

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Bc. Aneta Skotnicová

Vliv dihydromyricetinu na metabolismus ethanolu

Effect of dihydromyricetin on ethanol metabolism

Diplomová práce

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

Praha, 2019

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

Tímto bych ráda poděkovala prof. RNDr. Petru Hodkovi, CSc. za odborné vedení této diplomové práce, cenné rady, trpělivost a ochotu. Dále bych chtěla poděkovat MUDr. Nikolině Kutinové-Canové, Ph.D. za její vstřícnost a pomoc při izolaci hepatocytů a RNDr. Janu Kučkovi, Ph.D. za jeho rady a pomoc při odběru vzorků.

Abstrakt

Dihydromyricetin (DHM), též ampelopsin, je flavonoidní sloučenina vykazující široké spektrum pozitivních účinků na lidský organismus. Rostlinné výtažky obsahující tuto sloučeninu byly v tradiční čínské medicíně hojně využívány převážně pro své hepatoprotektivní vlastnosti. DHM též pomáhá při intoxikaci alkoholem a zmírňuje projevy kocoviny či abstinence.

Vzhledem k tomu, že se dosud nepodařilo objasnit mechanismus účinků DHM na metabolismus ethanolu, byl proto v této diplomové práci studován vliv dihydromyricetinu na expresi a aktivitu alkoholdehydrogenasy (ADH), jednoho z nejdůležitějších enzymů zapojených do metabolismu ethanolu.

Byly optimalizovány kultivační podmínky primárních hepatocytů izolovaných z nepremedikovaného a z ethanolem premedikovaného potkana vystavených působení EtOH a DHM. Při stanovení míry poškození buněk způsobené EtOH v přítomnosti DHM nebyl zjištěn žádný významný trend protektivního účinku DHM. Na druhou stranu byl technikou ELISA (stanovení alaninaminotransferasy) zaznamenán protektivní účinek ethanolu v hepatocytech kultivovaných v prostředí EtOH a DHM. Metodou Western blot s následnou imunodetekcí nebyla zjištěna indukce exprese ADH v hepatocytech. Dále nebyl zjištěn modulační vliv DHM na aktivitu ADH ve vzorcích hepatocytů ani na aktivitu purifikovaného enzymu. V souladu s těmito výsledky nebyla na myším modelu prokázána schopnost dihydromyricetinu ovlivnit rychlost metabolismu ethanolu. Na základě získaných dat lze předpokládat, že deklarované hepatoprotektivní účinky DHM při intoxikaci alkoholem zřejmě nesouvisí s ovlivněním aktivity alkoholdehydrogenasy.

Klíčová slova: hepatocyty, alkoholdehydrogenasa, flavonoidy

Abstract

Dihydromyricetin (DHM), also ampelopsin, is a flavonoid compound which exhibits a broad spectrum of positive effects on the human body. Herbal extracts containing this compound have been widely used in traditional Chinese medicine mainly for their hepatoprotective properties. DHM also helps with alcohol intoxication and reduces the signs of hangover or abstinence.

Given the fact that the mechanism of DHM effects on the ethanol metabolism has not been clarified yet, the effect of dihydromyricetin on the expression and activity of alcohol dehydrogenase (ADH), one of the most important enzymes involved in ethanol metabolism, was therefore studied in this thesis.

The cultivation conditions of primary hepatocytes which were isolated from unpretreated and ethanol-pretreated rats and subsequently exposed to EtOH and DHM were optimized. While determining the degree of cell damage caused by EtOH in the presence of DHM, no significant trend in the protective effect of DHM was found. On the other hand, the protective effect of ethanol in hepatocytes cultivated in EtOH and DHM was detected by technique of ELISA (the determination of alanine transaminase). The Western blot technique followed by immunodetection did not detect the induction of ADH expression in hepatocytes. Furthermore, the modulation effect of DHM on the ADH activity in the samples of hepatocytes and on the activity of purified enzyme was not found. In compliance with these results, the ability of dihydromyricetin to influence the metabolic rate of ethanol was not proved in the mouse model. Based on the obtained data, it can be assumed that the declared hepatoprotective effects of DHM during alcohol intoxication are unlikely to be related to affect activity of alcohol dehydrogenase.

Key words: hepatocytes, alcohol dehydrogenase, flavonoids

(In Czech)

Obsah

Seznam použitých zkratek	8
1 Úvod	10
1.1 Játra.....	11
1.1.1 Morfologie jater	11
1.1.2 Fyziologie jater	16
1.1.3 Laboratorní vyšetření funkce jater.....	18
1.2 Biotransformace xenobiotik.....	20
1.2.1 I. fáze biotransformace	22
1.2.2 II. fáze biotransformace	23
1.3 Metabolismus alkoholu	24
1.3.1 Alkoholdehydrogenasa	27
1.3.2 Aldehyddehydrogenasa.....	29
1.4 Flavonoidy	30
1.4.1 Interakce flavonoidů s biotransformačními enzymy.....	32
1.4.2 Dihydromyricetin	34
2 Cíl práce	36
3 Materiál a metody.....	37
3.1 Použité chemikálie.....	37
3.2 Použité přístroje	38
3.3 Metody	40
3.3.1 Premedikace potkanů.....	40
3.3.2 Izolace hepatocytů.....	40
3.3.3 Kultivace hepatocytů	42
3.3.4 Zpracování hepatocytů po kultivaci.....	43
3.3.5 Stanovení životnosti hepatocytů pomocí MTT testu	44
3.3.6 Stanovení katalytické koncentrace ALT	44
3.3.7 Stanovení katalytické koncentrace AST	45
3.3.8 Kvantitativní stanovení ALT metodou ELISA.....	45
3.3.9 Stanovení koncentrace proteinů	46
3.3.10 Diskontinuální elektroforesa na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného	47
3.3.11 Western blot s následnou imunodetekcí.....	48
3.3.12 Stanovení enzymové aktivity ADH ve vzorcích hepatocytů.....	49

3.3.13 Stanovení enzymové aktivity ADH v přítomnosti DHM.....	50
3.3.14 Stanovení koncentrace ethanolu a acetaldehydu v krvi myši	50
4 Výsledky	52
4.1 Izolace hepatocytů.....	52
4.1.1 Optimalizace podmínek kultivace potkaních hepatocytů vystavených působení EtOH a DHM ..	53
4.2 Stanovení míry poškození hepatocytů	55
4.2.1 Stanovení životnosti hepatocytů pomocí MTT testu	56
4.2.2 Stanovení katalytické koncentrace ALT	57
4.2.3 Stanovení katalytické koncentrace AST	59
4.2.4 Kvantitativní stanovení ALT metodou ELISA.....	61
4.3 Určení vlivu DHM na expresi ADH v hepatocytech.....	63
4.4 Vliv DHM na aktivitu alkoholdehydrogenasy	65
4.5 Vliv dihydromyricetinu na metabolismus ethanolu na myším modelu	67
5 Diskuze	69
6 Souhrn.....	74
Seznam použité literatury	75

Seznam použitých zkratek

6-WP	6jamková destička („well plate“)
24-WP	24jamková destička („well plate“)
ADH	alkoholdehydrogenasa
ALD	onemocnění jater způsobené alkoholem („alcohol liver disease“)
ALDH	aldehyddehydrogenasa
ALT	alaninaminotransferasa
ALP	alkalická fosfatasa
AST	aspartátaminotransferasa
BSA	hovězí sérový albumin
CYP	cytochrom P450
EGTA	ethylen glycol-bis(2-amino-ethylether)-N,N,N',N'-tetra octová kyselina
ELISA	(„enzyme-linked immunosorbent assay“)
FAEE	ethylestery mastných kyselin („fatty acid ethyl esters“)
FBS	fetální hovězí sérum
GABA	kyselina γ -aminomáselná
GGT	γ -glutamyltransferasa
GIT	gastrointestinální trakt
LDH	laktátdehydrogenasa
LPS	lipopolysacharid
MTT	dimethylthiazolyldifenyl-tetrazolium bromid
NAD ⁺	nikotinamidadenindinukleotid (oxidovaná forma)
PBS	fosfátem pufovaný isotonický roztok
PVDF	polyvinylidenfluorid
ROS	reaktivní formy kyslíku

RPM	otáček za minutu
SDS	dodecylsírán sodný
TAG	triacylglyceroly
TEMED	N,N,N',N-tetramethylethylendiamin
Tris/HCl	tris(hydroxymethyl)aminomethan hydrochlorid
WHO	Světová zdravotnická organizace

1 Úvod

V mnoha částech světa je užívání alkoholu součástí řady kulturních, náboženských a společenských událostí. Alkohol přináší svým konzumentům pocit radosti a uvolnění, ale jeho spotřeba s sebou nese také mnohé zdravotní či sociální problémy. Více než 200 patologických stavů je spojeno s nadměrným užíváním alkoholu, jako například onemocnění jater, rakovina, kardiovaskulární onemocnění či sebevraždy. Nadměrný příjem alkoholu se stal závažným celosvětovým problémem. Podle zprávy Světové zdravotnické organizace (WHO) trpí problémy spojenými s konzumací alkoholu více než 76 miliónů lidí a více než 3 miliony lidí ročně v důsledku toho zemřou.

V boji proti nepřiměřené konzumaci alkoholu je důležitá zejména prevence. WHO se snaží přijít s návrhy, které se týkají především zvýšení povědomí široké veřejnosti o tomto problému, regulace prodeje či dokonce samotné výroby alkoholu [1]. Také značná část odborné veřejnosti se touto problematikou zabývá, a to hlavně ve snaze zmírnit projevy kocoviny či abstinence. Některé studie však poukazují na fakt, že alkohol v přiměřeném množství může být zdraví prospěšný. Předpokládá se, že pomáhá snížit rizika kardiovaskulárních onemocnění, rakoviny prsu či v boji proti obezitě [2].

Mezi vhodné látky v boji proti účinkům této drogy, jak je alkohol velmi často označován, se v poslední době řadí především flavonoidy [3, 4]. Flavonoidy jsou fenolické sloučeniny přírodního původu. Jsou běžnou složkou naší potravy, nachází se v ovoci, zelenině, ořechách či čaji a jsou dobře známy pro své pozitivní účinky na lidský organismus. Jejich antioxidační, protizánětlivé, antialkoholové, antimutagenní nebo antibakteriální vlastnosti jsou využívány již od pradávna a i nyní stále stoupá množství potravních doplňků vyrobených právě z těchto rostlinných zdrojů [5]. Jejich vlastnosti se odvíjí od schopnosti modulovat funkce klíčových enzymů. Flavonoidy mohou inhibovat či stimulovat enzymovou aktivitu, indukovat biosyntézu některých enzymů nebo být těmito enzymy metabolizovány. Konkrétně by pak mohly zvyšovat aktivitu alkoholdehydrogenasy (ADH) a aldehyddehydrogenasy (ALDH), enzymů důležitých při metabolismu alkoholu, což by vedlo k jeho rychlejší eliminaci a možnému novému terapeutickému přístupu [3, 6].

Přes všechny příznivé vlastnosti mohou být některé flavonoidy také toxické. Studium interakcí flavonoidů s biotransformačními enzymy je tedy pro pochopení jejich vlivu na zdravotní stav velmi důležité [6].

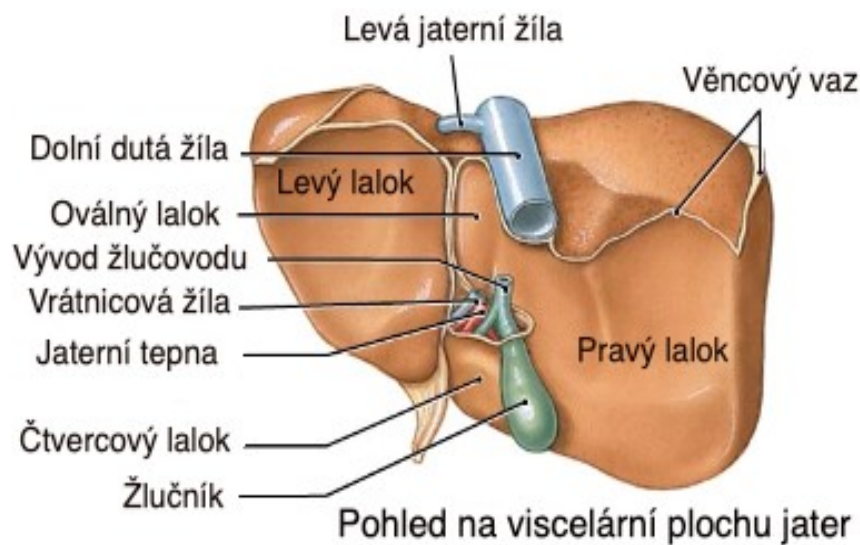
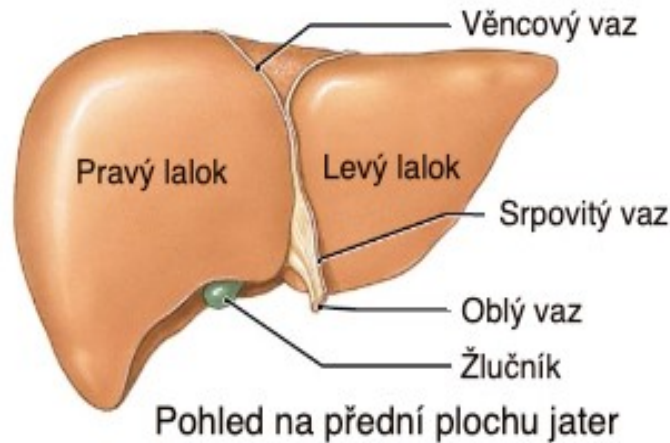
1.1 Játra

Játra jsou životně nezbytným orgánem s mnoha neobvyklými anatomickými či funkčními rysy. Jedná se o nejtěžší vnitřní orgán lidského těla s bohatou zásobou krve. Játra jsou svou intenzitou a rozsahem metabolických, syntetických, hemopoetických a imunologických aktivit nesmírně univerzálním orgánem, mají schopnost regenerace, ale zároveň se velmi často podílí na vzniku a progresi mnoha patologických procesů [7].

1.1.1 Morfologie jater

Játra jsou se svou průměrnou hmotností okolo 1500 g hned po kůži druhým největším orgánem lidského těla. Mají červenohnědou barvu, jsou dobře prokrvená, měkká, přesto relativně křehká a jsou uložena v pravé klenbě brániční a přesahují přes střední čáru břišní dutiny do levé klenby brániční [8, 9]. Jejich horní plocha je přímo srostlá s bránicí, dolní je obrácená k orgánům břišní dutiny, které způsobují výrazné otisky na játrech. Kromě zadní části jsou játra pokryta orgánovou pobřišnicí, která je chrání a drží na místě. Játra jsou na základě pravé a levé jaterní tepny a portální žíly s následnými přítoky žlučových kanálků rozdělena do čtyř zřetelných laloků – anatomicky větší pravý lalok (*dexter*), anatomicky menší levý lalok (*sinister*), čtvercový (*quadratus*) a oválný (*caudatus*) lalok (viz obrázek 1, str. 12) [9].

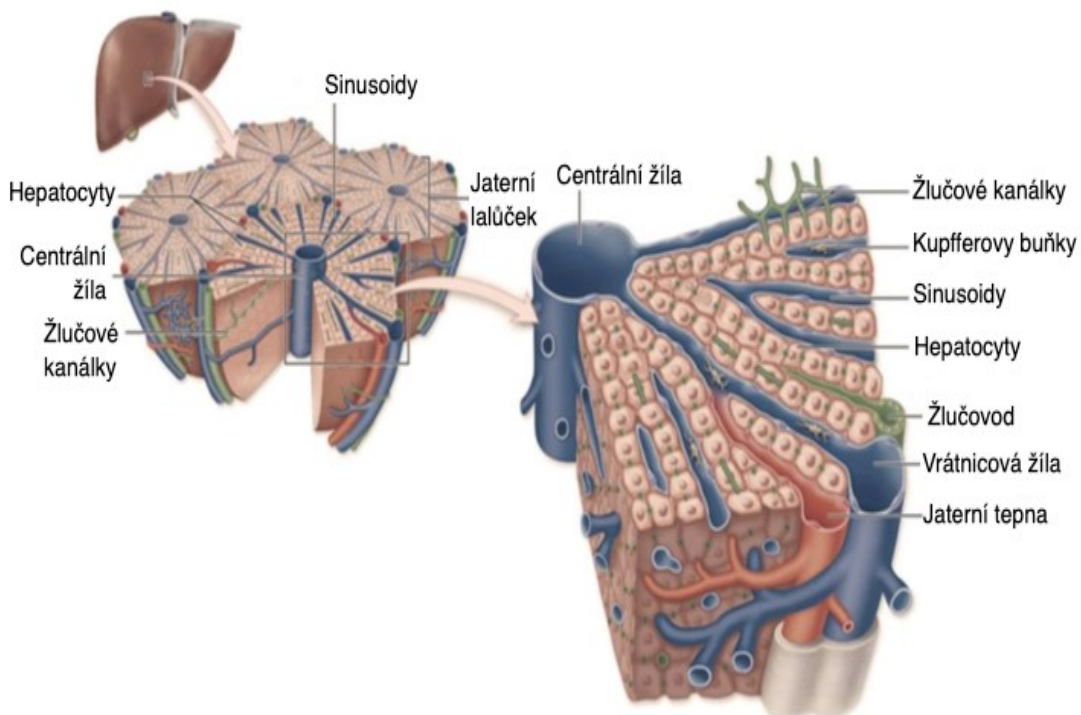
Játra mají jedinečné dvojitě zásobené krve, které v daném okamžiku pracuje s asi 13 % celkového krevního zásobení těla, a játry tak protéká zhruba 1,5 litru krve za minutu. Jaterní krevní oběh se rozděluje na tzv. funkční (portální) a výživný (nutritivní). U funkčního krevního oběhu se krev ze střev, sleziny, pankreatu i žaludku dostává do jater pomocí vrátnicové žíly. Ta se následně větví až na kapilární úroveň, kdy dosahuje těsného kontaktu s jaterními buňkami a v hepatocytech tak dochází k metabolické přeměně látek obsažených v této krvi. Krev je z jater následně odváděna do jaterních žil pomocí žil centrálních. U výživného krevního oběhu se krev bohatá na kyslík dostává do jater pomocí jaterní tepny. Jaterní tepna se také po vstupu do jater větví až na kapilární úroveň a dochází tak k zásobení jaterních buněk a žlučových cest kyslíkem [10, 11].



Obrázek 1: Anatomie jater. Převzato a upraveno z [12].

Tkáň jater je z morfologického hlediska tvořena malými jednotkami, tzv. jaterními lalůčkami (viz obrázek 2, str. 13). Ty bývají často schematizovány do tvaru pravidelného šestibokého hranolu, který se ovšem v reálných játrech nevyskytuje a lalůčky mají velmi nepravidelný tvar. Každá z těchto základních stavebních jednotek jaterního parenchymu je složena z hepatocytů, které jsou uspořádány do trámců paprskovitě se rozbíhajících od centrální žíly. Centrální žíla se nachází ve středu všech lalůček a je obklopena jaterními portálními žilami, jaterními tepnami a žlučovody. Tyto cévy jsou pak navzájem spojeny mnoha kapilárovitými trubicemi zvanými sinusoidy. Do jaterních sinusoidů se dostává krev z vrátnicové žíly či jaterní tepny poté, co nejprve projde portobiliárními prostory, což jsou místa mezi lalůčkami obsahující především žlučové kanálky, arterioly, větvy a malé množství vaziva. V sinusoidách se tedy nachází krev s obsahem metabolitů a krev obsahující kyslík a živiny, což zapříčiňuje střídání tzv. pracovních a rekreačních fází hepatocytů [9, 13].

Uvnitř sinusoidů jsou kromě hepatocytů také Kupfferovy buňky, které hrají důležitou roli v mononukleárním fagocytárním systému, buňky endotelové důležité pro zachování homeostázy a Pit buňky vycytávající patogeny (viz dále) [14–16]. Součástí každého jaterního lalůčku je v neposlední řadě také Disseův prostor. Jedná se o štěrbinu nacházející se mezi trávci hepatocytů a stěnami sinusoidů s výskytem Itoových buněk. Mezi nejdůležitější funkce těchto hvězdicovitých Itoových buněk patří skladování tuků a vitamínu A [17].



Obrázek 2: Jaterní lalůček. Převzato a upraveno z [18].

Hepatocyty

Hepatocyty jsou specializované jaterní epitelální buňky, které tvoří asi 80 % objemu jater. Mají polyedrický tvar, kulovitá jádra, jejich průměr je asi 20-30 μm a často se jedná o buňky dvoujaderné. V jaterním parenchymu tvoří komplexní trojrozměrné uspořádání zvané jaterní trávce (viz výše). Hepatocyty jsou hlavní funkční jaterní buňky, obsahují velké množství organel, díky čemuž se podílí na širokém spektru nejrůznějších funkcí. V cytoplazmě se nachází především mitochondrie důležité pro vysokou metabolickou

aktivitu, dobře vyvinuté hladké endoplazmatické retikulum, které hraje hlavní roli především při tvorbě žlučových konkrementů a je také spolu s peroxisomy důležité při detoxikaci exogenních i endogenních látek. Granulární endoplazmatické retikulum je pak zodpovědné za tvorbu krevních bílkovin. Dalšími důležitými organelami jsou lysozomy, které jsou klíčové při degradačních a regeneračních procesech organel a glykosomy, ve kterých jsou skladovány sacharidy, což je nezbytné pro regulaci koncentrace glukosy v krvi [10, 11, 13]. Hepatocytární cytoplazma může také obsahovat různé inkluse, vakuoly či pigmenty (např. lipofuscin) [19]. U hepatocytů je důležitá také jejich polarita. Pokud se každá dospělá, zdravá buňka nachází ve vysoce polarizovaném stavu, je pak schopna zajistit dva protiproudé průtokové systémy: sekreci a syntézu žluči (žlučový pól) a příjem, zpracování a vylučování krevních složek (krevní pól), což je klíčové pro správnou funkci celého organismu. Defekty v polarizaci hepatocytů vedou k významným patologickým následkům [20, 21].

