stěrky pro tkáňové kultury. Uvolněné hepatocyty ze třech jamek příslušné skupiny byly přeneseny do jedné mikrozkuumavky a centrifugovány 5 minut při 5000 RPM a teplotě 4 °C. Po odsání supernatantu byly pelety ihned zmrazeny a dále skladovány v kapalném dusíku.

3.3.6 Stanovení životnosti hepatocytů pomocí MTT

MTT test je kolorimetrická metoda, která využívá tetrazoliové soli 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazoliumbromidu pro stanovení míry cytotoxicity a proliferace buněk [107]. Pomocí tohoto testu je možné detekovat pouze živé buňky, které jsou ve svých mitochondriích schopné štěpit tetrazoliový kruh činidla za vzniku barevného produktu [107].

Nejprve byl připraven pracovní roztok MTT rozpuštěním práškové směsi MTT o výsledné koncentraci činila 1 mg/ml. Takto připravený roztok byl následně pětkrát naředěn kompletním mediem bez fetálního hovězího séra a byl přibližně 10 minut temperován v inkubátoru na teplotu 37 °C. Medium ze všech jamek na 24-WP bylo odsáno a bylo přidáno 300 µl vytemperovaného pracovního roztoku MTT. Destičky byly následně po tři hodiny

inkubovány v inkubátoru (SANYO CO₂) při teplotě 37 °C a 5% CO₂. Po třech hodinách byl pracovní roztok MTT odsán. Do všech jamek bylo aplikováno 500 µl dimethylsulfoxidu. Destičky byly po cca 10 minut promíchávány kývavým pohybem za účelem rozpuštění krystalků formasanu v živých buňkách. z každého vzorku bylo odebráno 2x po 100 µl do 96jamkové destičky a byla měřena absorbance při 540 nm (Sunrise™).

3.3.7 Stanovení aktivity alaninaminotransferasy

Alaninaminotransferasa, EC 2.6.1.2, je enzym řadící se mezi transferasy, který se převážně vyskytuje v játrech, méně často pak v červených krvinkách, buňkách srdeční a kosterní svaloviny, ve slinivce a ledvinách. Alaninaminotransferasa je zodpovědná za katalýzu přeměny α -ketokyselin na aminokyseliny za přenosu aminoskupiny, což je zásadní krok v procesu glukoneogeneze a degradace aminokyselin. Metoda je založena na reakci L-alaninu a 2-oxoglutarátu, jejímiž produkty jsou L-glutamát a pyruvát. Reakce je katalyzována právě ALT a kofaktorem reakce je pyridoxalfosfát. Pyruvát vzniklý reakcí podléhá dále redukcii na D-laktát, za katalýzy enzymu laktátdehydrogenasa a spotřeby NADH. Úbytek NADH má za následek pokles absorbance při 340 nm. Pokles absorbance je mírou katalytické aktivity ALT [108].

Roztok R1: 140mM Tris pH 7,15; 700mM L-alanin; $\geq 38,3$ µkat/l LDH

Roztok R2: 85mM 2-oxoglutarát; 1mM NADH

Pro stanovení katalytické koncentrace ALT v kultivačním mediu, které bylo odebráno z 6-WP (viz kapitola 3.3.5, str. 42), byl použit komerční kit (^LALT (GPT) kit). Reagenty, standard i blank byly před samotným měřením vytemperovány na teplotu 37 °C. Teplota reagencií je pro stanovení klíčovým faktorem. Byl vytvořen pracovní roztok smícháním roztoku R1 a R2 v poměru 4:1. Do křemenné kyvety bylo aplikováno 1,0 ml pracovního roztoku a 100 µl příslušného vzorku a následně probíhala po 60 sekund inkubace. Absorbance byla měřena (Cary 60 UV-Vis) při 340 nm v nultém čase a po 1, 2 a 3 minutách. Vzorky byly měřeny v triplikátech.

3.3.8 Stanovení ALT metodou ELISA

Metoda ELISA („enzyme-linked immunosorbent assay“) je hojně využívaná, vysoce specifická imunologická technika. Již z názvu metody vyplývá, že mimo imunochemické interakce antigen-protilátka je využíván enzymový konjugát pro detekci. Mezi nejčastěji používané enzymy patří alkalická fosfatasa či křenová peroxidasa. Metodu ELISA lze provádět v několika uspořádáních. Námi použitý komerční test (Rat ALT SimpleStep ELISA kit)

využívá „sandwichové“ uspořádání, kdy je jedna z protilátek navázána na povrchu jamky a na ní se váže antigen ze vzorku. Druhá protilátka (sekundární protilátka) je konjugována s enzymem a slouží k detekci antigenu. Změna zbarvení sekundární protilátky je detekována spektrofotometricky.

Všechny reagenty byly uvedeny na laboratorní teplotu. Nejprve byla připravena kalibrační řada aplikací 50 μ l standardu a vzorku (rekombinantní potkaní ALT protein) o koncentracích 15,6; 31,3; 62,5; 125; 250; 500 a 1000 ng/ml do 96jamkové mikrotitrační destičky. Vzorky media, které byly odebrány z 6-WP po ukončení kultivace hepatocytů, (viz kapitola 3.3.5, str. 42) byly nejprve centrifugovány 10 minut při 1220 RPM (Centrifuge 5418). Objem 50 μ l vzorku byl nanášen v triplicátech. Následně bylo do každé jamky vneseno po 50 μ l roztoku označeného výrobcem „Antibody Cocktail“. Po přikrytí mikrotitrační destičky pomocí folie probíhala inkubace po 60 minut na laboratorní třepačce (SHO-2D) při 400 RPM za laboratorní teploty. Po ukončení inkubace byly všechny jamky promyty 5x 200 μ l roztoku „1X Wash Buffer PT“. Dále bylo do každé jamky nanášeno 100 μ l „TMB Development Solution“ a destička byla inkubována na laboratorní třepačce při 400 RPM po 10 minut. v posledním kroku bylo přidáno 100 μ l „Stop Solution“ do všech jamek a po 60 sekundách byla měřena absorbance při 450 nm.

3.3.9 Stanovení koncentrace proteinu v buňkách podle Lowryho

Ke stanovení celkového obsahu proteinů ve vzorcích byla použita modifikovaná Lowryho metoda. Lowryho metoda je vylepšením méně citlivé biuretové metody. Metoda je založena na chelataci měďnatého iontu imidovými strukturami polypeptidového řetězce v bazickém prostředí, na čemž se podílí Folin-Ciocalteauvo činidlo, které se během procesu redukuje. Folin-Ciocalteauvo činidlo je směs kyseliny fosfomolybdenové a fosfowolframové, které jsou redukovány tyrosinovými zbytky proteinů. Stanovení koncentrace modře zbarveného produktu se měří spektrofotometricky při 650 nm [109].

Roztok A: 7,1mM Na-K-vinan; 0,85M Na₂CO₃; 0,45M NaOH

Roztok B: 78,7mM Na-K-vinan; 44,5mM CuSO₄; 0,1M NaOH

Vzorky použité pro stanovení koncentrace byly zpracovány dle kapitoly 3.3.5, str. 42. Všechny vzorky byly pro měření připravovány v paralelním provedení. k 10 μ l homogenátu hepatocytů bylo přidáno 190 μ l destilované vody. Následně byla připravena řada kalibračních roztoků ředěním zásobního roztoku hovězího sérového albuminu o koncentraci 0,1 mg/ml. Ke všem analyzovaným vzorkům bylo přidáno 200 μ l roztoku A. Všechny zkumavky byly promíchány na laboratorní třepačce (Vortex Genius 3) a následně inkubovány 10 minut ve vodní lázni při 50 °C. Po deseti minutách byly zkumavky vyjmuty z vodní lázně a do všech

bylo přidáno 20 μ l roztoku B. Po opětovném promíchání na laboratorní třepačce byly vzorky inkubovány 10 minut při laboratorní teplotě. Na závěr bylo do všech zkumavek přidáno 600 μ l Folin-Ciocalteauova činidla, které bylo předem zředěno 1:14 destilovanou vodou s Folin-Ciocalteauovým činidlem byly vzorky inkubovány po 10 minut ve vodní lázni při 50 °C. Po ochlazení vzorků na laboratorní teplotu byla měřena absorbance při 650 nm.

3.3.10 Stanovení množství reaktivních forem kyslíku a dusíku pomocí

DCFDA

Látka 2',7'-dichlorofluorescein diacetát je nejčastěji používanou fluorescenční sondou pro stanovení množství reaktivních forem kyslíku a dusíku v buněčných kulturách [110]. Princip detekce ROS spočívá v deacetylaci sondy uvnitř buňky pomocí buněčných esterás, kdy deacetylovaná forma vykazuje při kontaktu s ROS silnou fluorescenci při 525 nm po excitaci světlem okolo vlnové délky 488 nm [111, 112].

Pracovní roztok DCFDA o koncentraci 20 μ M byl připraven ředěním zásobního roztoku o koncentraci 5 mg/ml fosfátovým pufrem. z 24-WP bylo po ukončení kultivace (viz 3.3.5, str. 42) odsáno medium a do všech jamek bylo aplikováno 300 μ l pracovního roztoku DCFDA. Destičky byly následně inkubovány 60 minut ve tmě při 37 °C. Po inkubaci byl roztok odsán a všechny jamky byly promyty 300 μ l PBS. Fluorescence byla měřena při Ex/Em = 485/535 nm na čtečce mikrotitračních destiček Infinite® 200 PRO (Tecan Trading AG).

3.3.11 Stanovení množství reaktivních forem kyslíku a dusíku pomocí DHR

Dihydrorhodamine 123 je hojně využívanou látkou pro detekci určitých druhů reaktivních forem kyslíku a dusíku, zejména hydroxylového radikálu či peroxyinitritu [113]. DHR vstupuje do buněk, kde se při kontaktu s ROS přeměňuje na silně fluoreskující rhodamine 123. Rhodamine 123 se vzhledem ke svému pozitivnímu náboji a lipofilitě akumuluje v mitochondriích. Fluorescenci rhodaminu 123 lze měřit při 536 nm po excitaci světlem kolem vlnové délky 500 nm [114].

Pracovní roztok DHR o koncentraci 20 μ M byl připraven ředěním zásobního roztoku o koncentraci 2 mg/ml fosfátovým pufrem. z 24-WP bylo po ukončení kultivace (viz kapitola 3.3.5, str. 42) odsáno medium a do všech jamek bylo vneseno 300 μ l pracovního roztoku DHR. Destičky byly následně inkubovány 60 minut ve tmě při 37 °C. Po inkubaci byl roztok odsán

a všechny jamky byly promyty 300 μ l PBS. Fluorescence byla měřena při Ex/Em = 500/536 nm na čtečce mikrotitračních destiček Infinite® 200 PRO (Tecan Trading AG).

3.3.12 Vliv DHM na metabolismus EtOH v modelu potkana

Experiment byl prováděn ve spolupráci se Silvií Vargovou.

Pro pokus byli jako pokusná zvířata vybráni potkaní samci kmene Wistar o hmotnosti 300–400 g. Chov zvířat probíhal v akreditovaném zařízení Státního zdravotního ústavu při volném přístupu k vodě i granulované potravě, regulované laboratorní teplotě a 12hodinovém světelném režimu.

Potkaní samci byli zváženi a rozděleni do dvou skupin po čtyřech jedincích o přibližně stejné hmotnosti, dva potkani byli určeni jako kontrolní skupina. Potkani byli označeni značkou na ocásku. První skupině byla gaváží do žaludku podána dle hmotnosti dávka 40% ethanolu odpovídající 3 g ethanolu na kilogram tělesné hmotnosti. Druhé skupině potkanů byl mimo shodné dávky ethanolu podán dihydromyricetin rozpuštěný v příslušném 40% ethanolovém roztoku o koncentraci 0,8 g/l. Krev byla odebírána z očí potkana ve čtyřech časových intervalech – 5, 15, 30 a 60 minut po gaváži. Potkan byl před odběrem nejprve narkotizován pomocí CO₂ ve skleněném zvonu. Následně byla odebírána krev z oka pomocí kapiláry, která byla před odběrem naplněna 50 μ l heparinu (Zentiva). Odběry potkana probíhaly z obou očí tak, že po sobě jdoucí odběry byly vždy prováděny z opačného oka. Krev (100 μ l) byla ihned po odběru přenesena do skleněných nádobek určených pro „headspace“ analýzu a smíšena s 160 μ l terc. butanolu, jakožto interního standardu. Nádobky byly ihned uzavírány hliníkovými víčky, aby nedocházelo k úniku acetaldehydu. Každý krevní vzorek byl pro účely „headspace“ plynové chromatografie připraven v triplicátech. Paralelně byla připravena sada kalibračních roztoků, pro kterou byla použita krev potkana z kontrolní skupiny. Koncentrace ethanolu a acetaldehydu v krevních vzorcích byla měřena ještě týž den.

Polovina zvířat z obou skupin byla následující den podrobena dalšímu testování. Potkanům byla gaváží podána dle hmotnosti dávka 40% ethanolu odpovídající 3 g na kilogram tělesné hmotnosti a byla odebírána a zpracovávána krev dle postupu popsaného výše. Vzorky byly opět měřeny ještě týž den. Stanovení koncentrace ethanolu a acetaldehydu ve vzorcích pomocí „headspace“ plynové chromatografie bylo prováděno na Centrální toxikologické klinice, Na bojišti 1771/1 v Praze. Měření prováděla RNDr. Miroslava Bursová, Ph.D..

Zvířatům, která byla opakovaně premedikována ethanollem a kontrolní skupině zvířat byla po usmrcení odebrána játra pro účely dalších biochemických stanovení. Játra byla ihned uložena do -80 °C.

3.3.13 Izolace cytosolární frakce z jaterní tkáně

Pufir P1: 0,15M KCl; 0,05M Tris/HCl; pH 7,4; tokoferol v methanolu (v konečné koncentraci 50 μ M)

Pufir P2: 0,1M $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ (upraveno pomocí 1mM HCl na pH 7,2)

Pro přípravu cytosolárních jaterních frakcí byla použita játra potkanů po opakované premedikaci ethanolem (viz kapitola 3.3.12, str. 46), která byla uložena při -80°C .

