

**Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra biochemie**

Studijní program: Biochemie
Studijní obor: Biochemie



**Studium interakce dihydromyricetinu a alkoholu *in vivo*
Study of interaction of dihydromyricetin and alcohol *in vivo***

Bakalářská práce

Silvia Vargová

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

Praha, 2021

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne

.....

Silvia Vargová

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala panu prof. RNDr. Petru Hodkovi, CSc. za odborné vedení této bakalářské práce, hodně trpělivosti, ochotu vždy pomoci, jeho cenné rady a za vytvoření příjemného pracovního prostředí. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Gabriele Boubínové za její vstřícnost, ochotu a též pomoc s prací s mikrosomálními frakcemi.

Abstrakt

Dihydromyricetin (DHM), také znám jako ampelopsin, je přírodní antioxidant nacházející se v rostlině *Ampelopsis grossedentata*, používaní v tradiční čínské medicíně. Dihydromyricetin vykazuje zdraví prospěšné účinky, působí např. antioxidačně, protizánětlivě, antimikrobiálně a proti rakovině. Používá se také na potlačení intoxikaci alkoholem či zmírnění projevů kocoviny nebo abstinence.

Mechanismus působení DHM na metabolismus ethanolu je dodnes nejasný. Tato bakalářská práce je proto zaměřená na studium vlivu DHM na metabolismus ethanolu *in vivo* a vliv DHM na expresi cytochromu P450 2E1 (CYP2E1), který je jeden z hlavních enzymů účastnících se na odbourávání ethanolu v organismu.

Potkaní samci byli jednorázově premedikováni ethanolem (EtOH) anebo ethanolem v kombinaci s DHM a v krvi byla stanovována koncentrace EtOH. Množství EtOH a acetaldehydu v krvi jedinců svědčí, že DHM neovlivňuje rychlost metabolismu EtOH. Zároveň byl sledován vliv DHM při opakovaném premedikování EtOH. Skupina potkanů premedikována DHM vykazovala pomalejší metabolismus EtOH než skupina opakovaně premedikována pouze EtOH. Následně byl studován vliv DHM na expresi CYP2E1. Z jater potkanů byly připraveny mikrosomální frakce. Metodou Western blot s následnou imunodetekcí byla zjištěna zvýšená exprese CYP2E1 v jaterních mikrosomálních frakcích subjektů opětovně vystavených EtOH oproti subjektům vystavených EtOH v kombinaci s DHM. Tak byla potvrzena schopnost DHM snižovat obsah CYP2E1.

Klíčová slova: flavonoid, MEOS, biotransformace

Abstract – Abstrakt

Dihydromyricetin (DHM), also known as ampelopsin, is a natural antioxidant found in the plant *Ampelopsis grossedentata*, traditionally used in Chinese medicine. Dihydromyricetin exhibits health-benefiting activities. Besides its antioxidative, anti-inflammatory, anticancer, and antimicrobial effects, it is said to suppress intoxication by alcohol and mitigate the symptoms of hangover and abstention.

The mechanism of the activity of DHM on the metabolism of ethanol has not been fully explored. Thus, the focal point of the presented thesis was to explore the effect of DHM on the expression of CYP2E1, one of the major enzymes participating in the metabolism of ethanol in organisms.

Male rats were administered with ethanol (EtOH) or ethanol in combination with DHM, and the EtOH concentration of the blood was determined. The amount of EtOH and acetaldehyde in the blood of individuals indicates that DHM does not affect the rate of EtOH metabolism. Subsequently, the effect of DHM on repeated premedication of EtOH was monitored. The group of rats treated with DHM showed a slower metabolism of EtOH than the group solely premedicated with EtOH. Ultimately, the effect of DHM on CYP2E1 expression was studied. Microsomal fractions were prepared from the rat livers. By use of Western blotting with a following immunodetection, elevated levels of CYP2E1 were detected in the microsomal fractions of rats exposed to EtOH alone in opposition to rats exposed to EtOH in combination with DHM. Thus, the ability of DHM to reduce CYP2E1 was confirmed.

Key words: flavonoid, MEOS, biotransformation

Obsah

Seznam zkratk a symbol	8
1 Teoretický úvod	10
1.1 Ethanol.....	10
1.2 Metabolismus ethanolu.....	10
1.2.1 Oxidační cesta metabolismu ethanolu	10
1.2.2 Neoxidativní metabolismus ethanolu	11
1.3 Flavonoidy	12
1.3.1 Antioxidační účinky flavonoidů	12
1.4 Reaktivní formy kyslíku	14
1.4.1 Tvorba reaktivních forem kyslíku	15
1.4.2 Příznivé účinky reaktivních forem kyslíku.....	17
1.4.2 Negativní účinky reaktivních forem kyslíku	18
1.5 Dihydromyricetin	21
1.5.1 Chemické vlastnosti dihydromyricetinu	21
1.5.2 Účinky dihydromyricetinu na oxidační stres.....	22
1.5.3 Protirakovinná aktivita dihydromyricetinu.....	23
1.5.4 Vliv dihydromyricetinu na metabolismus	23
1.5.5 Účinky dihydromyricetinu na nervový systém.....	24
1.5.6 Vliv dihydromyricetinu na metabolismus alkoholu	25
2 Cíl práce	26
3 Materiály a metody.....	27
3.1 Použité chemikálie.....	27
3.2 Použité přístroje.....	28
3.3 Metody.....	29
3.3.1 Premedikace potkanů / stanovení koncentrace ethanolu a acetaldehydu v krvi potkanů	29
3.3.2 Preparace mikrosomální frakce	29
3.3.3 Stanovení koncentrace proteinů v mikrosomálních frakcích pomocí Lowryho metody	30

3.3.4 Diskontinuální elektroforéza na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného	31
3.3.5 Barvení polyakrylamidového gelu pomocí barviva Coomassie Brilliant Blue	32
3.3.6 Western blot s následnou imunodetekcí	32
4 Výsledky	34
4.1. Izolace mikrosomálních frakcí jater potkanů	34
4.2 Exprese CYP2E1 v mikrosomálních frakcích jater potkanů	35
4.3 Koncentrace ethanolu a acetaldehydu v krvi potkanů	37
5 Diskuse.....	42
6 Souhrn	45
7 Použitá literatura.....	46

Seznam zkratk a symbol

AD	Alzheimerova choroba
ADH	Alkoholdehydrogenasa
ALDH	Aldehyddehydrogenasa
ALS	Amyotrofická laterální skleróza
APAF-1	Apoptosu aktivující faktor 1
ATP	Adenosintrifosfát
BaP	Benzo[α]pyren
BNF	β -Naftoflavon
BSA	Hovězí serový albumin
CGD	Chronické granulomatózní onemocnění
cGMP	Cyklický guanosinmonofosfát
CoQ	Koenzym Q ₁₀
CYP	Cytochrom c
DHM	Dihydromyricetin
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
EROD	7-Ethoxyresorufin- <i>O</i> -deethylasa
ETC	Elektronový transportní řetězec
FAE	Prenatální expozice alkoholu
FAEE	Ethylester mastné kyseliny
FMN	Flavinmononukleotid
GABA	Kyselina gama-aminomáselná
GABAAR	GABA receptory
GSK-3β	Glykogensynthasakinasa-3 β
HepG2	Hepatokarcinomové buňky
HK-2	Buňky lidských ledvin
MAPK	Mitogenem aktivované protein-kinasy
MDH	Malondialdehyd
MEOS	Mikrosomální systém oxidující ethanol

miRs	mikroRNA
MnSOD	Superoxiddismutasa (s Mn)
MPO	Myeloperoxidasa
mTOR	Serin/threoninkinasa
NAC	<i>N</i> -acetyl-L-cystein
NAD⁺	Nikotinamidadenindinukleotid
NADH	Redukovaná forma NAD ⁺
NADP⁺	Nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NADPH	Redukovaná forma nikotinamidadenindinukleotidfosfátu
NMDA	<i>N</i> -methyl-D-aspartát
NSCLC	Nemalobunečné karcinomy plic
PDGF	Růstový faktor destiček
PI3K	Fosfoinositid-3-kinasa
PKA	Proteinkinasa A
PKG	cGMP-dependentní kinasa
PPARγ	Proliferací aktivované peroxisomové receptory
PTP	Protein-tyrosinfosfatasa
Ref-1	Redoxní faktor 1
RNA	Ribonukleová kyselina
RO*	Radikál ROS
ROS	Reaktivní formy kyslíku
RPM	Rotace za minutu
SDS	Dodecylsírán sodný
Sirt	Sirtuin
SOD	Superoxiddismutasa
T2D	Cukrovka typu II
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -tetramethylethylendiamin
TGFβ	Transformující růstový faktor P
Tris/HCl	Tris(hydroxymethyl)aminomethan hydrochlorid
UDP	Uridindifosfát
UV	Ultrafialové záření

1 Teoretický úvod

1.1 Ethanol

Ethylalkohol (C_2H_5OH), zvaný ethanol, patří do třídy organických sloučenin nesoucích obecný název alkoholy. Ethanol slouží v průmyslu jako rozpouštědlo, při syntéze jiných organických sloučenin, nebo jako přísada do automobilového benzínu. Ethanol je také intoxikační složkou mnoha alkoholických nápojů. Je to nejběžněji používaná návyková látka. Vliv alkoholu na organismus je individuální. Závisí na věku, pohlaví, zdravotním a duševním zdraví a zneužívání jiných návykových látek. Nadměrná konzumace vede ke krátkodobým ale i dlouhodobým škodlivým účinkům. Mezi krátkodobé škodlivé účinky patří ospalost, nevolnost, zvracení, průjem, dýchací potíže, potíže s řečí, zkreslené vidění a sluch. Dlouhodobé užívání alkoholu zvyšuje riziko chronického zánětu jater, onemocnění jater, podvýživu a alkoholismus. Způsobuje trávicí problémy, ovlivňuje tvorbu enzymů endokrinních žláz, co vede k pankreatitidě [1]. Alkohol také poškozuje centrální nervovou soustavu a může způsobit trvalé poškození mozku. Ovlivňuje mozkové neurony několika způsoby. Dokáže měnit jejich membránu, iontové kanály, enzymy a receptory. Ethanol se váže přímo na receptory pro acetylcholin, serotonin, kyselinu γ -aminomáselnou (GABA) a *N*-methyl-D-aspartát a ovlivňuje jejich funkci [2].

1.2 Metabolismus ethanolu

Ethanol může být v těle metabolisován dvěma různými cestami: oxidační a neoxidační. Hlavním místem metabolismu ethanolu jsou játra. Nicméně je známo, že žaludek také přispívá k tzv. metabolismu prvního průchodu.

1.2.1 Oxidační cesta metabolismu ethanolu

Oxidační metabolismus ethanolu se uskutečňuje v játrech a v cytosolu hepatocytů. Zde se ethanol metabolisuje enzymem alkoholdehydrogenasa (ADH). Metabolismus ethanolu s ADH produkuje vysoce reaktivní a toxický acetaldehyd, který může přispívat k poškození tkáně.

Oxidace ethanolu se také účastní mikrosomální systém oxidující ethanol (MEOS). Jedná se

o systém založený na cytochromu P450 (CYP), který se převážně nachází v endoplazmatickém retikulu. Enzym CYP2E1 zodpovídá za přibližně 10 % celkového metabolismu ethanolu [3]. Při chronickém alkoholismu, nebo při zvýšené koncentraci alkoholu, je indukovaná tvorba CYP2E1. To vede ke zvýšené míře oxidace ethanolu na acetaldehyd a také generování ROS, které přispívají ke stresu endoplazmatického retikula [4]. Studie naznačují, že individuální citlivost na ethanol a následný rozvoj patologií mohou souviset s rozdílem v katalytické aktivitě CYP2E1. Studie *in vitro* s lidskými mikrosomy prokázaly pozoruhodnou interindividuální variabilitu jak hladin proteinu, tak katalytické aktivity CYP2E1 [5, 6].

Katalasa je enzym, který se nachází na peroxisomech, a především rozkládá peroxid vodíku na kyslík a vodu. Také hraje menší roli v oxidaci ethanolu na acetaldehyd. Inhibice tohoto enzymu snižuje rychlost oxidace ethanolu na acetaldehyd, např. v mozku [7].

Následná oxidace aldehydu se uskutečňuje v mitochondriích enzymem aldehyddehydrogenasou (ALDH). Acetaldehyd se oxiduje na acetát za současné redukce NAD^+ na NADH, který může být znova oxidován mitochondriálním elektronovým transportním řetězcem (ETC) [8, 9]. Acetát je dále uvolněn do krevního řečiště, kde se může dále metabolisovat na oxid uhličitý, vodu nebo se účastnit biosyntézy mastných kyselin [3].

1.2.2 Neoxidativní metabolismus ethanolu

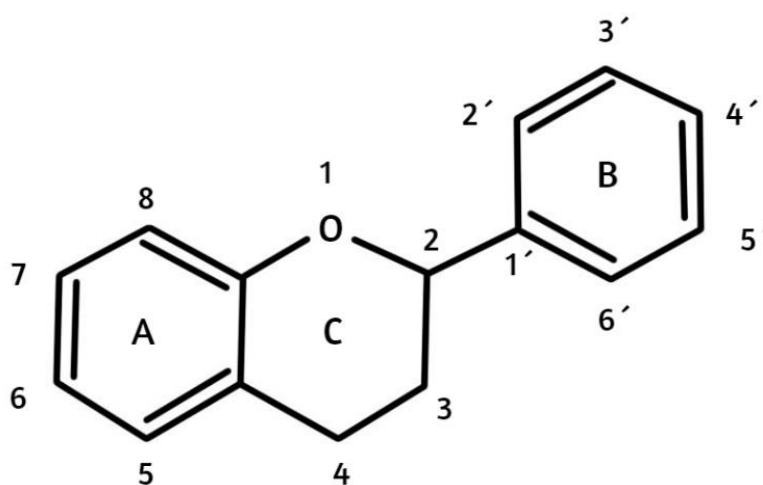
Neoxidativní metabolismus ethanolu tvoří pouze zlomek celkového metabolismu ethanolu a má primárně dvě cesty. Ethanol je neoxidativně metabolisován reakcí s mastnými kyselinami za vzniku ethylesterů mastných kyselin (FAEE). Další neoxidační cestou je tvorba fosfatidylethanolu. Tato cesta vyžaduje enzym fosfolipidasu D (PLD) [10], která štěpí fosfolipidy, primárně fosfatidylcholin, za vzniku kyseliny fosfatidové. PLD má vysokou Michaelisovu konstantu pro ethanol. To znamená, že enzymatická reakce pro tvorbu fosfatidylethanolu nastává až při vysokých koncentracích ethanolu. Při produkci fosfatidylethanolu enzymem PLD se inhibuje tvorba kyseliny fosfatidové a dochází k narušení buněčné signalizace [11]. Fosfatidylethanol se vylučuje pomaleji než samotný ethanol a může se akumulovat v tělesných tekutinách a tkáních. Tato vlastnost dělá fosfatidylethanol biomarkerem, který umožňuje retrospektivní stanovení příjmu ethanolu, i když už samotný ethanol v organismu není přítomen [11].