Kupfferovy buňky

Kupfferovy buňky jsou typické makrofágy nacházející se uvnitř jaterních sinusoidů. Tvoří přibližně 8 % všech jaterních buněk a 80–90 % všech tkáňových makrofágů v lidském těle. Jedná se o buňky nepravidelného tvaru, jejichž hlavní funkce spočívá v zachycení, rozštěpení a odstranění cizorodých látek přicházejících portální krví z gastrointestinálního traktu (GIT). Vznikají z kmenových buněk kostní dřeně a diferencují se pod vlivem specifických signálů či se v důsledku zánětlivého stavu přímo prolifерují v játrech [14]. Kupfferovy buňky jsou důležitou součástí vrozené imunity. Po jejich aktivaci dochází k vylučování řady cytokinů, které indukují zánětlivou odezvu nezbytnou k odstranění nežádoucích látek a iniciují proces hojení. U pacientů s onemocněním jater způsobené alkoholem (ALD, z anglického „alcoholic liver disease“) dochází ke zvýšené produkci těchto cytokinů. Kromě produkce cytokinů jsou aktivované Kupfferovy buňky hlavním zdrojem reaktivních forem kyslíku (ROS). V buňkách mohou být ROS generovány enzymem NADPH oxidasou, přičemž některé studie ukazují, že prevence produkce ROS inhibicí aktivity NADPH oxidasy by mohla snižovat poškození jater způsobené alkoholem [22, 23].

Itoovy buňky

Itoovy buňky (nazývané také buňky stelární či lipocyty) jsou dalším typem všestranných jaterních buněk nacházejících se v Disseově prostoru. Tvoří asi 8 % všech jaterních buněk a 50–80 % celkového vitamínu A je v lidském organismu skladováno právě v těchto buňkách. Při patologických stavech jater Itoovy buňky zásoby retinolu ztrácejí, zvětšuje se jejich endoplazmatické retikulum, jsou transdiferencovány do buněk podobným myofibroblastům a syntetizují velké množství extracelulárních složek jako je kolagen, proteoglykany, glykosaminoglykany nebo adhezivní glykoproteiny. Nadměrné hromadění těchto extracelulárních proteinů vede po jaterní fibrose a cirhose až k úplnému selhání tohoto orgánu. Na druhou stranu se v poslední době ukazuje, že tyto buňky jsou důležité nejen při vývoji jater ale také při regenerační odpovědi v již dospělých játrech. Produkty aktivovaných stelárních buněk pravděpodobně zmírňují poškození a zároveň zvyšují regeneraci hepatocytů [17, 24, 25].

Endotelové buňky

Buňky endotelové jsou malé buňky s průměrem kolem 6,5 μm nacházející se ve stěnách jaterních sinusoidů a ve výstelce jaterních cév. Tvoří asi 10–20 % všech jaterních buněk a jsou jedinými savčími endotelovými buňkami, které nemají souvislou bazální membránu a primární ultrastruktura podílející se na jejich funkčnosti se skládá z transcelulárních pórů zvaných fenestrace, díky kterým umožňují selektivní propustnost pro látky přecházející mezi vnitřním prostředím jater a krví. Jsou důležité při endocytóze a metabolismu širokého spektra makromolekul, včetně glykoproteinů, lipoproteinů a složek extracelulární matrix či při udržení nízkého portálního tlaku v játrech. Endotelové buňky také udržují klidový stav stelárních buněk, čímž brání vývoji fibrosy. Při patologických procesech hrají klíčovou roli v zahájení a progresi chronických stavů jater či hepatocelulárního karcinomu, podporují angiogenezi a vazokonstrikci. Jelikož se podílí na většině onemocnění jater, jsou endotelové buňky velmi atraktivním terapeutickým cílem [15, 26].

Pit buňky

V jaterních sinusoidách se v neposlední řadě nachází také tzv. Pit buňky. Pit buňky jsou v přímém kontaktu s krví. Často mohou adherovat na buňky endotelové. Jedná se o relativně velké a asymetrické buňky obsahující specifická granula a excentrické jádro. Pro jejich vysokou cytotoxickou aktivitu proti řadě nádorových buněčných linií a morfológickou podobnost jsou přirovnávány k NK-buňkám krve (přirození zabijáci, z anglického „natural killers“) [16].

1.1.2 Fyziologie jater

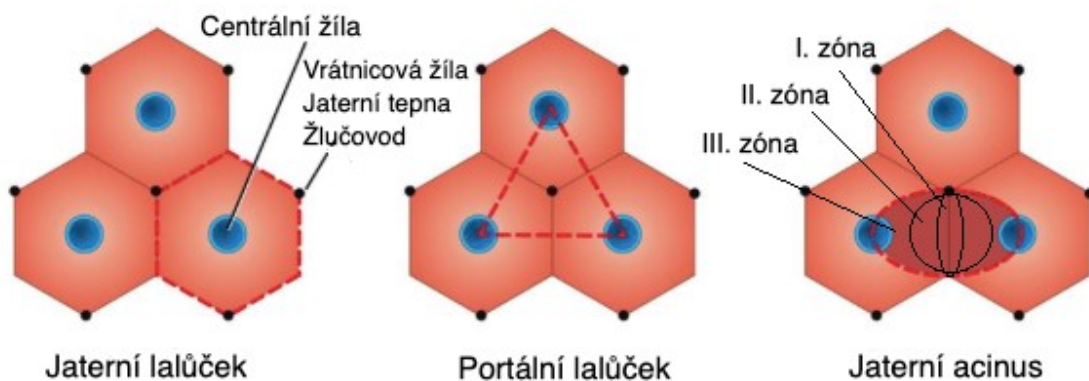
Z funkčního hlediska jsou játra dělena do jednotek zvaných jaterní acinus. Tento koncept dělení byl poprvé definován Rappaportem v roce 1954 [27] a je důležitý v popisu některých funkčně-strukturních vztahů jaterního lalůčku. Jaterní acinus je popisován jako dva pomyslné trojúhelníky s vrcholem v centrální žíle dvou sousedních lalůčků (viz obrázek 3, str. 17). Jaterní portální žíla a jaterní tepna tuto jednotku zásobují, a právě podle vzdálenosti od těchto distribučních cév jsou buňky děleny do tří zón. I. zóna (vnitřní) je zóna bohatá na kyslík a živiny a dochází zde hlavně k oxidačním procesům. Hepatocyty ve vnitřní zóně jsou také první, které vykazují morfológické změny po vystavení toxickým látkám či při obstrukcích žlučových cest. Ve III. zóně (vnější) dominují hlavně redukční reakce, je zde nejnižší zásobení kyslíkem a buňky v této oblasti jsou nejcitlivější na anoxické poškození. II. zóna (střední) se se svými vlastnostmi i funkcemi podobá vnitřní a vnější oblasti jaterního acinu.

Třetím způsobem rozdělení tkáně jater může být dělení na portální lalůčky, které se opět popisují jako pomyslný trojúhelník, jehož vrcholy jsou ve třech centrálních žilách a střed se poté nachází v místě jaterní portální žíly, jaterní tepny a žlučovodu (viz obrázek 3, str. 17) [10].

Játra plní značné množství životně důležitých funkcí a hepatocyty jsou tak pravděpodobně jedny z nejvšestrannějších buněk lidského organismu, kdy v jednom okamžiku dokáží detoxikovat, přenášet, shromažďovat či syntetizovat řadu látek.

Játra jsou zodpovědná za metabolismus sacharidů, lipidů, aminokyselin i proteinů, jelikož veškerá krev opouštějící trávicí systém prochází jaterní portální žílou. Při metabolismu sacharidů je hlavní rolí jater udržet fyziologické rozmezí koncentrace glukosy

v krvi. Glukosa je v játrech absorbovaná a uchovávaná ve formě glykogenu. Pokud je zaznamenána velmi vysoká hladina glykemie, glukosa slouží jako substrát pro syntézu mastných kyselin a následně triacylglycerolů (TAG), naopak při jejím poklesu je glukosa uvolňována do krve díky rozpadu glykogenu či dochází ke glukoneogenezi a glukosa je syntetizována z necukerných substrátů. Metabolismus lipidů je další významnou funkcí jater. Hepatocyty uchovávají některé tuky ve formě TAG, syntetizují lipoproteiny a cholesterol nebo oxidují mastné kyseliny. V játrech také probíhají procesy deaminace, dekarboxylace a transaminace, což jsou klíčové procesy při metabolismu aminokyselin. Transaminační reakce jsou katalyzovány enzymy alaninaminotransferasou (ALT) a aspartátaminotransferasou (AST), které bývají využívány k diagnostickým účelům při patologických stavech jater.



Obrázek 3: Schématické znázornění jaterního lalůčku, portálního lalůčku a jaterního acinu. Převzato a upraveno z [10].

Kromě sacharidů a lipidů játra skladují i mnoho esenciálních živin, vitaminů (A, D, E, K a B12) či minerálů. Také spolu s kůží a ledvinami syntetizují aktivní formu vitaminu D. Díky enzymům (především cytochromy P450), které se v hepatocytech vyskytují, jsou játra důležitým detoxikačním místem. Metabolizují xenobiotika, jako jsou například léky, alkohol či drogy (viz dále), odstraňují z krevního oběhu také hormony produkované endokrinními tkáněmi či je zde degradován, například inzulin. Mezi významné detoxikace probíhající v játrech patří také odstraňování amoniaku za současné tvorby močoviny. Játra jsou zodpovědná za syntézu hned několika plazmatických proteinů včetně protrombinu, fibrinogenu a albuminu. Je zde syntetizován také angiotenzin, hormon podílející se na udržování krevního tlaku nebo erythropoetin.

Mezi exokrinní funkce jater patří produkce žluči. Jedná se o alkalickou tekutinu složenou ze směsi vody, elektrolytů, žlučových koncrementů, cholesterolu a bilirubinu, díky kterému má nazelenalou barvu. Žluč je skladovaná ve žlučníku, kam se dostává pomocí jaterních žlučových cest. Žlučník uvolňuje žluč do dvanáctníku, kde dochází k emulgaci tuků, čímž je usnadněno jejich trávení a následná absorpce. V neposlední řadě jsou játra díky Kupfferovým buňkám také součástí imunitního systému [10, 11, 28].

Pro správnou funkci jater je klíčová rovnováha mezi buněčnou smrtí a regenerací. Buněčná smrt nastává v důsledku nekrosy či apoptosy. Při patologických procesech se však buněčné mechanismy zapojené do těchto procesů mohou měnit. Apoptosa je například zvýšena při ALD či při steatose. Při regeneraci, kdy je potřeba nahradit ztracenou jaterní tkáň, jsou tzv. záplaty klidových buněk stimulovány mediátory včetně cytokinů, aby se přesunuly do aktivovaného stavu, kdy růstové faktory mohou stimulovat syntézu DNA a buněčnou replikaci. Pokud jsou hepatocyty velmi poškozeny, mohou v procesu regenerace vznikat i z progenitorových či kmenových buněk. Jaterní regenerace je unikátní, uvádí se, že například játra potkana dokáží nahradit až 60 % svého objemu [11, 29].

1.1.3 Laboratorní vyšetření funkce jater

Testy jaterních funkcí mohou být použity pro screening jaterního onemocnění, k přímé diagnostice nebo k posouzení závažnosti, prognózy či odezvy na léčbu. Při základním biochemickém vyšetření se stanovují především enzymy – alaninaminotransferasa, aspartátaminotransferasa, γ -glutamyltransferasa (GGT), laktátdehydrogenasa (LDH) a alkalická fosfatasa (ALP). Tato stanovení se někdy mohou jevit jako necitlivá a nespecifická pro diagnostiku, jelikož například ke zvýšené hladině GGT dochází u pacientů s ALD nebo u pacientů trpících horečkou. K odhalení správné diagnózy je tedy většinou zapotřebí kombinace několika testů. Biochemická stanovení, která odrážejí funkci jater, jsou shrnuta v tabulce 1 (str. 19).

Aminotransferasy katalyzují přenos aminoskupiny z alaninu nebo aspartátu na 2-oxoglutarát. AST je izoenzym lokalizovaný v cytoplazmě a mitochondriích nejen v játrech ale také v srdci, ledvinách či v mozku. Výrazně nízké hladiny tohoto enzymu byly pozorovány u pacientů trpících chronickou hemodialýzou. ALT je cytosolický enzym, a přestože je jeho množství v játrech menší než množství AST, jedná se o specifičtější marker jaterních onemocnění. Zvýšené hladiny aminotransferas mohou být způsobeny ALD,

virovou hepatitidou, hemochromatózou nebo hepatotoxicitou vyvolanou léky. Mezi méně časté příčiny pak patří Wilsonova choroba, Addisonova choroba, mentální anorexie, celiakie a hypertyreóza. Poměr AST k ALT větší než dva bývá užitečný při diagnostice ALD [11, 30–32].

Tabulka 1: Fyziologické hodnoty vybraných biochemických stanovení při vyšetření funkce jater. Převzato a upraveno z [11].

Biochemická stanovení	Fyziologické rozmezí
Celkový bilirubin	5–17 $\mu\text{mol/l}$
Konjugovaný bilirubin	< 5 $\mu\text{mol/l}$
Alkalická fosfatasa	45–115 U/l
Aspartátaminotransferasa	8–48 U/l
Alaninaminotransferasa	45–115 U/l
γ -glutamyltransferasa	9–48 U/l
Albumin	35–50 g/l
Protrombinový čas	12–16 s

Alkalické fosfatasy jsou skupinou enzymů katalyzujících hydrolýzu fosfátových esterů. Vyskytují se v placentě, kostech, ledvinách či v játrech, kde se nachází v cytosolu hepatocytů. Hladina ALP by měla být testována za podmínek nalačno. Pokud jsou hodnoty ALP zvýšené, příčinou bývají především jaterní nádory a obstrukce žlučových cest. Naopak nízké hladiny ALP jsou spojeny s hypotyreózou, hemolýzou nebo s těžkou jaterní insuficiencí.

Enzym γ -glutamyltransferasa katalyzuje přenos γ -glutamylových skupin peptidů na jiné aminokyseliny. Hlavním cílem testování GGT je potvrdit zvýšené hladiny jaterní ALP, jelikož zvýšené hladiny γ -glutamyltransferasy jsou příčinou stejného spektra jaterních onemocnění jako zvýšené hodnoty ALP. GGT je spolu se stanovením bezsacharidového transferinu důležitý marker alkoholismu.

Laktátdehydrogenasa je cytoplazmatický enzym, jehož výrazné zvýšení bylo zjištěno u pacientů s ischemickou hepatitidou [11, 30, 32].

Bilirubin je degradačním produktem hemoglobinu a nekovalentně vázaný na albumin se dostává do jater, kde dochází ke konjugaci s dvěma glukuronovými kyselinami a vzniká konjugovaný bilirubin, který je následně vyloučen do žluče. Pro zjištění detoxikační

a extrakční funkčnosti jater se stanovuje celkový i konjugovaný bilirubin. Pacienti s výraznou smíšenou hyperbilirubinemií mohou trpět například hepatidou infekčního původu, toxickým poškozením jater, chronickým poškozením jater, cirhosou či cholestasou. Vzestup sérového nekonjugovaného bilirubinu naznačuje Gilbertův syndrom, hemolýzu, neefektivní erytropoézu či poukazuje na novorozeneckou žloutenku [11, 30, 33]. Hyperbilirubinemie konjugovaná většinou značí nádor, žlučový kámen nebo poměrně vzácný Dubinův-Johnsonův syndrom [11, 34].

V neposlední řadě patří mezi nejčastěji stanovované parametry funkčnosti jater také plazmatické proteiny. Hepatocyty produkují hlavně albumin, α_1 -antitrypsin, haptoglobin, ceruloplasmin, transferin a několik koagulačních faktorů. Hladina některých proteinů roste v závislosti na poškození tkáně (zánět) a naopak nižší hladiny obvykle odráží selhání jater [11, 30].

1.2 Biotransformace xenobiotik

Díky rozvoji nových technologických procesů se začíná v životním prostředí hromadit čím dál více xenobiotik. Xenobiotika (z řeckého *xenos* = cizí, *bios* = život) jsou v organismu přirozeně nevyskytující se látky, které neplní žádnou fyziologickou funkci a často mají naopak negativní dopad na lidské zdraví. Jedná se buď o přírodní sloučeniny (sekundární metabolity rostlin) nebo cíleně vyrobené či odpadní látky (především chemický průmysl), jako jsou léky, potravinářská aditiva, pesticidy či polutanty životního prostředí. Všechny organismy jsou xenobiotikům neustále a nevyhnutelně vystavovány a mohou s nimi interagovat několika způsoby – xenobiotikum s organismem nereaguje a je vylučováno v nezměněné podobě, xenobiotikum je v organismu akumulováno a xenobiotikum podléhá biotransformaci I. fáze a/nebo II. fáze, přičemž je díky enzymově katalyzované reakci přeměněno na látky, které jsou z organismu snadněji vylučovány. Poškození lidského organismu závisí především na toxicitě, koncentraci a době působení dané cizorodé látky [35–37].

Osud xenobiotika v organismu má několik fází. Nejprve dochází k samotnému vstupu léčiv či jiných xenobiotik do organismu. Často se rozlišují dvě možnosti vstupu – parenterální a enterální. Enterální podání zahrnuje všechny alimentární cesty (sublingvální, orální a rektální), zatímco parenterální aplikace zahrnuje všechny způsoby, které obcházejí gastrointestinální trakt (intravenózní, intraperitoneální, intramuskulární, subkutánní atd.)

[35]. Následně se xenobiotika v závislosti na svých fyzikálně-chemických vlastnostech dostávají procesem zvaným absorpce především skrze GIT, respirační systém nebo pokožku do krevního řečiště, čímž dochází k distribuci xenobiotik k cílovým buňkám. Rychlost distribuce je určena primárně průtokem krve a rychlostí difúze z kapilár do buněk určitého orgánu nebo tkáně. Tyto faktory bývají ovlivňovány věkem, patologickými stavy nebo jsou závislé na jiných vnějších vlivech. Konečná distribuce závisí do značné míry také na afinitě xenobiotika k buňkám daného orgánu. K následnému pronikání xenobiotik do cílových buněk může docházet několika způsoby – aktivním transportem nebo exo/endocytosou, volnou difúzí a usnadněnou difúzí, kdy mohou cizorodé látky interagovat s plazmatickými proteiny, které plní funkci transportérů (např. albumin) [35, 36, 38, 39].

V cílových buňkách orgánů či tkání dochází k metabolické přeměně xenobiotik (biotransformace). Biotransformace cizorodých látek je klíčovým detoxikačním procesem všech organismů. Jedná se o důležitý mechanismus pro udržení homeostázy a bez těchto degradačních reakcí by v závislosti na vysokých koncentracích či dlouhodobém působení xenobiotika docházelo k nevratnému poškození organismu a jeho následnému zániku. Výsledkem biotransformace je změna fyzikálních i chemických vlastností cizorodých látek, zpravidla těch, které podporují absorpci (lipofilnost) na ty, které podporují eliminaci (hydrofilnost). Proces biotransformace je důležitý také ve farmakologii, kdy jsou některá léčiva biotransformací naopak aktivována, což znamená, že terapeutický účinek má až samotný produkt, metabolit, nikoliv lék. Enzymové systémy katalyzující tyto reakce tak často určují intenzitu a trvání účinku léčiv. Dále hrají klíčovou roli v toxicitě a tumorigeně, jelikož kromě léčiv mohou aktivovat i většinu genotoxických karcinogenů. Jedná se o velmi komplexní enzymový systém, kdy jeden enzym může detoxikovat cizorodou látku, zatímco současně zvyšuje toxicitu látky jiné [35, 38, 40–42]. Široká substrátová specifita těchto enzymů umožňuje degradovat také velké množství endogenních látek, jako jsou například steroidní hormony, vitaminy A a D, bilirubin nebo žlučové kyseliny. Obecně jsou tyto biotransformační enzymy syntetizovány konstitutivně, ale některými xenobiotiky mohou být také indukovány. Biotransformace probíhá především v játrech, GIT, ledvinách či plicích a je rozdělována na dvě hlavní fáze – I. fáze, derivatizační a II. fáze, konjugační [35].

Posledním metabolickým krokem xenobiotika v organismu je jeho eliminace. Nejvíce xenobiotik je z těla vylučováno pomocí moči. Cizorodé látky se dále vylučují ve stolici, ve vydechaném vzduchu, v potu, slinách, slzách či v mateřském mléce. Pokud rychlost absorpce překročí rychlost eliminace, může docházet k nebezpečnému hromadění

xenobiotik a následným otravám organismu. Například játra, kosti či ledviny mohou zadržovat těžké kovy a látky lipofilní povahy jsou ukládány v tukové tkáni [35, 43, 44].

Metabolismu xenobiotik mohou ovlivňovat také environmentální a genetické faktory. Tyto faktory mohou indukovat či inhibovat enzymy metabolizující xenobiotika a mohou měnit rovnováhu mezi toxikací a detoxikací. Mezi environmentální faktory patří například jiné léky, steroidy, dietní faktory, alkohol či cigaretový kouř [35, 45].

1.2.1 I. fáze biotransformace

I. fáze biotransformace, nazývaná také jako derivatizační fáze, je proces, při kterém dochází k odhalení nebo zavedení polárních funkčních skupin (např. -OH, -NH₂, -COOH, -SH) u xenobiotik. To obvykle vede k určitému zvýšení jejich hydrofilnosti a následně větší rozpustnosti. Dochází tak k menšímu hromadění xenobiotik v organismu a jejich snadnější eliminaci. Dále jsou tyto metabolity schopny dalších interakcí a mohou se účastnit konjugace s aminy, kyselinami či alkoholy v následné II. fázi [35, 40].