Pro izolaci cytosolární frakce byla použita metoda standardní diferenciální centrifugace [115]. Veškeré úkony byly prováděny v chlazené místnosti při 4°C . Veškerý materiál a roztoky byly předem vychlazeny také na 4°C . Játra byla rozdrovena v třecí misce s tloučkem předem vychlazené na suchém ledu. Tkáň byla zvážena a důkladně promyta pufrem P1. Následně byla takto předpřipravená tkáň homogenizována pomocí skleněného homogenizátoru Potter-Elvehjem v pufru P1. Množství pufru P1 pro homogenizaci bylo voleno tak, aby na 1 gram tkáně byly použity 4 ml pufru P1. Homogenát byl centrifugován 10 minut při $600\times g$ při teplotě 5°C na centrifuze z 383K (HERMLE), rotor 220.86 (HERMLE). Byl odebrán supernatant a pelety byly znovu rehomogenizovány v pufru P1 – na 1 gram tkáně bylo použito 250 μ l pufru P1. Takto rehomogenizované pelety byly znovu centrifugovány za stejných podmínek ($600\times g$, 10 minut, 5°C). Následně byly odebrané supernatanty z obou centrifugací smíseny a centrifugovány po 20 minut při $15\,000\times g$ při teplotě 5°C na centrifuze Allegra X-30R (Beckman Coulter); rotor F0630 (Beckman Coulter). Supernatant byl opatrně odebrán a byl následně ultracentrifugován při $123\,000\times g$ po 90 minut při 4°C na ultracentrifuze Optima XPN-90 Ultracentrifuge (Beckman Coulter); rotor Ti45 (Beckman Coulter). Supernatant vzniklý po ultracentrifugaci (cytosolární frakce) byl odebrán do mikrozkušavek a ihned uložen do -80°C .

3.3.14 Diskontinuální elektroforesa na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného

Gelová elektroforesa je široce používanou elektroforetickou technikou, která je založena na dělení proteinů podle jejich velikosti a elektroforetické pohyblivosti. Dělení na základě velikosti proteinů je dosaženo pomocí dodecylsírany sodného, který svou vazbou na proteiny udává všem proteinům záporný náboj, který je úměrný jejich velikosti. Při připojení elektrického pole se proteiny separují na gelu na principu molekulového síta.

Polymerační gely: komerční kit – TGX™ FastCast™ Acrylamide Kit 10%

4X koncentrovaný vzorkový pufr: 0,25M Tris/HCl; 8% (w/v) SDS; 20% (v/v) 2- merkaptoethanol; 40% (v/v) glycerol; 0,004% (w/v) bromfenolová modř; pH 6,8

Elektrodový pufr: 0,025M Tris/HCl; 0,195M glycin; 0,1% (w/v) SDS; pH 8,3

Barvicí lázeň: 0,25% Coomassie brilliant blue R-250; 46% (v/v) ethanol; 9,2% (v/v) kyselina octová

Odbarvovací lázeň: 25% (v/v) ethanol; 10% (v/v) kyselina octová

Nejprve byla sestrojena aparatura pro přípravu gelů. Dle návodu výrobce byly připraveny roztoky pro přípravu gelů o síle 1 mm – separační gel s hustotou zesíťování 10 %. Hustota zaostřovacího gelu není výrobcem uváděna.

Jednotlivé vzorky cytosolárních frakcí (viz kapitola 3.3.13, str. 47) byly ředěny vzorkovým pufrům a vodou na výslednou koncentraci proteinu 2 mg/ml a následně 5 minut vařeny pomocí Mini Dry Bath – BS-MINIB-100I a centrifugovány na centrifuze Spectrafuge Mini Centrifuge C1301B. Do jednotlivých jamek gelu bylo přeneseno pomocí mikrostríkačky (Hamilton) 5 μ l standardu (Precision Plus Protein™ Dual Color Standards) a 20 μ l vzorku. Gely s nanesenými vzorky byly umístěny do elektroforetické vany (Mini-PROTEAN® Tetra Cel), která byla naplněna elektrodovým pufrům a připojeny ke zdroji konstantního elektrického napětí 200 v (PowePac Basic). Elektroforesa byla ukončena v okamžiku, kdy bromfenolová modř značící čelo doputovala přibližně 0,6 cm od spodního kraje gelu (přibližně 60 minut). z gelů byl odstraněn zaostřovací gel. Pro metodu Western blot nebyl gel dále barven. Druhý gel byl po jednu hodinu barven v barvicí lázni a následně odbarvován v odbarvovací lázni přes noc.

3.3.15 Western blot s následnou imunodetekcí

Metoda Western blot je založena na přenosu proteinových molekul rozdělených dle molekulové hmotnosti z gelu na membránu (blot). K přenosu proteinů na membránu (nitrocelulosoovou nebo polyvinylidenfluoridovou) se používá nejčastěji elektrotransfer pomocí stejnosměrného proudu. Detekce proteinů na membráně probíhá imunochemicky. Protein je inkubací se specifickou primární protilátkou na membráně detekován konjugátem sekundární protilátky a enzymu, který umožňuje vizualizaci cílových proteinů na membráně.

Přenosový pufr: 0,025M Tris; 0,192M glycin; pH 8,3

PBS Triton X-100: 134mM NaCl; 1,8mM Na₂HPO₄; 1mM NaH₂PO₄, pH 7,2

Blokovací roztok: 5% sušené odtučněné mléko (ředěno v PBS Triton X-100)

Vyvolávací roztok: 10 ml destilované vody; tableta SigmaFast

Separační gely byly po ukončení elektroforesy umístěny do přenosového pufru a inkubovány 20 minut za stálého míchání (třepačka SHO-2D) při laboratorní teplotě. Mezitím byly podle velikosti gelu nastříhány filtrační papíry (Whatman 3) a PVDF membrána. Aktivace PVDF membrány probíhala ponořením do methanolu (15 sekund), následně na 30 sekund do destilované vody a na závěr na 5 minut do přenosového pufru. Na anodu blotovacího přístroje (spodní kazeta) byly přeneseny tři filtrační papíry (Whatman 3) namočené v přenosovém pufru, následně aktivovaná PVDF membrána, gel a na závěr tři filtrační papíry navlhčené v přenosovém pufru. Po uzavření kazety blotovacího přístroje probíhal elektropřenos, nejprve 10 minut při $0,8 \text{ mA/cm}^2$ a pak dalších 45 minut při 2 mA/cm^2 . Gel byl po ukončení elektropřenosu umístěn na 60 minut do barvicí lázně a následně do odbarvovací lázně přes noc (kontrola správnosti elektropřenosu).

Membrána byla po 60 minut inkubována při $4 \text{ }^\circ\text{C}$ v blokovacím roztoku (třepačka SHO-2D), aby bylo zabráněno nespecifickým interakcím. Následně byla membrána inkubována při $4 \text{ }^\circ\text{C}$ za stálého míchání přes noc v 10 ml blokovacího roztoku s primární protilátkou. Ředění primární králičí protilátky proti ADH bylo zvoleno 1:10000 dle doporučení výrobce.

Následujícího dne byla membrána 4x promyta blokovacím roztokem (pokaždé 2 minuty), poté byla po 60 minut inkubována v roztoku sekundární protilátky za laboratorní teploty (třepačka SHO-2D). Ředění sekundární protilátky (kozí IgG protilátka proti IgG králíka s konjugovanou alkalickou fosfátasou) bylo zvoleno dle doporučení výrobce 1:1428 v blokovacím roztoku. Po ukončení inkubace byla membrána 5x promyta (pokaždé 2 minuty) blokovacím roztokem a následně ještě 5x 2 minuty PBS Triton X-100. Pro vizualizaci byla membrána ponořena na cca 5 minut do vyvolávacího roztoku ve tmě. k ukončení vizualizační reakce byla membrána ponořena do destilované vody. Po usušení byla membrána oskenována.

4 Výsledky

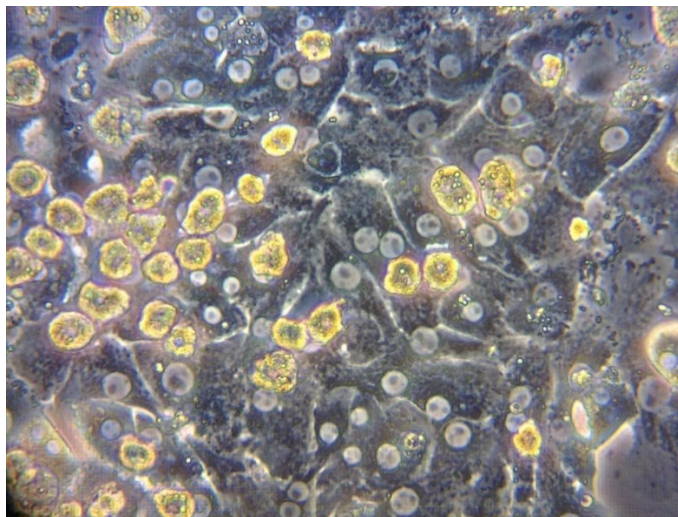
4.1 Experimenty prováděné na modelu hepatocytu potkana

Předmětem výzkumu předkládané diplomové práce bylo studium antioxidačních vlastností dihydromyricetinu a jejich vlivu na metabolismus ethanolu. Nejprve byly antioxidační vlastnosti testovány na modelu primárních hepatocytů potkana. Hepatocyty izolované z premedikovaného potkana a potkana nepremedikovaného, který sloužil jako kontrola, byly během kultivace vystaveny působení ethanolu a dihydromyricetinu o různých koncentracích. Byla měřena míra oxidačního poškození hepatocytů prostřednictvím měření množství vzniklých reaktivních forem kyslíku a dusíku pomocí fluorescenčních sond DCFDA a DHR. Míra hepatotoxického účinku EtOH byla ověřována dále pomocí MTT testu a pomocí ALT, která je markerem jaterního poškození.

4.1.1 Izolace a kultivace primárních hepatocytů

Pro izolaci hepatocytů byla použita standardní dvoufázová kolagenasová metoda. Hepatocyty byly izolovány z potkana premedikovaného ethanollem a z potkana, který nebyl premedikován ethanollem. Ihned po izolaci hepatocytů byla stanovena jejich životnost (viz kapitola 3.3.3, str. 40). Stanovená životnost hepatocytů z nepremedikovaného potkana se pohybovala okolo 80–85 %, zatímco životnost hepatocytů z potkana, který byl premedikován ethanollem byla přibližně o 10 % nižší, tedy 70–75 %.

Na základě zjištěné životnosti byly hepatocyty naředyeny dle příslušného poměru (viz kapitola 3.3.4, str. 41) a naneseny na kultivační plotny. v průběhu dvacetihodinové kultivace za standardních podmínek (kapitola 3.3.3, str. 41) došlo ke vzniku „monovrstvy“ zploštělých buněk dlaždicovitého tvaru na dně kultivační plotny (viz obrázek 10, str. 51). Kultury primárních hepatocytů byly po ukončení kultivace využívány v průběhu dalších experimentů.

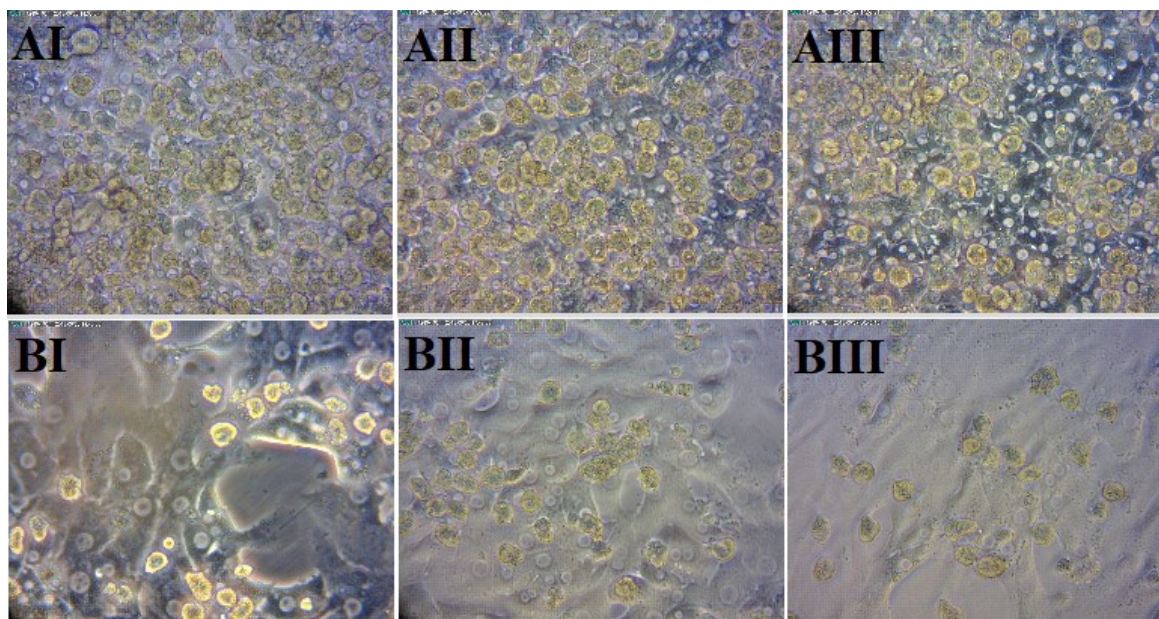


Obrázek 10: Ilustrační mikrofotografie primárních hepatocytů izolovaných z nepremedikovaného potkana. Hepatocyty tvoří „monovrstvu“ po 20 hodinách kultivace za standardních podmínek, pořízeno při dvacetinásobném zvětšení, mikroskop Leica DM IL LED.