Oxidační a neoxidační cesta metabolismu ethanolu jsou vzájemně propojeny. Ovlivnění

oxidace ethanolu sloučeninami, které inhibují ADH, CYP2E1 anebo katalasu, vede ke zvýšení neoxidačního metabolismu ethanolu a ke zvýšené produkci FAEE v játrech a pankreatu [12].

1.3 Flavonoidy

Flavonoidy (z latinského slova *flavus*) jsou fenolické sekundární metabolity rostlin. Tyto sloučeniny se řadu let využívají v tradiční medicíně. Základní struktura flavonoidů je na obrázku č. 1.



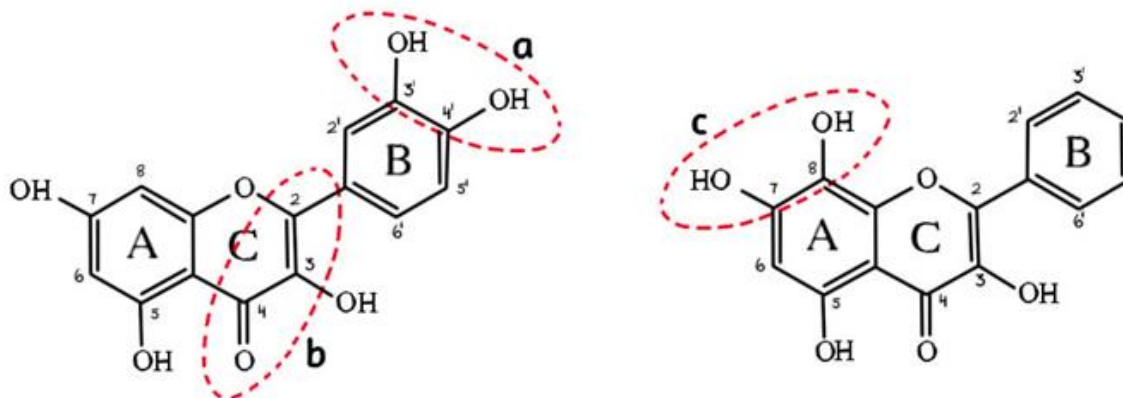
Obrázek č. 1 – Základní struktura flavonoidů: difenylpropanový skelet. Kostra flavonoidů sestává s 15 uhlíkového skeletu, který se skládá ze dvou fenylových kruhů (A a B) a heterocyklického kruhu (C). Obrázek byl vytvořen v programu Paint Tool Sai 1.1.0

Ve většině případů se kruh B připojuje k poloze 2 kruhu C, ale může se také vázat do polohy 3 nebo 4. Společně se strukturálními rysy kruhu B, glykosylací a hydroxylací všech tří kruhů, jsou flavonoidy jednou z největších a nejrozmanitějších skupin fytochemikálií.

1.3.1 Antioxidační účinky flavonoidů

Primárně antioxidanty působí zpožděním, prevencí nebo odstraněním oxidačního poškození. Antioxidační vlastnosti flavonoidů zahrnují vychytávání volných radikálů, chelataci kovů, inhibici enzymů tvořících radikály nebo stimulaci antioxidačních enzymů v organismu.

Nejlépe popsaná antioxidační vlastnost flavonoidů je odvozena z jejich schopnosti přímo vychytávat reaktivní formy kyslíku (ROS). Flavonoidy dokážou okamžitě vázat volné radikály donací atomu vodíku, nebo jednoduchým elektronovým přenosem [13]. Další možný mechanismus působení flavonoidů zahrnuje chelataci přechodných kovů. Flavonoidy mohou chelatovat přechodné kovy, nebo se vázat přímo na určitý iont kovu. Tímto mechanismem zabraňují tvorbě ROS. Některé flavonoidy mají schopnost chelatovat stopové prvky jako Fe^{2+} a Cu^+ , které hrají životně důležitou roli v metabolismu kyslíku a tvorbě volných radikálů [14]. Kromě již zmíněných způsobů flavonoidy mohou také působit jako intracelulární antioxidanty skrze inhibici enzymů tvořících volné radikály, např. xantinoxidasa, lipoxygenasa, proteinkinasa C, cyklooxygenasa, mikrosomální monooxygenasa, sukcinát oxidasa a NADPH-oxidasa [13]. V neposlední řadě mohou flavonoidy působit jako induktory vnitřních antioxidačních enzymů, jako jsou např. UDP-glukuronosyltransferasa, *N*-acetyltransferasa, sulfotransferasa, methyltransferasa [13]. Nespočet výzkumů (*in vitro* a *in vivo*) zkoumalo korelaci mezi strukturou přírodních flavonoidů a jejich antioxidační aktivitou. Charakteristické strukturální vlastnosti související s antioxidačními schopnostmi flavonoidů jsou: hydroxylové skupiny na kruhu A (označeno C, viz obrázek č. 2, str. 14), dvě hydroxylové skupiny na kruhu B v ortho poloze (označeno A, viz obrázek č. 2, str. 14), 2,3-nenasycená vazba v kombinaci s 4-keto-skupinou na kruhu C (označené B, viz obrázek č. 2, str. 14) a *O*-methylace [15].



Obrázek č. 2 – Shrnutí vztahů struktury flavonoidů a jejich antioxidačních vlastností. Převzato z [16].

Volné hydroxylové skupiny jsou donory vodíku a radikálové molekuly fungují jako akceptory vodíku. Tím dochází ke stabilizaci radikálů a vytvoří se relativně stabilní flavonoidový fenoxyl radikál. Následně může tato struktura reagovat s dalším radikálem (alkoxyl (RO^*)) a tím zaujmout stabilní chinonovou strukturu. Přítomnost hydroxylových skupin 3-OH a 5-OH zvyšuje schopnost flavonoidů vychytávat a absorbovat volné radikály. Přítomnost skupin 3'-OH a 4'-OH na kruhu B poskytuje vysokou stabilitu flavonoidovým fenoxilovým radikálům [16]. Kromě hydroxylových skupin několik studií ukázalo důležitost C2-C3 nenasycené vazby v kombinaci s přítomností 4-keto-skupiny. Nepřítomnost jedné z těchto charakteristik způsobuje výrazně menší antioxidační aktivitu [17]. Další struktura, která zvyšuje antioxidační aktivitu flavonoidů, je *O*-methylace. Rozdíly mezi antioxidační kapacitou u flavonoidů jsou zejména způsobeny rozdíly v hydrofobicitě a planaritě molekuly. Výzkum skupiny Wen X., et al. [18] ukázal, že flavony s methylovou skupinou byly metabolicky stabilnější a lépe se absorbovaly přes monovrstvu buněk adenokarcinomu lidského tlustého střeva ve srovnání s jejich nemethylovanými analogy. Tento výzkum také naznačil, že díky methylaci flavonoidy odolají i jaterní biotransformaci.

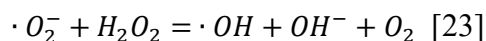
1.4. Reaktivní formy kyslíku

Molekuly volných radikálů, především reaktivní formy kyslíku (ROS) jsou také definovány jako reaktivní kyslíkové radikály a také jako neradikálové deriváty kyslíku [19]. Existuje několik druhů ROS, jako např. superoxidový anion (O_2^-), singletový kyslík (O_2), peroxid vodíku (H_2O_2) a vysoce reaktivní hydroxylový radikál ($\cdot\text{OH}$). Mezi endogenní druhy ROS

patří peroxid vodíku a superoxidový aniont, které se vyskytují v mitochondriálním dýchacím řetězci. Kromě toho mezi extracelulární zdroje ROS řadíme ultrafialové světlo (UV), ionizující záření, xenobiotika a znečišťující látky [20]. Oxidační poškození vyvolané volnými radikály se označuje jako oxidační stres. Oxidační stres je spojen s několika degenerativními chorobami, jako jsou osteoartritida, rakovina, cukrovka či onemocnění kardiovaskulárního systému. K oxidačnímu stresu dochází, pokud je rovnováha mezi produkcí ROS a endogenním antioxidantním obranným mechanismem změněna. Nadbytek ROS ovlivňuje makromolekuly jako DNA, proteiny, a lipidy. V důsledku toho může dojít k denaturaci proteinů, mutaci DNA, inhibici enzymů, změnám fluidity a struktury membrán. Avšak ROS nemusí být vždy škodlivé. V případě, že úroveň ROS se drží pod kontrolou, mohou fungovat jako intracelulární poslové a přispívat k správné funkci imunitního systému [21].

1.4.1 Tvorba reaktivních forem kyslíku

K produkci superoxidu dochází pomocí jednoelektronové redukce molekulárního kyslíku. Poté se superoxid převede na peroxid vodíku působením mitochondriálního enzymu, superoxidodismutasy závislé na manganu (MnSOD), nebo formy diatomického kyslíku [22]. Peroxid vodíku je poměrně nereaktivní, ale hraje roli ve Fentonově reakci. Vytváří radikály, které mohou poškozovat strukturu buněk a molekul. Haber a Weiss v roce 1934 představili reakci superoxidu s peroxidem vodíku za vzniku hydroxylových radikálů:



Hydroxylové radikály mohou být také tvořeny reakcemi s kyselinou chlornou, která je produkována myeloperoxidase [24].

Existuje mnoho enzymatických drah, kterými mohou být ROS v buňce generovány. Většina cest zahrnuje počáteční produkci superoxidu, což jak již bylo uvedeno, vede k produkci ještě reaktivnějších sloučenin. Ačkoli některé enzymatické systémy vytvářejí superoxid, např. NADP oxidasy, ROS také vzniká v anaerobní respiraci buněk. Zde je superoxid vedlejším produktem zpracování kyslíku. Jeho hlavním zdrojem generování je ATP syntasa a elektronový transportní řetězec (ETC), který se skládá ze tří komplexů. Elektronový transportní řetězec funguje pomocí přenosu elektronů prostřednictvím řady elektronových přenašečů. Přenos elektronů je spojen s uvolněním protonů (H^+) do mezimembránového prostoru mitochondrie, čímž se vytvoří elektrochemický potenciál, Δp , který může být využit

k syntéze ATP [8]. Pokud dojde k úniku elektronů z komplexů, mohou dané elektrony redukovat kyslík na superoxid. První komplex v ETC obsahuje flavinový mononukleotid. Jedná se o hlavní místo produkce superoxidů. Elektrony se přenáší z NADH na FMN. Poté dochází k přenosu elektronů přes FeS klastr k místu redukce CoQ [25]. Superoxid se tvoří při redukci FMN na FMNH₂. Míra redukce FMN závisí na poměru NADH/NAD⁺, přičemž vyšší poměr odpovídá většímu množství redukováných FMN [26]. Třetí komplex v ETC zastává významnou funkci při tvorbě superoxidu. Komplex III je místem, kde jsou elektrony přenášeny z CoQ na cytochrom c. Změny v Δp , nebo i redukční stav CoQ, stejně jako vazba inhibitoru antimycin přispívá k produkci superoxidu v komplexu III [8].

Při inhibici Komplexu I po přidání 2-oxoglutarátu vysokou hladinu superoxidu generuje enzymem α -ketoglutarátdehydrogenasa. Enzym obsahuje flavinovou podjednotku a využívá elektrony vzniklé při redukci NAD⁺, které Komplex I nedokáže použít [27].

Cytochrom P450 (CYP) je dalším enzymem v mitochondriích, který může vyrábět ROS. Cytochrom P450 katalyzuje monooxygenasové reakce, jenž vyžadují elektrony z NADH. Tyto elektrony mohou „uniknout“ a reagovat s diatomickým kyslíkem za tvorby superoxidu [28].

Mitochondriální respirace není jediným zdrojem ROS. Dalšími zdroji mohou být enzymy nikotinamidadenindinukleotidfosfát oxidasa (NADPH-oxidasa), xantinoxidoreduktasa a myeloperoxidasa [29]. NADPH-oxidasa funguje jako vícepodjednotkový enzym, který prostřednictvím elektronů přenesených z NADPH může redukovat kyslík na superoxid. Xantin-oxidoreduktasa má dvě vzájemně zaměnitelné formy, xantindehydrogenasu a xantinoxidasu. Obě formy jsou nezbytné pro katabolismus purinů. Oxidují hypoxantin na xantin a ten pak až na kyselinu močovou. Xantindehydrogenasa oxiduje NADH na NAD⁺, zatímco oxidasa dokáže produkovat superoxid a peroxid vodíku z diatomického kyslíku. Významnou funkci má myeloperoxidasa, jež se využívá k produkci kyseliny chlorné (HClO). Kyselina chlorná je klíčovým meziproduktem při tvorbě mnohých ROS a patří mezi velmi reaktivní sloučeniny. Může reagovat se superoxidem za vzniku hydroxylových radikálů, anebo s peroxidem vodíku za vzniku singletového kyslíku [24]. Kyselina chlorná se také podílí na různých buněčných reakcích. Iniciuje peroxidaci lipidů anebo oxidaci sulfhydrylových a thioetherových skupin na proteinech [24].

1.4.2 Příznivé účinky reaktivních forem kyslíku

Po dlouhou dobu se přepokládalo, že ROS patří mezi látky výhradně toxické. Tyto látky byly spojeny se stárnutím, karcinogenezí, neurodegenerací, aterosklerózou a cukrovkou. Nicméně ROS jsou nezbytné pro udržování redoxní homeostázy v organismu a správné funkce kardiovaskulárního a imunitního systému. Pokud dojde k překročení úrovně ROS, s kterou se organismus již nedokáže vyrovnat, dojde k oxidačnímu stresu. Na druhé straně, pokud úroveň ROS bude příliš nízká, dojde k redukčnímu stresu, který může také vést k řadě onemocnění jako rakovina nebo kardiomyopatie [30]. Úroveň ROS pro udržení optimální úrovně redukčního stavu v organismu se nazývá tzv. „redoxní okno“ [33]. Redoxní regulace je nezbytná pro udržování správných signalizačních procesů. Tyto redoxní reakce obvykle znamenají interakci ROS s aminokyselinou cystein na proteinech. ROS moduluje buněčnou proliferaci, dráhy k zajištění správné regulace buňky a programovanou buněčnou smrt. ROS aktivuje kinasy jako cGMP-dependentní proteinkinasy (PKG) anebo proteinkinasy A (PKA), což vede k apoptóze buňky. Kromě toho může také inhibovat proteinové fosfatasy oxidací cysteinu. Díky tomu zabraňuje jejím inhibičním účinkům v signalizaci mitogenem aktivované proteinkinasy (MAPK). Dochází k oxidaci protein-tyrosinfosfatasy (PTP) a inhibici ROS. Tímto procesem se udržuje optimální úroveň růstového faktoru. Tyrosinfosfatasa se aktivuje fyziologickou hladinou H_2O_2 cestou oxidace cysteinu na kyselinu sulfenovou, ale příliš vysoká koncentrace ROS oxiduje cystein na kyselinu sulfinovou. To může vést k nevratné modifikaci katalyzujícího cysteinu a úplné inaktivaci fosfatasy [31]. Další významná signalizační dráha, která je závislá na fosfoinositid-3-kinase (PI3K), je také regulována ROS. Produkty ROS aktivují antioxidační geny, které pomáhají organismu udržovat si optimální hladinu ROS. Jedním z genů je redoxní faktor-1 endonukleasi (Ref-1). Když je cytoplazmatický Ref-1 vystavený oxidačnímu stresu se přesune do jádra kde interaguje s transkripčními faktory, které dále iniciují antioxidační ochranný systém [32]. Mnoho z těchto redoxních regulačních cest se zkoumá pro dopady ROS na růst kolaterálních krevních cév. Tedy jedná se o hlavní oblast výzkumu cévních onemocnění, např. periferní cévní onemocnění, ischemická srdeční choroba. Předmětem studií ROS v koronárním kolaterálním růstu byla excesivní hladina ROS a zvýšený oxidační stres, které inhibují růst kolaterálu. Na opačné straně spektra, příliš nízká hladina ROS a tím způsobený redukční stres rovněž inhibují růst koronárních kolaterálů. Důležitou roli hrají

ROS při angiogenesi jako prostředník růstových faktorů a také jako spouštěč migrace a proliferace endoteliálních buněk [34]. Nerovnováha v uvedené redoxní homeostázi může mít i pozitivní dopad. Když organismus utrpí akutní trauma, jako např. krvácení, aktivuje se renin-angiotensin-aldosteronový systém a tělo začne vyrábět angiotensin II. Angiotensin II pomáhá zúžit krevní cévy a tím zvyšuje tlak [23]. Angiotensin II aktivuje NADPH-oxidasu v buňkách hladkého svalstva a tím zahajuje tvorbu superoxidů [35].