Do I. fáze biotransformace se řadí oxidace, redukce a hydrolýza. Xenobiotika, která obsahují ester, amid, thioester či kyselý anhydrid jako funkční skupinu, podléhají hydrolýze katalyzované především karboxylesterasami, cholinesterasami a organofosfatasami. K redukci pak dochází nejčastěji u nitro- a azo- sloučenin, aldehydů, ketonů, disulfidů nebo sulfoxidů. Redukce může probíhat enzymaticky (reduktasy) i neenzymaticky [35, 46]. Oxidace je pak nejčastější biotransformační reakcí a nejdůležitějšími skupinami enzymů jsou monooxygenasy, dioxygenasy a peroxidasy, které se nachází jak v mikrosomální frakci, tak v cytosolu. Příkladem mikrosomálních oxidačních reakcí jsou hydroxylace alifatických skupin, dealkylace, oxidační deaminace, dehalogenace či tvorba sulfoxidu. Díky monooxygenasám je začleněn jeden atom kyslíku do molekuly xenobiotika, dioxygenasy inkorporují dva atomy. Monooxygenasy se dále ještě mohou dělit na dvě skupiny – flavin-obsahující monooxygenasy, které jsou schopny katalyzovat monohydroxylaci aromatického kruhu, a oxygenasy se smíšenou funkcí, jehož součástí jsou cytochromy P450 (CYP), pravděpodobně nejdůležitější enzymy účastnící se biotransformačních procesů. Dále se mezi enzymy katalyzující oxidační reakce I. fáze řadí také alkoholdehydrogenasa, aldehyddehydrogenasa, aldehydoxidasa, xanthinoxidasa nebo tyrosinhydroxylasa [35, 37, 38, 47, 48].

U xenobiotik obsahujících již vhodnou funkční skupinu, která je schopna účastnit se konjugací ve II. fázi biotransformace, první fáze zcela schází. Mezi takovéto látky se řadí například flavonoidy [47, 49].

1.2.2 II. fáze biotransformace

Při druhé fázi biotransformačních reakcí, nazývané také jako konjugační fáze, dochází k interakcím mezi endogenní sloučeninou a funkčními skupinami, které buď byly na xenobiotiku již přítomny nebo odkryty či zavedeny ve fázi první. Biotransformační reakce II. fáze zahrnují glukuronidaci, sulfataci, acetylaci, metylaci, konjugaci s glutathionem za vzniku kyseliny merkapturové a konjugaci s aminokyselinami (např. glycin, kyselina glutamová). Obvykle dochází ke snížení biologické aktivity xenobiotika a většinou vedou tyto reakce také k výraznému zvýšení jeho hydrofilnosti. Metabolity nemohou difundovat přes membrány, jsou aktivně transportovány a snižuje se tak množství reabsorbované renálními tubuly, což vede k většímu množství vyloučeného xenobiotika z těla. Ovšem i ve druhé fázi biotransformace může docházet ke zvýšení biologické aktivity cizorodých látek a pokud je konjugát nestabilní, rozpadá se za vzniku toxičtější sloučeniny s karcinogenním potenciálem [35, 38, 40]. Reakce druhé fáze jsou výrazně rychlejší než reakce derivatizační, tudíž rychlost eliminace cizorodých látek je obecně definována pouze I. fází biotransformace [38]. Tyto konjugační reakce jsou obvykle katalyzovány enzymy ze třídy transferas a stejně jako enzymy první fáze se nachází v mnoha tkáních. Nejvíce jsou však obsaženy v játrech a to především v endoplazmatickém retikulu a cytosolu buněk [35, 40, 50].

Nejčastější konjugační reakcí je glukuronidace (40–70 % všech klinických léčiv je podrobena glukuronidačním reakcím). Jedná se o konjugaci s kyselinou glukuronovou katalyzovanou UDP-glukuronyltransferasou. Ke glukuronidaci dochází nejčastěji u alifatických alkoholů a fenolů, karboxylových kyselin či u primárních a sekundárních aromatických a alifatických aminů. Kromě mnoha xenobiotik (např. paracetamol, morfin) dochází ke glukuronidaci i u endogenních sloučenin, jako je bilirubin, steroidní hormony nebo hormony štítné žlázy [35, 50, 51]. Sulfatace je další významná reakce konjugační fáze katalyzovaná sulfotransferasami. Kofaktorem reakce je 3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfát a obecně je produktem ester kyseliny sírové, který je dobře rozpustný ve vodě. Mezi největší skupiny substrátů sulfotransferas patří primární (např. ethanol, polyethylenglycol)

a sekundární (2-butanol, cholesterol) alkoholy, fenoly či aromatické aminy [52, 53]. Methylace se liší od většiny ostatních reakcí druhé fáze, jelikož snižuje rozpustnost xenobiotik ve vodě a maskuje funkční skupiny, se kterými by jinak mohlo docházet ke konjugacím s jinými sloučeninami. Výjimkou těchto pravidel bývá *N*-methylace (produktem jsou kvartérní amoniové ionty) a *S*-methylace (produktem jsou pozitivně nabitě ionty sulfoxidu), kdy jsou konjugáty rozpustné ve vodě a snadno vylučitelné [35]. *N*-acetylace je hlavní konjugační cestou zejména pro xenobiotika obsahující aromatické aminy nebo hydrazinové funkční skupiny. Reakce jsou katalyzovány *N*-acetyl-transferasami, vyžadují acetylkoenzym A jako kofaktor a probíhají mechanismem známým jako „ping-pong“ [54]. Konjugace xenobiotik s glutathionem, který je tvořen glycinem, cysteinem a kyselinou glutamovou, je reakce katalyzovaná glutathion-*S*-transferasami, jejímiž substráty jsou sloučeniny hydrofobní a obsahující elektrofilní atom, především pak epoxidy, nenasycené ketony, prostaglandiny a steroidy [55, 56]. Glutathion-*S*-transferasy jsou důležité pro ochranu buňky proti oxidačnímu poškození [40].

1.3 Metabolismus alkoholu

Alkohol je spolu s tabákem nejhojněji konzumovanou škodlivou sloučeninou na světě, a přestože je alkoholismus poměrně častým problémem a silná konzumace alkoholu poškozuje téměř každou tkáň a orgán lidského těla, výskyt některých patologických stavů spojených s konzumací alkoholu je až překvapivě nízký (například cirhosa jater se vyvíjí pouze u zhruba 10–15 % silných konzumentů) [57, 58].

Absorpce ethanolu začíná již 10 minut po jeho požití a je absorbován především v tenkém střevě a částečně v břišní dutině. Přítomnost potravy v žaludku snižuje vstřebávání alkoholu. Ethanol přechází membránami pasivní difúzí a je distribuován v lidském těle do všech tkání a tekutin v poměru k jejich relativnímu obsahu vody. Ačkoli se metabolická kapacita pro eliminaci alkoholu značně liší, průměrná rychlost metabolismu je asi 1 g alkoholu na 10 kg tělesné hmotnosti za hodinu (např. alkoholici přijímají cca 200–300 g ethanolu denně). Pokud dochází k překročení této hodnoty, nastává akumulace v organismu následovaná intoxikací [35]. Koncentrace alkoholu v krvi je dána množstvím požitého alkoholu, přítomností potravy v žaludku, faktory ovlivňující vyprazdňování žaludku a rychlostí oxidace ethanolu. Množství alkoholu v tkáni závisí na obsahu vody,

rychlosti proudění krve a hmotnosti tkáně. Primárně je ethanol vylučován urinární eliminací či výdechem [35, 59].

U lidí je více než 90 % požitého alkoholu eliminováno metabolickými procesy v játrech (oxidační cesta) a zbylých 10 % podstupuje neoxidační cestu v extrahepatálních tkáních [60]. Při oxidační cestě se ethanol nejprve metabolizuje na acetaldehyd několika enzymatickými i neenzymatickými mechanismy. Acetaldehyd je první produkt metabolismu ethanolu. Jedná se o biologicky aktivní sloučeninu, která je vysoce reaktivní a toxická. Indukuje řadu hepatotoxických a také behaviorálních účinků. Oxidace ethanolu na acetaldehyd je katalyzována především alkoholdehydrogenasou (viz kapitola 1.3.1, str. 27) [59, 61].

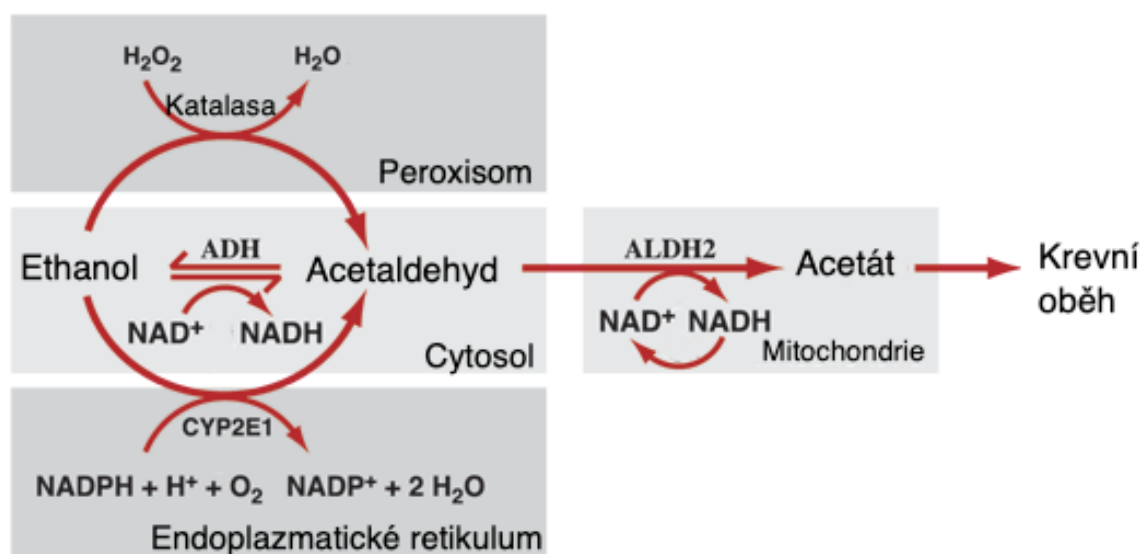
Společně s ADH se na metabolismu ethanolu podílí také mikrosomální ethanol-oxidující systém cytochromu P450, konkrétně pak CYP2E1. Tyto enzymy jsou obsaženy v endoplazmatickém retikulu buněk, kromě jater se vyskytují i ve střevech a mozku a mají spíše vedlejší roli v metabolismu alkoholu. Biotransformace se účastní především po jeho chronické konzumaci (CYP2E1 je indukován alkoholem) či při nedostatku NAD^+ . Mechanismus reakce se výrazně odlišuje od mechanismu ADH (viz obrázek 4, str. 26). Během katalytického cyklu CYP2E1 dochází k produkci značného množství ROS [60, 62–64].

Další enzym, který je schopen v přítomnosti peroxidu vodíku (dodáván působením NADPH oxidasy a xanthioxidasy) oxidovat alkohol na acetaldehyd, je katalasa. Katalasa se nachází v buněčných peroxisomech a katalyzuje reakci v případě, že organismus hladoví. Ve studiích prováděných na potkanech bylo zjištěno, že inhibitory katalasy snižují oxidaci alkoholu na acetaldehyd v mozku, což hraje roli ve vývoji tolerance k alkoholu a jeho dobrovolné konzumaci [59, 60, 65, 66].

Dalším krokem je v metabolismu alkoholu oxidace acetaldehydu na acetát. Reakce je katalyzována především aldehyddehydrogenasou (viz kapitola 1.3.2, str.29).

V extrahepatálních tkáních (např. srdce, slinivka) je oxidační metabolismus minimální nebo zcela chybí. Tyto lidské orgány tedy metabolizují ethanol prostřednictvím neoxidační cesty. Reakce mezi ethanolem a mastnou kyselinou vedou k tvorbě ethylesterů mastných kyselin (FAEE, z anglického „fatty acid ethyl esters“) za přítomnosti FAEE synthasy. FAEE mohou být toxické, inhibují syntézu DNA a proteinů a také slouží jako marker příjmu alkoholu poté, co již samotný alkohol v krvi není přítomný [61, 67]. Při vysokých koncentracích cirkulujícího alkoholu může vznikat také fosfatidylethanol. Reakce vyžaduje

přítomnost fosfolipasy D, která za normálních okolností katalyzuje reakci štěpení fosfolipidů za vzniku kyseliny fosfatidové a hraje roli v buněčné signalizaci. Degradace fosfatidylethanolu je poměrně pomalá, dochází k jeho hromadění v buněčných membránách a může tak ovlivňovat různé procesy (např. membránové vlastnosti, enzymové aktivity či hladiny signálních molekul) [59, 68]. K biotransformaci alkoholu může dále docházet konjugacími reakcemi, kdy je alkohol konjugován s kyselinou glukuronovou za vzniku ethylglukuronidu či se sulfátem za vzniku ethylsulfátu. Ethylglukuronid je netěkavý ve vodě rozpustný metabolit, který může být detekován například v potu či vlasech i po delší době po odstranění alkoholu. Význam konjugace alkoholu se sulfátem není zcela znám. Předpokládá se, že sulfátová konjugace představuje významnou metabolickou cestu pro detoxikaci alkoholu na počátku vývojového procesu plodu [53, 59]. Oxidační a neoxidační cesty metabolismu alkoholu jsou navzájem provázány, inhibice ADH či CYP2E1 vede ke zvýšení neoxidačního metabolismu alkoholu a vyšší produkci FAEE v játrech a slinivce břišní. Neoxidační metabolismus ethanolu může být vedle oxidační cesty důležitý v patologii onemocnění vyvolaného konzumací alkoholu [61, 66].



Obrázek 4: Oxidační cesta biotransformace alkoholu. Enzymy alkoholdehydrogenasa (ADH), cytochrom P450 2E1, katalasa a aldehyddehydrogenasa (ALDH2) se účastní metabolismu ethanolu. Převzato a upraveno z [61].

Mezi nejvýznamnější nemoci spojené s příjmem alkoholu patří cirhosa jater, pankreatitida, kardiomyopathie či hematologické, neurologické a psychiatrické poruchy

[69]. Chronická konzumace také značně zvyšuje riziko vzniku rakoviny jícnu, dutiny ústní a jater. Ke karcinogenezi zprostředkované alkoholem přispívá celá řada mechanismů – toxický účinek acetaldehydu a/nebo reaktivních forem kyslíku, indukce CYP2E1, inhibice methylace DNA, abnormální metabolismus vitamínu A a jeho derivátu kyseliny retinové [70]. Chronická konzumace alkoholu způsobuje přibližně 3,6 % všech druhů nádorových onemocnění [58].

1.3.1 Alkoholdehydrogenasa

Alkoholdehydrogenasa je enzym ze skupiny oxidoreduktas katalyzující především přeměnu primárních či sekundárních alkoholů, aromatických alkoholů a hemiacetalů na jejich příslušné aldehydy či ketony. Jedná se o jedny ze základních prokaryotických i eukaryotických reakcí. Na základě požadovaného kofaktoru bývají tyto enzymy obecně děleny do tří skupin. ADH spadající do první skupiny využívají při katalýze pyrrolochinolin chinon či kofaktor F_{420} , ve druhé skupině využívají kofaktoru flavinadenindinukleotidu a v poslední skupině se nachází nikotinamidadenindinukleotid- nebo nikotinamidadenindinukleotidfosfát-dependentní alkoholdehydrogenasy. Živočišné, rostlinné a mikrobiální ADH z této poslední zmíněné kategorie mohou být dále děleny podle strukturních a funkčních vlastností [71, 72].

Funkce ADH se mohou značně odlišovat v závislosti na organismu, ve kterém se nachází – v rostlinách hrají hlavní roli v anaerobním metabolismu a v produkci atraktantů, v kvasinkách redukuje acetaldehyd na ethanol (tzv. alkoholová fermentace) a u některých živočichů se také zapojují do metabolismu hormonů [73, 74].

Lidská alkoholdehydrogenasa je hlavní enzym zapojený do oxidačního metabolismu ethanolu. Jedná se o cytosolický enzym obsažený v několika tkáních, včetně jater, ledvin, plic či žaludeční sliznice [72, 75].

ADH představuje komplexní enzymovou rodinu. Lidská ADH je homo/heterodimerní protein skládající se ze dvou zhruba 40kDa podjednotek. Každá ze dvou podjednotek savčí ADH obsahuje dva ionty Zn^{2+} – jeden atom zinku s katalytickou funkcí a jeden atom zinku s funkcí strukturní. Ion Zn^{2+} je tetraedrálně koordinovaný k histidinovým a cysteinovým zbytkům [76]. Podjednotky α , β , γ , π , χ a σ (též nazývaná jako μ) jsou kódovány šesti různými třídami genů (*ADH1A*, *ADH1B*, *ADH1C*, *ADH4*, *ADH5* a *ADH6*). Dále existují tři alelické varianty β podjednotky (β_1 , β_2 a β_3) a dvě alelické varianty podjednotky γ (γ_1 a γ_2).

Lidské ADH enzymy tedy zahrnují celkem devět podjednotek, z nichž se všechny mohou kombinovat jako homodimery a podjednotky α , β , γ a jejich alelické varianty mohou mezi sebou tvořit také heterodimery.

Na základě molekulárních podob jsou lidské enzymy z této rodiny rozděleny do čtyř hlavních tříd. Třída I obsahuje enzymy ADH1A, ADH1B a ADH1C. ADH1A se může skládat buď ze dvou α podjednotek či z α plus β nebo γ podjednotky. ADH1B obsahuje buď dvě β podjednotky nebo β plus γ podjednotku a ADH1C se skládá ze dvou podjednotek γ . Tyto enzymy jsou zodpovědné za oxidaci ethanolu a jiných krátkých alifatických alkoholů. Jsou silně inhibovány pyrazolem a jeho alkylovými deriváty (4-methylpyrazolem, který se používá jako antidotum při otravě methanolem). Jejich exprese probíhá především v játrech a nadledvinkách a nevyskytují se v mozku. Jejich enzymová aktivita se i u těch, které se od sebe navzájem liší pouze jedinou aminokyselinou, značně odlišuje. Homodimery složené z podjednotek β_2 a heterodimery obsahující alespoň jednu podjednotku β_2 jsou velmi aktivní při oxidaci ethanolu za fyziologického pH. Alelické varianty *ADH1B* hrají hlavní roli v etnických rozdílech při konzumaci alkoholu a jeho toxicitě.

Třída II obsahuje enzym ADH4, který je tvořen dvěma π podjednotkami. Enzymy z této třídy se nachází primárně opět v játrech, kde přednostně oxidují delší alifatické a aromatické alkoholy. Nehrají téměř žádnou roli v oxidaci ethanolu či methanolu, čímž se liší od enzymů třídy I.

Třída III obsahuje enzym ADH5, který je složen ze dvou podjednotek χ (z tohoto důvodu jsou také někdy nazývány jako „chi-ADH“). Vhodnými substráty pro tuto třídu jsou alkoholy s dlouhým řetězcem a aromatické alkoholy (např. cinnamylalkohol). Enzymy z této třídy jsou přítomny ve všech tkáních.

Třída IV obsahuje enzym ADH6, který je tvořen dvěma podjednotkami σ a je nejaktivnější při oxidaci retinolu. Enzymy z této třídy se exprimují v žaludku a dalších oblastech GIT a nenachází se v dospělých lidských játrech [77–79]. Alkohol, který se po orálním požití nedostává do systémového oběhu, může být oxidován přímo v žaludku. Žaludeční ADH má v porovnání s jaterní nižší afinitu ale větší kapacitu pro oxidaci ethanolu. Žaludeční alkoholdehydrogenasa je tedy významná v závislosti na způsobu konzumace. Velké dávky během krátké doby způsobují vysoké koncentrace ethanolu v žaludku. Podle některých studií ženy trpící alkoholismem nemají detekovatelnou žaludeční ADH a hladiny ethanolu v krvi jsou po perorálním podání stejné jako po intravenózním. Aktivita žaludeční

ADH se snižuje za stavu nalačno. Nekompetitivním inhibítorem žaludeční ADH je například aspirin. Vzhledem k četnému výskytu ADH6 především v horní oblasti GIT a funkci při přeměně retinolu (tvorba kyseliny retinové je inhibována alkoholem a může vést ke změně diferenciaci a růstu epiteliálních buněk) se jedná o důležitý enzym, který by mohl souviset s rozvojem nádorového bujení po chronické konzumaci alkoholu [80].

Přeměna ethanolu na acetaldehyd katalyzovaná ADH vyžaduje kofaktor NAD^+ , který je redukován dvěma elektrony za vzniku $\text{NADH} + \text{H}^+$. Redoxní poměr NAD^+/NADH se tedy v důsledku této oxidace v buňce snižuje, což má účinky na jiné metabolické cesty (glykolýzu, oxidaci mastných kyselin či glukoneogenezi). Nedostatek NAD^+ může být pro degradaci ethanolu limitujícím krokem a je tedy důležitá jeho regenerace. Hlavním systémem pro reoxidaci $\text{NADH} + \text{H}^+$ je mitochondriální elektronový přenosový systém, který však nemá dostatečně vysokou kapacitu a často tak při vyšších dávkách alkoholu dochází k hromadění $\text{NADH} + \text{H}^+$. Vysoké hladiny redukované formy nikotinamidadeninukleotidu inhibují aktivitu Krebsova cyklu či stimulují syntézu cholesterolu a TAG, což může vést k jaterní steatose [59].

1.3.2 Aldehyddehydrogenasa

Aldehyddehydrogenasa je enzym ze skupiny oxidoreduktas katalyzující především přeměnu alifatických a aromatických aldehydů za vzniku karboxylových kyselin. Kyseliny jsou polárnější než odpovídající aldehyd, což usnadňuje jejich vylučování. Jedná se o reakce vyžadující kofaktor NAD^+ .