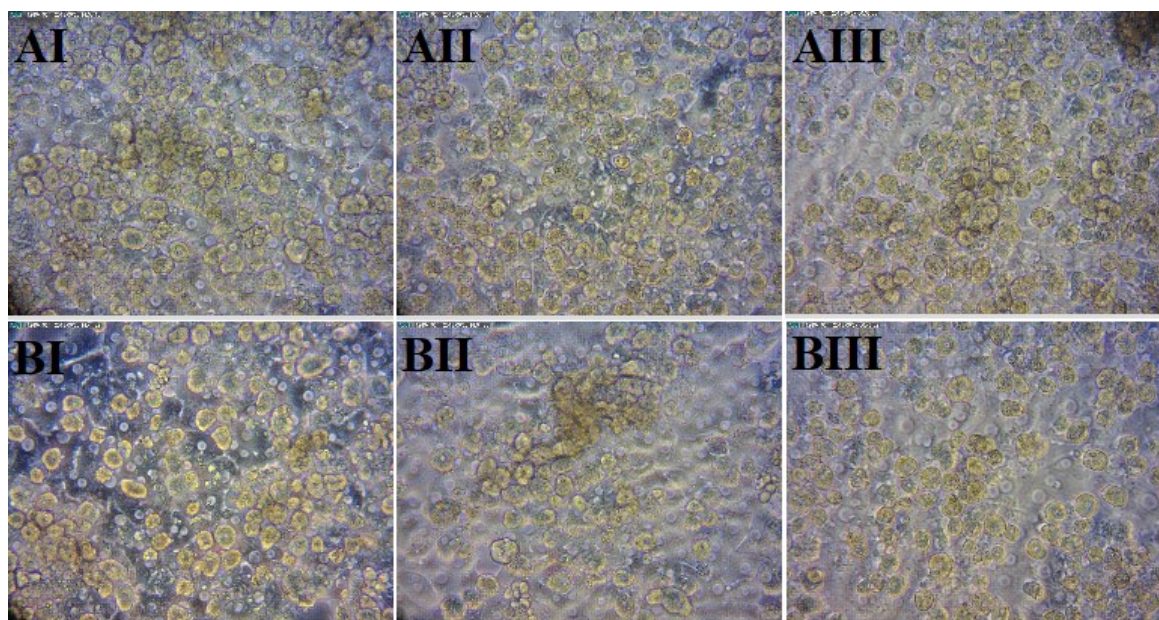
Standardní složení kultivačního media bylo modifikováno pro účely experimentu obohacením o ethanol, LPS a dihydromyricetin. Na základě výsledků uvedených v diplomové práci Mgr. Anety Skotnicové [116] byla jako vhodná koncentrace pro navození stabilního prostředí oxidačního stresu zvolena koncentrace ethanolu 300 mM nebo koncentrace LPS 15 $\mu\text{g/ml}$. Při zvolených koncentracích byly ovlivněny buněčné funkce, ale nedocházelo k výraznějšímu nárůstu apoptosy nebo nekrosy. Lipopolysacharid je látka s prokázanou hepatotoxicitou, která je schopna navodit oxidační stres v buňkách. v této práci byl LPS využíván pouze jako srovnávací látka při sledování hepatotoxických účinků ethanolu na úrovni morfologie buněk.

Hepatocyty z ethanolem premedikovaného potkana i nepremedikovaného potkana byly kultivovány v přítomnosti ethanolu a DHM rozpuštěného v ethanolu o výsledných koncentracích 1; 10; 50 a 100 μM . Toto koncentrační rozmezí pro DHM bylo též zvoleno na základě výsledků diplomové práce Mgr. Anety Skotnicové [116].

Při sledování vlivu DHM na primární hepatocyty po 20 hodinách kultivace v mediu s/bez EtOH nebo s/bez LPS, bylo možné rozlišit, že hepatocytů z potkana premedikovaného ethanolem je menší počet a mají odlišnou morfologii než hepatocyty z nepremedikovaného potkana. Buňky měly deformovaný tvar a netvořily souvislou monovrstvu. Pozorovaný efekt ethanolu o koncentraci 300 mM a LPS o koncentraci 15 $\mu\text{g/ml}$ byl srovnatelný. Efekt DHM nebylo možné vizuálně rozlišit. Vybrané reprezentativní snímky primárních hepatocytů po 4, 8 a 20 hodinách kultivace viz obrázky 11 a 12, str. 52.



Obrázek 11: *Representativní snímky primárních hepatocytů z potkana po expozici EtOH.* Primární hepatocyty z nepremedikovaného potkana, které byly kultivovány v kompletním mediu 4 hodiny (AI), 8 hodin (AII) a 20 hodin (AIII). Primární hepatocyty z potkana, který byl premedikován ethanolem, kultivované v kompletním mediu po 4 hodinách (BI), 8 hodinách (BII) a 20 hodinách (BIII). Pozorováno na mikroskopu Leica DM IL LED při dvacetinásobném zvětšení.



Obrázek 12: *Reprezentativní mikrofotografické snímky hepatocytů kultivovaných s EtOH a LPS.* Hepatocyty z nepremedikovaného potkana byly kultivovány v ethanolu o koncentraci 300 mM 4 hodiny (AI), 8 hodin (AII) a 20 hodin (AIII). Hepatocyty z nepremedikovaného potkana kultivované s LPS o koncentraci 15 $\mu\text{g/ml}$ 4 (BI), 8 hodin (BII) a 20 hodin (BIII). Mikroskop Leica DM IL LED při dvacetinásobném zvětšení.

4.1.2 Sledování hepatotoxického účinku ethanolu na primární hepatocyty

Pro účely pozorování antioxidačních vlastností DHM byla stanovena životnost buněk. Viabilita buněk byla stanovována po ukončení kultivace primárních hepatocytů při optimalizovaných laboratorních podmínkách v mediu, které obsahovalo ethanol o koncentraci 300 mM a roztok DHM rozpuštěného v ethanolu o koncentracích 1; 10; 50 a 100 μM .

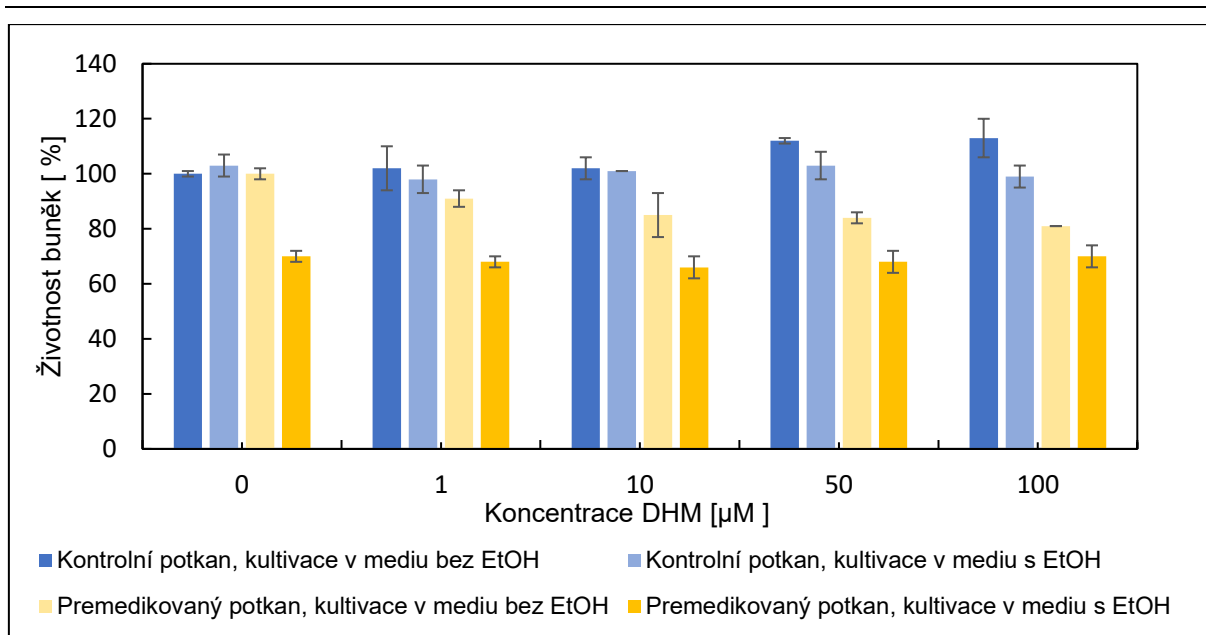
Pro stanovení životnosti buněk použity tři nezávislé metody – MTT test, stanovení aktivity ALT a stanovení ALT metodou ELISA.

Stanovení viability buněk pomocí MTT testu

Pro účely studia antioxidačních vlastností DHM byl pozorován vliv testovaných látek – ethanolu a dihydromyricetinu v kultivačním mediu na životnost buněk. Životnost primárních hepatocytů byla stanovena po 24 hodinách kultivace s příslušnými testovanými látkami na 24-WP. Výsledky byly vztaženy ke skupině hepatocytů z nepremedikovaného potkana, které byly kultivovány v kompletním mediu bez testovaných látek.

Na základě získaných dat bylo možné určit rozdíly v životnosti hepatocytů jednotlivých testovaných skupin. v případě skupiny hepatocytů z ethanolem nepremedikovaného potkana kultivované v mediu bez testovaných látek se vzrůstající koncentrací DHM docházelo k poklesu apopticko-nekrotických změn (viz obrázek 13, str. 54). Koncentrace DHM 50 a 100 μM vykazují pro tuto skupinu hepatocytů nejvyšší pozitivní efekt DHM. Vliv DHM na životnost hepatocytů z ethanolem premedikovaného potkana, které byly kultivovány v mediu obsahujícím ethanol o koncentraci 300 mM, není patrný.

Životnost hepatocytů izolovaných z potkana premedikovaného ethanolem byla oproti hepatocytům izolovaným z nepremedikovaného potkana přibližně o 10 % nižší. Při kultivaci hepatocytů z premedikovaného potkana v mediu obsahujícím ethanol je patrné hepatotoxické působení ethanolu. Životnost této skupiny buněk nevykazuje po přidavku DHM výrazné ovlivnění (viz obrázek 13, str. 54).

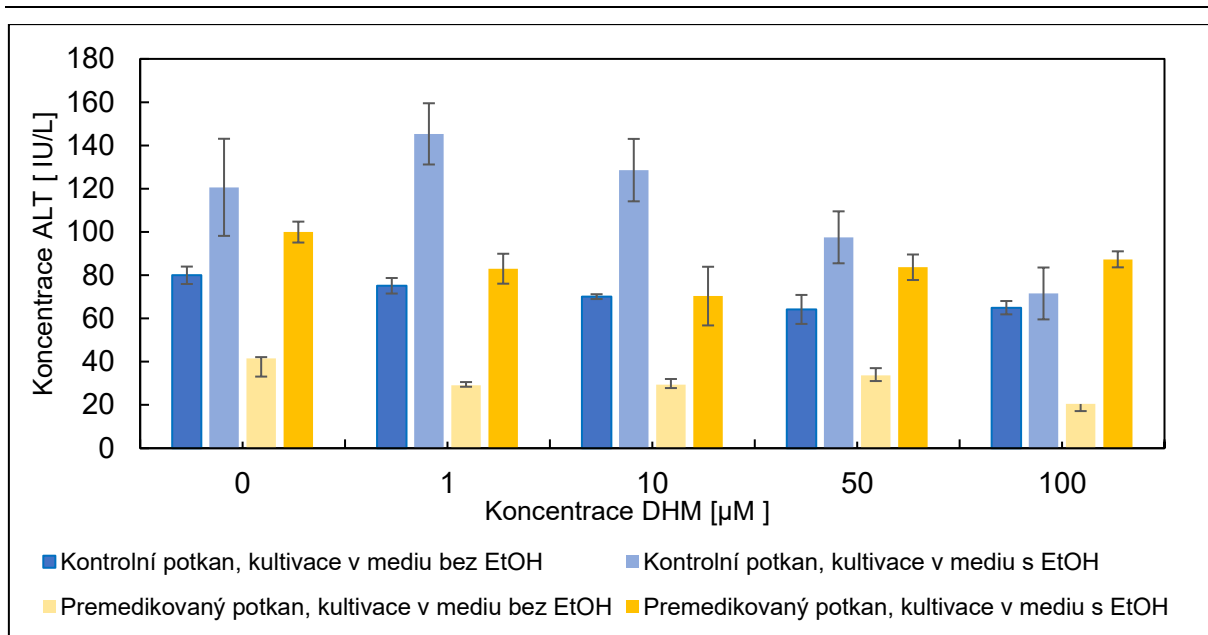


Obrázek 13: Vliv DHM na životnost hepatocytů izolovaných z ethanolem premedikovaného a nepremedikovaného potkana. Premedikace zvířat ethanolem probíhala 4 dny podáním 40% ethanolu. Životnost hepatocytů byla stanovena pomocí MTT testu na 24-WP. Jako vztažná skupina (100% životnost) byla zvolena skupina hepatocytů izolovaných z nepremedikovaného potkana kultivovaných za standardních podmínek bez testovaných látek v kultivačním mediu. Hepatocyty byly kultivovány v mediu obsahujícím ethanol o koncentraci 300 mM a DHM o koncentracích 1-100 μM .

Stanovení aktivity ALT

Viabilita buněk byla dále sledována na základě množství uvolněné alaninaminotransferasy, která je běžně využívaným markerem jaterního poškození. Ke stanovení bylo použito medium odebrané v poslední den kultivace z 6-WP (viz kapitola 3.3.5, str. 42).

Vypočtené hodnoty katalytické aktivity ALT ukazují, že hepatocyty, které byly izolovány z potkana premedikovaného ethanolem, byly méně poškozené oproti hepatocytům izolovaným z ethanolem nepremedikovaného potkana (viz obrázek 14, str. 55). Ethanol v kultivačním mediu zvyšuje aktivitu ALT. Přítomnost DHM v mediu snižuje aktivitu ALT. u hepatocytů z nepremedikovaného potkana, které byly kultivovány v mediu s EtOH se aktivita ALT v rozmezí koncentrací DHM 1 a 10 μM zvyšuje a v rozmezí koncentrací 50 a 100 μM snižuje. Aktivita ALT hepatocytů z potkana premedikovaného EtOH vykazuje přesně opačný trend (viz obrázek 14, str. 55).

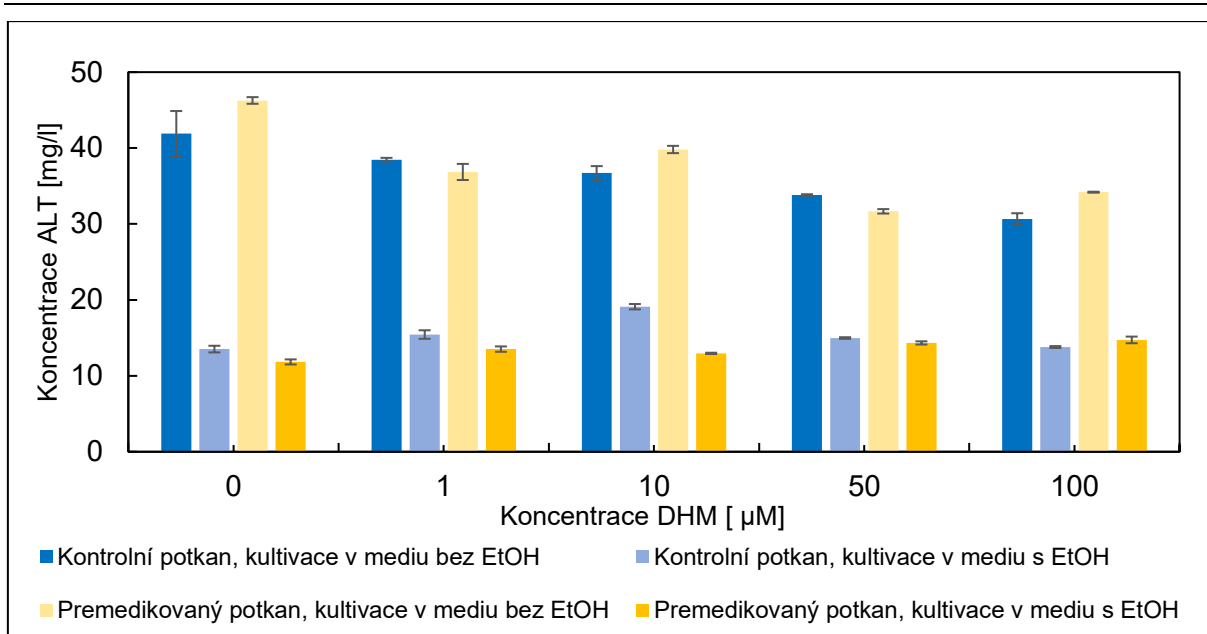


Obrázek 14: Aktivita ALT hepatocytů izolovaných z ethanolem premedikovaného a nepremedikovaného potkana. Premedikace zvířat ethanolem probíhala 4 dny podáním 40% ethanolu. Hepatocyty byly kultivovány v mediu obsahujícím ethanol o koncentraci 300 mM a ethanolový roztok DHM o koncentracích 1-100 μM . Pro měření prováděné v triplikátech bylo využito medium, které bylo odebráno z 6-WP. Pro účely měření aktivity byl použit komerční test (LALT (GPT) kit).