Cévní buňky hladkého svalstva vyžadují ROS pro vhodný růst. Růstový faktor destiček (PDGF) a trombin jsou agonisté pomáhající proliferaci buněk, oba vyžadují ROS pro zesílení signalizace vedoucí ke stimulaci růstu buněk [36].

Reaktivní formy kyslíku mají také důležitou roli v imunitním systému. Vrozená imunita využívá makrofágy, neutrofile a dendritické buňky. Tyto buňky mají specifické receptory na rozeznání cizích struktur, jako jsou např. bakterie či viry. Část vrozeného imunitního systému využívá fagocytózu. Reaktivní formy kyslíku pomáhají rozkládat cizorodé struktury. Produkce ROS probíhá ve fagocytující buňky pomocí NADPH-oxidasy [30]. Při navázání cizí látky na receptor se přes fagocytující buňky následně spouští tvorba ROS [36]. Chronické granulomatózní onemocnění (CGD) patří mezi vzácné dědičné onemocnění, u něhož dochází k poškození NADPH-oxidasy. V důsledku toho je produkce ROS narušena a organismus se stává náchylnějším k infekci (např. zánětu plic nebo osteomyelitidě). Imunita lidí trpících CGD není schopna bojovat s infekcí a tvoří kolem ložisek infekce granulomaty. Léčba probíhá prostřednictvím antibakteriální, antimykotické a imunomodulační terapie [37].

1.4.3 Negativní účinky reaktivních forem kyslíku

Jak již bylo zmíněno, nadměrné množství ROS v organismu způsobuje narušení homeostázy a může vést k patologiím od autoimunitních chorob až po kardiomyopatie. V buňce existuje mnoho cytosolických, extracelulárních a mitochondriálních zdrojů ROS. Menší množství ROS organismus využívá v různých metabolických drahách. Mírně zvýšená produkce ROS svědčí o zánětlivé odpovědi, nejčastěji aktivaci MAPK a protizánětlivých cytokinů. Avšak nadměrná produkce ROS se stává patologickou a může vést k mitochondriální a buněčné apoptóze prostřednictvím aktivace komplexu apoptosomu. Interakce apoptózu aktivujícího faktoru (APAF-1) s mitochondriálním cytochromem c hraje zásadní roli v aktivaci apoptosomu, jenž dále vede k aktivaci apoptotických caspas. Zda buňka vstoupí do stavu

zánětu, nebo nastane buněčná apoptóza, závisí na množství mitochondriálních ROS v buňce. Nadprodukce ROS způsobí zánětlivá onemocnění, jako je revmatoidní artritida, roztroušená skleróza nebo ateroskleróza, a to prostřednictvím nadměrné aktivace MAPK [38]. Vyšší produkce ROS může být způsobena enzymy, jako je např. myeloperoxidasa (MPO). Myeloperoxidasa, patřící do podrodiny peroxidas, produkuje kyselinu chlornou z H_2O_2 . Myeloperoxidasa se vyskytuje v neutrofilech a monocytech. Může být aktivována při cytotoxické reakci pro zabíjení patogenů a bakterií tzv. respirační vzplanutí. Nadměrná produkce HClO ovšem může způsobit oxidační poškození, apoptózu a zánětlivé onemocnění. Z klinického hlediska, nadměrná produkce ROS prostřednictvím MPO se projevuje produkcí nitrotyrosinu v endoteliálních oblastech zánětu, zhoršením NO-dependentní vazodilatace, inaktivací neutrofilních granulocytů během zánětu a prodloužením doby trvání respiračního vzplanutí. Tato poškození jsou patrná v onemocněních souvisejících s defekty MPO, jako je ateroskleróza, porucha tvorby krevních destiček, roztroušená ateroskleróza a Alzheimerova choroba [24].

Když produkce ROS vstoupí v buňce nad bazální úroveň nezbytnou pro buněčnou signalizaci a transdukcii, buňka má potřebu se zbavit nadbytečného množství ROS. Buňka si vyvinula antioxidační mechanismy pro vychytávání mitochondriální ROS a vracení buňky do jejího fyziologického stavu. Jeden z těchto mechanismů využívá enzym superoxiddismutasy (SOD), která se skládá s tří isoform: cytoplazmatická Cu/Zn superoxiddismutasa (SOD1), mitochondriální superoxiddismutasa dependentní na manganu (SOD2) a extracelulární Cu/Zn superoxiddismutasa (SOD3). Superoxiddismutasy katalyzují reakci O_2^- na H_2O_2 . Ten se dále redukuje na vodu pomocí glutathionperoxidasy a katalasy. SOD1 obsahuje měď na svém aktivním místě. Při nesprávném skládání enzymu nebo strukturálních změnách způsobených mutací se přístupnost a reaktivita katalytické mědi zvyšuje. Tyto změny mohou vést ke tvorbě vysoce toxických ROS, které přispívají k rozvoji amyotrofické laterální sklerózy (ALS) a neurodegenerativního onemocnění, která postihuje neurony [38]. Isoforma superoxiddismutasa 2 (SOD2) neboli mangan-dependentní dismutasa se nachází ve vnitřní mitochondriální membráně a přeměňuje toxické superoxidové anionty produkované mitochondriálním elektronovým transportním řetězcem na H_2O_2 a diatomický kyslík [39]. Tato funkce SOD2 umožňuje buňce zbavit se ROS, a tak předejít patologickým a buněčné smrti. Třetí isoforma superoxiddismutasy též katalyzuje superoxidový aniont na peroxid vodíku.

Na molekulární úrovni nadměrná exprese SOD3 snižuje koncentraci aniontů superoxidu a aktivuje mitogen kinázy [40].

Jak již bylo zmíněno, za fyziologických podmínek se ROS odstraňují pomocí SOD. Pokud jsou však ROS syntetizovány v těsné blízkosti NO, může se spontánně tvořit toxický radikál peroxynitrit (ONOO^-). Peroxynitritové radikály mohou volně procházet buněčnými membránami; aniontovými kanály nebo pasivní difúzí. Selektivně reagují v buňce nitrací tyrosinových zbytků na proteinech [41]. Přítomnost vzniklých nitrotyrosinů může měnit konformaci a funkci proteinů, jako jsou např. neurofilamenty a aktin, což vede k patologiím, jako ateroskleróza, ischemie myokardu a syndrom dráždivého tračníku [41]. Peroxynitrity též oxidují hemové skupiny proteinů jako hemoglobin, myoglobin anebo cytochrom c [42]. Dále může peroxynitrit poškozovat DNA oxidací bází DNA a tím přispět k apoptóze buňky. Během reperfúze anebo zánětu mitochondrie produkují vyšší množství NO, čímž dochází k inhibici komplexu IV v elektronovém transportním řetězci a zvýšení úniku elektronů s následnou tvorbou superoxidu a peroxynitritu. Zvýšená produkce ROS následně způsobuje mitochondriální oxidační poškození a také zvyšuje počet přítomných volných radikálů [29]. V patologickém stavu se kvůli nadměrné produkci ROS NO mění na ONOO^- , zapříčiňující endoteliální dysfunkci. Pokles koncentrace NO narušuje vazodilataci závislou na endotelu, což vede k dlouhodobým kardiovaskulárním potížím. Tato dysfunkce cévního endotelu je spojená s patologiemi jako hypertenze, preeklampsie, ateroskleróza a ischemická srdeční choroba [43].

Nadměrné množství ROS má také negativní dopad na posttranslační modifikaci proteinů, jak u vratných, tak i nevratných oxidačních modifikací. Bylo pozorováno, že reakce ROS se zbytky aminokyselin vede ke stárnutí a dysfunkci proteinů. Jak již bylo uvedeno tyto posttranslační modifikace se nejčastěji vyskytují na thiolové funkční skupině (-SH), na cysteinových zbytcích. Atom síry na thiolové skupině umožňuje oxidaci cysteinu na kyselinu sulfenovou, sulfinilou nebo sulfonovou [44]. Bylo zjištěno, že nitrosylace cysteinových zbytků ROS chrání proteiny před oxidativním stresem a dalším oxidačním poškozením, může dokonce urychlit čas zotavení. Na druhé straně glutathionylace pomocí ROS je spojena s neurodegenerativními a kardiovaskulárními nemocemi. Sulfenylace je vysoce reaktivní a nestálá modifikace proteinů, která je spojena s ireverzibilním oxidačním poškozením a apoptózou buňky. Mezi jiné modifikace patří také karbonylace a fosforylace

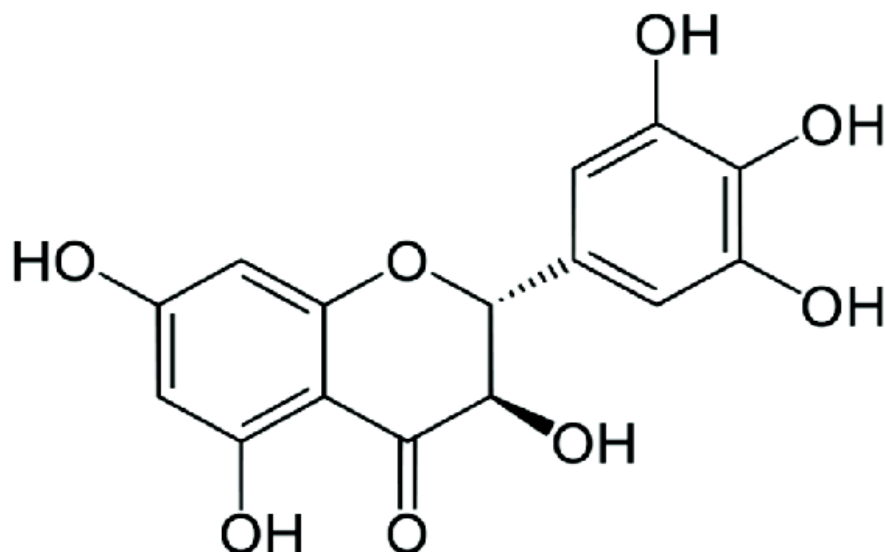
[45]. Tyto modifikace mohou změnit polaritu aminokyseliny a tím modulovat přenos buněčného signálu a změnu v interakci s kovovými kofaktory. Běžným příkladem může být inaktivace membránových proteinů, jako jsou přenašeče glukosy nebo Na^+/K^+ -ATPasy. Inhibice těchto přenašečů může vést k neurodegenerativním poruchám. Dodatečně se také může vyskytnout oxidace methioninových zbytků na sulfoxid, jenž vede ke snížení buněčné signalizace a následné fosforylace [45].

1.5 Dihydromyricetin

Dihydromyricetin (DHM), známý také pod názvem ampelopsin, patří do skupiny flavonoidů. Tato látka byla izolována z rostliny *Ampelopsis grossedentata*, která roste na jihu Číny. *A. grossedentata* se používá v tradiční v čínské medicíně k léčbě pyretické horečky, kašle, bolesti hltanu a hrtanu a. Dále se využívá při prevenci a léčbě nefritidy, hepatitidy, halitózy a polyorexie [45]. Nedávné studie prokázaly, že DHM vykazuje řadu zdraví prospěšných aktivit, včetně antioxidačních, protizánětlivých, protirakovinných, antimikrobiálních, a také působí jako modulátor enzymů účastnících se metabolismu lipidů a glukosy.

1.5.1 Chemické vlastnosti dihydromyricetinu

Dihydromyricetin vykazuje poměrně nízkou biologickou dostupnost což omezuje jeho potenciální léčebné aplikace. Rozpustnost DHM se zvyšuje zahřátím, např. z 0,2 mg/ml při 25 °C na 0,9 mg/ml při 37°C. Rozpustnost DHM také pozitivně koreluje s koncentrací hydroxypropyl- β -cyklodextrinu, PVP K30 a PEG6000 [46]. Při acylaci DHM vzniká dihydromyricetin-16-acetát který má desetkrát vyšší rozpustnost v lipidech než DHM [47]. Nízká biologická dostupnost DHM též souvisí s jeho nízkou stabilitou. Dihydromyricetin se při působení světla, pH, pepsinů a pankreatinových enzymů rozkládá. Metabolity flavonoidů obvykle vznikají hydrolýzou, štěpením kruhu a redukcí [48].



Obrázek č. 3 – Struktura dihydromyricetinu. Převzato a upraveno z [48].

1.5.2 Účinky dihydromyricetinu na oxidační stres

Oxidační stres se označuje jako stav nerovnováhy buněčné homeostázy, charakterizovaný jako nadprodukce reaktivních forem kyslíku, které přetěžují antioxidační systém organismu. Jak již bylo zmíněno výše, nadměrné množství ROS přispívá k mitochondriálně dependentní apoptóze. V nedávných studiích byla dokázána schopnost DHM chránit mezenchymální kmenové buňky vychytáváním radikálů [49]. Antioxidační účinky DHM byly také potvrzeny ve výzkumu antioxidačních účinků extraktů rostliny *Ampelopsis grossedentata* v sójovém oleji a vařeném mletém hovězím mase [50]. Nadměrné množství ROS působí jako dominantní faktor přispívající k fibróze myokardu. Srdeční fibroblast se aktivuje vazokonstrikčním peptidovým hormonem, angiotensin II. Jak již bylo zmíněno, angiotensin II zvyšuje tvorbu ROS aktivací NADPH-oxydasy. Dihydromyricetin snižuje hladiny ROS a biomarkeru malondialdehydu (MDH), utlumuje expresi lidského neutrofilního cytochromu b, p22^{phox} (podjednotka NADPH-oxydasy) a stimuluje celkovou antioxidační kapacitu [51]. Přebytek ROS v organismu také koreluje s neurodegenerativními chorobami. Kyselina 3-nitropropionová může vyvolat motorickou dysfunkci či poruchy učení a paměti prostřednictvím hyperprodukce ROS. Dihydromyricetin obnovuje metabolické abnormality ve striatu, podporuje expresi antioxidačního systému a inhibuje mitochondriálně závislou apoptózu [52]. Poruchy paměti jsou také způsobeny hypobarickou hypoxií, která často

vyvolává oxidační stres v mozku. Bylo prokázáno, že DHM potlačuje produkci ROS a zmírňuje peroxidaci lipidů v hipokampu. Také podporuje mitochondriální biogenezi a zlepšuje funkci mitochondrie. Kromě toho DHM chrání neurony před hypobarickou hypoxií snížením oxidačního stresu vyvolaného signalizací Sirt3-FOXO3a [53]. Oxidativní stres bývá považován za kritický faktor, který souvisí s nefrotoxitou vyvolanou cisplatinou. V lidských buňkách ledvin HK-2 DHM chrání před tímto typem nefrotoxicity, a to redukcí oxidačního zánětlivého stresu [54].