Lidská ALDH je homotetramer s relativní molekulovou hmotností 216 kDa [81]. Existuje mnoho forem ALDH, které jsou rozděleny do devíti hlavních tříd a kódovány dvanácti různými geny. Aldehyddehydrogenasy mají dvě hlavní funkce. Jsou klíčové pro normální vývoj organismu, protože oxidují například retinal na kyselinu retinovou. A chrání organismus před potencionálně toxickými aldehydy obsaženými v potravinách či jiných xenobiotikách. Na metabolismu acetaldehydu produkovaného během oxidace ethanolu se pak podílí pouze dva enzymy z této rodiny. Konkrétně se jedná o ALDH1 nacházející se v cytosolu buňky a ALDH2 (viz obrázek 4, str. 26) nacházející se v mitochondriální části buněk. ALDH2 je exprimována v játrech a žaludku, ale vyskytuje se také v jiných tkáních včetně mozku [66].

Existuje vysoká individuální variabilita metabolismu alkoholu, která je většinou způsobena genetickými variacemi aldehyddehydrogenasy. Tyto genetické polymorfismy určují úroveň akumulace acetaldehydu po konzumaci alkoholu, a proto mají vliv na individuální citlivost na jeho toxické účinky a alkoholismus. Například asi 50 % Asiatů má neaktivní formu ALDH a po požití ethanolu trpí návaly, bolestí hlavy, tachykardií, nevolností, zvracením a hyperventilací [35, 66, 82–84]. Jako další příklad mohou sloužit nosiči neaktivní alely *ALDH2*2*, kteří mají zvýšené riziko nádorového bujení jícnu. Tato inaktivní alela je poměrně běžná u lidí čínského, japonského a korejského původu a u lidí evropského či afrického původu chybí [57].

Mezi inhibitory aldehyddehydrogenasy patří například lék disulfuram, který se také využívá jako doplňkový prostředek na podporu abstinence, dále kyanamid, s nímž byly ovšem spojeny nežádoucí účinky, či některá cefalosporinová antibiotika. Inhibitory tohoto enzymu lze nalézt také v běžných potravinách jako je zelí či houby [38].

Přesná rovnováha mezi rychlostí oxidace ethanolu a acetaldehydu by mohla být klíčová při určování koncentrací acetaldehydu v buňkách. Malé rozdíly v relativních aktivitách ADH a ALDH mohou způsobit významné rozdíly v koncentraci acetaldehydu.

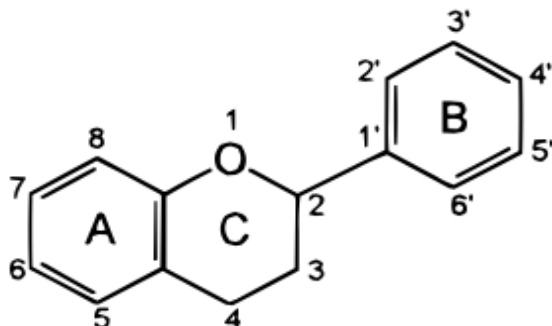
1.4 Flavonoidy

Flavonoidy jsou látky přírodního původu s variabilními fenolovými strukturami nacházející se například v ovoci, zelenině, čaji nebo víně. Tyto přírodní produkty jsou dobře známy pro své široké spektrum pozitivních účinků na lidský organismus. Bylo identifikováno již více než 8000 sloučenin flavonoidní struktury. V dnešní době jsou již nepostradatelnou složkou různých nutraceutických, farmaceutických, léčebných a kosmetických přípravků [5, 6].

Základní strukturu flavonoidů tvoří flavanové jádro složené z patnácti uhlíků spojených do tří kruhů, které se označují jako A, B a C (viz obrázek 5, str. 31). Flavonoidy se na základě stupně oxidace a druhu substituce kruhu C dělí na několik skupin: flavony, flavonoly, flavanony, flavanonoly, flavanoly, isoflavony, anthokyanidiny, flavonolignany a chalkony [5, 85].

Flavonoidy jsou sekundární metabolity rostlin vyskytující se ve formě glykosidů, aglykonů či methylovaných derivátů. Ve vyšších rostlinách plní mnoho důležitých funkcí. Jsou zodpovědné za barvu a vůni květů či plodů, chrání rostliny před různými biotickými

a abiotickými stresy, slouží jako ochrana před UV zářením, fungují jako signální molekuly, detoxikační činidla, fytoalexiny či mohou sloužit jako antimikrobiální obranné sloučeniny [5]. Biosyntéza flavonoidů začíná kondenzací 4-kumaroyl-CoA se třemi molekulami malonyl-CoA za vzniku chalkonu, prekursoru všech flavonoidů [6].



Obrázek 5: Flavanová struktura. Základní struktura flavonoidů.

Jedná se o látky, které jsou nedílnou součástí potravy lidí i zvířat. Flavonoidy jsou v potravinách obecně zodpovědné za barvu, chuť, prevenci oxidace tuků a ochranu vitaminů a enzymů. Mezi hlavní zdroje patří ovoce a ovocné produkty (například citrusové plody, borůvky, šípky a třešně), zelenina (cibule, špenát či brokolice), čajové lístky, ořechy či sójové boby. Jejich průměrný denní příjem v potravě se pohybuje okolo 50–800 mg/den (například u vitamínu C je to pouze 70–100 mg/den), což jsou hodnoty v porovnání s hodnotami použitými ve většině studií velmi nízké, přičemž příprava a zpracování potravin ještě dále snižuje množství obsažených flavonoidů [85–87].

Flavonoidy mají rozsáhlé biologické vlastnosti, které pomáhají snižovat riziko onemocnění. Byly objeveny ve třicátých letech [85] jako sloučeniny vykazující výraznou antioxidační aktivitu, což je jedna z jejich nejdůležitějších vlastností, pro kterou jsou často zpracovávány do formy potravních doplňků. Jak přijaté flavonoidy, tak jejich metabolity mohou bránit poškození způsobené ROS několika mechanismy: mohou přímo vychytávat reaktivní meziprodukty, jsou schopny chelatovat dvojmocné kovy, aby nebyly dostupné pro redoxní reakce, inhibují enzymy produkující reaktivní formy kyslíku nebo naopak aktivují antioxidační enzymy. Volné radikály jsou reaktivní sloučeniny, které se přirozeně produkují v lidském těle (nejčastěji se jedná o reaktivní formy kyslíku, například hydroxylové radikály, superoxidové anion radikály či lipidové peroxyradikály). Mohou mít jak pozitivní účinky (například na imunitní systém), tak negativní (poškozují různé buněčné komponenty, jako

jsou lipidy, proteiny či DNA). Nerovnováha mezi produkcí ROS a jejich odstraněním je definována jako oxidační stres. Oxidační stres může vést k buněčnému poškození, které souvisí s různými patologickými stavy, jako jsou diabetes mellitus, neurodegenerativní poruchy (např. Alzheimerova či Parkinsonova choroba), chronická žilní onemocnění a stárnutí [85, 88–91]. Flavonoidy se tedy používají jako chemopreventivní nutraceutika snižující výskyt koronárních onemocnění srdce, jater jakož i některých druhů rakoviny. Antioxidační vlastnosti těchto fenolických sloučenin také souvisí například s prevencí tvorby šedého zákalu a degradací žluté skvrny. Na druhou stranu mohou také některé flavonoidy působit za určitých okolností jako prooxidanty a oxidační poškození způsobovat [6]. Předpokládá se, že prooxidační aktivita je přímo úměrná celkovému počtu hydroxylových skupin v molekule flavonoidu [91].

Flavonoidy dále hrají klíčové role v antialergenních procesech, kdy inhibují uvolňování histaminu a biosyntézu interleukinu-4 [92]. Jejich antibakteriální vlastnosti jsou spojeny s inhibicí syntézy nukleových kyselin, změnou permeability membrány či zeslabením patogenity mikroorganismů [93]. Mezi další vlastnosti pak patří antivirové, kdy mohou snižovat infektivitu viru či jeho intracelulární replikaci, protizánětlivé, kdy účinky flavonoidů *in vitro* inhibují syntézu prozánětlivých mediátorů (např. cytokinů, C-reaktivních proteinů) či protinádorové, kdy inhibují topoisomerasu I a II, zpomalují proliferaci buněk a spouští apoptosu [94–96]. Na druhou stranu některé studie ukazují negativní účinky těchto přírodních sloučenin na lidský organismus, které bývají často přehlíženy. Při vyšších dávkách mohou flavonoidy působit jako mutageny, inhibitory syntézy některých hormonů či mohou indukovat/inhibovat klíčové biotransformační enzymy. Ve vysokých dávkách tak mohou nepříznivé účinky převažovat nad těmi prospěšnými a je tedy třeba dbát zvýšené opatrnosti [97, 98].

1.4.1 Interakce flavonoidů s biotransformačními enzymy

Farmakokinetika jednotlivých flavonoidů je velmi komplexní. Flavonoidy bývají obvykle absorbovány v tenkém střevě, některé však byly považovány za neabsorbovatelné, jelikož jsou vázány na sacharidy ve formě β -glykosidů. Mikroorganismy v tlustém střevě je ovšem hydrolyzují na aglykony, u nichž se očekává lepší průchodnost střevní stěnou. Na druhou stranu například quercetin je absorbován jako glykosid mnohem lépe než jako aglykon [99]. Vždy tedy záleží na konkrétní sloučenině a její biologické aktivitě. Následná

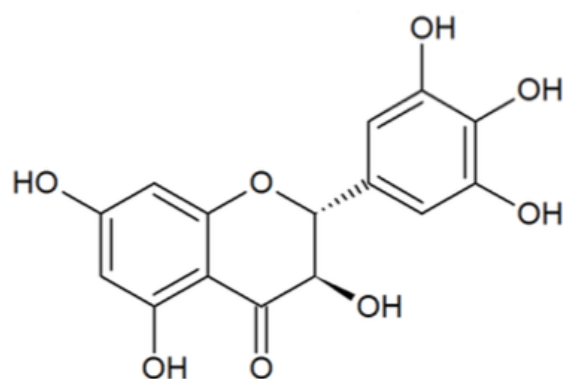
distribuce flavonoidů využívá ATP-(in)dependentní transportéry. Hlavním místem metabolismu flavonoidů je mikroflóra tlustého střeva, která degraduje flavonoidy na fenolové kyseliny, a játra, kde dochází ke glukuronidaci, sulfataci nebo methylaci. Biologický poločas eliminace konjugovaných flavonoidů je poměrně dlouhý (23–28 hodin), tudíž při pravidelném příjmu dochází k akumulaci flavonoidů a k dosažení koncentrace, která již ovlivňuje lidský organismus. Exkrece flavonoidů probíhá biliární nebo renální cestou [6, 87, 99–101].

Jelikož flavonoidy často ovlivňují vlastnosti farmaceutických léčiv (snižují jejich terapeutický účinek nebo zvyšují jejich toxicitu), je pro další vývoj terapeutik studium interakcí flavonoidů s biotransformačními enzymy klíčové [102]. Již řada studií prokázala jejich vliv na enzymy podílející se na metabolismu cizorodých látek. Flavonoidy ovlivňují například cytochromy P450, nejdůležitější enzymy účastníci se biotransformace, a to hned několika způsoby: indukují expresi několika CYP a inhibují či stimulují jejich metabolickou aktivitu či jsou cytochromy P450 přímo metabolizovány. Flavonoidy mohou ovlivňovat metabolismus léčiv právě indukcí specifických CYP, dále modulují například katalytickou aktivitu xanthinoxidasy i některých enzymů druhé fáze (například glutathion-*S*-transferasy, *N*-acetyltransferasy) [6, 103, 104].

Flavonoidy mohou také modulovat aktivitu enzymů zapojených do metabolismu alkoholů. Například quercetin nekompetitivně inhibuje alkoholdehydrogenasu izolovanou z kvasinky, spolu s resveratrolem inhibují aktivitu aldehyddehydrogenasy a isoflavanony (sophoronol 2, sophoraisoflavanon A3 a kensanon H4) zvyšují aktivitu obou těchto enzymů již v mikromolárních koncentracích [105–107]. Lidskou ADH inhibuje například genistein či daidzen, flavonoidy nacházející se v sójových bobech, isoflavon prunetin a čtyři flavony hydroxyflavon, apigenin, galangin a kaempferol. Některé deriváty těchto zmíněných flavonoidů pak neinhibují samotnou ADH, ale jsou účinnými inhibitory ALDH [108]. Konzumace alkoholu se také nedoporučuje současně s čerstvým pomerančovým džusem nebo energetickými nápoji (konkrétně Red Bullem), které výrazně zvyšují koncentrace acetaldehydu v krvi, zvyšují aktivity ALT i AST a inhibují aktivitu ALDH. Doporučen je zelený čaj, který urychluje metabolismus ethanolu a působí preventivně na poškození jater způsobené alkoholem [109]. Dihydromyricetin je ovšem stále nejvíce diskutovaným flavonoidem v souvislosti s jeho účinky působícími proti intoxikaci alkoholu (viz dále).

1.4.2 Dihydromyricetin

Dihydromyricetin (viz obrázek 6, str. 34), nazývaný též ampelopsin, patří do rodiny flavanonolů a bývá izolovaný převážně z kmene a listů dvou druhů rostlin. První z nich je *Ampelopsis grossedentata*, divoká rostlina bohatá na flavonoidy, která se v tradiční čínské medicíně používá k léčbě horečky nebo kašle již více než stovky let. Fytochemické studie ukázaly, že DHM spolu s myricetinem jsou dva hlavní flavonoidy vyskytující se v této rostlině, respektive obsah DHM (20–30 % w/w) je mnohem vyšší než obsah myricetinu (1,5–3,0 % w/w) [110]. Druhou rostlinou z níž je DHM izolován je *Hovenia dulcis*, známá též jako „rozinkový japonský strom“, běžně rostoucí ve východní Asii – nalézt ji můžeme v Japonsku, Koreji, Číně, ale i v Himalájích, a to až do 2000 m n. m. Výtažky z této rostliny patří ve východním světě mezi přední hepatoprotektivní přípravky používané při detoxikaci po otravě alkoholem nebo při samotné kocovině [3, 111].



Obrázek 6: Strukturální vzorec dihydromyricetinu.

Jak již bylo zmíněno, flavonoidy mají mnoho příznivých účinků na lidský organismus. Také dihydromyricetin vykazuje četné farmakologické vlivy. DHM má antioxidační vlastnosti. Je schopen vychytávat volné radikály, inhibovat aktivitu superoxidového anion radikálu a inhibovat peroxidaci lipidů, což vede ke zmírnění oxidačního stresu a ke stimulaci buněčné vitality [112]. Dihydromyricetin také snižuje hladinu glukosy v krvi, zlepšuje inzulínovou rezistenci a zmírňuje diabetickou kardiomyopatii [113]. Ampelopsin dále působí neuroprotektivně a získává obrovskou pozornost jako slibné léčivo pro Alzheimerovu, Parkinsonovu nebo Huntingtonovu chorobu, jelikož se předpokládá, že oxidační stres je primárním faktorem u těchto neurodegenerativních onemocnění. DHM je také spojován s potlačením hepatocelulárního karcinomu, nemalobuněčného karcinomu plic, osteosarkomu, ovariálního karcinomu a karcinomu žaludku [112]. Jeho

dermatoprotektivní účinky jsou přisuzovány inhibici aktivity tyrosinkinasy a snižování množství melaninu v buňkách. DHM zmírňuje růst melanomu a chrání před poškozením kůže UV zářením. Dihydromyricetin se dále používá k léčbě bakteriálních infekcí, osteoporózy, astmatu, depresí a poranění ledvin. Může také chránit před kardiovaskulárními onemocněními a to inhibicí tvorby pěnových buněk během aterosklerózy, zvýšením odtoku cholesterolu, silnou kardioprotekcí při myokardiální ischemii, arytmií či hypertenzi plicní tepny [110]. Avšak jedny z jeho nejdůležitějších vlastností jsou ty, které působí proti účinkům alkoholu.

Dihydromyricetin významně snižuje chuť k alkoholu, má velmi dobrý vliv na projevy abstinence (potlačení úzkosti a přecitlivělosti) a nedávno byl také zaznamenán potencionální ochranný účinek proti fetálnímu alkoholovému syndromu. Tyto vlastnosti DHM jsou pravděpodobně spojeny se skutečností, že DHM působí jako antagonist receptorů GABA_A. V CNS je primárním inhibičním neurotransmiterem kyselina γ -aminomáselná (GABA) a hlavním excitačním neurotransmiterem je glutamát. EtOH mění rovnováhu mezi inhibičním a excitačním neurotransmiterem a zvyšuje inhibici způsobenou GABA_A receptorem. Dlouhodobá konzumace alkoholu pak také vede k plasticitě tohoto receptoru, což přispívá k závislosti na alkoholu [3, 4, 114]. Ve studiích provedených na potkanech DHM potlačuje indukované poškození jater tetrachlormethanem nebo galaktosaminem, inhibuje aktivitu sérových enzymů – ALT, AST i LDH, a celkově zmírňuje poškození jater [112, 113].

2 Cíl práce

Cílem předkládané diplomové práce bylo určení vlivu dihydromyricetinu na expresi a aktivitu alkoholdehydrogenasy za podmínek *in vitro* a *in vivo*. Pro dosažení tohoto cíle bylo třeba splnit následující dílčí úkoly:

- premedikovat potkany ethanolem, izolovat hepatocyty a optimalizovat jejich kultivační podmínky,
- určit míru poškození hepatocytů způsobené EtOH a DHM za použití stanovení markerů ALT a AST,
- určit vliv DHM na expresi ADH v hepatocytech metodou Western blot s následnou imunodetekcí,
- stanovit schopnost DHM modulovat aktivitu alkoholdehydrogenasy ve vzorcích hepatocytů,
- sledovat ovlivnění aktivity ADH dihydromyricetinem s izolovaným enzymem,
- určit vliv DHM na metabolismus EtOH na myším modelu.

3 Materiál a metody

3.1 Použité chemikálie

Abcam (UK)

králičí protilátka proti alkoholdehydrogenase (ab202951), RAT ALT SimpleStep ELISA kit

APIChem (Čína)

dihydromyricetin

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

aqua pro injectione

Bio-Rad (USA)

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

BioVendor (Česká republika)

^LALT (GPT) kit, ^LAST (GOT) kit, ^DBiocal standard

Cambrian chemicals (Kanada)

NAD⁺

Gibco[®] by life technologies[™] (USA)

fetální hovězí sérum (FBS), L-glutamin

Fluka (Švýcarsko)

2–merkptoethanol, dodecylsíran sodný (SDS), tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)

Lachema Brno (Česká republika)

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

Lach-ner (Česká republika)

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

Mlékárna Pragolaktos, a.s. (Česká republika)

trvanlivé mléko 0,5%

PENTA s.r.o. (Česká republika)

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

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

kolagen z potkaních ocásků, NADH

Serva (Německo)

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

Sigma-Aldrich (USA)

dimethylsulfoxid, dimethylthiazolyldifenyl-tetrazolium bromid (MTT), Dulbecco's fosfátový pufr (PBS), ethylenglycol-bis(2-amino-ethylether)-N,N,N',N'-tetraoctová kyselina (EGTA), glukosa, hovězí sérový albumin (BSA), chlorid sodný (0,9%), chlorid vápenatý, insulin, penicilin-streptomycin, rekombinantní koňská alkoholdehydrogenasa, SigmaFast tablety, trypanová modř, William's E medium

Whatman (USA)

filtrační papír, č. 3

Zentiva Group, a.s. (Nizozemsko)

albumin, heparin, kolagenasa produkovaná bakterií *Clostridium histolyticum*

3.2 Použité přístroje

Analytické váhy

Discovery (Ohaus Corp., USA)

Automatické pipety

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

Blotovací systém

Fastblot B43 (Biometra, Německo)

Centrifugy

Centrifuge 5418 (Eppendorf, Německo); ROTOFIX 32 (Hettich, Německo); Sigma 2K15 (Sigma, Německo); Spectrafuge C1301B (Labnet International, Inc., USA)

Elektroforetická aparatura

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

Injekční mikrostříkačka

MICROLITER Syringe 702RN (Hamilton, Švýcarsko)

Inkubátory

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

Kapilára potažená heparinem

Heparin Na – 75 mm, 60 µl (Keraglass a.s., Česká republika)

Laboratorní třepačka

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

Laminární box

HeraSafe HS18 (Heraeus, Německo)

Magnetická míchačka

Monotherm (Variomag, Německo)

Mikroskop

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

Mikrotitrační destičky

Nunclon™ Multidishes (Schoeller Pharma, Česká republika)

pH metr

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

Předvážky

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

Stavebnicové čerpadlo

Stavebnicové čerpadlo SC4 (Vývojové díly ČSAV, Česká republika)

Stěrka pro tkáňové kultury

Cell Scraper (BIOLOGIX Research Company, Čína)

Spektrofotometr

Cary 60 UV-Vis (Agilent Technologies, USA); Multiskan GO (Thermo Scientific, USA); Sunrise™ (Tecan Trading AG, Švýcarsko)

Vodní lázeň

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

Zdroj pro elektroforesu

PowerPac Basic (Bio-Rad, USA)

3.3 Metody

3.3.1 Premedikace potkanů

Jako pokusná zvířata byli použiti dospělí potkaní samci kmene Wistar o hmotnosti 300–400 g a stáří 7–12 týdnů. Zvířata byla chována za standardních podmínek při volném přístupu k vodě i granulované potravě, regulované laboratorní teplotě a 12hodinovém světelném režimu v akreditovaném zařízení Farmakologického ústavu 1.LF UK. Potkani byli rozděleni po dvou jedincích do dvou skupin. Premedikace probíhala čtyři dny podáním gaváží do žaludku 9,7 ml 40% ethanolu na 1 kg váhy a dva dny byl 20% ethanol přítomen také ve vodě, kterou měla zvířata k dispozici jako jediný zdroj pití. Kontrolní skupině bylo podáno gaváží do žaludku 9,7 ml PBS na 1 kg váhy. Pět hodin před operací byla všem skupinám odebrána potrava.