Stanovení ALT metodou ELISA

Viabilita primárních hepatocytů při kultivaci s ethanolem a dihydromyricetinem byla hodnocena též na základě množství ALT v mediu stanoveného metodou ELISA. Pro stanovení bylo využito medium odebrané z 6-WP po ukončení kultivace (viz kapitola 3.3.5, str. 42). Pro stanovení koncentrace ALT byl využit komerční test (RAT ALT SimpleStep ELISA kit).

Mezi naměřenými hodnotami koncentrace ALT jednotlivých testovaných skupin byl pozorovatelný rozdíl. Množství ALT u skupin buněk kultivovaných v mediu s ethanolem o koncentraci 300 mM bylo nižší než u buněk kultivovaných v mediu bez ethanolu. u hepatocytů, které byly kultivovány v mediu s ethanolem, není patrný žádný efekt DHM. Množství ALT se u skupin hepatocytů kultivovaných v mediu bez EtOH v závislosti na vzrůstající koncentraci DHM snižuje (viz obrázek 15, str. 56).



Obrázek 15: Stanovení koncentrace ALT v mediu hepatocytů izolovaných z ethanolem premedikovaného a nepremedikovaného potkana metodou ELISA. Premedikace zvířat ethanolem probíhala 4 dny podáním 40% ethanolu. Hepatocyty byly kultivovány v mediu obsahujícím ethanol o koncentraci 300 mM a DHM o koncentracích 1-100 μM . Pro měření prováděné v triplicátech bylo využito medium, které bylo odebráno z 6-WP.

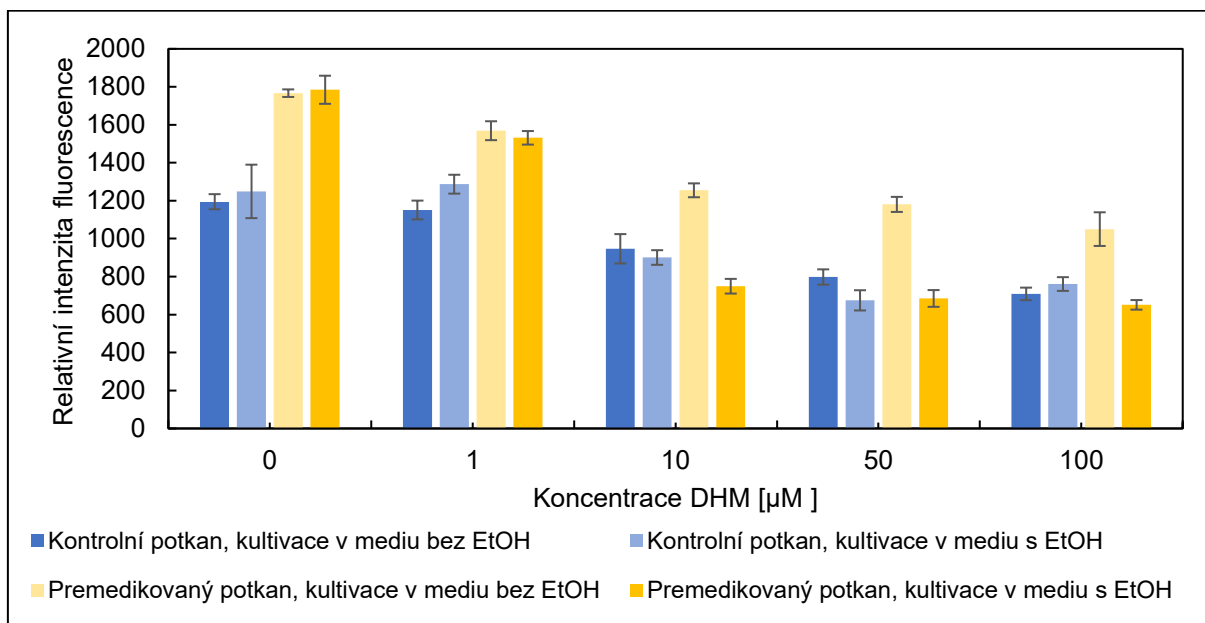
4.1.3 Vliv dihydromyricetinu na obsah ROS v hepatocytech

Antioxidační vlastnosti DHM byly sledovány na primárních hepatocytech z ethanolem premedikovaného a nepremedikovaného potkana po ukončení kultivace v mediu, které obsahovalo ethanol o koncentraci 300 mM a DHM o koncentracích 1;10; 50 a 100 μM . u jednotlivých skupin hepatocytů bylo stanovováno množství reaktivních forem kyslíku a dusíku, které jsou přímým ukazatelem míry oxidačního poškození buněk. k tomuto účelu byly použity dvě fluorescenční sondy s rozdílnou selektivitou vůči jednotlivým druhům reaktivních forem kyslíku a dusíku – DCFDA a DHR.

Stanovení ROS pomocí DCFDA

Antioxidační vlastnosti DHM byly ověřovány pomocí fluorescenční látky DCFDA, která je nejběžněji používanou látkou pro detekci redoxních změn v buňce v souvislosti s oxidačním poškozením. Vzhledem k nízké specifitě sloužila DCFDA v tomto experimentu jako celkový ukazatel ROS/RNS v buňkách. Pro měření byly použity hepatocyty z 24-WP z ethanolem premedikovaného potkana a nepremedikovaného potkana (viz kapitola 3.3.5, str. 42).

Na základě hodnot intenzity fluorescence bylo možno pozorovat rozdíly v rámci jednotlivých skupin hepatocytů. Naměřené hodnoty intenzity fluorescence hepatocytů z nepremedikovaného potkana jsou výrazně nižší než hodnoty intenzity fluorescence potkana, který byl premedikován ethanolom. u všech skupin je patrný lineární pokles intenzity fluorescence se vzrůstající koncentrací DHM v mediu. u hepatocytů z ethanolom premedikovaného potkana, které byly inkubovány s ethanolom, dochází při koncentraci DHM 10 μM k poklesu intenzity fluorescence téměř o polovinu (viz obrázek 16).



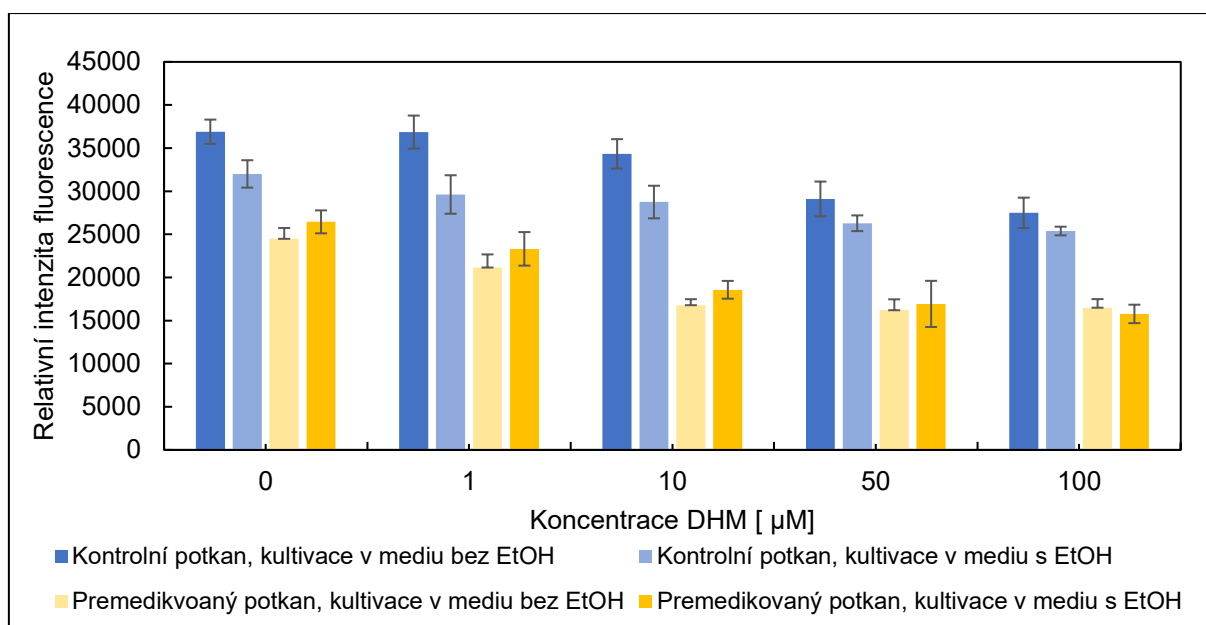
Obrázek 16: Vliv DHM na množství ROS stanovených pomocí DCFDA v primárních hepatocytech izolovaných z ethanolom premedikovaného a nepremedikovaného potkana. Premedikace zvířat ethanolom probíhala 4 dny podáním 40% ethanolu. Hepatocyty byly kultivovány v mediu obsahujícím ethanol o koncentraci 300 mM a DHM o koncentracích 1-100 μM . Pro měření byly použity hepatocyty kultivované na 24-WP po ukončení kultivace.

Stanovení množství peroxynitritu a jeho derivátů pomocí DHR

Antioxidační vlastnosti DHM byly následně ověřovány také pomocí fluorescenční sondy DHR, která je hojně využívána jako indikátor peroxynitritu a jeho derivátů, které vznikají v buňce ve větším množství v souvislosti s oxidačním poškozením. v rámci našeho experimentu sloužila DHR jako doplňková sonda pro detekci přítomnosti peroxynitritu a hydroxylového radikálu, který vzniká spontánním rozpadem peroxynitritu při oxidačním poškození buněk. Pro měření byly použity hepatocyty z 24-WP z ethanolom premedikovaného potkana a nepremedikovaného potkana kultivované za laboratorních podmínek v mediu, které

obsahovalo ethanol o koncentraci 300 mM a roztok DHM rozpuštěného v ethanolu o koncentracích 1;10; 50 a 100 μM po 20 hodinách kultivace (viz kapitola 3.3.5, str. 42).

Na základě naměřených hodnot intenzity fluorescence bylo možno pozorovat rozdíly v rámci jednotlivých skupin hepatocytů. Intenzita fluorescence hepatocytů z nepremedikovaného potkana je výrazně vyšší než hodnoty intenzity fluorescence potkana, který byl premedikován ethanolem. v případě obou skupin hepatocytů je možné se vzrůstající koncentrací DHM pozorovat lineární pokles intenzity fluorescence. u hepatocytů z ethanolem premedikovaného potkana dochází při koncentracích DHM 10, 50 a 100 μM k poklesu intenzity fluorescence (viz obrázek 17).



Obrázek 17: Vliv DHM na množství ROS stanovených pomocí DHR v primárních hepatocytech izolovaných z ethanolem premedikovaného a nepremedikovaného potkana. Premedikace zvířat ethanolem probíhala 4 dny podáním 40% ethanolu. Hepatocyty byly kultivovány v mediu obsahujícím ethanol o koncentraci 300 mM a ethanolový roztok DHM o koncentracích 1-100 μM . Pro měření byly použity hepatocyty kultivované na 24-WP po ukončení kultivace.

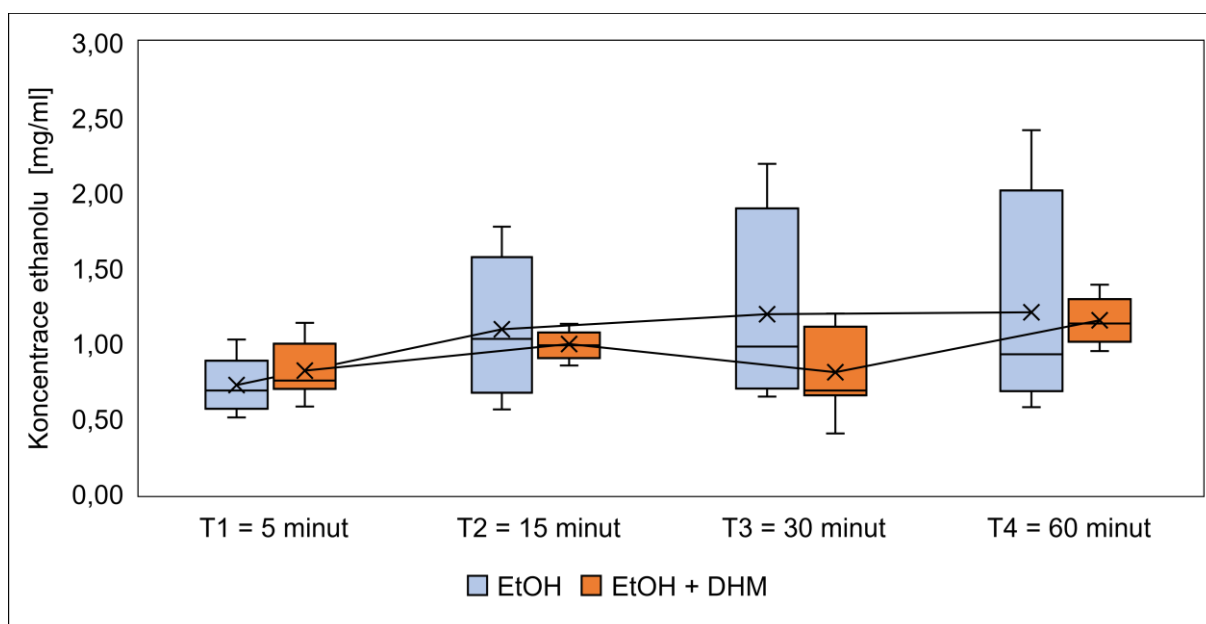
4.2 Vliv dihydromyricetinu na metabolismus ethanolu *in vivo*

Druhá část výzkumu byla věnována sledování vlivu DHM na metabolismus ethanolu na modelu potkana *in vivo*. Byl sledován vliv DHM na rychlost metabolismu ethanolu na základě stanovení množství ethanolu a acetaldehydu v krvi potkana. Na závěr byl sledován vliv DHM na alkoholdehydrogenasu na úrovni proteinové exprese tohoto enzymu v jaterních cytosolárních frakcích získaných v rámci studia vlivu DHM na rychlost metabolismu ethanolu *in vivo*.