1.5.3 Protirakovinná aktivita dihydromyricetinu

Vyšší hladina ROS a oxidační stres pozitivně korelují s karcinogenezí. Dihydromyricetin může potenciálně regulovat buněčnou smrt prostřednictvím regulace tvorby ROS. Dihydromyricetin v závislosti na dávce podporuje tvorbu ROS a aktivaci mitochondriálně dependentní apoptózy v buňkách lidského hepatokarcinomu HepG2 [55]. Prostřednictvím snížení regulace Akt/Bad signalizace dochází k apoptóze, jež se aktivuje pomocí DHM. Dále DHM inhibuje fosforylaci Akt-Ser473 a Bad-Ser122/Ser136. Tím zvyšuje expresi Bax a Bad proteinů a dochází k tvorbě heterodimerů Bcl-2/Bcl-xL a aktivaci Bax-stimulované apoptózy v buňkách HepG2 [56]. Dihydromyricetin v závislosti na dávce snižuje expresi p53 a zvyšuje expresi Bcl-2, což vede k aktivaci apoptózy v rakovinové buňce, např. žaludku [57]. Dihydromyricetin podporuje apoptózu buněk redukcí TGF β a aktivací signálních drah p53 v buňkách HepG2 [58]. Dihydromyricetin také reguluje expresi Bcl-2 a zvyšuje poměr Bax/Bcl-2 a příznivě ovlivňuje regulaci signální dráhy p53 v buňkách HepG2 [59]. Dihydromyricetin vykazuje selektivní cytotoxicitu vůči nemalobuněčným karcinomům plic (NSCLC). Může to souviset s tvorbou ROS vyvolanou DHM, která způsobí mitochondriálně závislou apoptózu. Kromě toho DHM podporuje ROS-indukované signální dráhy [60]. DHM může indukovat nejen apoptózu, ale také autofagii v buňkách lidského melanomu. Zesiluje tvorbu ROS, která může být potlačena *N*-acetyl-L-cysteinem (NAC). Mechanismus autofagie indukované DHM souvisí s "upregulací" fosforylace NF-kB indukovanou ROS [61].

1.5.4 Vliv dihydromyricetinu na metabolismus

Flavonoidy vystupují často jako agonisté proliferace aktivovaných peroxisomových receptorů (PPARy), jež vykazují inhibiční účinek na diabetes. "Upregulace" exprese diabetogenních adipokinů a "downregulace" exprese adiponektinů jsou zprostředkovány

fosforylací PPAR γ -Ser273, která je regulována signalizační cestou ERK/CDK5. U modelových diabetických potkanů bylo zjištěno, že DHM může inhibovat fosforylací PPAR γ -Ser273 oslabením signalizační dráhy ERK/CDK5, to vede ke zpomalení nástupu hyperglykémie a ke zlepšení rezistence na inzulín bez přibývání na váze [62]. Řízení inzulínové rezistence v kosterním svalu se stává strategií léčby cukrovky typu II (T2D). Dihydromyricetin zvyšuje senzitivitu inzulínu kosterního svalstva, tím dochází k indukci "upregulace" exprese receptorů p-IRS-1 a protilátek p-AKT. Indukcí tvorby autofagosomů dochází částečně skrze aktivaci dráhy v myotubulech myších myoblastových buněk C2C12 [63]. Mnoho flavonoidů (naringenin, quercetin a dihydromyricetin) se podílí na zlepšení ambulantního profilu glukosy. Společně s benzo[α]pyrenem (BaP), β -naftoflavonem (BNF) DHM aktivuje CYP1A expresi a 7-ethoxyresorufin-*O*-deethylaci (EROD) zprostředkovanou tímto cytochromem P450. Bylo také prokázáno, že příjem DHM před nebo současně s podáváním BaP může zvýšit riziko BaP vyvolané tumorogeneze v tenkém střevě [64].

1.5.5 Účinky dihydromyricetinu na nervový systém

Bylo prokázáno, že se mikroRNA (miRs) podílejí na vývoji Alzheimerovy choroby (AD). Sirt funguje jako přímý substrát miR-34a, může podpořit buněčnou toleranci ke stárnutí indukci autofagie. V modelech pro stárnutí buněk DHM "downreguloval" expresi miR-34a a p53/p21 indukovanou D-galaktosou a "upreguloval" expresi Sirt1. Serin/threoninová kinasa, mTOR negativně působí na aktivaci autofagie. Dihydromyricetin zvyšuje fosforylací mTOR na Ser2448 a inaktivuje ji v modelech indukovaných D-galaktosou, což vedlo k aktivaci autofagie [65]. U Parkinsonovy choroby DHM také vykazuje neuroprotektivní aktivitu prostřednictvím zeslabení cytotoxicity vyvolané 1-methyl-4-fenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridinem (MPTP), generováním ROS a aktivací glykogensynthasakinas-3 β (GSK-3 β) [66].

Bylo prokázáno, že DHM vykazuje ochranné účinky při intoxikaci alkoholem a tím zvyšuje toleranci k alkoholu. Molekulární mechanismus může být spojen s kompetitivní vazbou DHM na vazební místa benzodiazepinu na receptorech pro kyselinu γ -aminomáselnou (GABAAR) [67]. Prenatální expozice alkoholu (FAE) propaguje dlouhodobé alterace chování a fyziologie, které mohou souviset s dysfunkcí GABAAR v hipokampu. V modelech potkanů DHM účinně předchází poruchám FAE regulací GABAAR [68]. Dysfunkce

GABAAR při neurotransmisi také přispívá k vývoji AD. U dvou kmenů transgenních myší (TG2576 a TG-SwDI) DHM snižuje produkci amyloid- β -peptidu a obnovuje hladiny gephyrinu, GABAergický přenos a funkční synapse. To vede ke zlepšení klinických symptomů [52].

1.5.6 Vliv dihydromyricetinu na metabolismus alkoholu

Konzumace alkoholu představují nejběžnější formu zneužívání návykových látek. Může se vyvinout alkoholismus, pro nějž je charakteristické opakované užívání alkoholu vedoucí k toleranci, abstinenční syndrom a fyzická a psychická závislost. V současné době neexistuje účinný lék na tuto poruchu, který by neměl vedlejší účinky. Nicméně nejnovější studie naznačují, že farmakologické vlastnosti DHM jsou základem pro úspěšný vývoj léčby poruch užívání alkoholu. Dihydromyricetin dokáže snížit intoxikaci EtOH a potencionálně též ochránit játra vůči hepatotoxickým látkám. Snižuje steatózu jater, jaterní triglyceridy, aktivuje enzym proteinkinasu aktivovanou cAMP. Dihydromyricetin zřejmě též indukuje expresi enzymů metabolisujících EtOH (jako jsou ADH a ALDH) a redukuje tak koncentrace EtOH a acetaldehydu [69]. Nejnovější studie ukazují na schopnost DHM snížit tvorbu ROS při konzumaci EtOH inhibicí mikrosomálního CYP2E1 [70]. Dihydromyricetin mimo jiné, též potlačuje abstinenční příznaky u potkanů, včetně úzkosti a náchylnost k záchvatům a výrazně snižuje dobrovolnou konzumaci EtOH u potkanů [71].

2 Cíl práce

Hlavním cílem předložené bakalářské práce bylo zjištění účinku dihydromyricetinu na metabolismus alkoholu za podmínek *in vivo*. Pro dosažení daného cíle bylo potřebné splnit následující dílčí úkoly:

- Izolace jaterních mikrosomálních frakcí potkanů, kteří byli vystaveni buď samotnému ethanolu nebo ethanolu v kombinaci s dihydromyricetinem.
- Zjištění vlivu dihydromyricetinu na expresi CYP2E1 na úrovni proteinu.
- Určení vlivu dihydromyricetinu na koncentraci ethanolu a acetaldehydu v krvi potkanů premedikovaných buď ethanolem nebo ethanolem v kombinaci s dihydromyricetinem.

3 Materiály a metody

Použité chemikálie

Abcam, UK

králičí protilátka proti CYP2E1 (ab19140)

APIChem, Čína

dihydromyricetin

Fluka, Švýcarsko

α -tocopherol, β -mercaptoethanol, Tris(hydroxymethyl)aminomethan

Gibco® by life technologies™, USA

Hovězí sérový albumin (BSA)

Lachema Brno, Česká republika

Bromofenolová modř, kyselina chlorovodíková, kyselina octová, methanol, vinan sodnodraselný

Linde, Česká republika

kapalný dusík, suchý led

Millipore Corp., USA

Immobilon – NC nitrocelulosová přenosová membrána

Penta, Česká republika

hydroxid sodný, ethanol, Folin-Ciocalteu roztok, chlorid draselný

PML a.s., Česká republika

nízkotučné sušené mléko Laktino

Serva, Německo

akrylamid, bis-akrylamid (BIS), Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBB), Tris/HCL, N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin (TEMED), Triton X-100,

Sigma-Aldrich, USA

5-bromo-4-chloro-3-inodylfosfát (BCIP), kozí IgG protilátka proti IgG králíka s konjugovanou alkalickou fosfatasou, nitrobluetetrazolium (NBT)

Zentiva A.S., Česká republika

Heparinum natricum

3.2 Použité přístroje

Analytické váhy

Discovery, Ohaus Corp (USA)

Automatické pipety

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

Blotovací systém

Trans-Blot[®] Turbo Transfer Systém, Bio-Rad (USA)

Centrifugy

Allegra X-30R Centrifuge (USA); Centrifuge 5418, Eppendorf (Německo); Hermle LaborTechnik GmbH Z 383 K (Německo); Optima XPN-90 (USA); Spectrafuge Mini Centrifuge C1301B, Labnet International, Inc. (USA)

Inkubátory

Thermomixer compact, Eppendorf (Německo)

Laboratorní míchadlo

IKA RW 16 basic overhead stirrer (Německo)

Laboratorní třepačka

Vortex Genius 3, IKA-Werke GmbH & Co. KG (Německo)

Magnetická míchačka

Monotherm, Variomag (Německo)

pH metr

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

Sonikátor

Elmasonic E 30 H, P-Lab (Česká republika)

Spektrofotometr

Cary 60 UV-Vis (Agilent Technologies, USA)

Předvážky

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

Vodní lázeň

EL 20R, KAVALIER (Česká republika)

Zdroj pro elektroforézu

PowerPac Basic, Bio-Rad (USA)

3.3 Metody

3.3.1 Premedikace potkanů / stanovení koncentrace ethanolu a acetaldehydu v krvi potkanů

Deset dospělých samců potkanů (značených R1-R10) stáří 7-12 týdnů kmene Wistar (Anlab, Německo) o hmotnosti 300-400 g bylo aklimatizováno ve standardních klecích při laboratorní teplotě a 12 hodinovém světelném režimu. Pokus proběhl v souladu s vyhláškou Ministerstva zemědělství č. 311/1997 Sb., o chovu a využití pokusných zvířat a byl schválen Odbornou komisí pro práci s pokusnými zvířaty 1. LF UK.

Zvířata byla rozdělena do tří skupin. První den byl potkanům R1, R4, R6, R7 gaváží do žaludku podán 40 % ethanol a potkanům R2, R3, R8 a R10 obdobně podán 40 % ethanol v kombinaci s 0,8M dihydromyricetinem. V časových intervalech 5 minut, 15 minut, 30 minut a 60 minut po gaváži byla zvířata uspána oxidem uhličitým a byla jim odebrána krev. Krev z oka se odebírala skleněnou kapilárou potaženou Heparinem. Zvířeti R5 nebylo nic podáváno a jeho krev sloužila pro kalibraci. Druhý den byly potkani R1-R4 premedikováni 40 % ethanolem a byla jim znova odebrána krev ve stejných časových intervalech spolu s potkanem R5. Zvíře R9 nebylo během pokusu premedikováno a ani uspáváno a sloužilo jako kontrola. Potkani R1, R2, R3, R4, R5 a R9 byly následně usmrceni a jejich játra byla vyjmuta. Játra byla ihned zmrazena a uskladněna při teplotě -80 °C. Odebrané vzorky krve byly poslány na Ústav soudního lékařství na analýzu koncentrace ethanolu a acetaldehydu. Všechna zvířata byla před zahájením pokusu 12 hodin bez přístupu k potravě. Tento experiment byl prováděn ve spolupráci s Bc. Gabrielou Boubínovou.

3.3.2 Preparace mikrosomální frakce

Pufir B1: 0,15 M KCl; 0,05 M Tris/HCl; pH 7,4; tokoferol v methanolu (v konečné koncentraci 50 μM)

Pufir B2: 0,1 M Na₄P₂O₇·10H₂O (upraven na pH 7,2 HCl)

Pufir B3: 0,15 KCl; 0,05 M Tris/HCl; 20 % (v/v) glycerol; pH 7,4

Mikrosomální frakce byly připraveny z jater potkanů R1, R2, R3, R4, R5 a R9. Po usmrcení potkanů byla játra ihned vyjmuta a uskladněna při teplotě -80 °C.

Pro izolaci mikrosomálních frakcí jater potkanů byla použita diferenční centrifugace [72]. Celý proces izolace byl proveden ve chlazené místnosti při 4 °C, všechny pufry a použité materiály byly předem vychlazeny. Kousky mražených jater byly odváženy, nastříhány nůžkami a důkladně promyty pufrem B1. Následně byly jaterní tkáň homogenizovány v pufru B1 pomocí homogenizátoru Potter-Elvehjem. Objem pufru B1 byl stanoven podle na hmotnosti jaterní tkáň. Pro každý 1 g jaterní tkáň bylo použito 4 ml pufru B1. Homogenát byl centrifugován při 600×g po dobu 10 minut při teplotě 0–5 °C (centrifuga Hermle LaborTechnik GmbH Z 383 K). Supernatanty byly dále centrifugovány při 15 000×g po dobu 20 minut při teplotě 0–5 °C (centrifuga Allegra X-30R). Supernatanty byly opatrně odebrány a dále centrifugovány na ultracentrifuze při 123 000×g po dobu 90 minut při teplotě 4 °C (ultracentrifuga Optima XPN-90). Supernatanty (cytosolová frakce) byly ihned zmrazeny a uloženy při -80 °C. Pelety se resuspendovaly a následně homogenizovaly pomocí malého Potter-Elvehjem homogenizátoru v pufru B2 (pro každý původní 1 g tkáň bylo použito 2 ml pufru B2). Homogenizát se poté centrifugoval na ultracentrifuze při 425 000×g po dobu 90 minut při 4 °C (ultracentrifuga Optima XPN-90). Po odstranění supernatantu se mikrosomy opatrně oddělily od glykogenu a resuspendovaly v pufru B3 (na 1 g tkáň bylo použito 800 µl pufru B3). Z mikrosomálních frakcí byly vytvořeny alikvoty a ty byly ihned zmrazeny a uskladněny při -80 °C.