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

Izolace primárních hepatocytů z jater potkana proběhla standardní dvoustupňovou kolagenasovou metodou [115] s drobnými modifikacemi [116].

Experiment byl prováděn ve spolupráci s Bc. G. Hauptmanovou.

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

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

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

Pracovní roztok B: 26,1 mM NaHCO₃; 4,0 mM CaCl₂.2H₂O; 11% (v/v) roztok I

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

Pracovní roztoky byly 7 minut probublávány karbogenem (95% O₂ + 5% CO₂) a hodnota pH byla upravena na 7,4.

Nejprve bylo připraveno 250 ml pracovního roztoku A do první kádinky v lázni (EL 20R). Lázeň pro jaterní buňky byla temperována na 37°C. K 150 ml pracovního roztoku B bylo přidáno 50 mg kolagenasy a v 75 ml pracovního roztoku C bylo rozpuštěno 1,0 g albuminu. Potkan byl před vlastní izolací hepatocytů uspán ve skleněném zvonu etherem, po usnutí byl fixován k polystyrenové podložce a k čumáku mu byla dána kádinka s vatou pokropenou etherem sloužící k udržení etherové narkózy. Následně byla rozstřížena břišní dutina, odhrnuta střeva na pravou stranu ven a orgány omyty gázou namočenou ve fyziologickém roztoku. Do *vena cava* bylo aplikováno 0,2 ml heparinu. V délce cca 1 cm byla od tuku očištěna *vena portae*, pod kterou byly pinzetou provléknuty dvě nitě – horní nit byla zavázána na uzel, dolní nit nebyla zcela utážena. Po této přípravě byla céva nastříhnutá očními nůžkami a byla do ní zasunuta kanyla, která byla napojena na perfúzní aparaturu a utáhnutá dolní nit tak, aby kanyla nevypadla. Poté byl přes kanylu do jater pomocí stovebnicového čerpadla (SC4) puštěn pracovní roztok A. Přívod roztoku byl uzavřen ve chvíli, kdy došlo ke zvětšení a změně barvy jater. Játra po odstříhnutí a vyjmutí z dutiny břišní byla v kádince opláchnuta fyziologickým roztokem a následně umístěna do lázně, kde byla další 3,5 minuty promývána roztokem A. Následně byla játra 16 minut promývána pracovním roztokem B. Na závěr byla opatrným krouživým pohybem vyklepnuta do plastové kádinky obsahující 30 ml Krebs-Henseleitova pufru. Suspenze byla přelita přes plastový trychtýř vyložený mulem do plastových centrifugačních zkumavek a centrifugována 3 minuty při 400 otáčkách za minutu (RPM) (Sigma 2K15). Po odsátí

supernatantů byly buňky resuspendovány v 5 ml pracovního roztoku C a opět byla směs za stejných podmínek centrifugována. Nakonec byl odebrán supernatant a buňky byly slity do jedné zkumavky.

Stanovení počtu buněk v suspenzi a jejich viability

Pro stanovení počtu buněk byla nejprve suspenze izolovaných hepatocytů 100x naředěna pracovním roztokem C (viz kapitola 3.3.2, str. 40). Do Bürkerovy komůrky bylo odebráno 20 μ l této suspenze. Buňky byly pod mikroskopem (LABOVAL 3) při zvětšení 12x5 počítány v pěti a pěti čtvercích po šestnácti okénkách. Výsledek se uvádí jako počet buněk v milionech na mililitr.

Pro zjištění viability hepatocytů byl obsah suspenze buněk vhodně zředěn pracovním roztokem C. Následně bylo kápnuto 10 μ l buněčné suspenze a 10 μ l roztoku 0,4% trypanové modři na podložní sklíčko a pod mikroskopem (LABOVAL 3) při zvětšení 25x0,5 byly počítány živé a mrtvé buňky v šestnácti až dvaceti náhodně vybraných polích. Mrtvé a poškozené buňky byly trypanovou modří obarveny na modro. Výsledek se uvádí jako procentuální poměr počtu živých buněk k celkovému počtu buněk hodnocených.

3.3.3 Kultivace hepatocytů

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

Ke kultivaci hepatocytů byly používány sterilní dvacetičtyřjamkové (24-WP) a šestijamkové (6-WP) mikrotitrační destičky. Všechny úkony probíhaly za sterilních podmínek v laminárním boxu (HeraSafe HS18).

Před samotnou kultivací hepatocytů musí být všechny kultivační destičky rovnoměrně potaženy kolagenem. Kolagen byl rozpuštěn v 20 mM kyselině octové, aby jeho výsledná koncentrace činila 1,8 mg/ml. Nejprve bylo tedy dávkováno 200 μ l do 24-WP a 800 μ l do 6-WP roztoku kolagenu. Po zhruba 15 minutách byl kolagen odsát a pro neutralizaci pH byly jamky v 24-WP promyty 0,5 ml a v 6-WP 2 ml fyziologického roztoku. Aby se zabránilo vyschnutí jamek, byl fyziologický roztok odejmut až těsně před nanesením buněk.

Podle získaných hodnot počtu a viability hepatocytů (viz kapitola 3.3.2, str. 40), byly buňky před nanesením na kultivační destičky naředěny cca na denzitu 666 667 hepatocytů na 1,0 ml kompletního media a následně nanášeny v konečném objemu 0,3 ml na 24-WP (cca 200 000 hepatocytů na jamku) a 1,5 ml na 6-WP (cca 1 milion hepatocytů na jamku). Hepatocyty mají velkou tendenci usazovat se na dně zkumavek, tudíž je při jejich nanášení důležité dbát na dostatečné promíchávání suspenze. Po nanesení hepatocytů byly buňky ponechány tři hodiny za standardních kultivačních podmínek v inkubátoru (SANYO CO₂) při 95% vlhkosti, 5% CO₂ a teplotě 37 °C. Poté byly neuchycené hepatocyty odsáty a bylo přidáno 0,3 ml na 24-WP, respektive 1,5 ml na 6-WP, zahřátého (37 °C) kompletního media. Po výměně media byly hepatocyty kultivovány přes noc (cca 21 hodin) v inkubátoru za standardních podmínek.

Následně bylo medium odsáto a k buňkám bylo přidáno 0,3 ml na 24-WP, respektive 1,5 ml na 6-WP, zahřátého (37 °C) media bez fetálního hovězího séra s již příslušnými testovanými látkami. Jako testované látky byly použity: LPS (lipopolysacharid) ve výsledné koncentraci 15 µg/ml, ethanol ve výsledných koncentracích 100, 200, 250, 300, 400, 500 a 800 mM a dihydromyricetin rozpuštěný v ethanolu ve výsledných koncentracích 1, 10, 50, 100 a 1000 µM. Ke skupinám, ke kterým bylo přidáno medium s ethanolem jako testovanou látkou, bylo po sedmi hodinách aplikováno 72 µl do 6-WP a 14,4 µl do 24-WP media bez FBS s příslušnou koncentrací ethanolu z důvodu jeho vypařování. Všechny buňky byly inkubovány dalších 15–16 hodin při teplotě 37 °C a 5% CO₂.

3.3.4 Zpracování hepatocytů po kultivaci

Hepatocyty z 6-WP byly po kultivaci celou dobu udržovány v kultivační destičce na ledu. Nejprve bylo z každé jamky odebráno medium do jednotlivých mikrozkuvek (Eppendorf) pro biochemická stanovení (viz kapitola 3.3.6, 3.3.7 a 3.3.8, str. 44 a 45). Buňky po odebrání media byly promyty jedenkrát 2 ml studeného (4 °C) PBS, poté bylo přidáno 0,2 ml opět ledového PBS, ve kterém byly hepatocyty pomocí stěrky pro tkáňové kultury (Cell Scraper) uvolněny ze dna jamky a přepipetovány do mikrozkuvky. Hepatocyty příslušných skupin byly vždy ze tří jamek 6-WP umístěny do jedné mikrozkuvky. Suspenze byla centrifugována (Sigma 2K15) 5 minut při 4 °C a při 5000 RPM. Peleta byla ihned zmrazena a skladována v kapalném dusíku.

Hepatocyty z 24-WP byly použity pro jiná stanovení (viz kapitola 3.3.5, str. 44).

3.3.5 Stanovení životnosti hepatocytů pomocí MTT testu

Kolorimetrický MTT test s použitím tetrazoliové soli [117] je využíván pro měření cytotoxicity a buněčné proliferace. Test detekuje živé, nikoli mrtvé buňky, a generovaný signál závisí na stupni aktivace buněk. Princip testu spočívá ve štěpení tetrazoliového kruhu aktivními mitochondriálními enzymy (reakce probíhá pouze v živých buňkách) [117].

Nejdříve byla rozpuštěna prášková směs MTT v PBS, aby výsledná koncentrace byla 1 mg/ml. Připravený roztok byl poté pětkrát naředěn kompletním médiem bez FBS a byl temperován na teplotu 37 °C. Po odsátí media z 24-WP bylo do všech jamek odměřeno 300 µl zahřátého roztoku MTT a destičky byly inkubovány v inkubátoru (SANYO CO₂) při 5% CO₂ a teplotě 37 °C. Po třech hodinách byl roztok odsát. Do každé jamky bylo následně aplikováno 500 µl dimethylsulfoxidu. Destičky byly kývavým pohybem promíchávány cca 10 minut při laboratorní teplotě, čímž došlo k rozpuštění krystalků. Vzorky o objemu 100 µl byly v duplikátech přeneseny na čistou 96jamkovou destičku. Byla měřena absorbance při 540 nm (Sunrise™).

3.3.6 Stanovení katalytické koncentrace ALT

Alaninaminotransferasa je enzym ze skupiny transferas katalyzující přeměnu α -ketokyselin na aminokyseliny přenosem aminoskupin (viz kapitola 1.1.3, str. 18). Princip metody je založen na reakci mezi L-alaninem a 2-oxoglutarátem za vzniku pyruvátu a L-glutamátu, která je katalyzována ALT a kofaktorem reakce je pyridoxal-5-fosfát. Vzniklý pyruvát je redukován na D-laktát v reakci katalyzované laktátdehydrogenasou za současného úbytku NADH, který se projevuje poklesem absorbance při 340 nm. Katalytická koncentrace ALT je pak přímo úměrná tomuto poklesu [118].

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

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

Ke stanovení byl použit komerční test (^LALT (GPT) kit). Katalytická koncentrace ALT byla stanovována v médiu, které bylo odebráno z 6-WP poslední den kultivace hepatocytů (viz kapitola 3.3.4, str. 43). Vždy byly měřeny tři vzorky z každé skupiny. Před

samotným měřením byly všechny reagenty včetně vzorků, standardu a blanku temperovány na teplotu 37 °C. Roztoky R1 a R2 byly smíchány v poměru 4:1. Do kyvety bylo aplikováno 1,0 ml R1+R2 a reakce byla iniciována přidáním 100 µl příslušného vzorku. Po minutové inkubaci byla měřena absorbance (Cary 60 UV-Vis) při 340 nm v čase 0, 1, 2 a 3 minuty.

3.3.7 Stanovení katalytické koncentrace AST

Aspartátaminotransferasa je enzym ze skupiny transferas katalyzující přeměnu α -ketokyselin na aminokyseliny přenosem aminoskupin (viz kapitola 1.1.3, str. 18). Princip metody je založen na reakci mezi L-aspartátem a 2-oxoglutarátem za vzniku L-glutamátu a oxalacetátu, která je katalyzována AST a kofaktorem reakce je pyridoxal-5-fosfát. Vzniklý oxalacetát je redukován na L-malát v reakci katalyzované malátdehydrogenasou za současného úbytku NADH, který se projevuje poklesem absorbance při 340 nm. Katalytická koncentrace ALT je pak přímo úměrná tomuto poklesu [118].

Roztok R1: 110 mM Tris pH 7,65; 320 mM L-aspartát; $\geq 13,3$ µkat/l malátdehydrogenasa; $\geq 13,3$ µkat/l LDH

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

Ke stanovení byl použit komerční test (^LAST (GOT) kit). Katalytická koncentrace AST byla stanovována v mediu, které bylo odebráno z 6-WP poslední den kultivace hepatocytů (viz kapitola 3.3.4, str. 43). Vždy byly měřeny tři vzorky z každé skupiny. Před samotným měřením byly všechny reagenty včetně vzorků, standardu a blanku temperovány na teplotu 37 °C. Roztoky R1 a R2 byly smíchány v poměru 4:1 (R1:R2). Do kyvety bylo aplikováno 1,0 ml R1+R2 a reakce byla iniciována přidáním 100 µl příslušného vzorku. Po minutové inkubaci byla měřena absorbance (Cary 60 UV-Vis) při 340 nm v čase 0, 1, 2 a 3 minuty.

3.3.8 Kvantitativní stanovení ALT metodou ELISA

Metoda ELISA („enzyme-linked immunosorbent assay“) je jedna z nejpoužívanějších imunologických technik. V tomto stanovení se využívá interakce mezi na jamce zachycenou

afinitně purifikovanou protilátkou a antigenem (analyt) přítomném v testovaném vzorku. Pro detekci slouží sekundární protilátka značená křenovou peroxidasou. Pro vyvolání se přidává substrát, tetramethylbenzidin, který vytváří modré zbarvení. Pro zastavení této reakce je přidávána kyselina a dochází ke změně barvy z modré na žlutou. Absorbance určená při 450 nm je přímo úměrná množství vázaného analytu.

Ke stanovení byl použit komerční test (RAT ALT SimpleStep ELISA kit). Nejprve byly reagenty temperovány na laboratorní teplotu. Do 96jamkové mikrotitrační destičky s plochým dnem bylo dávkováno po 50 μ l příslušného vzorku a standardu (rekombinantní potkaní ALT protein). Všechny vzorky byly před nanesením do mikrotitrační destičky centrifugovány (Centrifuge 5418) při 1220 RPM po dobu 10 minut. Koncentrace standardu pro sestavení kalibrační křivky byly následovné: 15,6; 31,3; 62,5; 125; 250; 500 a 1000 ng/ml. Vzorky media byly získány z 6-WP poslední den kultivace (viz kapitola 3.3.4, str. 43) a byly nanášeny v triplicátech. Do každé jamky bylo následně dávkováno 50 μ l „Antibody cocktail“. Mikrotitrační destička byla přikryta fólií a inkubována po dobu jedné hodiny na třepačce (SHO-2D) při 400 RPM za laboratorní teploty. Následně byla každá jamka promyta 5x 200 μ l „1X Wash buffer PT“. Poté bylo do každé jamky přidáno 100 μ l „TMB Development solution“ a destička byla na třepačce (SHO-2D) ve tmě inkubována 10 minut při 400 RPM. Nakonec bylo do všech jamek přidáno 100 μ l „Stop solution“ a po minutové inkubaci byla měřena absorbance při 450 nm.

3.3.9 Stanovení koncentrace proteinů

Ke stanovení obsahu proteinů v buněčných homogenátech byla použita modifikace Lowryho metody. Lowryho metoda zlepšuje méně citlivou biuretovou metodu. Jedná se o metodu založenou na chelataci měďnatého iontu imidovými strukturami polypeptidového řetězce v alkalickém prostředí, k čemuž přispívá redukce Folin-Ciocalteu činidla (směs kyseliny fosfowolframové a kyseliny fosfomolybdenové) tyrosinovými zbytky proteinů. Koncentrace výsledného modře zbarveného produktu se měří spektrofotometricky při 650 nm [119].

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 CuSO₄.5H₂O; 0,1M NaOH

Ke stanovení koncentrace proteinů byly použity vzorky, které byly zpracovány podle kapitoly 3.3.4 (str. 43). Všechny vzorky byly připravovány v duplikátech. K 10 μ l buněčného homogenátu bylo přidáno 190 μ l destilované vody. Dále byla ze zásobního roztoku BSA o koncentraci 0,1 mg/ml připravena kalibrační sada roztoků. Ke všem analyzovaným vzorkům bylo přidáno 200 μ l roztoku A, zkumavky byly promíchány na laboratorní třepačce (Vortex Genius 3) a inkubovány 10 minut ve vodní lázni (TW8 Water Bath) při 50 °C. Poté bylo do všech zkumavek přidáno 20 μ l roztoku B, opět promícháno na laboratorní třepačce a inkubováno 10 minut za laboratorní teploty. Nakonec bylo dávkováno 600 μ l Folin-Ciocalteuova činidla zředěného 1:14 destilovanou vodou a poslední inkubace proběhla při 50 °C po dobu 10 minut. Absorbance vzorků byla měřena po ochlazení na laboratorní teplotu při 650 nm.

3.3.10 Diskontinuální elektroforesa na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného

Gelová elektroforesa je jednou z nejrozšířenějších elektroforetických technik. Při této separační metodě se proteiny rozdělují podle své velikosti a elektroforetické pohyblivosti. Přítomný dodecylsírany sodný se váže na proteiny, kterým udává záporný náboj přímo úměrný jejich velikosti. V elektrickém poli tak proteiny migrují k anodě a mohou být díky efektu molekulového síta separovány.

Polymerační gely: TGX™ FastCast™ Acrylamide Kit 10%

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

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

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

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

Nejprve byly připraveny polymerační roztoky pro gely o síle 1 mm podle návodu uvedeného od výrobce. Hustota zesíťování separačního gelu byla 10 % a hustota

zaostřovacího gelu není výrobcem uvedena.

Vzorky hepatocytů (viz kapitola 3.3.4, str. 43) byly ředěny vodou a vzorkovým pufrům tak, aby výsledná koncentrace proteinu byla 2 mg/ml. Před nanášením vzorků do gelu byly vzorky 5 minut vařeny (Mini Dry Bath – BS-MINIB-100I) a následně krátce centrifugovány (Spectrafuge Mini Centrifuge C1301B). Do každé jamky gelu bylo injekční mikrostříkačkou nanášeno 20 µl vzorku (40 µg proteinu) a 5 µl standardu. Jako standard byl použit *Precision Plus Protein™ Dual Color Standards*. Do elektroforetické vany (Mini-PROTEAN® Tetra Cel) naplněné elektrodočným pufrům byly umístěny gely. Sada byla připojena ke konstantnímu zdroji elektrického napětí 200 V (PowerPac Basic). Elektroforesa probíhala přibližně 60 minut, dokud se čelo udávané bromfenolovou modří nedostalo cca 0,7 cm od spodního kraje gelu.

Nakonec byl vrchní zaostřovací gel odstraněn a separační gel byl umístěn na dobu jedné hodiny do barvicí lázně. Gel byl odbarvován přes noc v odbarvovací lázni. Pro metodu Western blot byl použit gel, který nebyl barven.

3.3.11 Western blot s následnou imunodetekcí

Western blot, nazývaný také jako metoda otisků, je metoda, při které dochází k přenosu proteinových molekul z mobilních fází na pevnou fázi. Směs se nejprve separuje na základě molekulové hmotnosti, například gelovou elektroforesou, poté jsou proteiny přeneseny na membránu běžnou difúzí či pomocí elektropřenosu stejnosměrným proudem. K detekci proteinů dochází imunochemicky. Membrána je inkubována se specifickou primární protilátkou, která je následně rozeznána značenou sekundární protilátkou.

Přenosový pufr: 192 mM glycin; 25 mM Tris; pH 8,3

PBS Triton X-100: 0,134 M NaCl; 1,8 mM Na₂HPO₄; 1 mM NaH₂PO₄; 0,3% (w/v) Triton X-100; pH 7,2

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

Vyvolávací roztok: tableta SigmaFast v 10 ml destilované H₂O

Po skončení elektroforesy byly separační gely ponořeny do přenosového pufru a při laboratorní teplotě za stálého míchání na třepačce (SHO-2D) inkubovány 20 minut. Dle

velikosti gelů byly mezitím uštěřeny filtrační papíry (Whatman 3) a polyvinylidenfluoridová membrána. PVDF membrána byla aktivována ponořením do methanolu (15 sekund), následně do destilované vody (30 sekund) a nakonec do přenosového pufru (5 minut). Na spodní kazetu (anoda) blotovacího přístroje byly umístěny tři filtrační papíry namočené v přenosovém pufru, PVDF membrána, polyakrylamidový gel, další tři vlhké filtrační papíry (Whatman 3) a nakonec horní kazeta (katoda). Elektropřenos probíhal prvních 10 minut při 0,8 mA/cm² a poté dalších 45 minut při 2 mA/cm².

Po ukončení elektropřenosu byl gel ponořen na 1 hodinu do barvicí lázně a poté přes noc do lázně odbarvovací. Aby se zabránilo nespecifickým interakcím mezi membránou a primární protilátkou, byla membrána po dobu jedné hodiny při 4 °C inkubována v blokovacím roztoku za stálého třepání (SHO-2D). Přes noc byla membrána inkubována v 10 ml blokovacího roztoku s primární protilátkou za stálého míchání při 4 °C. Primární králičí protilátka proti ADH byla ředěna dle doporučení výrobce 1:1000.

Následující den byla membrána promyta 4x 2 minuty blokovacím roztokem a poté byla inkubována v roztoku sekundární protilátky po dobu jedné hodiny za stálého třepání (SHO-2D). Sekundární protilátka (koží IgG protilátka proti IgG králíka s konjugovanou alkalickou fosfatase) byla dle doporučení výrobce ředěna v blokovacím roztoku v poměru 1:1428. Po inkubaci byla membrána opět promyta 5x 2 minuty blokovacím roztokem a 5x 2 minuty PBS Triton-X100. K vizualizaci byla membrána inkubována ve vyvolávacím roztoku cca 5 minut ve tmě. Ponořením membrány do destilované vody došlo k ukončení vizualizace a usušená membrána mohla být oskenována.

3.3.12 Stanovení enzymové aktivity ADH ve vzorcích hepatocytů

Alkoholdehydrogenasa katalyzuje oxidaci ethanolu na acetaldehyd za přítomnosti kofaktoru NAD⁺, který je redukován na NADH. Redukovaná forma NAD⁺ má na rozdíl od neredukované absorpční maximum při 340 nm. Rychlost reakce byla sledována jako přírůstek absorbance při 340 nm v čase.