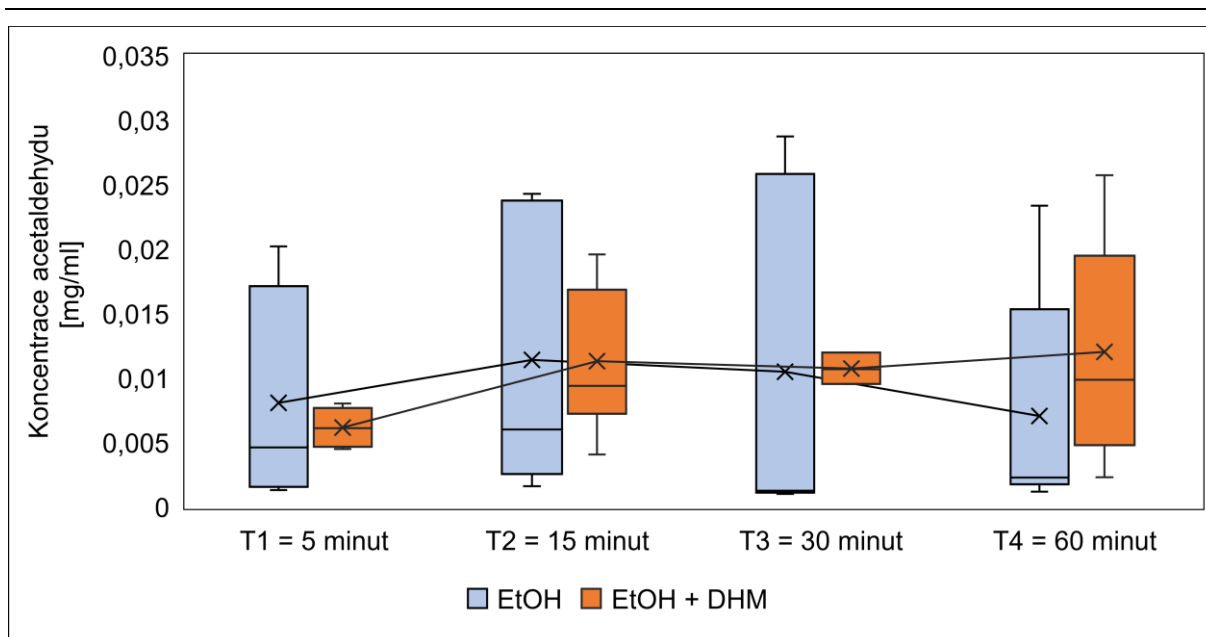
4.2.1 Stanovení množství ethanolu a acetaldehydu v krvi potkana

Byl sledován vliv dihydromyricetinu na koncentraci ethanolu a acetaldehydu v krvi potkanů při jednorázové a opakované premedikaci ethanolom (viz kapitola 3.3.12, str. 46). Potkanům, kteří byli rozděleni do dvou skupin, byl gaváží do žaludku podáván 40% ethanol nebo 40% ethanol s přidavkem DHM. Krev byla odebrána z oka ve čtyřech časových intervalech. Účinky opakované premedikace 40% ethanolom byly ověřovány za stejných podmínek na polovině potkanů z obou skupin (viz kapitola 3.3.12, str. 46).

U skupiny potkanů, které byl podán DHM dochází po 30 minutách k poklesu koncentrace ethanolu v krvi, která následně opět narůstá (obrázek 18). Efekt DHM na rychlost odbourávání acetaldehydu také není patrný (viz obrázek 19, str. 60). Na základě naměřených dat není patrný vliv DHM na rychlost odbourávání ethanolu při jednorázovém podání.

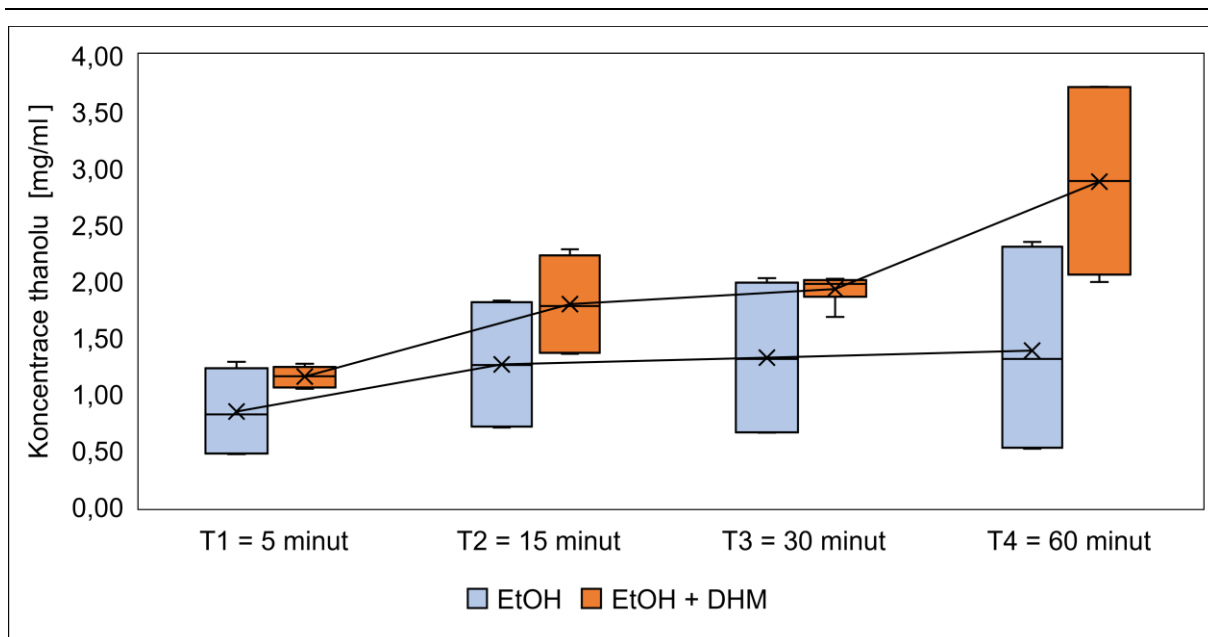


Obrázek 18: Koncentrace ethanolu v krvi potkanů v závislosti na čase při jednorázovém podání. Zvířata byla rozdělena do dvou skupin: první skupina (n = 4) byla premedikována 40% ethanolom; druhá skupina (n = 4) byla premedikována 40% ethanolom s přidavkem DHM. Krev byla potkanům odebrána z oka ve čtyřech časových intervalech (5, 15, 30 a 60 minut). Množství ethanolu v krvi bylo stanoveno pomocí plynové chromatografie (v triplikátech).

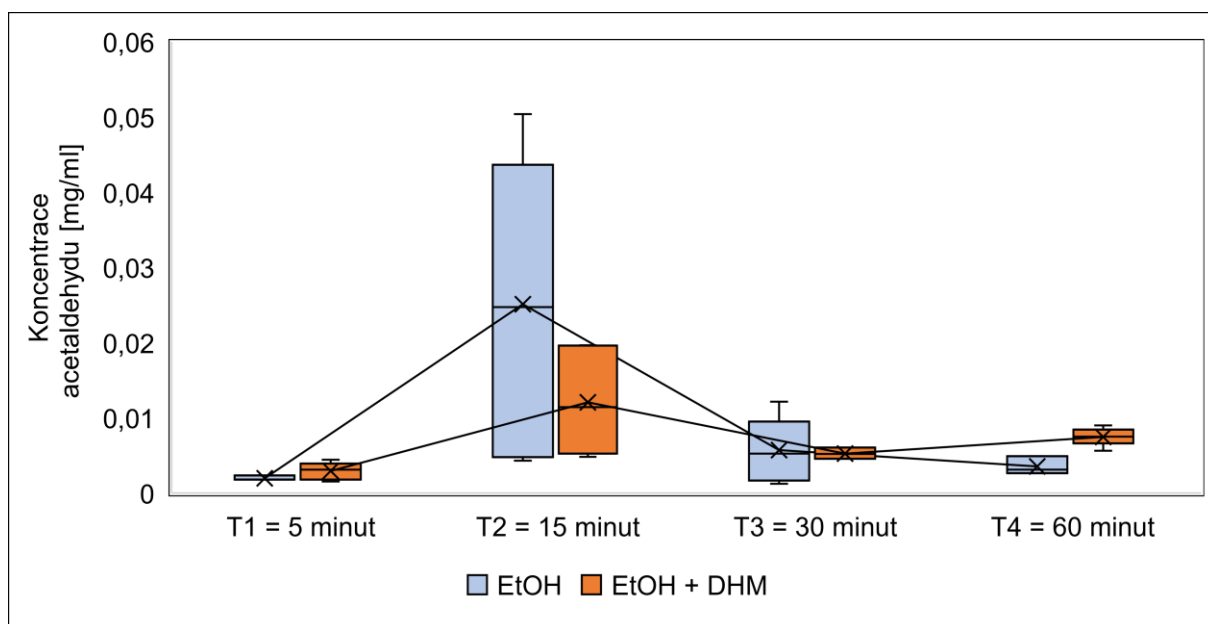


Obrázek 19: Koncentrace acetaldehydu v krvi potkanů v závislosti na čase při jednorázovém podání. Zvířata byla rozdělena do dvou skupin: první skupina (n = 4) byla premedikována 40% ethanolem, druhá skupina (n = 4) byla premedikována 40% ethanolem s přidavkem DHM. Krev byla potkanům odebírána z oka ve čtyřech časových intervalech (5, 15, 30 a 60 minut). Množství acetaldehydu v krvi bylo stanoveno pomocí plynové chromatografie (v triplikátech).

Účinky opakovaného podání ethanolu byly ověřovány následující den. Potkani, kteří byli první den premedikováni 40% EtOH s přidavkem DHM vykazují po opakované premedikaci 40% EtOH výrazně vyšší koncentraci ethanolu v krvi, než skupina potkanů opakovaně premedikovaná pouze 40% EtOH. Koncentrace ethanolu u skupiny potkanů, která byla premedikovaná DHM v závislosti na čase, narůstá. u potkanů, kteří byli opakovaně premedikováni 40% ethanolem dochází v 30 minutě ke stabilizaci koncentrace ethanolu v krvi – plató fáze (viz obrázek 20, str. 61). Koncentrace acetaldehydu v krvi potkanů, kteří byli poprvé premedikováni 40% ethanolem s DHM, je 15 minut po premedikaci výrazně nižší než u skupiny potkanů premedikovaných opakovaně 40% ethanolem. Množství acetaldehydu u potkanů premedikovaných DHM ve 30 minutě výrazně klesá a v 60 minutě mírně stoupá. Koncentrace acetaldehydu u potkanů opakovaně premedikovaných ethanolem má od 15 minuty sestupný trend (viz obrázek 21, str. 61).



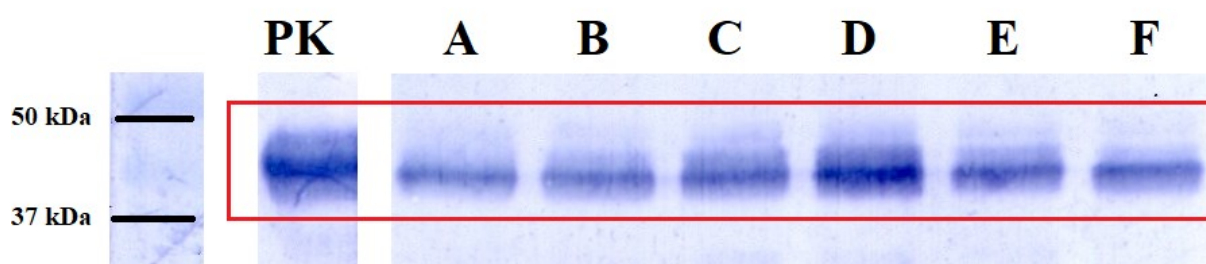
Obrázek 20: Koncentrace ethanolu v krvi potkanů v závislosti na čase při opakované dávce ethanolu. Polovina zvířat z obou skupin ($n = 2$), která byla premedikována 40% EtOH a 40% EtOH s DHM, byla premedikována podruhé 40% EtOH. Krev byla potkanům odebírána z oka ve čtyřech časových intervalech (5, 15, 30 a 60 minut). Množství ethanolu v krvi bylo stanoveno pomocí plynové chromatografie (v triplikátech).



Obrázek 21: Koncentrace acetaldehydu v krvi potkanů v závislosti na čase při opakované dávce ethanolu. Polovina zvířat z obou skupin ($n = 2$), která byla premedikována 40% EtOH a 40% EtOH s DHM, byla premedikována podruhé 40% EtOH. Krev byla potkanům odebírána z oka ve čtyřech časových intervalech (5, 15, 30 a 60 minut). Množství acetaldehydu v krvi bylo stanoveno pomocí plynové chromatografie (v triplikátech).

4.2.2 Studium vlivu dihydromyricetinu na expresi alkoholdehydrogenasy v cytosolární jaterní frakci

V jednotlivých vzorcích cytosolárních jaterních frakcí získaných z potkanů, kteří byli opakovaně premedikováni ethanolem a potkanů, kterým byl během první premedikace podán ethanolový roztok DHM a během druhé pouze ethanol (kapitola 3.3.12, str. 46), bylo stanoveno množství ADH. Na obrázku 22 je patrné, že DHM podaný potkanům během první premedikace neovlivňuje expresi ADH.



Obrázek 22: *Western blot* cytosolárních jaterních frakcí. Elektroforesa probíhala na 10% polyakrylamidovém gelu, do jednotlivých jamek bylo aplikováno 40 μ g proteinu. Vzorky v redukujícím pufru byly naneseny do jednotlivých drah v pořadí: pozitivní kontrola pro imunodetekci ADH – koňská alkoholdehydrogenasa (PK); cytosolární jaterní frakce potkana, který byl oba dny premedikován 40% ethanolem (A, D); cytosolární jaterní frakce potkana, kterému byl první den podán 40% ethanol a DHM (B, C); potkan kontrolní skupiny, kterému byla odebírána krev z oka – vliv acidosis (E) a potkan kontrolní skupiny (F).