3.3.3 Stanovení koncentrace proteinů v mikrosomálních frakcích pomocí Lowryho metody

Stanovení koncentrace proteinů v mikrosomálních frakcích bylo provedeno pomocí Lowryho metody [73].

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

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

Při Lowryho metodě se využívá chelatace měďnatého iontu imidovými strukturami polypeptidového řetězce v alkalickém prostředí, k čemuž přispívá redukce Folin-Ciocalteu činidla (směs kyseliny fosfowolframové a kyseliny fosfomolybdenové) tyrosinovými zbytky

bílkovin. Roztok činidla se zabarvují modře. Zbarvení se pak měří spektrofotometricky při 650 nm [73].

Takto byla stanovena celková koncentrace proteinů vzorků zpracovaných v kapitole 3.3.2. Pracovalo se v duplikátech. K 10 μ l mikrosomální frakce bylo přidáno 190 μ l destilované vody a následně 200 μ l roztoku A. Vzorky byly promíchány na laboratorní třepačce (Vortex Genius 3) a 10 minut inkubovány ve vodní lázni (EL 20R, KAVALIER) při 50°C. Po inkubaci bylo ke všem roztokům přidáno 20 μ l roztoku B, opět bylo vše promícháno a inkubováno 10 minut za laboratorní teploty. Na závěr bylo dávkováno 600 μ l Folin-Ciocalteauova činidla zředěného 1 : 14 destilovanou vodou. Finální roztok byl inkubován 10 minut při 50 °C. Po ochlazení vzorků na laboratorní teplotu byla změřena jejich absorbance při 650 nm spektrofotometrem Cary 60 UV-Vis. Následně byla ze zásobního roztoku BSA o koncentraci 0,1 mg/ml připravena kalibrační řada roztoků (viz obrázek č. 5, strana 35) a proměřena výsledná absorbance při 650 nm stejným způsobem.

3.3.4 Diskontinuální elektroforéza na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíranu sodného

Použité roztoky:

Pufr A: 1,5 M Tris/HCl; pH 8,8

Polymerizační roztok A: 30 % (w/v) akrylamid; 0,8 % (w/v) bis-akrylamid; v pufru A

Pufr B: 1,5 M Tris/HCl; pH 6,5

Polymerizační roztok B: 30 % (w/v) akrylamid; 0,8 % (w/v) bis-akrylamid; v pufru B

Vzorkový pufr: 0,25 M Tris/HCl; 8 % (w/v) SDS; 20 % (v/v) 2-merkapt ethanol, 40 % (v/v) glycerol; 0,004% (w/v) bromofenolová modř; pH 6,8

Elektrodový pufr: 0,192 M glycin; 0,025 M Tris/HCl; pH 8,3; 0,1 % (w/v) SDS

Příprava 4 gelů:

Separační gel 10 %: 7,9 ml destilovaná voda; 5,0 ml pufr A; 6,7 ml polymerizační roztok A; 8,0 μ l tetramethylethylendiamin (TEMED); 200 μ l (100 mg/ml) dodecylsulfát sodný (SDS); 200 μ l (100 mg/ml) peroxodisíran amonný (APS)

Zaostřovací gel 4 %: 3,6 ml destilovaná voda; 630 μ l pufr B; 667 μ l polymerizační roztok B; 5,0 μ l TEMED; 50 μ l (100 mg/ml) SDS; 50 μ l (100 mg/ml) APS Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíranu sodného (SDS-PAGE) se používá

k rozdělení složek proteinové směsi na základě jejich molekulové hmotnosti. Polyakrylamidový gel slouží jako nosné a separační médium a dodecylsírán funguje jako aniontový detergent sloužící k denaturaci proteinů. Bílkoviny pokryté SDS jsou záporně nabitě a při použití elektrického pole jsou silně přitahovány k anodě (kladně nabitá elektroda). Roztok pro separační gel byl nanesen mezi dvě skla ($10 \times 8,2$; $10 \times 7,4$ cm; 1 mm) a překryt vodou, aby nedošlo k vysušení. Dále byl ponechán polymerizovat 30 minut. Následně byl na separační gel nanesen roztok pro zaostřovací gel a mezi "spacery" byl vložen hřeben pro vytvoření deseti jamek. Roztok se nechal polymerizovat 15 minut při laboratorní teplotě. Gel byl vložen do aparatury pro elektroforézu, která byla naplněna elektrodoým pufrem po vyznačenou úroveň na aparatuře. Mikrosomální vzorky byly ředěny s vodou na finální koncentraci $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ a dále smíchány se vzorkovým pufrem v poměru 3 : 1. Všechny vzorky byly ponechány ve vodní lázni při $100 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 5 minut. Připravené vzorky (20 μl) a marker (5 μl) byly nanесeny do jamek gelu pomocí automatické pipety. Elektroforéza probíhala při konstantním napětí 200 V po dobu 80 minut. Pracovalo se v kvadruplikátech. Dva gely se separovanými proteiny byly vizualizovány pomocí barviva Coomassie Brilliant Blue. Další dva gely byly použity pro Western blotting.

3.3.5 Barvení polyakrylamidového gelu pomocí barviva Coomassie Brilliant Blue

Použité roztoky:

Barvicí lázeň: 0,25 % (w/v) 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

Dva polyakrylamidové gely obsahující separované proteiny byly při mírném třepání barveny barvicí lázní po dobu 1 hodiny při laboratorní teplotě. Následně došlo k odbarvení gelů přes noc v odbarvovací lázni.

3.3.6 Western blot s následnou imunodetekcí

Použité roztoky:

Přenosový pufr: 0,025 M Tris; 0,192 M glycin; pH 8,3; 10 % (v/v) methanol

PBS Triton X-100: 0,134 M NaCl; 1,8 mM Na_2HPO_4 ; 1 mM Na_2HPO_4 ; pH 7,2; 0,3 % (w/v) Triton X-100

Blokovací roztok: 5 % (w/v) sušené mléko v PBS Triton X-100

Vyvolávací roztok: 20 ml Tris/HCl; 15 mM NaCl; 1 mM MgCl₂; 10 mM NaN₃; pH 9; 132 µl nitro-blueterazolium chlorid; 66 µl 5-bromo-4-chloro-3'-indolylfosfát-p-toluidin

Western blot je metoda používaná pro určení relativního množství bílkoviny nacházející se ve vzorcích. Po elektroforéze jsou separované mikrosomální proteiny převedeny elektropřenosem na membránu a pomocí specifických protilátek vizualizovány.

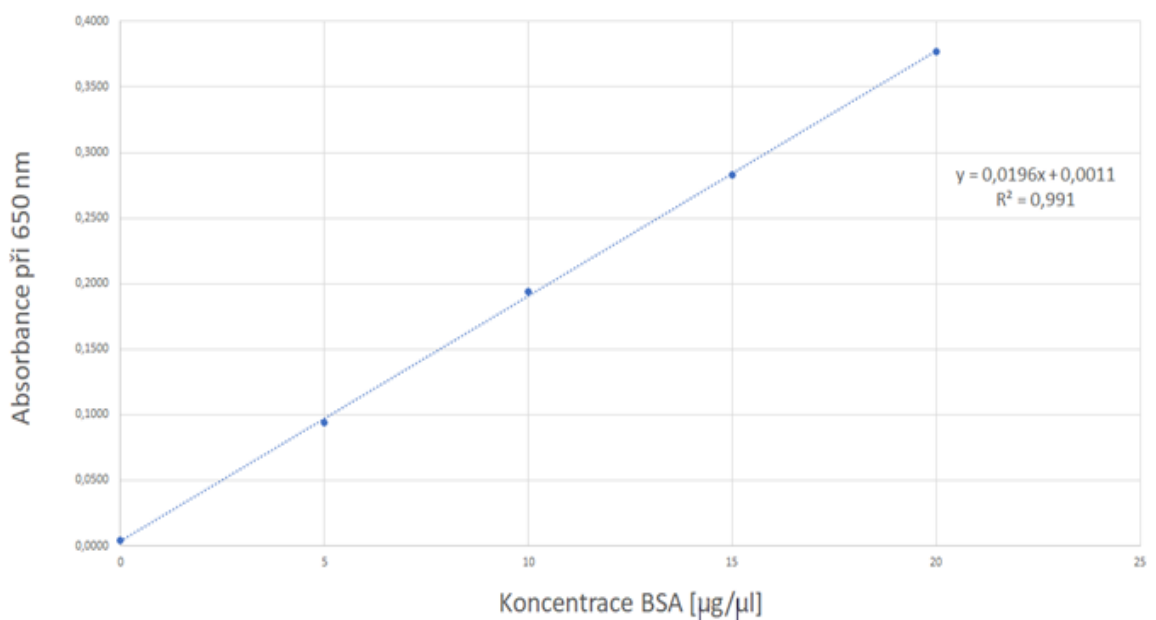
Gel se separovanými proteiny byl 30 minut při mírném třepání ekvilibrován s přenosovým pufrem. Mezitím byla nitroceluloseová membrána a filtrační papíry (Whatman #3) rozstříženy na rozměry odpovídající velikosti gelu. Nitroceluloseová membrána byla aktivovaná namočením do destilované vody po dobu 5 minut a následně do přenosného pufru na 15 minut při laboratorní teplotě. Filtrační papíry byly smočeny v přenosovém pufru. Do kazety pro blotování byly položeny tři filtrační papíry a nitroceluloseová membrána. Na membránu byl položen gel, který byl pokryt zbylými třemi filtračními papíry. Pomocí válečku na blot se odstranily bubliny mezi papíry. Kazeta byla vložena do blotovacího přístroje Trans-Blot® Turbo. Proteiny byly přeneseny při konstantním napětí 25 V po dobu 15 minut.

Po ukončení přenosu byla membrána blokována v blokovacím roztoku po dobu 1 hodiny při 4 °C při mírném třepání. Tím se zabránilo nespecifickému vázání primární protilátky na membránu. Následně byla membrána přes noc inkubována se specifickou primární protilátkou (králičí protilátka proti CYP2E1) při 4 °C a mírném třepání. Primární protilátka byla dle doporučení výrobce ředěna 1 : 5000 blokovacím roztokem. Další den byla membrána 4× promyta blokovacím roztokem a poté inkubována po dobu 1 hodiny se sekundární protilátkou (kozí IgG protilátka proti IgG králíka) s konjugovanou alkalickou fosfataseou) při 4 °C při mírném třepání. Sekundární protilátka byla ředěna dle doporučení výrobce 1 : 30000 blokovacím roztokem. Po inkubaci byla membrána opět 5× promyta blokovacím roztokem a 5× PBS Triton-X100. K vizualizaci proteinů na membráně byla membrána inkubovaná ve vyvolávacím roztoku po dobu 5 minut. Vizualizace se ukončila promytím membrány destilovanou vodou a po vysušení byly pořízeny fotografické snímky obou membrán. Výsledky byly zpracovány programem Image Lab 6.1.0.7 společnosti Bio-Rad Laboratories.

4 Výsledky

4.1. Izolace mikrosomálních frakcí jater potkanů

Mikrosomální frakce byly izolovány z jater potkanů premedikovaných první den ethanolem nebo ethanolem v kombinaci s dihydromyricetinem a druhý den pouze ethanolem, jako bylo popsáno v kapitole 3.3.1. Koncentrace celkového množství proteinů v mikrosomálních preparátech byla stanovena pomocí Lowryho metody (viz Tabulka č. 1).



Obrázek č. 4 – Kalibrační křivka pro stanovení koncentrace proteinů v mikrosomálních frakcích pomocí Lowryho metody. Zředěním zásobního roztoku BSA v destilované vodě (1 mg/ml) byla připravená kalibrační řada. Z naměřených absorbancí byla sestrojena kalibrační křivka pro stanovení koncentrace proteinu v mikrosomálních frakcích.

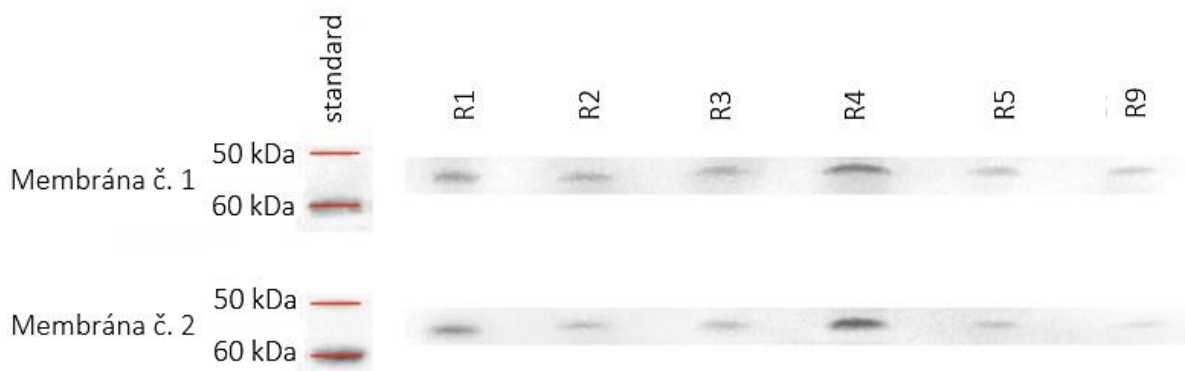
Vzorky	c1 [mg/ml]	c2 [mg/ml]	c _{průměrná} [mg/ml]	c _{původní} [mg/ml]
R1	33,92	32,81	33,36	133,46
R2	17,81	17,34	17,57	70,30
R3	41,58	43,11	42,34	169,38
R4	18,21	38,90	28,56	114,22
R5	39,10	22,94	31,02	124,07
R9	32,32	32,78	32,55	130,19

Tabulka č. 1: Koncentrace proteinu v mikrosomálních frakcích jater

c1 – koncentrace prvního vzorku z duplikátu, c2 – koncentrace druhého vzorku z duplikátu, c_{průměrná} – průměrná koncentrace roztoku c1 a c2, c_{původní} – původní koncentrace v mikrosomálních frakcích po vynásobení použitým ředěním.