Pro stanovení enzymové aktivity byla použita 96jamková čirá mikrotitrační destička s plochým dnem. Do každé jamky byla pipetována reakční směs obsahující 82 μl 0,1 M fosfátového pufru o pH 7,4, 8 μl 10 mM NAD⁺ a 50 μl vzorku o výsledné koncentraci proteinu 1 mg/ml. Vzorky hepatocytů byly získány postupem popsaným v kapitole 3.3.4 (str. 43). Koncentrace NADH pro sestavení kalibrační křivky byly následovné: 0; 0,13; 0,27;

0,40; 0,53 a 0,67 mM. Reakce byla iniciována přidáním 10 μ l ethanolu. Nárůst absorbance byl měřen (Multiskan GO) při 340 nm každé dvě minuty po celkovou dobu cca 1 hodiny při 37 °C za stálého třepání.

3.3.13 Stanovení enzymové aktivity ADH v přítomnosti DHM

Princip tohoto stanovení byl totožný jako postup popsáný v kapitole 3.3.12 (str. 49). Do každé jamky byla pipetována reakční směs obsahující 79 μ l 0,1 M fosfátového pufru o pH 7,4; 8 μ l 10 mM NAD⁺; 50 μ l enzymu (rekombinantní koňská ADH) o výsledné koncentraci 0,5; 1; 2 a 3 mg/ml a 3 μ l ethanolového roztoku DHM ve výsledných koncentracích 10; 100 a 1000 μ M. Koncentrace NADH pro sestavení kalibrační křivky byly následovné: 0; 0,13; 0,27; 0,40; 0,53 a 0,67 mM. Reakce byla iniciována přidáním 10 μ l ethanolu. Nárůst absorbance byl měřen (Multiskan GO) při 340 nm každé dvě minuty po dobu 60 minut při 37 °C za stálého třepání.

3.3.14 Stanovení koncentrace ethanolu a acetaldehydu v krvi myši

Jako pokusná zvířata byli použiti dospělí myši samci kmene C57Bl/6 o hmotnosti 20–30 g. Zvířata byla chována za standardních podmínek při volném přístupu k vodě i granulované potravě, regulované laboratorní teplotě a 12hodinovém světelném režimu v akreditovaném zařízení Centra pokročilého preklinického zobrazování 1.LF UK. Myši byly zváženy a rozděleny do čtyř skupin po pěti tak, aby v celkovém součtu měly jednotlivé skupiny přibližně stejnou hmotnost. Myši byly následně označeny na ocásku. Poté byl myším podán gaváž do žaludku buď samotný ethanol nebo v kombinaci s DHM: dvěma skupinám bylo podáno v závislosti na váze zvířete (260 μ l na 20 g váhy) 30% ethanolu a dalším dvěma skupinám roztok 30% ethanolu s dihydromyricetinem ve výsledné koncentraci 2,5 mM. Po třiceti minutách byla odebírána krev prvním deseti myším obou skupin. Po 80 minutách byla odebrána krev zbývajícím myším. Odběr krve probíhal tak, že byla myš nejprve narkotizována etherem a následně jí byla do oka vsunuta kapilára potažená heparinem (Heparin Na – 75 mm, 60 μ l). Mikrozkušavky s odebranou krví byly následně centrifugovány (ROTOFIX 32) 10 minut při 15 °C při 3000 RPM. Po centrifugaci byla odebrána plazma do nových zkumavek, které byly skladovány v -20 °C. Koncentrace

ethanolu a acetaldehydu ve vzorcích plazmy byla měřena RNDr. Miroslavou Bursovou, Ph.D. na Centrální toxikologické klinice, Na bojišti 1771/1 v Praze. Stanovení proběhlo pomocí plynové chromatografie.

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.

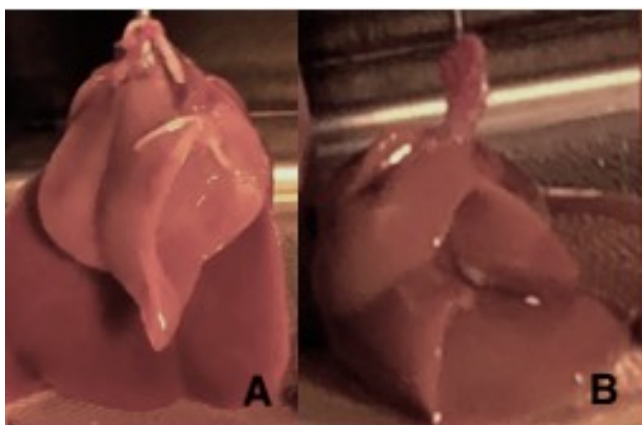
4 Výsledky

Pro studium stimulačního vlivu DHM na metabolismus ethanolu byly nejprve izolovány hepatocyty z nepremedikovaného a z ethanolem premedikovaného potkana a následně vystaveny EtOH v kombinaci s DHM. Míra poškození hepatocytů ethanolem byla kvantifikována MTT testem a pomocí markerů jaterního poškození – ALT a AST. Vliv DHM na ADH byl sledován na úrovni proteinové exprese, protekce aktivity a modulace enzymové aktivity tohoto enzymu. Finálně byl vliv DHM na rychlost metabolismu ethanolu sledován na myším modelu *in vivo*.

4.1 Izolace hepatocytů

Izolace primárních hepatocytů z jater potkana proběhla standardní dvoufázovou kolagenasovou metodou. Na obrázku 7 (str. 52) jsou zobrazena játra nepremedikovaného a ethanolem premedikovaného potkana po jejich vyjmutí z břišní dutiny. Z této ilustrační fotografie lze usoudit, že játra ethanolem premedikovaného potkana vykazují horší morfolonii než játra nepremedikovaného potkana.

Životnost izolovaných hepatocytů stanovená postupem popsáním v kapitole 3.3.2 (str. 40) se u nepremedikovaného potkana pohybovala v rozmezí 80–85 % a u ethanolem premedikovaného potkana byla v rozmezí 70–75 %. Životnost hepatocytů stanovená ihned po izolaci je vyšší u nepremedikovaného potkana.

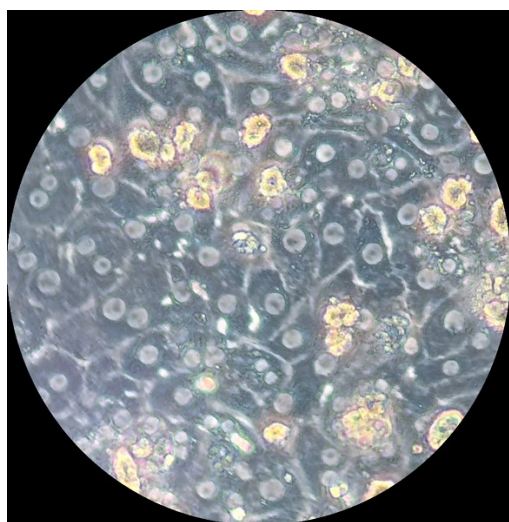


Obrázek 7: Ilustrační fotografie jater nepremedikovaného (A) a ethanolem premedikovaného (B) potkana. Premedikace potkanů probíhala 4 dny podáním gaváží do žaludku 9,7 ml 40% ethanolu na 1 kg váhy a dva dny byl 20% ethanol přítomen ve vodě.

4.1.1 Optimalizace podmínek kultivace potkaních hepatocytů vystavených působení EtOH a DHM

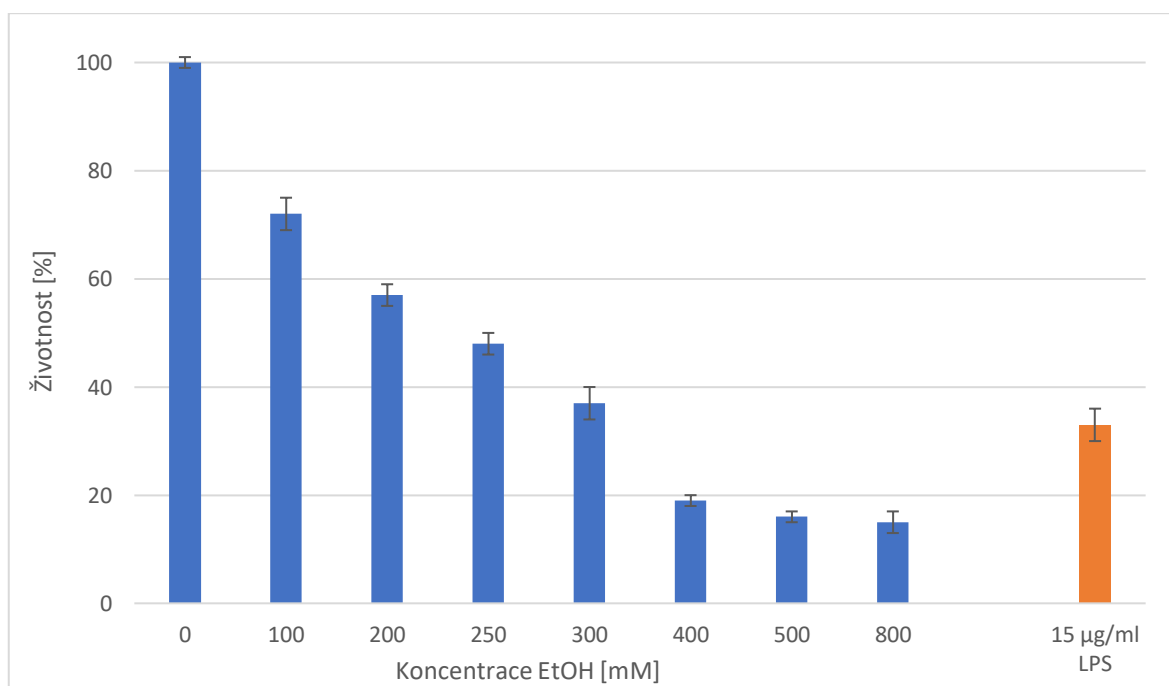
Při kultivaci primárních hepatocytů za standardních kultivačních podmínek (viz kapitola 3.3.3, str. 42) byla po 18 hodinách kultivace vytvořena jedna vrstva buněk, tzv. „monolayer“ (viz obrázek 8, str. 53). Takto připravené kultury byly použity pro další experimenty.

Standardní kultivace primárních hepatocytů byla v závislosti na účelu vlastního pozorování modifikována použitím kompletního media obohaceného o LPS, ethanol a dihydromyricetin. LPS ve výsledné koncentraci 15 $\mu\text{g/ml}$ a ethanol ve výsledných koncentracích 100; 200; 250; 300; 400; 500 a 800 mM byly přidávány k hepatocytům izolovaným z nepremedikovaného potkana. LPS je známý a běžně využívaný pro své hepatotoxické vlastnosti, jelikož je schopen tvořit stabilní prostředí oxidativního stresu, čímž dochází k navození apopticko-nekrotických změn u hepatocytů [120]. LPS tak v této práci sloužil pouze pro srovnání úrovně hepatotoxicity. Byla tedy porovnávána životnost buněk, které byly kultivovány v mediu s ethanolem a životnost buněk, které byly kultivovány v mediu s LPS. Dihydromyricetin rozpuštěný v ethanolu byl k hepatocytům izolovaným z nepremedikovaného i z ethanolem premedikovaného potkana přidáván spolu s kompletním mediem ve výsledných koncentracích 1; 10; 50; 100 a 1000 μM .



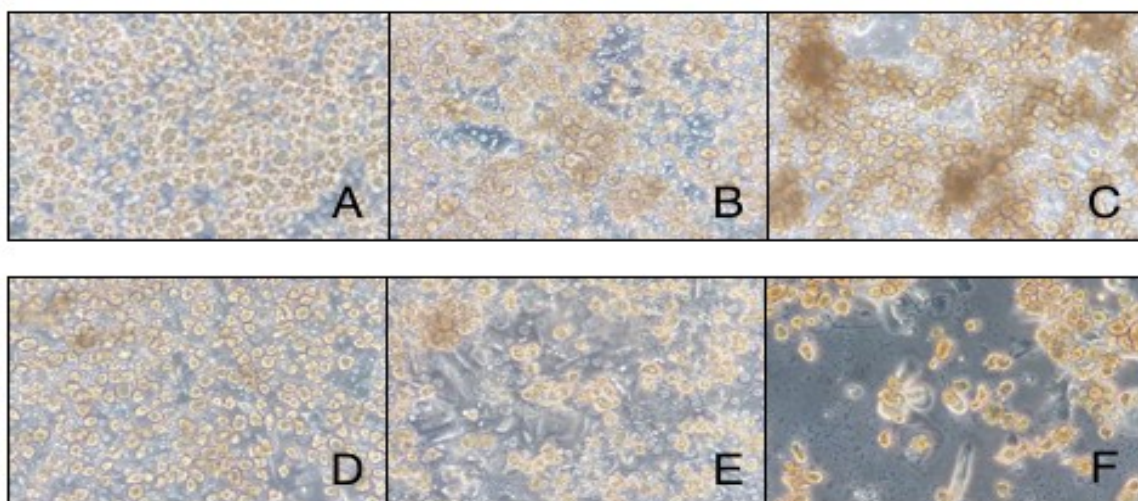
Obrázek 8: Mikrofotografie primárních hepatocytů izolovaných z nepremedikovaného potkana. Reprezentativní obrázek buněk tvořících tzv. „monolayer“ při 18hodinové kultivaci za standardních podmínek. Mikroskop Leica DM IL LED, dvacetinásobné zvětšení.

Při pozorování buněk inverzním mikroskopem po 8 a 24 hodinách kultivace v mediu obohaceného o ethanol bylo sledováno, že hepatocyty vystavené působení 100–250 mM ethanolu byly po kontrole (medium bez přidaného ethanolu) v nejlepším stavu, co se týká jejich morfologie, životnosti a schopnosti tvořit tzv. „monolayer“. Při použití koncentrace ethanolu 300–400 mM živé hepatocyty výrazně ubývaly a převažovala zde nekrosa (u koncentrace 400 mM v obou časových bodech, u koncentrace 300 mM pouze po 24 hodinách, po 8 hodinách byly ještě vitální). Koncentrace ethanolu 500 mM (po 24 hodinách) a koncentrace 800 mM byly pro hepatocyty již fatální. V závislosti na viabilitě hepatocytů stanovené pomocí MTT testu (viz obrázek 9, str. 54), dle pozorování buněk pod inverzním mikroskopem a v porovnání s buňkami kultivovanými v mediu s LPS byla určena koncentrace ethanolu 300 mM jako nejvhodnější pro další experimenty, jelikož již při této koncentraci byly ovlivněny vlastnosti hepatocytů, přičemž stále nedocházelo k jejich výrazné apoptose či nekrose.



Obrázek 9: Stanovení životnosti hepatocytů izolovaných z nepremedikovaného potkana. Životnost byla stanovena pomocí MTT testu u hepatocytů kultivovaných ve 24-WP po 24 hodinách. Jako kontrola sloužila skupina buněk, která byla kultivována v mediu bez přidaného ethanolu (100% životnost). Další skupiny byly kultivovány v mediu s přidaným 15 µg/ml LPS nebo ethanolem ve výsledných koncentracích 100–800 mM.

Při sledování hepatocytů po 19 hodinách kultivace v mediu s/bez EtOH obohaceném o flavonoid bylo pozorováno: u hepatocytů vystavených působení DHM o koncentraci 1 a 10 μM nebyla pozorována žádná výrazná změna, u koncentrací DHM 50 a 100 μM docházelo k úbytku živých hepatocytů a koncentrace 1000 μM byla pro většinu hepatocytů fatální (viz obrázek 10, str. 55). Opět bylo v závislosti na životnosti buněk stanovené pomocí MTT testu a dle pozorování hepatocytů pod inverzním mikroskopem určeno koncentrační rozmezí dihydromyricetinu 1; 10; 50 a 100 μM jako nejvhodnější pro další účely experimentu, jelikož při těchto koncentracích nedocházelo k výrazné apoptose či nekrose.



Obrázek 10: Reprezentativní snímky primárních hepatocytů při kultivační expozici EtOH a DHM. Kultivace buněk izolovaných z nepremedikovaného potkana probíhala 19 hodin v mediu s dihydromyricetinem rozpuštěným v ethanolu o výsledných koncentracích 0 μM (snímek A), 50 μM (snímek B) a 1000 μM (snímek C). A kultivace buněk izolovaných z ethanolem premedikovaného potkana probíhala 19 hodin v mediu s dihydromyricetinem rozpuštěným v ethanolu o výsledných koncentracích 0 μM (snímek D), 50 μM (snímek E) a 1000 μM (snímek F). Premedikace potkanů probíhala 4 dny podáním gaváží do žaludku 9,7 ml 40% ethanolu na 1 kg váhy a dva dny byl 20% ethanol přítomen ve vodě. Mikroskop Leica DM IL LED, dvanáctinásobné zvětšení.

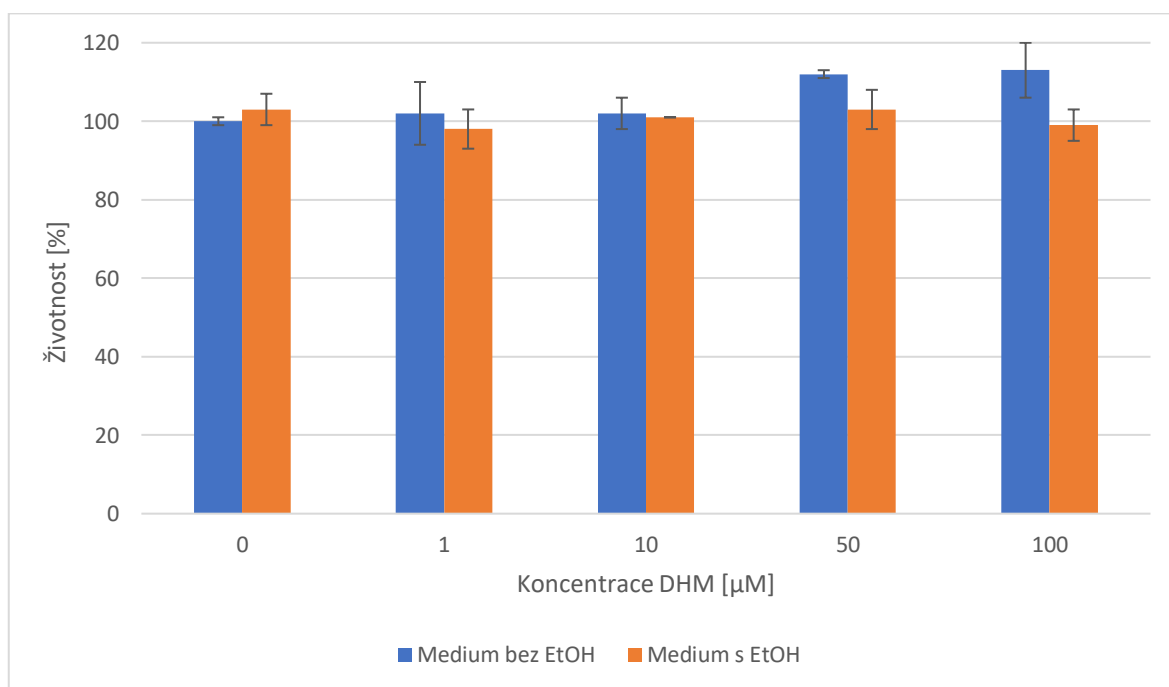
4.2 Stanovení míry poškození hepatocytů

Všechna další stanovení viability buněk proběhla na primárních hepatocytech kultivovaných při optimalizovaných podmínkách – v mediu obsahujícím 300 mM ethanol a ethanolový roztok dihydromyricetinu ve výsledných koncentracích 1; 10; 50 a 100 μM .

4.2.1 Stanovení životnosti hepatocytů pomocí MTT testu

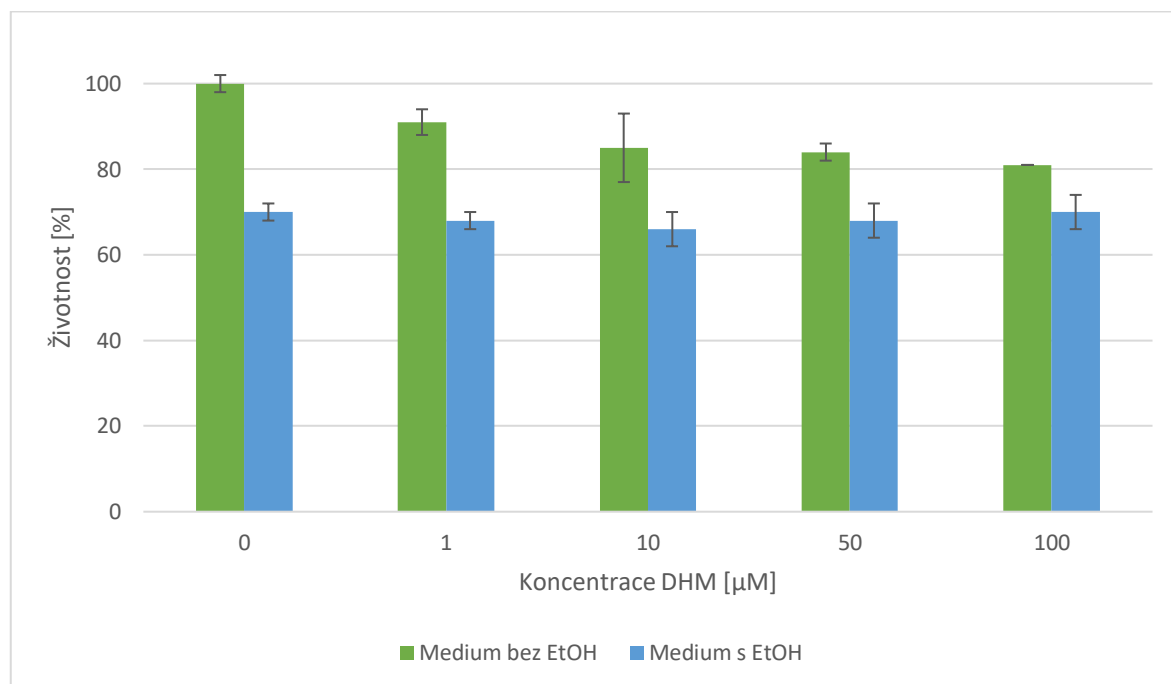
Byl sledován vliv přidávaných látek ethanolu a dihydromyricetinu do media na viabilitu buněk. Viabilita hepatocytů byla stanovena pomocí MTT testu na 24-WP po 24 hodinách kultivace s EtOH a DHM (viz kapitola 3.3.5, str. 44). Jako kontrola sloužil vzorek hepatocytů kultivovaných v mediu za standardních podmínek bez přítomnosti EtOH a DHM (100% životnost).