5 Diskuze

Nadměrná konzumace alkoholu je příčinou řady jaterních onemocnění. Dlouhodobě probíhá široký výzkum a vývoj potenciálně hepatoprotektivních látek či látek pozitivně ovlivňujících průběh odbourávání alkoholu, abstinenci příznaky a projevy kocoviny. Sloučeniny ze skupiny flavonoidů jsou často spojovány s možnými pozitivními účinky na jaterní metabolismus ethanolu [117].

Flavonoid dihydromyricetin je tradičně využíván v čínské medicíně při alkoholové intoxikaci a jako podpůrný prostředek při příznacích kocoviny. Studie [101], která se zabývala vlivem DHM na metabolismus EtOH, byla podkladem pro tuto diplomovou práci. Cílem předkládané diplomové práce bylo ověřit antioxidační účinky jak DHM na hepatocytech potkana *in vitro*, tak vliv DHM na rychlost metabolismu ethanolu v potkaním modelu *in vivo*.

Pro studium antioxidačních vlastností DHM a jeho vlivu na biotransformační enzymy, byly zvoleny primární hepatocyty, které byly izolovány z ethanolem premedikovaného potkana a nepremedikovaného potkana, aby bylo možné pozorovat rozdíl účinku DHM. Hepatocyty z obou potkanů byly během kultivace vystaveny působení EtOH nebo EtOH v kombinaci s DHM. Pro účely studia antioxidačních vlastností DHM bylo nutné nejprve určit životnost buněk, aby bylo možné antioxidační efekty pozorovat v širších souvislostech. z důvodu zajištění vyšší důvěryhodnosti dat, byly pro určení životnosti buněk použity tři nezávislé metody – stanovení životnosti buněk pomocí MTT testu, stanovení aktivity ALT a stanovení množství ALT metodou ELISA.

Primární hepatocyty byly po izolaci kultivovány v kultivačním mediu, které bylo pro účely experimentu obohaceno o látky EtOH, LPS a DHM nebo o jejich kombinace. Na základě výsledků diplomové práce Mgr. Anety Skotnicové [116] byla zvolena koncentrace EtOH 300 mM jako vhodná pro navození oxidačního stresu. Jako modelová sloučenina pro porovnání hepatotoxického efektu na úrovni morfologie buněk byl použit LPS o koncentraci 15 µg/ml. Lipopolysacharid bývá vzhledem ke svým hepatotoxickým účinkům a schopnosti navodit oxidační stres hojně využíván při studiích jaterního poškození [118]. Vzhledem k rozdílnému mechanismu toxicity oproti EtOH nebyl LPS používán při dalších experimentech, které byly na primárních hepatocytech prováděny. Na základě publikovaných výsledků bylo pro testování vlivu DHM na hepatocyty zvoleno koncentrační rozmezí 1–100 µM [119].

Životnost hepatocytů určená pomocí MTT testu odpovídá předpokládanému snížení životnosti u hepatocytů izolovaných z ethanolem premedikovaného potkana proti hepatocytům izolovaným z nepremedikovaného potkana. Očekávaný pozitivní efekt DHM na životnost

buněk nebylo možné prokázat (viz obrázek 13, str. 54). Vznik fialového zabarvení roztoku MTT je spojen s aktivitou mitochondriální dehydrogenasy, která může být vlivem počínající apoptosy zvýšena, což může způsobit zkreslení výsledků. Životnost hepatocytů by pravděpodobně s časem začala klesat. Dále je stanovení životnosti pomocí MTT testu závislé také na množství nanesených buněk. Při nanášení buněk a výměně media v jednotlivých jamkách může špatnou manipulací vznikat výrazná chyba. Na základě výše zmíněných nedostatků MTT testu bylo jako alternativní možnost určení životnosti hepatocytů použito stanovení aktivity ALT. i přes výše zmíněné nedostatky je MTT test díky své jednoduchosti a rychlosti stále hojně využívanou metodou.

Data získaná pomocí stanovení aktivity ALT (viz obrázek 14, str. 55) nepotvrdila výsledky, které poskytlo stanovení pomocí MTT testu (viz obrázek 13, str. 54). Hepatocyty, které byly izolovány z ethanolem premedikovaného potkana, vykazují menší uvolnění enzymu ALT oproti hepatocytům izolovaným z nepremedikovaného potkana. z výsledků je ale patrné, že ethanol přítomný v mediu zvyšuje poškození buněk. Přídavek DHM v závislosti na koncentraci vykazuje u hepatocytů kultivovaných v mediu bez ethanolu mírný protektivní efekt. Tento výsledek je v souladu s několika studii, které popisují pokles hodnot alaninaminotransferasy, aspartátaminotransferasy a laktátdehydrogenasy působením DHM při navození jaterního poškození v myším a potkaním modelu [96, 120]. Pro úplnou jistotu správnosti naměřených dat bylo provedeno ještě stanovení ALT metodou ELISA, které by mělo být pravděpodobně přesnější, protože umožňuje sledovat enzym na úrovni proteinu.

Stanovení ALT metodou ELISA nepotvrdilo výsledky obou výše popsaných technik stanovení životnosti hepatocytů. Ethanol v mediu podle výsledků metody ELISA zřejmě působil protektivně, což vysvětluje, že obsah ALT u skupin buněk kultivovaných v mediu s ethanolem ($c = 300 \text{ mM}$) byl nižší než u buněk kultivovaných v mediu bez ethanolu (viz obrázek 15, str. 56). Hepatocyty jsou zřejmě schopné se adaptovat na opakované dávky ethanolu, což se projevuje zvýšením jejich regenerační kapacity. Toto pozorování je v souladu se studií prováděnou na lidských i potkaních hepatocytech, která popisuje vliv ethanolu na nekrosu a peroxidaci lipidů v buňkách [121]. Protektivní efekt DHM (viz obrázek 15, str. 56) je stejně jako v případě stanovení aktivity ALT (viz obrázek 14, str. 55) patrný pouze u hepatocytů kultivovaných bez ethanolu.

Rozporné závěry ze získaných výsledků mohou být způsobeny biologickou interindividuální variabilitou jednotlivých potkanů. Pro izolaci hepatocytů byl použit vždy jen jeden potkan premedikovaný ethanolem a jeden nepremedikovaný. Účinky cizorodých látek na jaterní metabolismus se mohou u jednotlivých zvířat lišit. Pro eliminaci biologické variability

byly experimenty prováděny opakovaně (5x) a pro izolaci byli vždy použiti potkaní samci stejného druhu, váhy i věku. Výsledky získané v rámci jednotlivých pokusů se shodují.

Reaktivní formy kyslíku a dusíku jsou přímým ukazatelem oxidačního poškození buněk. Po nejasných výsledcích, které přinesla stanovení životnosti (viz výše), byly testovány další markery hepatotoxicity a to pomocí stanovení množství ROS/RNS. Pro účely měření byly vybrány dvě fluorescenční látky s rozdílnou selektivitou vůči jednotlivým druhům reaktivních forem – DCFDA a DHR (viz kapitola 3.3.10, str. 45 a 3.3.11, str. 45).

Fluorescenční sonda DCFDA, která je nejběžněji používanou látkou pro detekci redoxních změn v buňce v souvislosti s oxidačním poškozením, sloužila v tomto experimentu jako ukazatel celkového množství ROS/RNS v buňkách [122]. Výsledky měření potvrdily předpoklad, že DHM snižuje množství ROS/RNS (viz obrázek 16, str. 57). V případě obou potkanů – premedikovaného EtOH i nepremedikovaného je viditelný lineární pokles relativní intenzity fluorescence (což odpovídá množství ROS/RNS) v závislosti na vzrůstající koncentraci DHM. Hodnoty intenzity fluorescence u vzorků hepatocytů z ethanolem premedikovaného potkana jsou výrazně vyšší než u hepatocytů z potkana nepremedikovaného, což potvrzuje, že námi prováděná premedikace navodila v buňkách prostředí oxidační nerovnováhy. Tyto výsledky jsou v souladu s nejnovější studií [103], která popisuje schopnost DHM regulovat množství ROS prostřednictvím indukce jaterní katalasy. Další studie potvrzuje schopnost DHM rychle snižovat množství ROS a signifikantně indukovat apoptosu v buňkách HepG2, a zároveň poukazuje na narušení vnitřní redoxní rovnováhy vlivem razantního poklesu ROS v buňce [123]. U hepatocytů z ethanolem premedikovaného potkana, které byly inkubovány v mediu s EtOH, závislost množství ROS/RNS na koncentraci DHM není proporcionální, nejúčinnější jsou koncentrace DHM 10 μ M a 50 μ M způsobující výrazný pokles relativní intenzity fluorescence (viz obrázek 16, str. 57). Tento jev by pravděpodobně mohl být způsoben adaptací hepatocytů na opakované dávky ethanolu, což bylo diskutováno výše. Druhým vysvětlením je schopnost EtOH lapat radikály, a tím snižovat množství ROS/RNS v buňce [124].

Jako doplňkové stanovení množství ROS byla využita fluorescenční látka DHR, která je běžně využívána pro detekci peroxynitritu a jeho derivátů, které vznikají v buňce v souvislosti s oxidačním poškozením [122]. v našem experimentu byla tato fluorescenční sonda použita pro detekci přítomnosti peroxynitritu a hydroxylového radikálu, který vzniká spontánním rozpadem peroxynitritu při oxidačním poškození buněk. Toto stanovení také potvrzuje schopnost DHM snižovat množství ROS/RNS v hepatocytech (viz obrázek 17, str. 58).

Antioxidační efekt DHM při intoxikaci EtOH byl tedy potvrzen pomocí obou dvou látek. Jejich výsledky, ale zcela nekorelují. Množství ROS/RNS stanovené pomocí DHR je výrazně vyšší u buněk, které byly izolovány z nepremedikovaného potkana. Rozdíly jsou pravděpodobně způsobeny rozdílnou selektivitou použitých fluorescenčních látek. Obě látky slouží spíše pro detekci předpokládaného oxidačního poškození (množství ROS/RNS), ale nikoliv pro jeho přesnou kvantifikaci. Nelze proto výsledky obou stanovení mezi sebou zcela porovnávat. Pro účely kvantitativního a selektivního stanovení jednotlivých druhů ROS/RNS by bylo vhodné využít např. elektronové paramagnetické rezonance, která poskytuje výrazně přesnější výsledky a lze ji považovat za metodu absolutní [125].

Druhá část předkládané diplomové práce byla zaměřena na studium vlivu DHM na metabolismus EtOH *in vivo*. k tomuto účelu byli jako pokusný model vybráni potkaní samci kmene Wistar. v pilotních experimentech bylo zjištěno, že etherová anestezie výrazně snižuje aktivitu ADH. Inhibici ADH při etherové anestezii potvrzuje několik studií [126–128]. Z tohoto důvodu byla pro odběry krve z oka potkana využita anestezie pomocí oxidu uhličitého. Byl sledován vliv DHM na koncentraci ethanolu a acetaldehydu v krvi potkanů při jednorázové a opakované premedikaci ethanolem.

Potkani byli premedikováni buď 40% roztokem ethanolu nebo 40% ethanolem s přídavkem DHM (o koncentraci 0,8 g/l). Výsledky jednorázové premedikace (viz obrázek 18, str. 59 a obrázek 19, str. 60) nepotvrdily závěry studie [101], která prokázala pozitivní vliv DHM na koncentraci alkoholu v krvi. Námi získané výsledky ukazují, že DHM nesnižuje množství EtOH a zároveň ani koncentrace acetaldehydu není vlivem DHM v krvi snížena. Koncentrace ethanolu v krvi potkanů premedikovaných ethanolem během prvních 15 minut narůstá a po 30 minutách se stabilizuje, zatímco u potkanů premedikovaných DHM dochází po 30 minutách k poklesu koncentrace EtOH a po 60 minutách k opětovnému nárůstu. Tento jev by mohl souviset se schopností DHM ovlivňovat redoxní rovnováhu buňky, jak popisuje studie [123]. Výsledky studie prokázaly schopnost DHM ovlivňovat redoxní stav buněk lidského jaterního karcinomu prostřednictvím snižování množství ROS.

Rozpor mezi námi získanými a publikovanými výsledky ve studii [101] může být způsoben rozdílnou formou podání EtOH. Ve zmíněné studii byly EtOH a DHM aplikovány potkanům intraperitoneálně, zatímco v našem experimentu byla pro přesnější simulaci orálního požití EtOH použita gaváž do žaludku. Nejnovější studie označuje použití intraperitoneálního podání pro účely studia metabolismu EtOH a DHM jako nevhodné [103]. Je tedy možné, že námi získaná data lépe odpovídají podmínkám požití alkoholu a poskytují správnější výsledky.

V následném experimentu byla část potkanů vystavena opakované premedikaci 40% EtOH za účelem zjištění vlivu DHM na metabolismus EtOH při kumulativní intoxikaci. Ze získaných výsledků vyplývá, že DHM při opakovaném podání EtOH zpomaluje metabolismus EtOH. Koncentrace EtOH v krvi byla u skupiny s DHM výrazně vyšší (viz obrázek 20, str. 61). Nebyla nalezena žádná publikovaná data, která by tyto námi získané výsledky potvrzovala či vyvracela. Prudký nárůst koncentrace acetaldehydu 15 minut po gaváži u obou skupin a pokles ve 30 minutě (viz obrázek 21, str. 61) je typický pro fluktuace koncentrace acetaldehydu související s redukcí aktivity cytosolární aldehyddehydrogenasy u pacientů s alkoholem indukovanou jaterní chorobou [129].

V závěrečné části byl ještě ověřován vliv DHM na množství ADH v jaterních cytosolárních frakcích na úrovni genové exprese pomocí metody Western blot s následnou imunodetekcí. Na základě výsledků (viz obrázek 22, str. 62) lze soudit, že vlivem DHM nedochází k významnému zvýšení exprese ADH v cytosolárních jaterních frakcích. Tato data potvrzují výsledky diplomové práce Mgr. Anety Skotnicové, které byly prováděny na primárních potkaních hepatocytech [116].