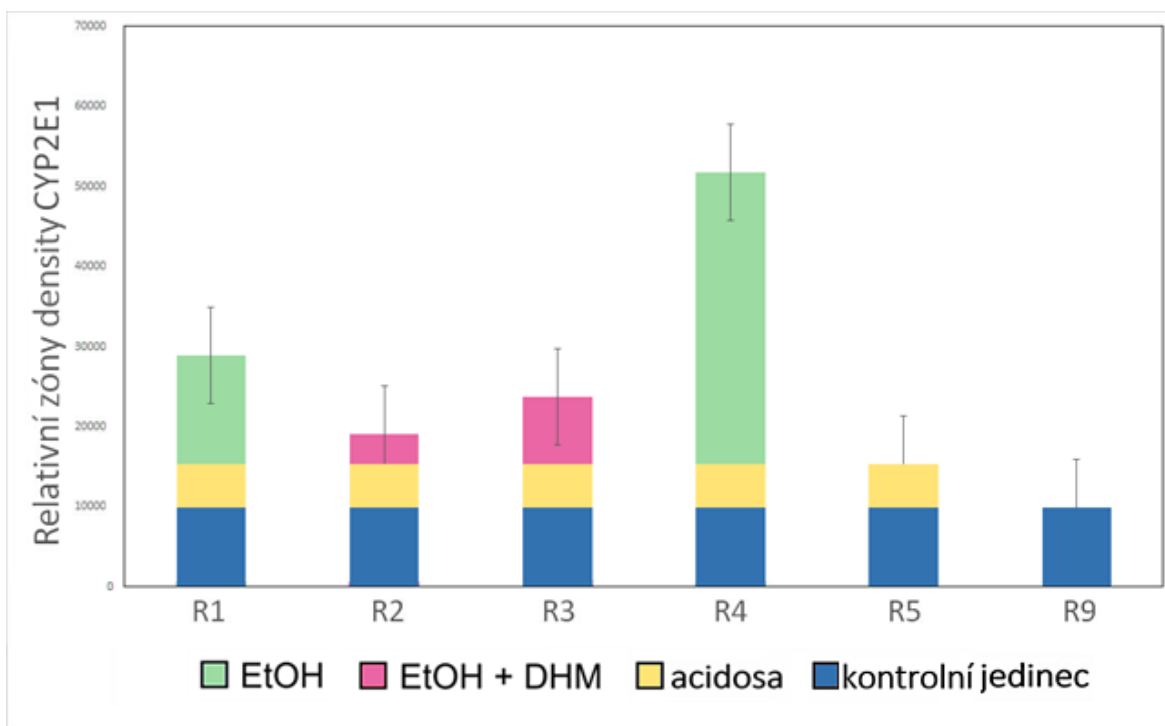
4.2 Expres CYP2E1 v mikrosomálních frakcích jater potkanů

Přítomnost enzymu CYP2E1 v jaterních mikrosomálních frakcích byla zjišťována metodou Western blotu (viz obrázek č. 5). Zvýšená exprese CYP2E1 bylo pozorováno pouze u vzorku R4. Vzorky R1, R2 a R3 mají srovnatelné hladiny CYP2E1. Z výsledků je patrné, že DHM expresi CYP2E1 ovlivňuje pouze minimálně.



Obrázek č. 5: Western blot mikrosomálních jaterních frakcích po detekci CYP2E1. Do jamek 10 % polyakrylamidového gelu byly nanášeno 10 µg proteinu. Byly použity mikrosomální frakce jater potkanů, kterým byl gavážně podáván ethanol (R1 a R4) nebo ethanol v kombinaci s DHM (R2 a R3). Druhý den byla zvířata opětovně premedikována 40 % EtOH. Mikrosomální frakce potkana R5 pouze uspávaného CO₂ sloužila jako pro zjištění vlivu acidosis na expresi CYP2E1. Jako další kontrola byla použita mikrosomální frakce

neovlivněného jedince (R9). Membrány č. 1 a 2 obsahovaly stejné vzorky a byly identicky zpracovány.



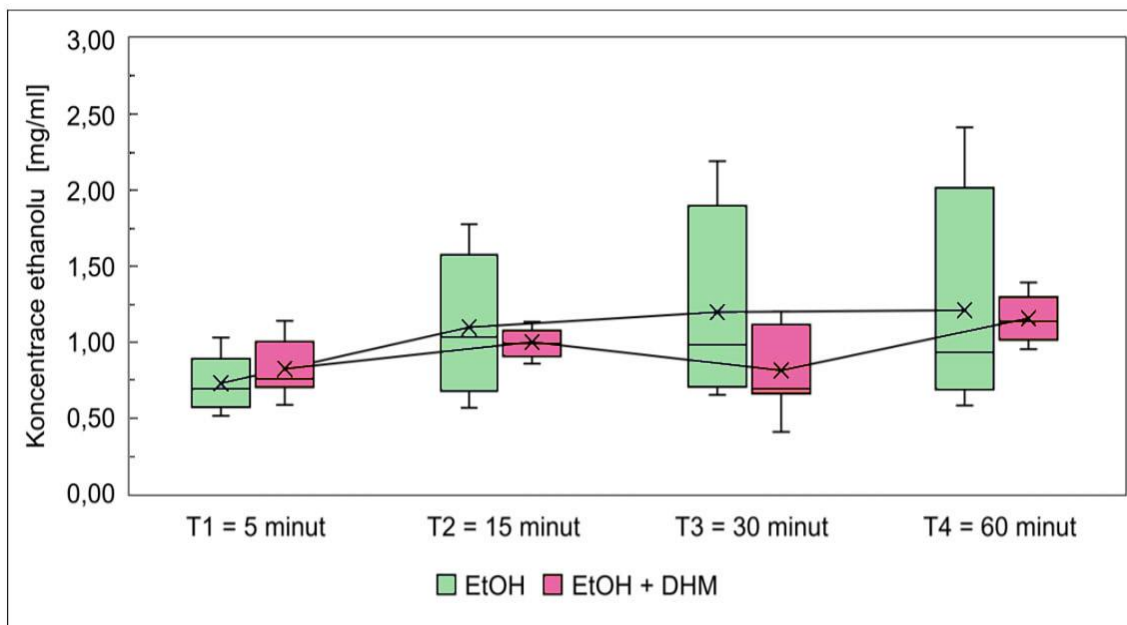
Obrázek č. 6: Relativní densita zón CYP2E1 jednotlivých jaterních frakcí. Zvířata R1 a R4 byla prvně premedikována 40 % EtOH s DHM a druhý den 40 % EtOH. Zvířata R2 a R3 byla oba dny premedikována pouze 40 % EtOH. U vzorku R5 lze pozorovat vliv acidosa na expresi CYP2E1. Kontrolní zvíře (R9) reprezentuje konstitutivní hladinu CYP2E1. Přibližné množství CYP2E1 vzniklé vlivem acidosa je značeno žlutě a množství CYP2E1 běžně se nacházející v kontrolním jedinci je značeno modře. Vzniklé množství CYP2E1 vlivem EtOH je značeno zeleně a množství CYP2E1 vzniklé vlivem EtOH v kombinaci s DHM je značeno růžově. Denzitometrické vyhodnocení bylo provedeno pomocí programu Image Lab 6.1.0.7 společnosti Bio-Rad Laboratories.

Obrázek č. 6 ukazuje analýzu relativní zastoupení CYP2E1 v jednotlivých mikrosomálních frakcích. Jedinec exponovaný jen oxidu uhličitému (R5) vykazuje o 53 % vyšší hodnoty CYP2E1 ve srovnání s kontrolním jedincem (R9). Byl vypočítán procentuální rozdíl mezi vzorky premedikovaných 40 % EtOH v kombinaci s DHM (R2 a R3) a vzorky premedikovaných pouze 40 % EtOH (R1 a R4) odečítáním přibližného množství CYP2E1

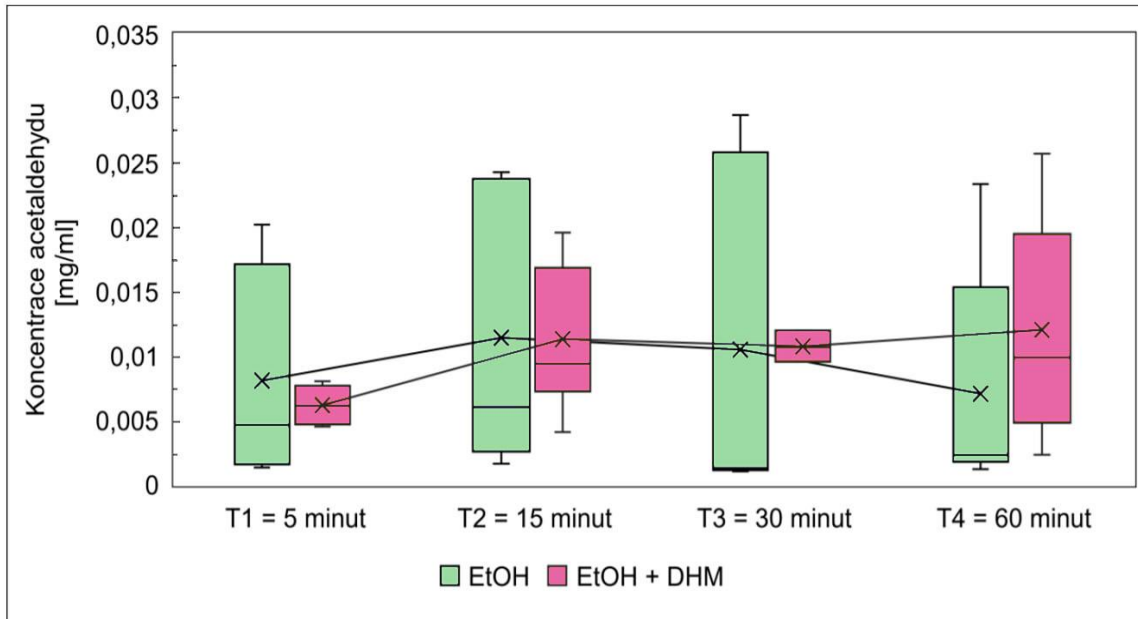
nacházejícího se v kontrolním jedinci (značeno modře, viz obrázek č. 6 str. 36) vzniklého acidósu (značeno žlutě, viz obrázek č. 6 str. 36). V jaterních mikrosomálních frakcích R2 a R3 je v průměru o 75,5 % méně CYP2E1 než v mikrosomálních frakcích R1 a R4.

4.3 Koncentrace ethanolu a acetaldehydu v krvi potkanů

Byl monitorovaný vliv dihydromyricetinu na koncentraci ethanolu a acetaldehydu v krvi potkanů při jednorázové a opakované premedikování EtOH (viz kapitola 3.3.1, str. 29). Pokusná zvířata byla rozdělena do dvou skupin a byl jim podán gaváž 40 % EtOH nebo 40 % EtOH s přídatkem DHM (o koncentraci 0,8 M). Krev jim byla odebrána z oka v časových intervalech 5, 15, 30 a 60 min a stanovená koncentrace obou analytů. Opakovaná premedikace 40 % EtOH probíhala za stejných podmínek na polovině potkanů z obou skupin (viz kapitola 3.3.1 str. 29). U skupiny potkanů premedikovaných EtOH lze pozorovat mírný kontinuální nárůst koncentrace EtOH v krvi. Ve 30. minutě se koncentrace EtOH stabilizuje a v 60. minutě se koncentrace EtOH téměř nemění. U skupiny zvířat premedikovaných EtOH s přídatkem DHM je patrný určitý pokles koncentrace EtOH v krvi při 30 min, která znovu narůstá při 60 min (viz obrázek č. 7, str. 38).

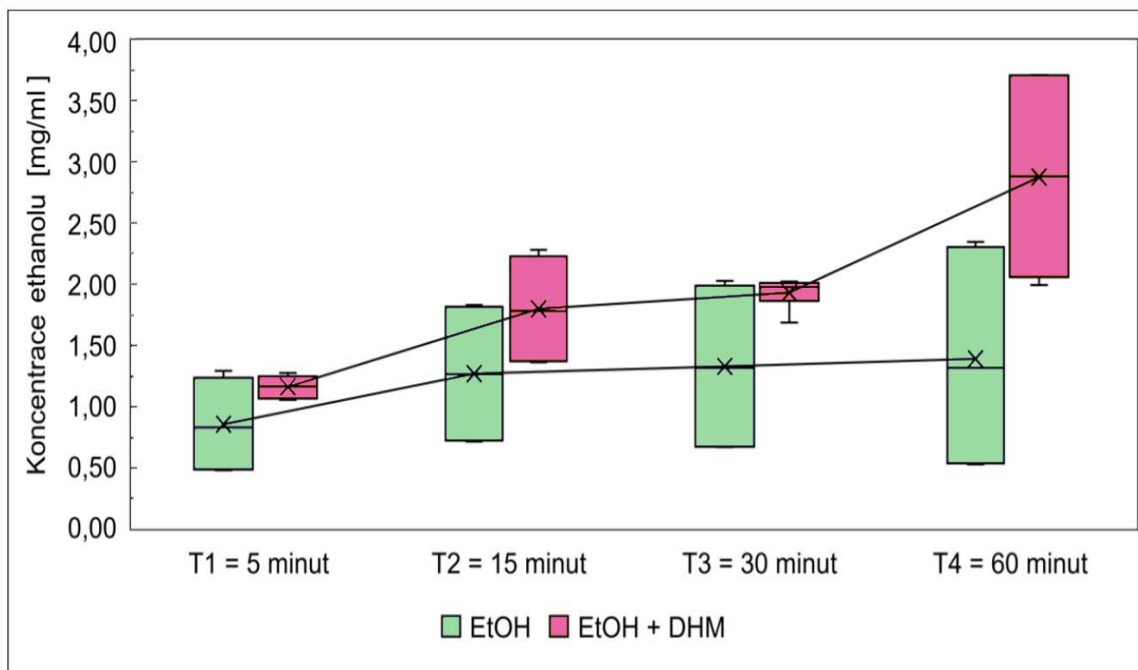


Obrázek č. 7 – Koncentrace EtOH v krvi potkanů v závislosti na čase při jednorázovém podání. Potkani byli rozděleny do dvou skupin. První skupině (n=4) byl podán 40 % EtOH. Druhé skupině (n=4) byl podán EtOH v kombinaci s DHM. Vzorky krve byly odebrány z oka v časových intervalech 5, 15, 30 a 60 minut po podání gaváže. Koncentrace ethanolu v krvi byla stanovena plynovou chromatografií (v triplikátech) na Ústavu soudního lékařství. Ethanol se v organismu oxiduje na acetaldehyd. Současně s ethanolem byla též změřena koncentrace aldehydu v krvi v daných časových úsecích. Výsledky byly vyneseny do grafu (viz obrázek č. 8, str. 39). Účinek DHM na odbourávání acetaldehydu nebyl pozorován.