Dle získaných hodnot byly pozorovány rozdíly v životnosti u jednotlivých skupin hepatocytů. U hepatocytů izolovaných z nepremedikovaného potkana a kultivovaných v mediu bez ethanolu DHM se se vzrůstající koncentrací snižuje spontánní rozpad hepatocytů. Nejvyšší hepatoprotektivní efekt je pozorován u koncentrace DHM 50 a 100 μM . U hepatocytů izolovaných z nepremedikovaného potkana a kultivovaných v mediu s ethanolem působí ethanol spíše protektivně a DHM tento efekt v koncentracích 10 a 50 μM stabilizuje (viz obrázek 11, str. 56)



Obrázek 11: Stanovení životnosti hepatocytů izolovaných z nepremedikovaného potkana. Životnost byla stanovena pomocí MTT testu u hepatocytů kultivovaných ve 24-WP v mediu za standardních podmínek bez testovaných sloučenin (100% životnost), v mediu obsahujícím 300 mM ethanol a v mediu obsahujícím ethanol s rozpuštěným DHM o koncentracích 1–100 μM .

Hepatocyty izolované z ethanolem premedikovaného potkana měly v porovnání s hepatocyty izolovanými z nepremedikovaného potkana celkově sníženou životnost přibližně o 10 %. Ethanol přidáný do media k hepatocytům izolovaným z ethanolem premedikovaného potkana působí spíše hepatotoxicky a přidáný DHM k téže skupině nevykazuje výrazné ovlivnění životnosti (viz obrázek 12, str. 57).



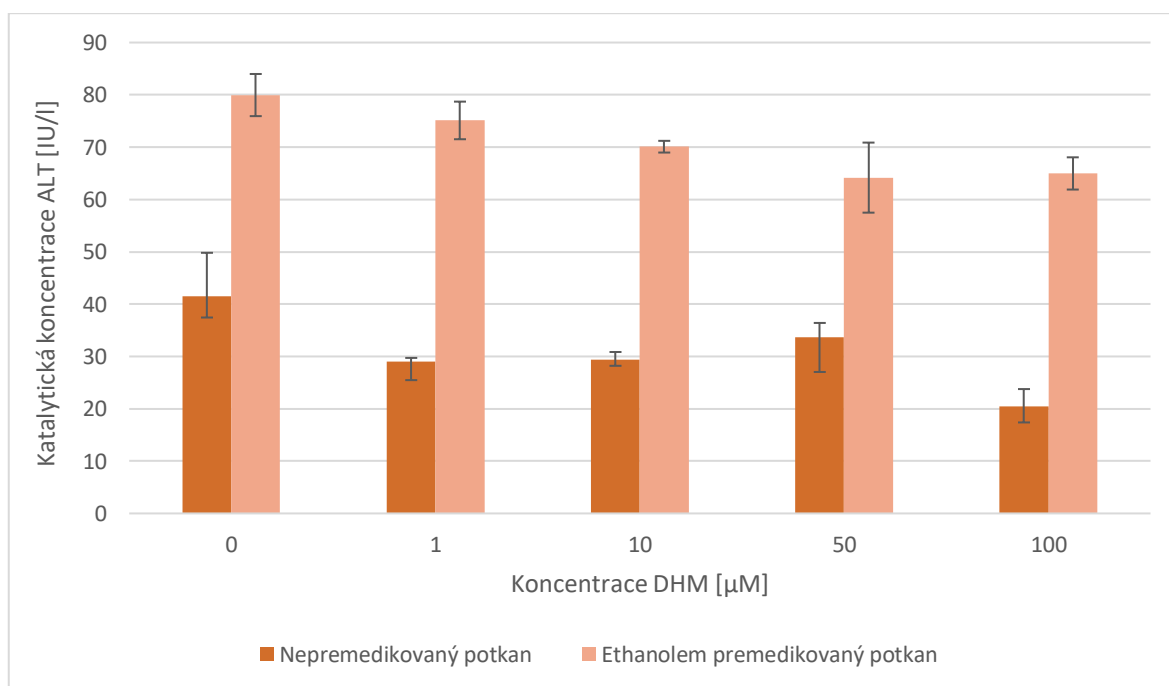
Obrázek 12: Stanovení životnosti hepatocytů izolovaných z potkana premedikovaného ethanolem. Premedikace potkanů probíhala 4 dny podáním gaváží do žaludku 9,7 ml 40% ethanolu na 1 kg váhy a dva dny byl 20% ethanol přítomen ve vodě. Životnost byla stanovena pomocí MTT testu u hepatocytů kultivovaných ve 24-WP v mediu za standardních podmínek bez testovaných sloučenin (100% životnost), v mediu obsahujícím 300 mM ethanol a v mediu obsahujícím ethanol s rozpuštěným DHM o koncentracích 1–100 μM .

4.2.2 Stanovení katalytické koncentrace ALT

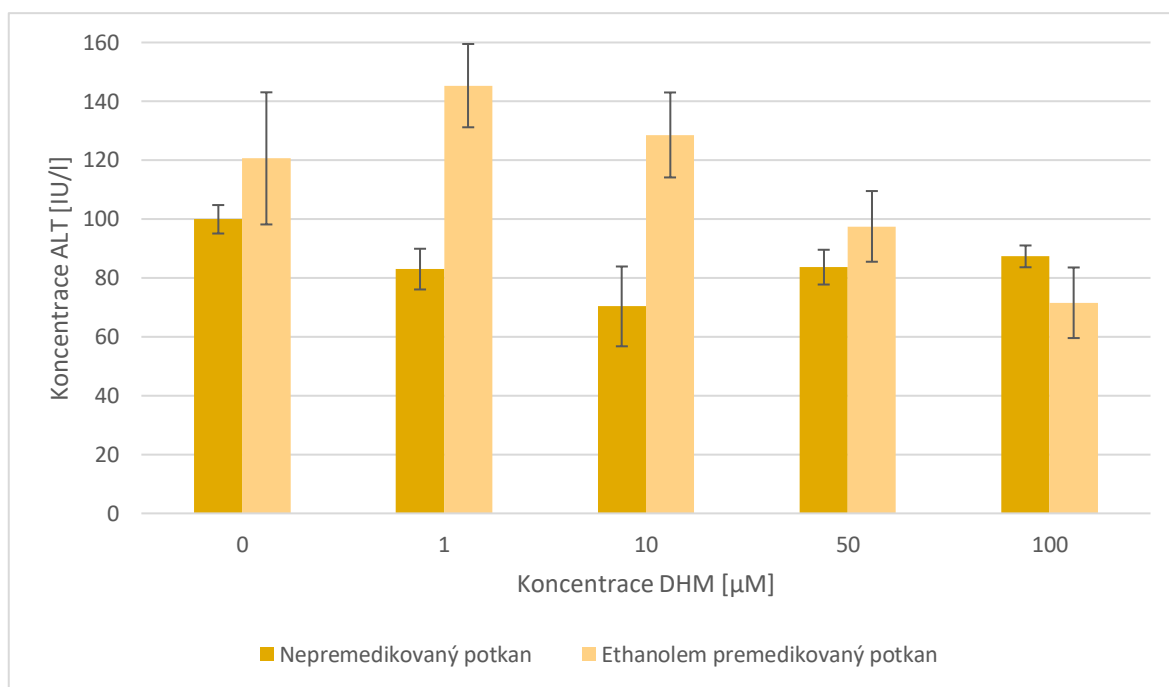
Nejprve byl sledován vliv ethanolu a dihydromyricetinu na viabilitu buněk metodou MTT. Poškození hepatocytů bylo dále sledováno pomocí množství uvolněné alaninaminotransferasy, která se využívá jako marker jaterních onemocnění. Stanovení proběhlo v mediu, které bylo odebráno poslední den kultivace z 6-WP (viz kapitola 3.3.6,

str. 44) a pro určení katalytické koncentrace ALT bylo použito komerčního testu (^LALT (GPT) kit).

Dle vypočítaných hodnot katalytické koncentrace ALT lze usoudit, že hepatocyty izolované z ethanolem premedikovaného potkana byly více poškozené oproti těm izolovaným z potkana nepremedikovaného. Hodnoty katalytické koncentrace ALT stanovené u buněk kultivovaných v mediu obsahujícím ethanol jsou až jedenkrát vyšší než hodnoty zjištěné u buněk kultivovaných v mediu bez ethanolu. Dihydromyricetin u buněk kultivovaných bez přidaného ethanolu působí protektivně (viz obrázek 13, str. 58). U buněk izolovaných z nepremedikovaného potkana kultivovaných s ethanolem DHM působí také protektivně. U hepatocytů izolovaných z ethanolem premedikovaného potkana přidaný DHM ve výsledné koncentraci 1 a 10 μM působí hepatotoxicky. V těchto skupinách byly také zjištěny nejvyšší hodnoty katalytické koncentrace ALT (145 IU/l a 128 IU/l). Koncentrace DHM 50 a 100 μM poté působí opět protektivně (viz obrázek 14, str. 59).



Obrázek 13: Katalytická koncentrace ALT v mediu hepatocytů bez ethanolu. Premedikace potkanů probíhala 4 dny podáním gaváže do žaludku 9,7 ml 40% ethanolu na 1 kg váhy a dva dny byl 20% ethanol přítomen ve vodě. Hepatocyty byly kultivovány v mediu obsahujícím ethanolový roztok DHM ve výsledných koncentracích 1–100 μM . Medium bylo odebrané z 6-WP. Měření byla prováděna v triplikátech.



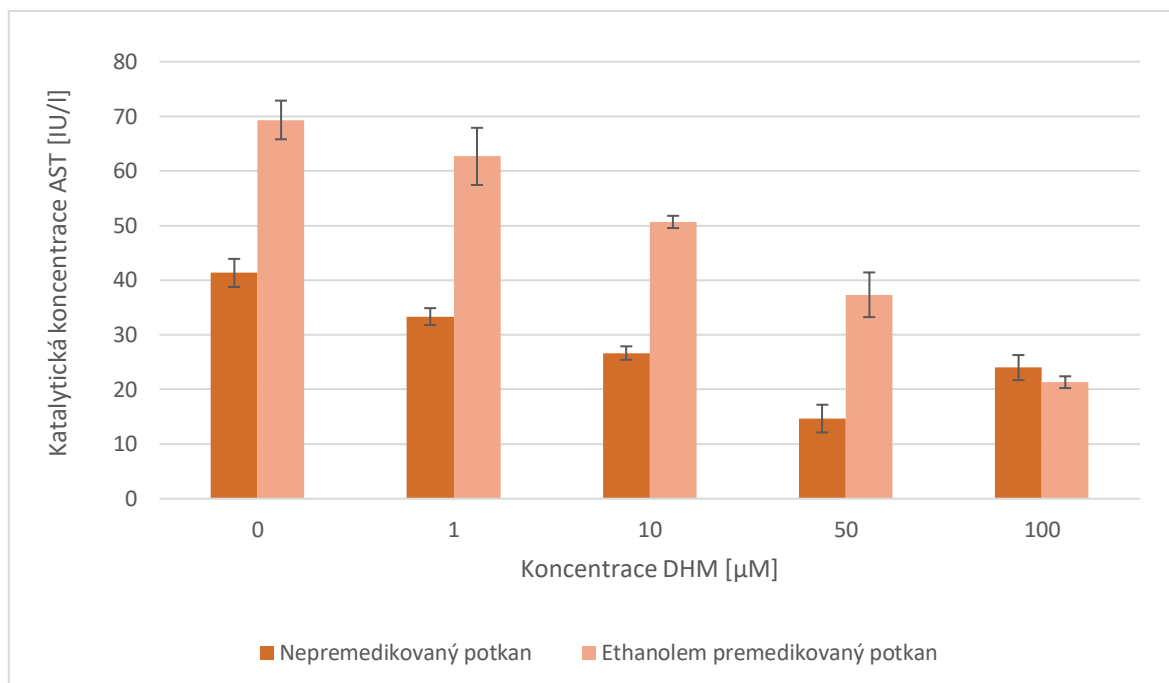
Obrázek 14: Katalytická koncentrace ALT v mediu hepatocytů s ethanolom. Premedikace potkanů probíhala 4 dny podáním gaváží do žaludku 9,7 ml 40% ethanolu na 1 kg váhy a dva dny byl 20% ethanol přítomen ve vodě. Hepatocyty byly kultivovány v mediu obsahujícím 300 mM EtOH a ethanolový roztok DHM ve výsledných koncentracích 1–100 μM . Medium bylo odebráno z 6-WP. Měření byla prováděna v triplikátech.

4.2.3 Stanovení katalytické koncentrace AST

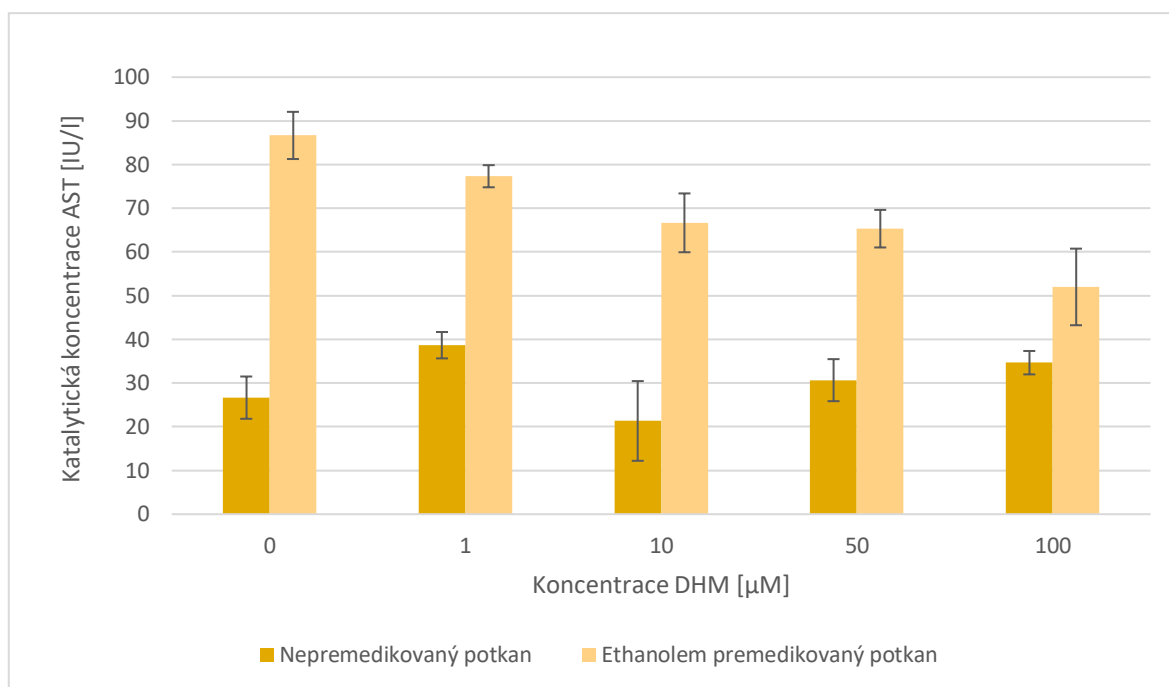
Následně byl sledován vliv ethanolu a dihydromyricetinu na viabilitu buněk pomocí uvolněné aspartátaminotransferasy, která se také využívá jako marker jaterních onemocnění. Poškození hepatocytů bylo sledováno na základě určení katalytické koncentrace aspartátaminotransferasy v mediu, které bylo odebráno poslední den kultivace z 6-WP (viz kapitola 3.3.7, str. 45). Pro stanovení katalytické koncentrace AST bylo použito komerčního testu (L AST (GOT) kit).

Na základě získaných hodnot (viz obrázek 15, str. 60 a obrázek 16, str. 61) lze u hepatocytů izolovaných z nepremedikovaného potkana pozorovat nižší hodnoty katalytické koncentrace AST než u ethanolom premedikovaného zvířete. Při kultivaci hepatocytů v mediu bez ethanolu působil DHM protektivně v závislosti na dávce. Při kultivaci buněk izolovaných z ethanolom premedikovaného potkana v mediu obsahujícím 300 mM ethanol působí DHM taktéž protektivně. U hepatocytů izolovaných

z nepremedikovaného potkana kultivovaných v mediu obsahujícím 300 mM ethanol a DHM v koncentracích 1; 50 a 100 μM došlo k mírnému snížení vitality buněk v porovnání s hepatocyty kultivovanými v mediu bez přídavku DHM.



Obrázek 15: Katalytická koncentrace AST v mediu hepatocytů bez ethanolu. Premedikace potkanů probíhala 4 dny podáním gaváží do žaludku 9,7 ml 40% ethanolu na 1 kg váhy a dva dny byl 20% ethanol přítomen ve vodě. Hepatocyty byly kultivovány v mediu obsahujícím ethanolový roztok DHM ve výsledných koncentracích 1–100 μM . Medium bylo odebrané z 6-WP. Měření byla prováděna v triplikátech.



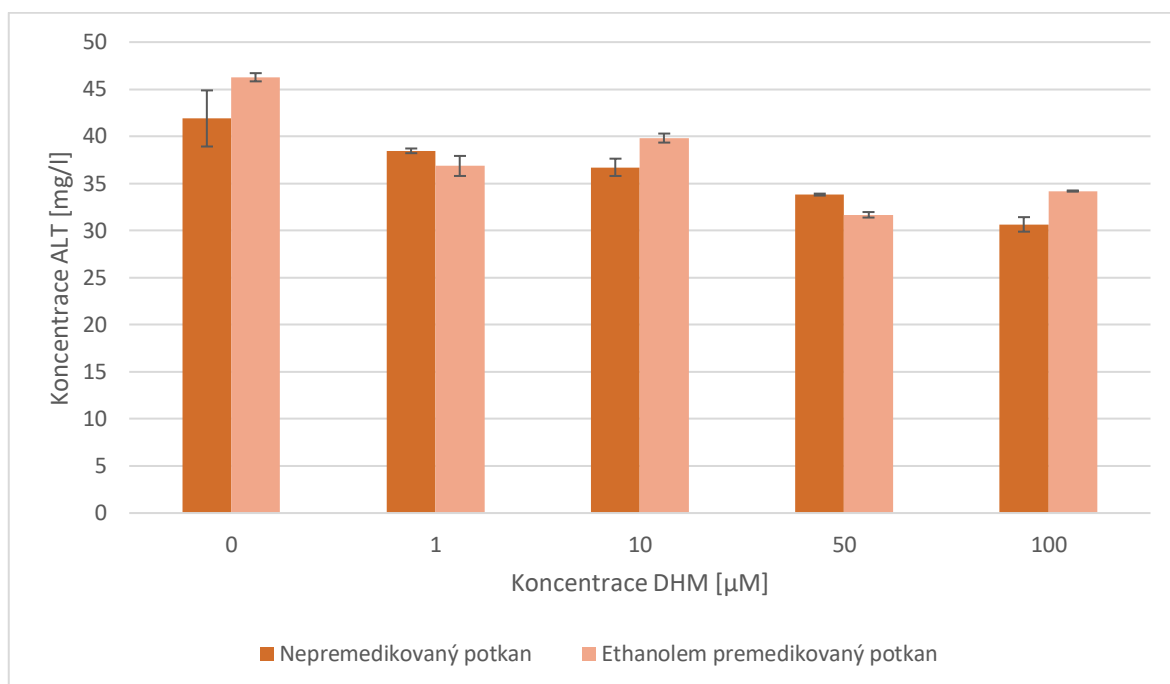
Obrázek 16: Katalytická koncentrace AST v mediu hepatocytů s ethanolom. Premedikace potkanů probíhala 4 dny podáním gaváží do žaludku 9,7 ml 40% ethanolu na 1 kg váhy a dva dny byl 20% ethanol přítomen ve vodě. Hepatocyty byly kultivovány v mediu obsahujícím 300 mM EtOH a ethanolový roztok DHM ve výsledných koncentracích 1–100 µM. Medium bylo odebráno z 6-WP. Měření byla prováděna v triplikátech.