Závěrem lze shrnout, že DHM je prokazatelně schopen snížit množství ROS/RNS v buňkách, a tím přispívat ke snížení případného oxidačního stresu způsobeného intoxikací alkoholem. Dihydromyricetin ovšem nesnižuje množství EtOH ani acetaldehydu v krvi, jak bylo publikováno [101]. Při opakované intoxikaci ethanolem DHM naopak zpomaluje metabolismus EtOH. Je třeba mít na paměti, že výsledky této diplomové práce byly získány v experimentech prováděných na potkaním modelu, který je oproti lidskému organismu v mnohém odlišný. Účinky DHM na lidský organismus je tedy nutné dále studovat na vhodném modelovém systému.

6 Souhrn

Tato diplomová práce byla zaměřena na studium vlivu flavonoidní látky dihydromyricetinu na jaterní metabolismus ethanolu. Provedené experimenty poskytly tyto výsledky:

- Životnost izolovaných primárních hepatocytů kultivovaných v přítomnosti EtOH a DHM stanovena pomocí tří technik – MTT test, stanovení aktivity ALT a stanovení ALT metodou ELISA – nebyla dihydromyricetinem výrazně ovlivněna.
- Antioxidační schopnosti DHM byly potvrzeny na modelu primárních potkaních hepatocytů.
- Za podmínek *in vivo* DHM neovlivňuje rychlost metabolismus EtOH při jednorázové premedikaci.
- DHM zpomaluje metabolismus EtOH při opakované premedikaci *in vivo*.
- Podání DHM při opakované premedikaci ethanolem neindukuje ADH na úrovni genové exprese.

Seznam použité literatury:

- [1] DRING Consulting s.r.o. (2019) *Odborová příručka pro živnost: Výroba lihu sulfitového nebo lihu syntetického.*
- [2] Chieragato, A., Velasquez Ochoa, J., Bandinelli, C., Fornasari, G., Cavani, F., Mella, M. (2015) On the Chemistry of Ethanol on Basic Oxides: Revising Mechanisms and Intermediates in the Lebedev and Guerbet reactions. *ChemSusChem*. **8**, 377–388.
- [3] Shinnosuke Onuki, M.S., Koziel, J. A., van Leeuwen, J., Jenks, W.S., Grewell, D., Lingshuang, C. (2008) Ethanol production, purification, and analysis techniques: a review. *ASABE*. **12**, 7210–7221.
- [4] World Health Organization. (2018) *Global status report on alcohol and health 2018.*
- [5] Linhart, I. (2014) *Toxikologie*. 2. rozš. vyd. Praha, Vysoká škola chemicko-technologická.
- [6] Heinz, L., Klaus, M., Martin, W. (2004) *Farmakologie a toxikologie*. 15. přeprac. vyd. Praha, Grada.
- [7] Kalant, H. (1971) Absorption, Diffusion, Distribution, and Elimination of Ethanol: Effects on Biological Membranes. In: *The Biology of Alcoholism*. Boston: Springer US, p. 1–62.
- [8] Salaspuro, V., Nyfors, S., Heine, R. (1999) Ethanol Oxidation and Acetaldehyde Production in Vitro by Human Intestinal Strains of Escherichia coli under Aerobic, Microaerobic, and Anaerobic Conditions. *Scand. J. Gastroenterol.* **34**, 967–973.
- [9] Waszkiewicz, N., Zalewska, A., Szulc, A., Kepka, A., Konarzewska, B., Zalewska-Szajda, B., Chojnowska, S., Waszkiel, D., Zwierz, K. (2011) The influence of alcohol on the oral cavity, salivary glands and saliva. *Pol. Merkur. Lekarski*. **30**, 69–74.
- [10] Lolli, G., Rubin, M. (1943) The Effect of Concentration of Alcohol on the Rate of Absorption and the Shape of the Blood Alcohol Curve. *Q. J. Stud. Alcohol*, **4**, 57–63.
- [11] Haggard, H. W., Greenberg, L. A., Cohen, L. H. (1938) Quantitative Differences in the Effects of Alcoholic Beverages. *N. Engl. J. Med.* **219**, 466–470.
- [12] Harichaux, P., Moline, J. (1964) Influence of ingestion of 10% ethanol on emptying of the stomach of the rat. *Compte rendu des seances la Soc. Biol.* **158**, 1389–1392.
- [13] Dinoso, V., Chey, W. Y., Hendricks, J., Lorber, S. H. (1969) Intestinal mucosal hormones and motor function of the stomach in man. *J. Appl. Physiol.* **26**, 326–329.
- [14] Gillespie, R. J. G. and Lucas, C. C. (1961) Effect of single intoxicating doses of ethanol on the gastric and intestinal mucosa of rats. *Can. J. Biochem. Physiol.* **39**, 237–241.

-
- [15] Pihkanen, T. A. (1957) Neurological and physiological studies on distilled and brewed beverages. *Ann. Med. Exper. Biol. Fenn.* **35**, 152.
- [16] Klein, H. (1951) Blood alcohol curve after sweet drinks. *Dtsch. Z. Gesamte Gerichtl. Med.* **40**, 455–467.
- [17] Ehrmann, J., Schneiderka, P. (2006) *Alkohol a játra*. Praha, Grada.
- [18] Wagner, J. G., Wilkinson, P. K., Sedman, A. J., Kay, D. R., Weidler, D. J. (1976) Elimination of alcohol from human blood. *J. Pharm. Sci.* **65**, 152–154.
- [19] Holford, N. H. G. (1987) Clinical Pharmacokinetics of Ethanol. *Clin. Pharmacokinet.* **13**, 273–292.
- [20] Paton, A. (1928) Alcohol in the body. *J. Am. Med. Assoc.* **91**, 174.
- [21] Cederbaum, A. I. (2012) Alcohol Metabolism. *Clin. Liver Dis.* **16**, 667–685.
- [22] Crabb, D. W., Matsumoto, M., Chang, D., You, M. (2004) Overview of the role of alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase and their variants in the genesis of alcohol-related pathology. *Proc. Nutr. Soc.* **63**, 49–63.
- [23] Edenberg, H. J., Ph, D. (2007) Metabolism. *Alcohol Res. Heal.* **30**, 5–13.
- [24] Hurley, T. D., Edenberg, H. J., Li, T.K. (2002) Pharmacogenomics of Alcoholism. In: *Pharmacogenomics*. Weinheim, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, p. 417–441.
- [25] Heymann, H. M., Gardner, A. M., Gross, E. R. (2018) Aldehyde-Induced DNA and Protein Adducts as Biomarker Tools for Alcohol Use Disorder. *Trends Mol. Med.* **24**, 144–155.
- [26] Sultatos, L. G., Pastino, G. M., Rosenfeld, C. A., Flynn, E. J. (2004) Incorporation of the genetic control of alcohol dehydrogenase into a physiologically based pharmacokinetic model for ethanol in humans. *Toxicol. Sci.* **78**, 20–31.
- [27] Parés, X., Vallee, B. L. (1981) New human liver alcohol dehydrogenase forms with unique kinetic characteristics. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **98**, 122–130.
- [28] Bosron, W. F. and Li, T. (1987) Catalytic Properties of Human Liver Alcohol Dehydrogenase Isoenzymes. *Enzyme.* **37**, 19–28.
- [29] Bosron, W. F., Crabb, D. W., Housinger, T. A., Li, T. K. (1984) Effect of Fasting on the Activity and Turnover of Rat Liver Alcohol Dehydrogenase. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **8**, 196–200.
- [30] Crichton, R. R. (2008) Zinc: Lewis Acid and Gene Regulator. In: *Biological Inorganic Chemistry*. Amsterdam: Elsevier, p. 197–210.

-
- [31] Greenfield, N. J., Pietruszko, R. (1977) Two aldehyde dehydrogenases from human liver. Isolation via affinity chromatography and characterization of the isozymes. *Biochim. Biophys. Acta-Enzymol.* **483**, 35–45.
- [32] Imber, M., Pietrzyk-Brzezinska, A. J., Antelmann, H. (2019) Redox regulation by reversible protein S-thiolation in Gram-positive bacteria. *Redox Biol., Elsevier B.V.* **20**, 130–145.
- [33] Dickinson, F. M., Hart, G. J., Kitson, T. M. (1981) The use of pH-gradient ion-exchange chromatography to separate sheep liver cytoplasmic aldehyde dehydrogenase from mitochondrial enzyme contamination, and observations on the interaction between the pure cytoplasmic enzyme and disulfiram. *Biochem. J.* **199**, 573–579.
- [34] Michelot, D. (1992) Poisoning by *Coprinus atramentarius*. *Nat. Toxins.* **1**, 73–80.
- [35] Kitson, T. M. (1977) The disulfiram ethanol reaction: a review. *J. Stud. Alcohol.* **38**, 96–113.
- [36] Lieber, C. S. (2005) Metabolism of Alcohol. *Clin. Liver Dis.* **9**, 1–35.
- [37] Aebi, H. (1974) Catalase. In: *Methods of Enzymatic Analysis*. Amsterdam: Elsevier, p. 673–684.
- [38] Miwa, G. T., Levin, W., Thomas, P. E., Lu, A. Y. H. (1978) The direct oxidation of ethanol by a catalase – and alcohol dehydrogenase-free reconstituted system containing cytochrome P-450. *Arch. Biochem. Biophys.* **187**, 464–475.
- [39] Lieber, C. S. (2004) The Discovery of the Microsomal Ethanol Oxidizing System and Its Physiologic and Pathologic Role. *Drug Metab. Rev.* **36**, 511–529.
- [40] Iseri, O. A., Lieber, C. S., Gottlieb, L. S. (1966) The ultrastructure of fatty liver induced by prolonged ethanol ingestion. *Am. J. Pathol.* **48**, 535–555.
- [41] Remmer, H., Merker, H. J. (1965) Effect of drugs on the formation of smooth endoplasmic reticulum and drug metabolizing enzymes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **123**, 79–97.
- [42] Lieber, C. S., DeCarli, L. M. (1968) Ethanol oxidation by hepatic microsomes: Adaptive increase after ethanol feeding. *Science.* **162**, 917–918.
- [43] Nelson, D. R., Koymans, L., Kamataki, T., Stegeman, J. J., Feyereisen, R., Waxman, D. J., Waterman, M. R., Gotoh, O., Coon, M. J., Estabrook, R. W. (1996) P450 superfamily: Update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics.* **6**, 1–42.

-
- [44] Dicker, E., Cederbaum, A. I. (1988) Increased oxygen radical-dependent inactivation of metabolic enzymes by liver microsomes after chronic ethanol consumption. *FASEB J.* **2**, 2901–2906.
- [45] Hasumura, Y., Teschke, R., Lieber, C. S. (1974) Increased carbon tetrachloride hepatotoxicity, and its mechanism, after chronic ethanol consumption. *Gastroenterology.* **66**, 415–422.
- [46] Tamie, N., Tomonori, O., Akio, S. (1987) Kinetic studies on benzene metabolism in rat liver – possible presence of three forms of benzene metabolizing enzymes in the liver. *Biochem. Pharmacol.* **36**, 2799–2804.
- [47] Wickramasinghe, S. N., Gardner, B., Barden, G. (1987) Circulating cytotoxic protein generated after ethanol consumption: Identification and mechanism of reaction with cells. *Lancet.* **330**, 122–126.
- [48] Švihovec, J., Bultas, J., Anzenbacher, P., Chládek, J., Příborský, J., Slíva, J., Votava, M. (2018) *Farmakologie.* Praha, Grada.
- [49] Vonghia, L., Leggio, L., Ferrulli, A., Bertini, M., Gasbarrini, G., Addolorato, G., Abenavoli, L., D'Angelo, C., Cardone, S., Mirijello, A. (2008) Acute alcohol intoxication. *Eur. J. Intern. Med.* **19**, 561–567.
- [50] Marnett, L. J. (1999) Lipid peroxidation – DNA damage by malondialdehyde. *Mutat. Res.* **424**, 83–95.
- [51] Roberts II, L. J., Morrow, J. D. (2002) Products of the isoprostane pathway: unique bioactive compounds and markers of lipid peroxidation. *Cell. Mol. Life Sci.* **59**, 808–820.
- [52] Harper, C., Matsumoto, I. (2005) Ethanol and brain damage. *Curr. Opin. Pharmacol.* **5**, 73–78.
- [53] Harper, C. (1998) The Neuropathology of Alcohol-specific Brain Damage, or Does Alcohol Damage the Brain. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **57**, 101–110.
- [54] Cook, R. T. (1998) Alcohol Abuse, Alcoholism, and Damage to the Immune System – A Review. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **22**, 1927.
- [55] Poli, G. (1993) Liver damage due to free radicals. *Br. Med. Bull.* **49**, 604–620.
- [56] Koch, O. R., Pani, G., Borrello, S., Colavitti, R., Cravero, A., Farrè, S., Galeotti, T. (2004) Oxidative stress and antioxidant defenses in ethanol-induced cell injury. *Mol. Aspects Med.* **25**, 191–198.
- [57] Halliwell, B. (2006) Phagocyte-derived reactive species: salvation or suicide. *Trends Biochem. Sci.* **31**, 509–515.

-
- [58] Pham-huy, L. A., He, H., Pham-huy, C. (2008) Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *Int. J. Biomed. Sci.* **4**, 89–96.
- [59] Liu, T., Stern, A., Roberts, L. J., Morrow, J. D. (1999) The isoprostanes: Novel prostaglandin-like products of the free radical-catalyzed peroxidation of arachidonic acid. *J. Biomed. Sci.* **6**, 226–235.
- [60] Uttara, B., Singh, A., Zamboni, P., Mahajan, R. (2009) Oxidative Stress and Neurodegenerative Diseases: A Review of Upstream and Downstream Antioxidant Therapeutic Options. *Curr. Neuropharmacol.* **7**, 65–74.
- [61] Barbusiński, K. (2009) Controversy Over Fenton Mechanism. *Ecol. Chem. Eng. S.* **16**, 347–358.
- [62] Dizdaroglu, M., Jaruga, P., Birincioglu, M., Rodriguez, H. (2002) Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free Radic. Biol. Med.*, **32**, 1102–15.
- [63] Sinha, N., Dabla, P. K. (2015) Oxidative stress and antioxidants in hypertension: A current Review. *Curr. Hypertens. Rev.* **11**, 132–142.
- [64] Buonocore, G., Perrone, S., Tataranno, M. L. (2010) Oxygen toxicity: Chemistry and biology of reactive oxygen species. *Semin. Fetal Neonatal Med.* **15**, 186–190.
- [65] Bouayed, J., Bohn, T. (2010) Exogenous Antioxidants – Double-Edged Swords in Cellular Redox State: Health Beneficial Effects at Physiologic Doses versus Deleterious Effects at High Doses. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **3**, 228–237.
- [66] Albano, E., Cheeseman, K. H., Tomasi, A., Carini, R., Dianzani, M. U., Slater, T. F. (1986) Effect of spin traps in isolated rat hepatocytes and liver microsomes. *Biochem. Pharmacol.* **35**, 3955–3960.
- [67] Albano, E., Tomasi, A., Gorla-Gatti, L., Dianzani, M. U. (1988) Spin trapping of free radical species produced during the microsomal metabolism of ethanol. *Chem. Biol. Interact.* **65**, 223–234.
- [68] Ekström, G., Ingelman-Sundberg, M. (1989) Rat liver microsomal NADPH-supported oxidase activity and lipid peroxidation dependent on ethanol-inducible cytochrome P-450 (P-450IIE1). *Biochem. Pharmacol.* **38**, 1313–1319.
- [69] Shaw, S., Jayatilleke, E. (1987) Acetaldehyde-mediated hepatic lipid peroxidation: Role of superoxide and ferritin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **143**, 984–990.
- [70] Albano, E., Ingelman-Sundberg, M., Tomasi, A., Poli, G. (1991) Free Radical Mediated Reactions and Ethanol Toxicity: Some Considerations on the Methodological Approaches. In: *Alcoholism*. Boston: Springer US, p. 45–56.