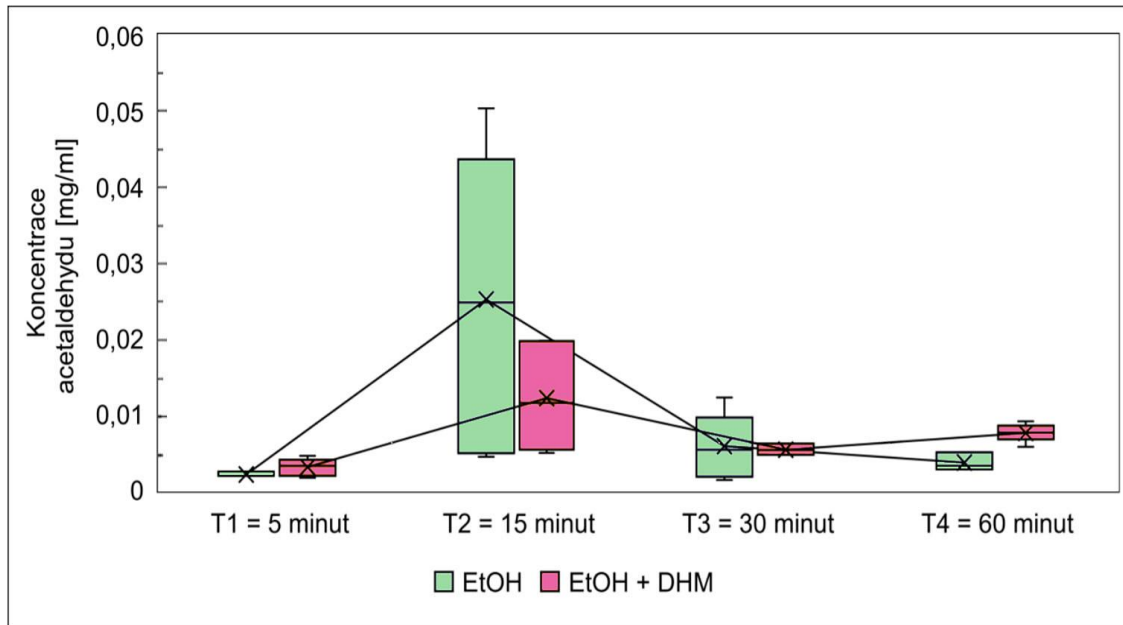
Obrázek č. 8 – Koncentrace acetaldehydu v krvi potkanů v závislosti na čase po prvním podání ethanolu. Koncentrace acetaldehydu v krvi byla měřena v časových intervalech 5, 15, 30 a 60 minut po podání gaváže. Koncentrace acetaldehydu v krvi byla stanovena plynovou chromatografií (v triplicátech) na Ústavu soudního lékařství.

Vliv dihydromyricetinu při opakovaném podání EtOH byl testován následující den (viz 3.3.1 str. 29). Skupina potkanů, která první den byla premedikována 40 % EtOH s kombinací DHM vykazuje po opakovaném podání 40 % EtOH vyšší koncentraci EtOH v krvi než skupina zvířat nevystavená DHM. Koncentrace EtOH v krvi potkanů, kteří byli opakovaně premedikováni EtOH vykazuje podobný průběh metabolismu EtOH jako první den (viz obrázek č. 9, str. 40). Koncentrace EtOH se po 15. minutě stabilizuje a dále se již nemění.



Obrázek č. 9 – Koncentrace EtOH v krvi potkanů v závislosti na čase po opakovaném podání ethanolu. Polovina (n=2) obou skupin zvířat byla druhý den znova premedikována 40 % EtOH a byla jim odebrána krev z oka v časových intervalech 5, 15, 30 a 60 minut. Koncentrace EtOH v krvi byla stanovena plynovou chromatografií (v triplikátech) na Ústavu soudního lékařství.

Krev potkanů prvně premedikovaných 40 % EtOH v kombinaci s DHM vykazuje značně nižší koncentrace acetaldehydu po opětovné premedikaci 40 % EtOH při 15 min než skupina potkanů vystavených pouze 40 % EtOH (viz obrázek č. 10, str. 41). Po uplynutí 15 min koncentrace acetaldehydu v krvi potkanů opakovaně premedikovaných pouze 40 % EtOH klesá. Koncentrace acetaldehydu u skupiny potkanů premedikovaných EtOH+DHM při 30 min výrazně klesá a při 60 min mírně narůstá (viz obrázek č. 10, str. 41).



Obrázek č. 10 – Koncentrace acetaldehydu v krvi potkanů v závislosti na čase po opakovaném podání ethanolu. Polovina (n=2) obou skupin zvířat byla druhý den opětovně premedikována 40 % EtOH a byla jim odebrána krev z oka v časových intervalech 5, 15, 30 a 60 minut. Koncentrace acetaldehydu v krvi byla stanovena plynovou chromatografií (v triplikátech) na Ústavu soudního lékařství.

5 Diskuse

Nadměrná konzumace alkoholu (ethanolu) je významnou příčinou chronického onemocnění jater jako je hepatitis, cirhóza jater a hepatocelulární karcinom. Dihydromyricetin (DHM) je flavonoid používaný v čínské tradiční medicíně. Tato fytochemikálie je známa pro své pozitivní účinky na zdraví člověka. Navíc se DHM také používá při intoxikaci alkoholem, ke zmírnění příznaků kocoviny a potenciálně může chránit i před chemickým poškozením jater. Podkladem pro tuto bakalářskou práci byly studie zabývající se vlivem DHM na metabolismus EtOH [69] a vlivem DHM na CYP2E1 [70]. Cílem předkládané bakalářské práce bylo ověřit působení DHM na koncentraci CYP2E1 a otestovat hypotézu, která uvádí DHM jako látku urychlující metabolismu EtOH za podmínek *in vivo*.

V předkládané bakalářské práci byl sledován vliv DHM na metabolismus ethanolu. Pro tento účel byla měřena koncentrace EtOH a acetaldehydu v krvi potkanů. Jako pokusný model byli vybráni potkaní samci kmene Wistar. Zvířata byla rozdělena do dvou skupin. První skupině byla podána gaváž s 40 % EtOH a druhé skupině 40 % EtOH s přídavkem DHM (o koncentraci 0,8 M). Zvířata byla uspána oxidem uhličitým a krev jim byla odebrána z oka v časových intervalech 5 min, 15 min, 30 min a 60 min. Získané výsledky (viz obrázek č. 7, str. 38) však nepotvrdily závěry studie [69], která prokazovala schopnost DHM snižovat koncentrace EtOH v krvi. Získané výsledky předložené práce ukazují, že DHM neovlivňuje ani koncentraci EtOH ani koncentraci acetaldehydu v krvi. Koncentrace EtOH v krvi potkanů premedikovaných 40 % EtOH s DHM výrazně klesne při 30. minutách. Fenomén může souviset se schopností DHM ovlivňovat redoxní rovnováhu buňky. Studie prokázala, že dihydromyricetin ovlivňuje redoxní stav buněk lidského karcinomu pomocí snižování koncentrace ROS [55]. Neshoda získaných výsledků s publikovanými daty [71] mohou být způsobeny biologickou interindividuální variabilitou a tolerancí potkanů na alkohol potkanů. Rozpor lze též připsat podáním EtOH jedincům rozdílnou formou než ve zmíněné publikaci. V předkládané práci se pro přesnější simulaci orálního požití ethanolu použila gaváž do žaludku na rozdíl od intraperitoneálního podání uvedeného v publikaci. Intraperitoneální podání EtOH u hlodavců jako metoda modelování účinku expozice alkoholu není vhodné, protože neodpovídá běžnému způsobu konzumace alkoholu u lidí [74]. Způsob, který byl zvolen pro řešení této práce, je rozhodně pro extrapolaci výsledků na člověka správnější.

V následujících experimentech byl zjišťován vliv DHM na metabolismus EtOH a acetaldehydu při kumulativní intoxikaci. Polovina jedinců z obou skupin potkanů byla opětovně premedikována 40 % EtOH a byla jim odebrána krev z oka v průběhu 60 min. Koncentrace EtOH v krvi potkanů, kteří byli první den vystaveni ethanolu v kombinaci s DHM byla významně vyšší (viz obrázek 9, str. 40) než koncentrace u jedinců premedikovaných pouze alkoholem. Ze získaných výsledků je patrné, že expozice DHM zpomaluje metabolismus EtOH při opakovaném podání. Tento efekt DHM nebyl v obdobných studiích dosud zjištěn ani publikován. Koncentrace acetaldehydu při opakované premedikaci 40 % EtOH výrazně stoupá v 15 min a opět klesá v 30. min. V 60. minutě koncentrace acetaldehydu znova mírně narůstá. U pacientů postižených alkoholem indukovanou jaterní chorobou dochází k redukci aktivity cytosolární aldehyddehydrogenasy, což může způsobit pozorovanou fluktuaci koncentrace acetaldehydu [75].

Alkoholdehydrogenasa (ADH) je hlavním enzymem oxidujícím ethanol na acetaldehyd. Pro oxidaci EtOH ADH systém vyžaduje kofaktor NAD^+ , který přijímá vodík a redukuje se na NADH, což zvyšuje poměr NADH/NAD^+ a přispívá tak k steatóze jater [76]. Na rozdíl od ADH systému, který potřebuje koenzym NAD^+ , CYP2E1 vykazuje vysokou aktivitu NADPH oxidasy způsobenou slabým spojením s NADPH-cytochrom P450 reduktasou [77], což dále vede k produkci reaktivních forem kyslíku, které poškozují jaterní buňky.

V druhé části předkládané bakalářské práce byl sledovaný vliv DHM na expresi CYP2E1 *in vivo*. Pro zjištění vlivu DHM na expresi CYP2E1 byli izolovány jaterní mikorsomy z potkanů premedikovaných EtOH. Potkanům byl gaváží podáván buď 40% roztokem EtOH nebo 40 % EtOH s přídatkem DHM (o koncentraci 0,8 M). Druhý den byli premedikováni 40 % EtOH. Proteiny jednotlivých mikrosomálních frakcí byli separováni pomocí diskontinuální elektroforézy. Relativní množství CYP2E1 bylo zjištěno pomocí metody Western blot. Byla pozorována zvýšená hladina CYP2E1 u všech jedinců (R1, R2, R3, R4), kterým byl podán ethanol, což svědčí o schopnosti ethanolu indukovat expresi CYP2E1 [78]. Nejvyšší exprese CYP2E1 byla pozorována v jaterní mikrosomální frakci potkana R4 (viz obrázek č. 6, str. 36) Vzhledem k možné chybě při stanovení koncentrace proteinu v tomto roztoku, nemusí být tento výsledek zcela relevantní. Tento předpoklad potvrzuje porovnání se vzorkem R1 z obdobně premedikovaného potkana, kde je patrný určitý nárůst obsahu

CYP2E1 vzhledem k odpovídající kontrole R5, ale podstatně nižší než u vzorku R4.

Dihydromyricetin nevykazuje schopnost urychlovat metabolismus ethanolu, a tak snižovat koncentraci ethanolu a acetaldehydu v krvi. Při opakovaném vystavení EtOH metabolismus alkoholu dokonce zpomaluje. Dihydromyricetin ovšem patrně snižuje koncentraci CYP2E1 při intoxikaci EtOH. Protože experimenty byly provedeny na potkaním modelu, nejsou tyto výsledky zcela přenositelné na lidský organismus. Před pokusy s lidskými subjekty bude třeba účinky DHM na metabolismus alkoholu dále studovat na vhodném modelovém systému.

6 Souhrn

Předložená bakalářská práce se věnovala vlivu dihydromyricetinu na biotransformační enzym CYP2E1 a na metabolismus ethanolu *in vivo*. Provedené studie poskytly následující výsledky:

- Byly izolovány jaterní mikrosomální frakce potkanů premedikovaných ethanolem, kterým byl dříve podán samotný ethanol nebo ethanol v kombinaci s dihydromyricetinem.
- V jaterních mikrosomálních frakcích zvířat ošetřených DHM bylo zjištěno snížené množství CYP2E1, což svědčí o schopnosti DHM inhibovat expresi CYP2E1 v přítomnosti EtOH.
- Časový průběh metabolismu EtOH u potkanů vystavených samotnému EtOH a EtOH s DHM byl srovnatelný. Nebyl tedy prokázán stimulační efekt DHM.
- U potkanů vystavených DHM, kterým byl opakovaně podán EtOH druhý den, byl metabolismus EtOH viditelně zpomalen oproti skupině bez DHM.

7 Použitá literatura

- [1] Sher, K., Wood, M. D., (2005) Subjective Effects of Alcohol II: Individual Differences. In *Mind-Altering Drugs: The Science of Subjective Experience*. Oxford University Press. s. 135–153.
- [2] Lovinger, D. M., (2008) Communication networks in the brain: Neurons, receptors, neurotransmitters, and alcohol. *Alcohol Research & Health*. s. 196–214.
- [3] Caballería, J., (2003) Current concepts in alcohol metabolism. *Ann. Hepatol.* s. 60–68.
- [4] T.-M. Leung a N. Nieto., (2013) CYP2E1 and oxidant stress in alcoholic and non-alcoholic fatty liver disease. *J. Hepatol.* **58**, s. 395–398.
- [5] Shimada, T., Yamazaki, H., Mimura, M., Inui, Y., Guengerich, F. P., (1994) Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens, and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **270**, s. 414–423.
- [6] Forrester, L. M., Henderson, C. J., Glancey, M. J., Back, D. J., Park, B. K., Ball, S. E., Kitteringham, N. R., McLaren, A.W., Miles, J. S., Skett, P., Wolf, C. R., (1992) Relative expression of cytochrome P450 isoenzymes in human liver and association with the metabolism of drugs and xenobiotics. *Biochem. J.* **281**, s. 359–368.
- [7] Deitrich, R., Zimatkin, S., Pronko, S., (2006) Oxidation of ethanol in the brain and its consequences. *Alcohol Res. Health J. Natl. Inst. Alcohol Abuse Alcohol.* **29**, s. 266–73.
- [8] Liu, Y., Fiskum, G., Schubert, D., (2002) Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *J. Neurochem.* **80**, s. 780–787.
- [9] Lemasters, J. J., Holmuhamedov, E. L., Czerny, C., Zhong, Z., Maldonado, E. N., (2012) Regulation of mitochondrial function by voltage dependent anion channels in ethanol metabolism and the Warburg effect. *Biochim. Biophys.* **1818**, s. 1536–1544.
- [10] Laposata, M., (1999) Fatty acid ethyl esters: current facts and speculations. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.* **60**, s. 313–315.
- [11] Wurst, F. M., Thon, N., Yegles, M., Schrück, A., Preuss, U. W., Weinmann, W., (2015) Ethanol metabolites: their role in the assessment of alcohol intake. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **39**, s. 2060–2072.
- [12] Werner, J., Saghir, M., Warshaw, A. L., Lewandrowski, K. B., Laposata, M., Iozzo, R. V., Carter, E. A., Schatz, R. J., Fernández-Del Castillo, C., (2002) Alcoholic pancreatitis in rats: injury from nonoxidative metabolites of ethanol. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **283**, s. 73.
- [13] Procházková, D., Boušová, I., Wilhelmová, N., (2011) Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia.* **82**, s. 513–523.
- [14] Dusan, M., Vesna, K., (2007) Investigation of metal–flavonoid chelates and the determination of flavonoids via metal–flavonoid complexing reactions. *J. Serbian Chem. Soc.* **72**.
- [15] Bubols, G. B., Vianna, D. R., Medina-Reimon, A., von Poser G., Lamuela-Raventos, R. M., Eifler-Lima, V.L., Garcia, S. C., (2013) The antioxidant activity of coumarins and flavonoids. *Mini Rev. Med. Chem.* **13**, s. 318–334.
- [16] Amić, D., Davidovic-Amic Beslo, D., Rastija, V., Lucić, B., Trinajstić, N., (2007) SAR and QSAR of the antioxidant activity of flavonoids. *Curr. Med. Chem.* **14**, s. 827–845.
- [17] Wolfe, K. L., Liu, R. H., (2008) Structure-activity relationships of flavonoids in the cellular antioxidant activity assay. *J. Agric. Food Chem.* **56**, s. 8404–8411.
- [18] Wen, X., Walle, T., (2006) Methylated flavonoids have greatly improved intestinal absorption and metabolic stability. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* **34**, s. 1786–1792.
- [19] Halliwell, B., (2006) Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol.* **141**, s. 312–322.
- [20] Alfadda, A. A., Sallam, R. M., (2012) Reactive oxygen species in health and disease. *J. Biomed.*

Biotechnol.

- [21] Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., Kalayci, O., (2012) Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ. J.* **5**, s. 9–19.
- [22] Fukai, T., Ushio-Fukai, M., (2011) Superoxide Dismutases: Role in Redox Signaling, Vascular Function, and Diseases. *Antioxid. Redox Signal.* **15**, s. 1583–1606.
- [23] Haber, F., Weiss, J., Pope, W. J., (1934) The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. - Math. Phys. Sci.* **147**, s. 332–351.
- [24] Arnhold, J., (2004) Properties, functions, and secretion of human myeloperoxidase. *Biochem. Biokhimiia.* **69**, s. 4–9.
- [25] Murphy, M. P., (2009) How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem. J.* **417**, s. 1–13.
- [26] Hirst, J., King, M. S., Pryde, K. R., (2008) The production of reactive oxygen species by complex I. *Biochem. Soc. Trans.* **36**, s. 976–980.
- [27] Starkov, A. A., Fiskum, G., Chinopoulos, Ch., Lorenzo, B. J., Browne, S. E., Patel, M. S., Beal, M. F., (2014) Mitochondrial alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex generates reactive oxygen species. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **24**, s. 7779–7788.
- [28] Hanukoglu, I., (2006) Antioxidant protective mechanisms against reactive oxygen species (ROS) generated by mitochondrial P450 systems in steroidogenic cells. *Drug Metab. Rev.* **38**, s. 171–196.
- [29] Bayir, H., (2005) Reactive oxygen species. *Crit. Care Med.* **33**, s. 498–501.
- [30] Liou, G.-Y., Storz, P., (2010) Reactive oxygen species in cancer. *Free Radic. Res.* **44**.
- [31] Machado, L. E. S. F., Shen, T.-L., Page, R., Peti, R., (2007) The KIM-family protein-tyrosine phosphatases use distinct reversible oxidation intermediates: Intramolecular or intermolecular disulfide bond formation. *J. Biol. Chem.* **292**.
- [32] Ray, P. D., Huang, B.-W., Tsuji, Y., (2012) Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell. Signal.* **24**, s. 981–990.
- [33] Yun, J., Rocic, P., Fen Pung, Y., Belmadani, S., Ribeiro Carrao, A. C., Ohanyan, V., Chilian, W. M., (2019) Redox-Dependent Mechanisms in Coronary Collateral Growth: The “Redox Window” Hypothesis. *Antioxid. Redox Signal.* **11**, s. 1961–1974.
- [34] Fyhrquist, F., Metsärinne, K., Tikkanen, I., (1995) Role of angiotensin II in blood pressure regulation and in the pathophysiology of cardiovascular disorders. *J. Hum. Hypertens.* **5**, s. 19–24.
- [35] Griending, K. K., Minieri, C. A., Ollerenshaw, J. D., Alexander, R. W., (1994) Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* **74**, s. 1141–1148.
- [36] Kohchi, C., Inagawa, H., Nishizawa, T., Soma, G.-I., (2009) ROS and innate immunity", *Anticancer Res.* **29**, s. 817–821.
- [37] Song, E., Jaishankar, G. B., Saleh, H., Jithpratuck, W., Sahni, R., Krishnaswamy, G., (2011) Chronic granulomatous disease: a review of the infectious and inflammatory complications. *Clin. Mol. Allergy CMA.* **9**, s. 10.
- [38] Bakavayev, S., Chetrit, N., Zvagelsky, T., Mansour, R., Vyazmensky, M., Barak, Z., Israelson, A., Engel, S., (2019) Cu/Zn-superoxide dismutase and wild-type like fALS SOD1 mutants produce cytotoxic quantities of H₂O₂ via cysteine-dependent redox short-circuit. *Sci Rep.* **9**.
- [39] NCBI Gene database: *SOD2 superoxide dismutase 2 [Homo sapiens (human)]* - Gene – NCBI. Dostupné z URL: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=6648>> [cit. 22. 5. 2020]
- [40] Laukkanen, M., (2016) Extracellular Superoxide Dismutase: Growth Promoter or Tumor Suppressor? *Oxid Med Cell Longev.*
- [41] Beckman, J. S., Koppenol, W. H., (1996) Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good,

- the bad, and ugly. *Am. J. Physiol.* **271**, s. 1424–1437.
- [42] Pacher, P., Beckman, J. S., Liaudet, L., (2007) Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol. Rev.* **87**, s. 315–424.
- [43] Szocs, K., (2004) Endothelial dysfunction and reactive oxygen species production in ischemia/reperfusion and nitrate tolerance. *Gen. Physiol. Biophys.* **23**, s. 265–295.
- [44] Chung, H. S., Wang, S.-B., Venkatraman, V., Murray, C. I., Van Eyk, J. E., (2013) Cysteine oxidative posttranslational modifications: emerging regulation in the cardiovascular system. *Circ. Res.* **112**, s. 382–392.
- [45] Cai, Z., Yan, L.-J., (2013) Protein Oxidative Modifications: Beneficial Roles in Disease and Health. *J. Biochem. Pharmacol. Res.* **1**, s. 15–26.
- [46] Ruan, L.-P., Yu, B.-Y., Fu, G.-M., Zhu, D., (2015) Improving the solubility of ampelopsin by solid dispersions and inclusion complexes. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **38**, s. 457–464.
- [47] Cao, S.-L., Deng, X., Xu, P., Huang, Z. X., Zhou, J., Li, X. H., Zong, M. H., Lou, W.Y., (2017) Highly Efficient Enzymatic Acylation of Dihydromyricetin by the Immobilized Lipase with Deep Eutectic Solvents as Cosolvent. *J. Agric. Food Chem.* **65**, s. 2084–2088.
- [48] Xiang, D., Wang, Ch., Wang, W., Shi, Ch., Xiong, W., Wang, M., Fang, J., (2017) Gastrointestinal stability of dihydromyricetin, myricetin, and myricitrin: an in vitro investigation", *Int. J. Food Sci. Nutr.* **68**, s. 704–711.
- [49] Li, X., Liu, J., Lin, J., Wang, T., Huang, J., Lin, Y., Chen, D., (2016) Protective Effects of Dihydromyricetin against •OH-Induced Mesenchymal Stem Cells Damage and Mechanistic Chemistry. *Molecules.* **21**.
- [50] Ye, L., Wang, H., Duncan, S. E., Eigel, W. N., O'Keefe, S. F., (2015) Antioxidant activities of Vine Tea (*Ampelopsis grossedentata*) extract and its major component dihydromyricetin in soybean oil and cooked ground beef. *Food Chem.* **172**, s. 416–422.
- [51] Song, Q., Liu, L., Yu, J., Zhang, J., Xu, M., Sun, L., Luo, H., Feng, Z., Meng, G., (2017) Dihydromyricetin attenuated Ang II induced cardiac fibroblasts proliferation related to inhibitory of oxidative stress", *Eur. J. Pharmacol.* **807**, s. 159–167.
- [52] Liang, J., Lindemeyerr, A. K., Shen, Y., López-Valdés, H. E., Martínez-Coria, H., Shao, X. M., Olsen, R.W., (2014) Dihydromyricetin Ameliorates Behavioral Deficits and Reverses Neuropathology of Transgenic Mouse Models of Alzheimer's Disease. *Neurochem. Res.* **39**, s. 1171–1181.
- [53] Liu, P., Zou, D., Chen, K., Zhou, Q., Gao, Y., Huang, Y., Zhu, J., Zhang, Q., Mi, M., (2016) Dihydromyricetin Improves Hypobaric Hypoxia-Induced Memory Impairment via Modulation of SIRT3 Signaling. *Mol. Neurobiol.* **53**, s. 7200–7212.
- [54] Wu, F., Li, Y., Song, H., Zhang, Y., Zhang, Y., Jiang, M., Wang, F., Mu, Q., Zhang, W., Li, L., Tang, D., (2016) Preventive Effect of Dihydromyricetin against Cisplatin-Induced Nephrotoxicity In Vitro and In Vivo. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.*
- [55] Liu, B., Tan, X., Liang, J., Wu, S., Liu, J., Zhang, Q., Zhu, R., (2014) A reduction in reactive oxygen species contributes to dihydromyricetin-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells. *Sci. Rep.* **4**.
- [56] Zhang, Z., Zhang, H., Chen, S., Xu, Y., Yao, A., Liao, Q., Han, L., Zou, Z., Zhang, X., (2017) Dihydromyricetin induces mitochondria-mediated apoptosis in HepG2 cells through down-regulation of the Akt/Bad pathway. *Nutr. Res.* **38**, s. 27–33.
- [57] Ji, F. J., Tian, X. F., Liu, X.W., Fu, L.B., Wu, Y.Y., Fang, X. D., Jin, H.Y., (2015) Dihydromyricetin induces cell apoptosis via a p53-related pathway in AGS human gastric cancer cells. *Genet. Mol. Res.* **14**, s. 15564–15571.
- [58] Huang, H., Hu, M., Zhao, R., Li, P., Li, M., (2013) Dihydromyricetin suppresses the proliferation of hepatocellular carcinoma cells by inducing G2/M arrest through the Chk1/Chk2/Cdc25C pathway. *Oncol. Rep.* **30**, s. 2467–2475.
- [59] Wu, S., Liu, B., Zhang, Q., Liu, J., Zhou, W., Wang, Ch., Li, M., Bao, Sh., Zhu, R., (2013) Dihydromyricetin Reduced Bcl-2 Expression via p53 in Human Hepatoma HepG2 Cells. *PLoS*

- ONE*. **8**, s. e76886.
- [60] Kao, S.-J., Lee, W. J., Chang, J. H., Chow, J. M., Chung, Ch. L., Hung, W. Y., Chien, M. H., (2017) Suppression of reactive oxygen species-mediated ERK and JNK activation sensitizes dihydromyricetin-induced mitochondrial apoptosis in human non-small cell lung cancer. *Environ. Toxicol.* **32**, s. 1426–1438.
- [61] Zhou, D.-Z., Sun, H.-Y., Yue, J.-Q., Peng, Y., Chen, Y.-M., Zhong, Z.-J., (2017) Dihydromyricetin induces apoptosis and cytoprotective autophagy through ROS-NF- κ B signalling in human melanoma cells. *Free Radic. Res.* **51**, s. 517–528.
- [62] Liu, L., Wan, J., Lang, H., Si, M., Zhu, J., Zhou, Y., Mi, M., (2017) Dihydromyricetin delays the onset of hyperglycemia and ameliorates insulin resistance without excessive weight gain in Zucker diabetic fatty rats. *Mol. Cell. Endocrinol.* **439**, s. 105–115.
- [63] Shi, L., Zhang, T., Zhou, Y., Zeng, X., Ran, L., Zhang, Q., Zhu, J., Mi, M., (2015) Dihydromyricetin improves skeletal muscle insulin sensitivity by inducing autophagy via the AMPK-PGC-1 α -Sirt3 signaling pathway. *Endocrine.* **50**, s. 378–389.
- [64] Hodek, P., Fousova, P., Brabencova, E., Moserova, M., Pavek, P., Anzenbacherova, E., Brotanek, J., Hudevek, J., Frei, E., Stiborova, M., (2014) Effect of dihydromyricetin on benzo[a]pyrene activation in rats. **35**, s. 11.
- [65] Kou, X., Liu, X., Chen, X., Li, Jie, Yang, X., Fan, J., Yang, Yi., Chen, N., (2016) Ampelopsin attenuates brain aging of D-gal-induced rats through miR-34a-mediated SIRT1/mTOR signal pathway. *Oncotarget.* **7**, s. 74484–74495.
- [66] Ren, Z., Zhao, Y., Cao, T., Zhen, X., (2016) Dihydromyricetin protects neurons in an MPTP-induced model of Parkinson's disease by suppressing glycogen synthase kinase-3 beta activity. *Acta Pharmacol. Sin.* **37**.
- [67] Liang, J., Olsen, R. W., (2014) Alcohol use disorders and current pharmacological therapies: the role of GABA A receptors. *Acta Pharmacol. Sin.* **35**.
- [68] Liang, J., Shen, Y., Shao, X. M., Scott, M. B., Ly, E., Wong, S., Nguyen, A., Tan, K., Kwon, B., Olsen, R. W., Spigelman, I., (2014) Dihydromyricetin Prevents Fetal Alcohol Exposure-Induced Behavioral and Physiological Deficits: The Roles of GABAA Receptors in Adolescence. *Neurochem. Res.* **39**, s. 1147–1161.
- [69] 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.
- [70] Liu, L., Sun, S., Rui, H., Li, X., (2017) In vitro inhibitory effects of dihydromyricetin on human liver cytochrome P450 enzymes. *Pharm. Biol.* **55**, s. 1868–1874.
- [71] 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**.
- [72] Ohlendieck, K., Harding, S., (2018) Centrifugation and Ultracentrifugation. *Wilson and Walker's Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology.* 424–453.
- [73] Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, s. 265–75.
- [74] Iwaniec U. T., Turner R.T., (2013) Intraperitoneal injection of ethanol results in drastic changes in
bone metabolism not observed when ethanol is administered by oral gavage. *Alcohol Clin Exp Res.* s. 1271–1277.
- [75] Matthewson, K., Al Mardini, H., Bartlett, K., Record, C. O. (1986) Impaired acetaldehyde metabolism in patients with non-alcoholic liver disorders. *Gut.* **27**, s. 756–764.
- [76] Lieber C.S., DeCarli L. M., (1972) The role of the hepatic microsomal ethanol oxidizing system (MEOS) for ethanol metabolism *in vivo*. *J Pharmacol Exp Ther.* s. 279–87.
- [77] Cederbaum, A. I., Lu, Y., Wu, D., (2009) Role of oxidative stress in alcohol-induced liver injury. *Arch Toxicol.* **83**, s. 519–548.
- [78] Leung, T. M., Lu, Y., (2017) Alcoholic Liver Disease: from CYP2E1 to CYP2A5. *Curr Mol*

Pharmacol. s. 172–178.