-
- [71] Cheeseman, K. H. (1990) Methods of Measuring Lipid Peroxidation in Biological Systems: An Overview. In: *Free Radicals, Lipoproteins, and Membrane Lipids*. New York: Springer US, p. 143–152.
- [72] Mahomoodally, M. F., Gurib-Fakim, A., Subratty, A. H. (2005) Antimicrobial Activities and Phytochemical Profiles of Endemic Medicinal Plants of Mauritius. *Pharm. Biol.* **43**, 237–242.
- [73] Pandey, A. K. (2007) Anti-staphylococcal activity of a pan-tropical aggressive and obnoxious weed *Parthenium hysterophorus*: an in vitro study. *Natl. Acad. Sci. Lett.* **30**, 383–386.
- [74] Brouillard, R. (1988) Flavonoids and flower colour. In: *The Flavonoids*. Boston: Springer US, p. 525–538.
- [75] Iwashina, T. (2003) Flavonoid Function and Activity to Plants and Other Organisms. *Biol. Sci. Sp.* **17**, 24–44.
- [76] Samanta, A., Das, G., Das, S. (2011) Roles of flavonoids in plants. *Int. J. Pharm. Sci. Technol.* **6**, 12–35.
- [77] Kumar, S., Pandey, A. K. (2013) Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *Sci. World J.* **2013**, 1–16.
- [78] Nishiumi, S., Miyamoto, S., Kawabata, K., Ohnishi, K., Mukai, R., Murakami, A., Ashida, H., Terao, J. (2011) Dietary flavonoids as cancer-preventive and therapeutic biofactors. *Front. Biosci.* **3**, 1332–1362.
- [79] Middleton, E.: Effect of Plant Flavonoids on Immune and Inflammatory Cell Function. In: *Flavonoids in the Living System*. Boston: Springer US, 1998, p. 175–182.
- [80] K. Raj Narayana, M. Sripath Reddy, M.R. Chaluvadi Krishna, D. R. (2001) Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian J. Pharmacol.* **33**, 2–16.
- [81] Hollman, P. C. H., Bijlsman, M. N. C. P., van Gameren, Y., Cnossen, E. P. J., de Vries, J. H. M., Katan, M. B. (1999) The sugar moiety is a major determinant of the absorption of dietary flavonoid glycosides in man. *Free Radic. Res.* **31**, 569–573.
- [82] Day, A. J., Cañada, F. J., Díaz, J. C., Kroon, P. A., Mclauchlan, R., Faulds, C. B., Plumb, G. W., Morgan, M. R., Williamson, G. (2000) Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase. *FEBS Lett.* **468**, 166–170.
- [83] Bravo, L. (1998) Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. *Nutr. Rev.* **56**, 317–333.

-
- [84] Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., Bobilya, D. J. (2002) Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J. Nutr. Biochem.* **13**, 572–584.
- [85] Pandey, A. K., Mishra, A. K., Mishra, A. (2012) Antifungal and antioxidative potential of oil and extracts derived from leaves of indian spice plant *Cinnamomum tamala*. *Cell. Mol. Biol.* **58**, 142–147.
- [86] Cao, G., Sofic, E., Prior, R. L. (1997) Antioxidant and Prooxidant Behavior of Flavonoids: Structure-Activity Relationships. *Free Radic. Biol. Med.* **22**, 749–760.
- [87] Mishra, A., Kumar, S., Pandey, A. K. (2013) Scientific Validation of the Medicinal Efficacy of *Tinospora cordifolia*. *Sci. World J.* **2013**, 1–8.
- [88] Brown, E. J., Khodr, H., Hider, C. R., Rice-Evans, C. A. (1998) Structural dependence of flavonoid interactions with Cu^{2+} ions: implications for their antioxidant properties. *Biochem. J.* **330**, 1173–1178.
- [89] Van Acker, S. A. B. E., Van Den Berg, D., Tromp, M. N. J. L., Griffioen, D. H., Van Bennekom, W. P., Van Der Vijgh, W. J. F., Bast, A. (1996) Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radic. Biol. Med.* **20**, 331–342.
- [90] Kerry, N. L., Abbey, M. (1997) Red wine and fractionated phenolic compounds prepared from red wine inhibit low density lipoprotein oxidation in vitro. *Atherosclerosis.* **135**, 93–102.
- [91] Sekher Pannala, A., Chan, T. S., O'Brien, P. J., Rice-Evans, C. A. (2001) Flavonoid B-Ring Chemistry and Antioxidant Activity: Fast Reaction Kinetics. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **282**, 1161–1168.
- [92] Ratty, A. K., Das, N. P. (1988) Effects of flavonoids on nonenzymatic lipid peroxidation: Structure-activity relationship. *Biochem. Med. Metab. Biol.* **39**, 69–79.
- [93] Saller, R., Meier, R., Brignoli, R. (2001) The Use of Silymarin in the Treatment of Liver Diseases. *Drugs.* **61**, 2035–2063.
- [94] Cowan, M. M. (1999) Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clin. Microbiol. Rev.* **12**, 564–582.
- [95] Liang, J., Olsen, R. W. (2014) Alcohol use disorders and current pharmacological therapies: the role of GABA_A receptors. *Acta Pharmacol. Sin.* **35**, 981–993.
- [96] Murakami, T., Miyakoshi, M., Araho, D., Mizutani, K., Kambara, T., Ikeda, T., Chou, W. H., Inukai, M., Takenaka, A., Igarashi, K. (2004) Hepatoprotective activity of tocha, the stems and leaves of *Ampelopsis grossedentata*, and ampelopsin. *BioFactors.* **21**, 175–178.

-
- [97] Li, H., Li, Q., Liu, Z., Yang, K., Chen, Z., Cheng, Q., Wu, L. (2017) The Versatile Effects of Dihydromyricetin in Health. Evidence-Based Complement. *Altern. Med.* **2017**, 1–10.
- [98] Liu, L., Yin, X., Wang, X., Li, X. (2017) Determination of dihydromyricetin in rat plasma by LC-MS/MS and its application to a pharmacokinetic study. *Pharm. Biol.* **55**, 657–662.
- [99] Xiang, D., Wang, C., Wang, W., Shi, C., Xiong, W., Wang, M., Fang, J. (2017) Gastrointestinal stability of dihydromyricetin, myricetin, and myricitrin: an in vitro investigation. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **68**, 704–711.
- [100] Zhang, Y., Que, S., Yang, X., Wang, B., Qiao, L., Zhao, Y. (2007) Isolation and identification of metabolites from dihydromyricetin. *Magn. Reson. Chem.* **45**, 909–916.
- [101] Shen, Y., Lindemeyer, A. K., Gonzalez, C., Shao, X. M., Spigelman, I., Olsen, R. W., Liang, J. (2012) Dihydromyricetin As a Novel Anti-Alcohol Intoxication Medication. *J. Neurosci.* **32**, 390–401.
- [102] Hou, X., Tong, Q., Wang, W., Xiong, W., Shi, C., Fang, J. (2015) Dihydromyricetin protects endothelial cells from hydrogen peroxide-induced oxidative stress damage by regulating mitochondrial pathways. *Life Sci.* **130**, 38–46.
- [103] Silva, J., Yu, X., Moradian, R., Folk, C., Spatz, M. H., Kim, P., Bhatti, A. A., Davies, D. L., Liang, J. (2020) Dihydromyricetin Protects the Liver via Changes in Lipid Metabolism and Enhanced Ethanol Metabolism. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **44**, 1046–1060.
- [104] Liang, X., Zhang, T., Shi, L., Kang, C., Wan, J., Zhou, Y., Zhu, J., Mi, M. (2015) Ampelopsin protects endothelial cells from hyperglycemia-induced oxidative damage by inducing autophagy via the AMPK signaling pathway. *BioFactors.* **41**, 463–475.
- [105] Moldéus, P., Högberg, J., Orrenius, S. (1978) Isolation and use of liver cells. *Methods Enzymol.* **52**, 60–71.
- [106] Farghali, H., Buchar, E., Machková, Z., Kameníková, L., Masek, K. (1986) Muramyl dipeptide and carbon tetrachloride hepatotoxicity in rats: involvement of plasma membrane and calcium homeostasis in protective effect. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* **8**, 469–477.
- [107] Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.* **65**, 55–63.

-
- [108] Huang, X. J., Choi, Y. K., Im, H. S., Yarimaga, O., Yoon, E., Kim, H. S. (2006) Aspartate aminotransferase (AST/GOT) and alanine aminotransferase (ALT/GPT) detection techniques. *Sensors*. **6**, 756–782.
- [109] Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265–75.
- [110] LeBel, C. P., Ischiropoulos, H., Bondy, S. C. (1992) Evaluation of the Probe 2',7'-Dichlorofluorescein as an Indicator of Reactive Oxygen Species Formation and Oxidative Stress. *Chem. Res. Toxicol.* **5**, 227–231.
- [111] Keston, A. S., Brandt, R. (1965) The fluorometric analysis of ultramicro quantities of hydrogen peroxide. *Anal. Biochem.* **11**, 1–5.
- [112] Brandt, R., Keston, A. S. (1965) Synthesis of diacetyldichlorofluorescein: A stable reagent for fluorometric analysis. *Anal. Biochem.* **11**, 6–9.
- [113] Buxser, S. E., Sawada, G., Raub, T. J. (1999) Analytical and numerical techniques for evaluation of free radical damage in cultured cells using imaging cytometry and fluorescent indicators. *Methods Enzymol.* **300**, 256–75.
- [114] Henderson, L. M., Chappell, J. B. (1993) Dihydrorhodamine 123: a fluorescent probe for superoxide generation. *Eur. J. Biochem.* **217**, 973–980.
- [115] Svedberg, T. (1937) The Ultra-Centrifuge and the Study of High-Molecular Compounds. *Nature*. **139**, 1051–1062.
- [116] Skotnicová, A. (2019) *Effect of dihydromyricetin on ethanol metabolism*. Praha, Diplomová práce. Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce prof. RNDr. Petr Hodek CSc.
- [117] Zhao, L., Zhang, N., Yang, D., Yang, M., Guo, X., He, J., Wu, W., Ji, B., Cheng, Q., Zhou, F. (2018) Protective Effects of Five Structurally Diverse Flavonoid Subgroups against Chronic Alcohol-Induced Hepatic Damage in a Mouse Model. *Nutrients*. **10**, 1754.
- [118] Canová, N. K., Martínek, J., Kmoníčková, E., Zídek, Z., Kameníková, L., Farghali, H. (2008) Modulation of spontaneous and lipopolysaccharide-induced nitric oxide production and apoptosis by D-galactosamine in rat hepatocyte culture: The significance of combinations of different methods. *Toxicol. Mech. Methods*. **18**, 63–74.
- [119] Zeng, G., Liu, J., Chen, H., Liu, B., Zhang, Q., Li, M. and Zhu, R. (2014) Dihydromyricetin induces cell cycle arrest and apoptosis in melanoma SK-MEL-28 cells. *Oncol. Rep.* **31**, 2713–2719.

-
- [120] Chen, Y., Lv, L., Pi, H., Qin, W., Chen, J., Guo, D., Lin, J., Chi, X., Jiang, Z., Yang, H. (2016) Dihydromyricetin protects against liver ischemia/reperfusion induced apoptosis via activation of FOXO3a-mediated autophagy. *Oncotarget*. **7**, 76508–76522.
- [121] Castilla, R., González, R., Fouad, D., Fraga, E., Muntané, J. (2004) Dual effect of ethanol on cell death in primary culture of human and rat hepatocytes. *Alcohol Alcohol*. **39**, 290–296.
- [122] Kalyanaraman, B., Darley-Usmar, V., Davies, K. J. A., Dennery, P. A., Forman, H. J., Grisham, M. B., Mann, G. E., Moore, K., Roberts, L. J., Ischiropoulos, H. (2012) Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations. *Free Radic. Biol. Med.* **52**, 1–6.
- [123] Liu, B., Tan, X., Liang, J., Wu, S., Liu, J., Zhang, Q., Zhu, R. (2015) A reduction in reactive oxygen species contributes to dihydromyricetin-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells. *Sci. Rep.* **4**, 7041.
- [124] Da Silva, J. M. R., Darmon, N., Fernandez, Y., Mitjavila, S. (1991) Oxygen free radical scavenger capacity in aqueous models of different procyanidins from grape seeds. *J. Agric. Food Chem.* **39**, 1549–1552.
- [125] Halliwell, B., Whiteman, M. (2004) Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: How should you do it and what do the results mean. *Br. J. Pharmacol.* **142**, 231–255.
- [126] Aune, H., Hals, P. A., Hansen, B. I., Aarbakke, J. (1984) Effect of diethylether on the formation of paracetamol sulphate and glucuronide in isolated rat hepatocytes. *Pharmacology*. **28**, 67–73.
- [127] Bessesen, A., Merland, J. (1985) Effects of Anaesthetics on Protein Synthesis in Isolated Rat Hepatocytes: Inhibition by Diethyl Ether in Contrast to No Influence by Pentobarbital and Fentanyl. *Acta Pharmacol. Toxicol.* **57**, 23–29.
- [128] Normann, P. T., Ripel, Å., Mørland, J. (1987) Diethyl Ether Inhibits Ethanol Metabolism in Vivo by Interaction with Alcohol Dehydrogenase. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **11**, 163–166.
- [129] Matthewson, K., Al Mardini, H., Bartlett, K., Record, C. O. (1986) Impaired acetaldehyde metabolism in patients with non-alcoholic liver disorders. *Gut*. **27**, 756–764.