4.2.4 Kvantitativní stanovení ALT metodou ELISA

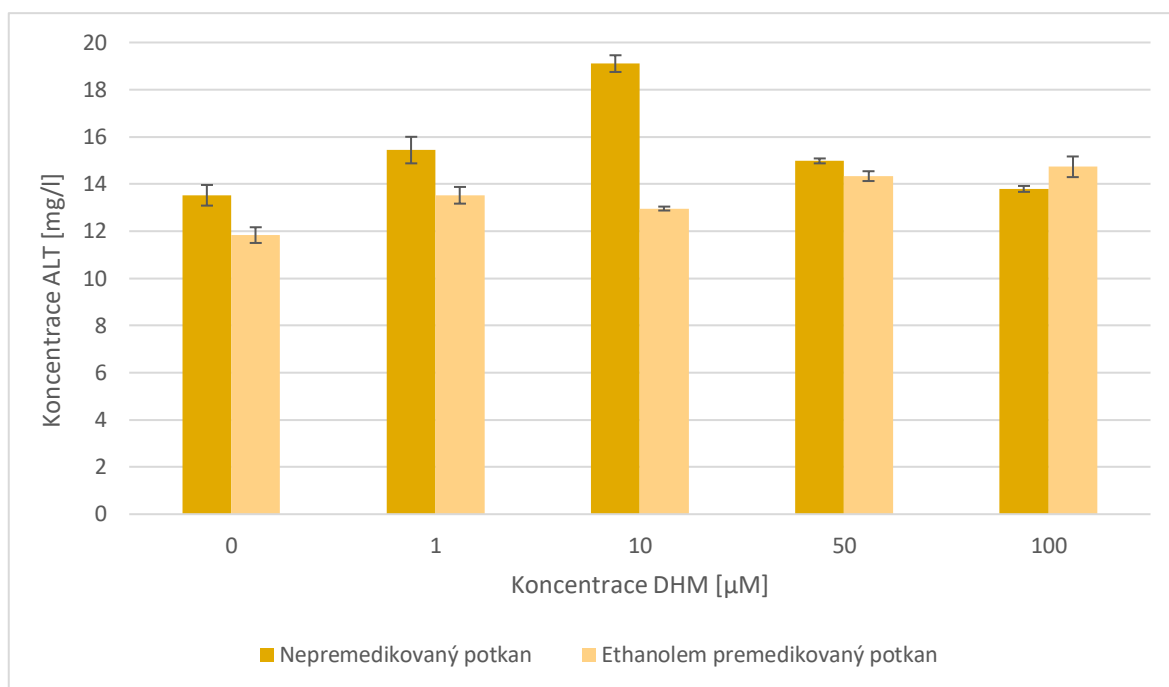
Nakonec byl sledován vliv EtOH a DHM na viabilitu hepatocytů metodou ELISA. Ethanol byl přidáván do media ve výsledné koncentraci 300 mM a ethanolový roztok dihydromyricetinu ve výsledných koncentracích 1; 10; 50 a 100 µM. Poškození hepatocytů bylo sledováno na proteinové úrovni pomocí určení koncentrace alaninaminotransferasy, která se používá jako marker jaterního onemocnění. Stanovení proběhlo v mediu hepatocytů, které bylo odebráno poslední den kultivace z 6-WP (viz kapitola 3.3.8, str. 45). Koncentrace ALT byla stanovena pomocí komerčního testu (RAT ALT SimpleStep ELISA kit).

Dle získaných hodnot byly opět pozorovány rozdíly v koncentracích ALT u jednotlivých skupin. Koncentrace ALT stanovená v mediu obsahujícím 300 mM ethanol byla nižší než v mediu bez ethanolu. Ethanol zde působil zřejmě protektivně. U hepatocytů kultivovaných v mediu bez EtOH působí DHM protektivně v závislosti na koncentraci.

Hepatocyty kultivované v mediu s EtOH a DHM nevykazují žádné výrazné zhoršení ani zlepšení viability (viz obrázek 17, str. 62 a obrázek 18, str. 63).



Obrázek 17: Koncentrace ALT stanovená v mediu hepatocytů bez ethanolu. Premedikace potkanů probíhala 4 dny podáním gaváží do žaludku 9,7 ml 40% ethanolu na 1 kg váhy a dva dny byl 20% ethanol přítomen ve vodě. Hepatocyty byly kultivovány v mediu obsahujícím ethanolový roztok ve výsledných koncentracích 1–100 μM . Medium bylo odebrané z 6-WP. Měření byla prováděna v triplikátech.

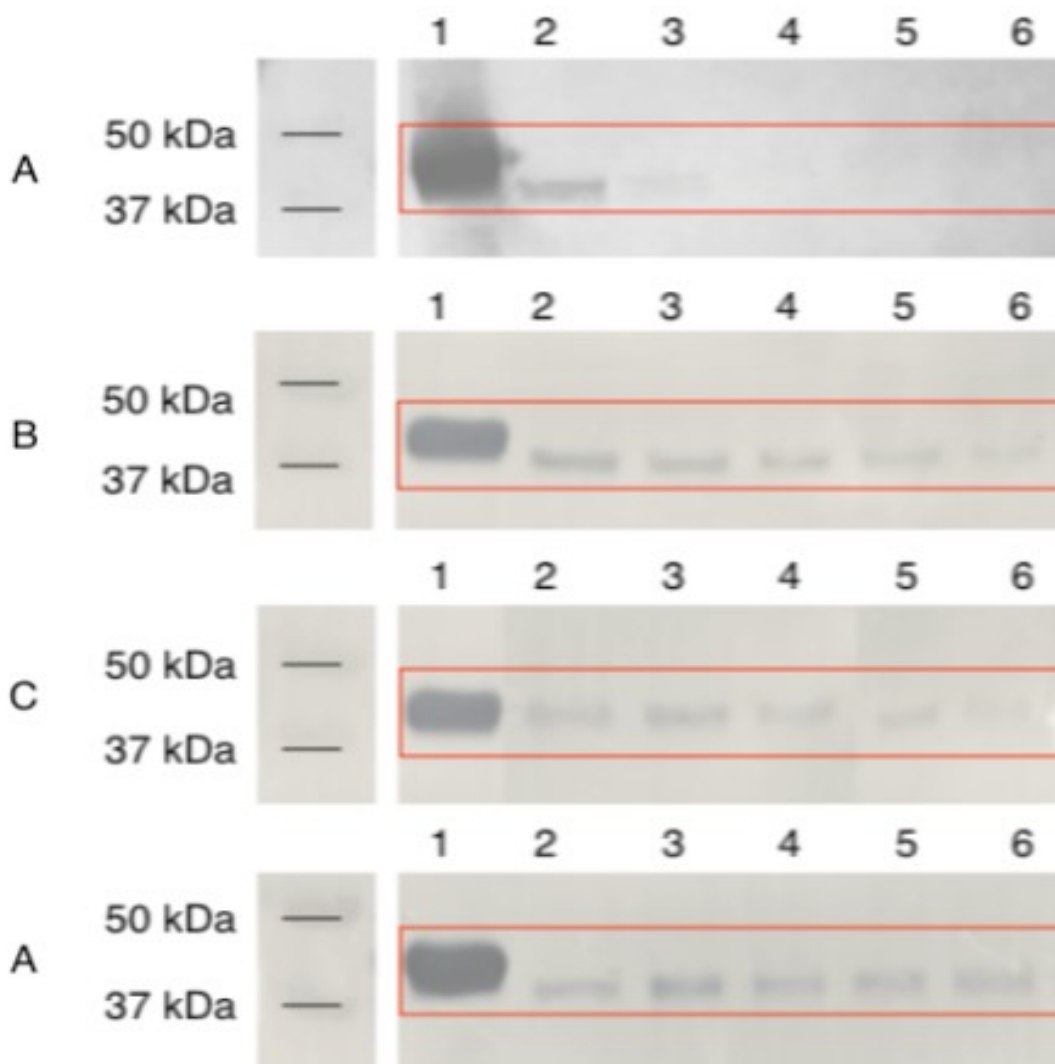


Obrázek 18: Koncentrace ALT stanovená v mediu hepatocytů s ethanolem. Premedikace potkanů probíhala 4 dny podáním gaváží do žaludku 9,7 ml 40% ethanolu na 1 kg váhy a dva dny byl 20% ethanol přítomen ve vodě. Hepatocyty byly kultivovány v mediu obsahujícím 300 mM EtOH a ethanolový roztok DHM ve výsledných koncentracích 1–100 μM . Medium bylo odebrané z 6-WP. Měření byla prováděna v triplikátech.

4.3 Určení vlivu DHM na expresi ADH v hepatocytech

Bylo sledováno množství enzymu alkoholdehydrogenasy v jednotlivých vzorcích hepatocytů izolovaných z nepremedikovaného a z ethanolem premedikovaného potkana v závislosti na vlivu dihydromyricetinu metodou Western blot s následnou imunodetekcí (viz kapitola 3.3.10, str. 47 a kapitola 3.3.11, str. 48).

Ze zobrazených membrán (viz obrázek 19, str. 64) lze usoudit, že dihydromyricetin přidaný do kultivačního media nevyvolává změny v expresi alkoholdehydrogenasy.



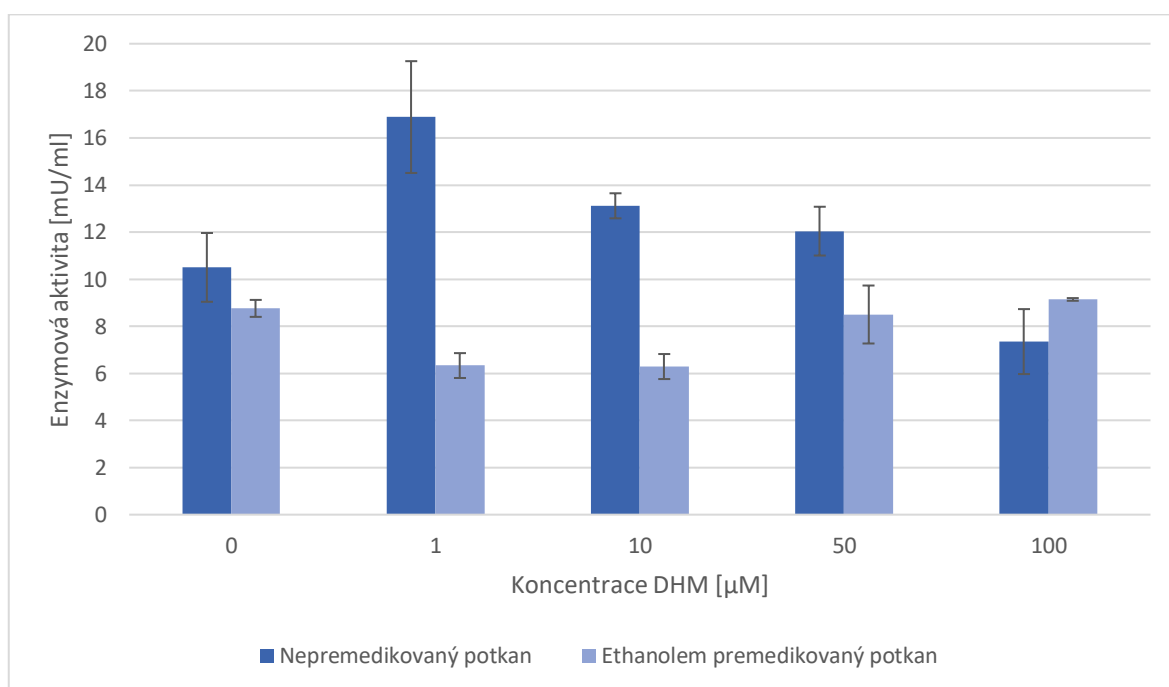
Obrázek 19: Vliv dihydromyricetinu na expresi ADH. Pro elektroforesu byl použit 10% polyakrylamidový gel, do každé jamky bylo aplikováno 40 μg proteinu. Do jednotlivých drah byly nanесeny vzorky v redukuјícím pufru v následujícím pořadí: pozitivní kontrola pro imunodetekci ADH – koňská alkoholdehydrogenasa (1); obrázek A: hepatocyty izolované z nepremedikovaného potkana kultivované v mediu v přítomnosti ethanolového roztoku DHM ve výsledných koncentracích 0 μM (2); 1 μM (3); 10 μM (4); 50 μM (5) a 100 μM (6); obrázek B: hepatocyty izolované z nepremedikovaného potkana kultivované v mediu v přítomnosti 300 mM ethanolu a ethanolového roztoku DHM ve výsledných koncentracích 0 μM (2); 1 μM (3); 10 μM (4); 50 μM (5) a 100 μM (6); obrázek C: hepatocyty izolované z ethanolem premedikovaného potkana kultivované v mediu v přítomnosti ethanolového roztoku DHM ve výsledných koncentracích 0 μM (2); 1 μM (3); 10 μM (4); 50 μM (5) a 100 μM (6); obrázek D: hepatocyty izolované z ethanolem premedikovaného potkana kultivované v mediu v přítomnosti 300 mM ethanolu a ethanolového roztoku DHM ve výsledných koncentracích 0 μM (2); 1 μM (3); 10 μM (4);

50 μM (5) a 100 μM (6). Premedikace potkanů probíhala 4 dny podáním gaváží do žaludku 9,7 ml 40% ethanolu na 1 kg váhy a dva dny byl 20% ethanol přítomen ve vodě.

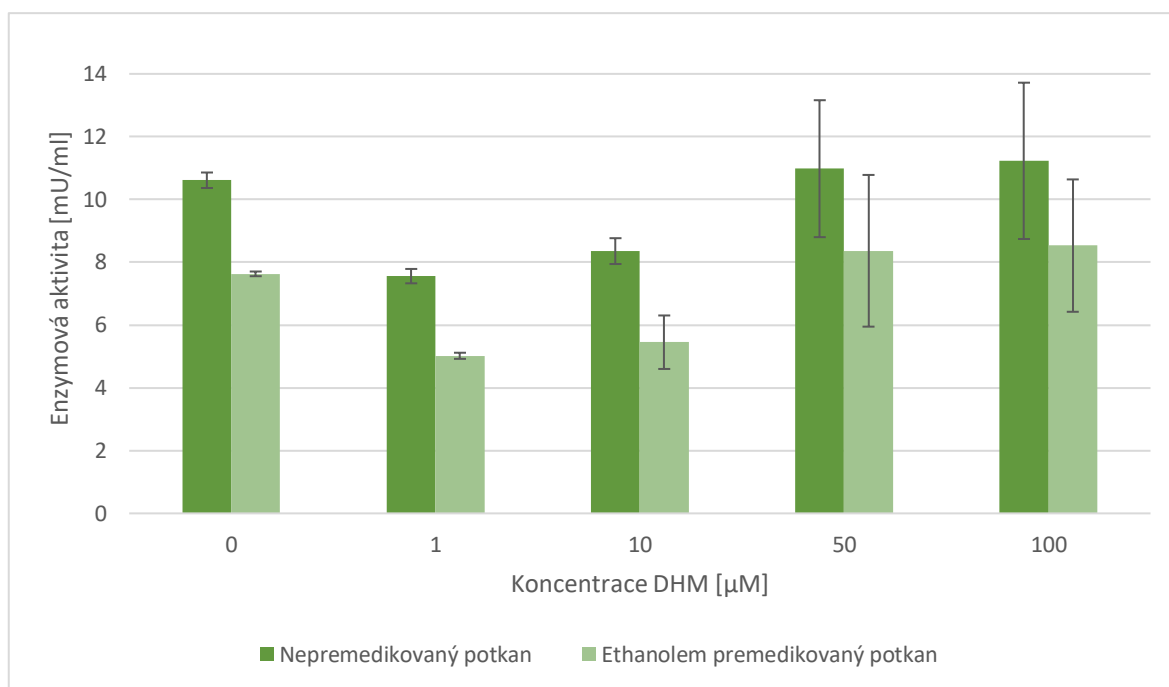
4.4 Vliv DHM na aktivitu alkoholdehydrogenasy

Aktivita alkoholdehydrogenasy ve vzorcích izolovaných hepatocytů byla sledována v závislosti na přídávku dihydromyricetinu a ethanolu do kultivačního media. Dihydromyricetin byl do media přidáván jako ethanolový roztok ve výsledné koncentraci 1; 10; 50 a 100 μM a ethanol byl ve výsledné koncentraci 300 mM. Průběh reakce při daném složení reakční směsi byl lineární zhruba 30 minut od iniciace reakce.

Ze získaných hodnot (viz obrázek 20, str. 65 a obrázek 21, str. 66) lze usoudit, že dihydromyricetin přidáný do kultivačního media nevykazuje výrazný vliv na aktivitu alkoholdehydrogenasy.



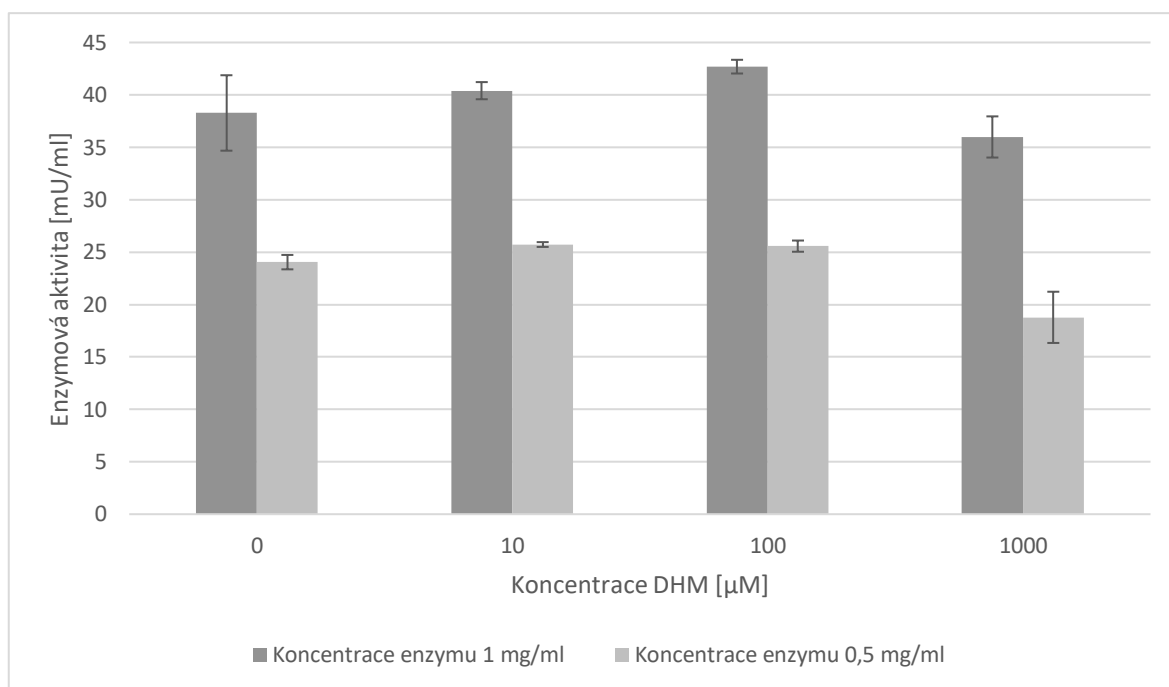
Obrázek 20: Vliv DHM na aktivitu alkoholdehydrogenasy ve vzorcích izolovaných hepatocytů kultivovaných v mediu bez EtOH. Premedikace potkanů probíhala 4 dny podáním gaváží do žaludku 9,7 ml 40% ethanolu na 1 kg váhy a dva dny byl 20% ethanol přítomen ve vodě. Do media byl přidáván dihydromyricetin jako ethanolový roztok v koncentraci 1–100 μM . Reakce byla sledována jako nárůst absorbance při 340 nm v čase. Průběh reakce při daném složení reakční směsi byl lineární 30 minut od iniciace reakce. Hodnoty enzymové aktivity byly vypočítány na základě sestrojení kalibrační křivky.



Obrázek 21: Vliv DHM na aktivitu alkoholdehydrogenasy ve vzorcích izolovaných hepatocytů kultivovaných v mediu s 300 mM EtOH. Premedikace potkanů probíhala 4 dny podáním gaváže do žaludku 9,7 ml 40% ethanolu na 1 kg váhy a dva dny byl 20% ethanol přítomen ve vodě. Do media byl přidáván dihydromyricetin jako ethanolový roztok v koncentraci 1–100 μM . Reakce byla sledována jako nárůst absorbance při 340 nm v čase. Průběh reakce při daném složení reakční směsi byl lineární 30 minut od iniciace reakce. Hodnoty enzymové aktivity byly vypočítány na základě sestrojení kalibrační křivky.

Aktivita rekombinantní koňské alkoholdehydrogenasy byla sledována v závislosti na přídávku dihydromyricetinu. Aktivita ADH byla určena pomocí specifické reakce oxidace ethanolu na acetaldehyd za přítomnosti kofaktoru NAD^+ . Dihydromyricetin byl do reakční směsi přidáván do výsledné koncentrace 1000 μM .

Z naměřených hodnot je zřejmé, že koncentrace DHM 10 a 100 μM neovlivňuje aktivitu ADH. Určitá inhibice je patrná až při vysoké koncentraci DHM (viz obrázek 22, str. 67).



Obrázek 22: Vliv DHM na aktivitu alkoholdehydrogenasy. Reakční směs obsahovala rekombinantní koňskou alkoholdehydrogenasu o koncentraci 1 mg/ml a 0,5 mg/ml a 3 μl ethanolového roztoku dihydromyricetinu ve výsledných koncentracích 10–1000 μM . Průběh reakce při daném složení reakční směsi byl lineární zhruba 30 minut od iniciace reakce. Množství redukovaného kofaktoru NADH bylo stanoveno spektrofotometricky při 340 nm.

4.5 Vliv dihydromyricetinu na metabolismus ethanolu na myším modelu

Byl sledován vliv dihydromyricetinu na koncentraci ethanolu a acetaldehydu v krvi myši. Kontrolní skupině myši byl podán gaváží do žaludku roztok 30% ethanolu a druhé skupině byl podán roztok 30% ethanolu a DHM o výsledné koncentraci 2,5 mM (viz kapitola 3.3.14, str. 50). Na základě předchozích, dosud nepublikovaných výsledků, byly zvoleny pouze dva časy, které byly pro odběr krve nejvhodnější. Krev byla odebírána po 30 a 80 minutách od podání gaváže.

Dle výsledných hodnot (viz tabulka 2, str. 68) lze usoudit, že aplikovaný zásah DHM byl neúčinný, jelikož nedošlo k ovlivnění střední hodnoty pokusné skupiny vlivem aplikace zásahu DHM ve srovnání se střední hodnotou kontrolní skupiny. Koncentrace acetaldehydu nemohla být stanovena, jelikož byla u všech vzorků pod limitem detekce tj. 0,001 mg/ml.

Tabulka 2: Vliv DHM na koncentraci EtOH v krvi myší.

Podávané látky	Koncentrace EtOH [g/kg]	
	vzorek v čase 30 minut	vzorek v čase 80 minut
30% EtOH	2,31 ± 0,73 (s _r = 26,82 %)	2,32 ± 0,39 (s _r = 14,14 %)
30% EtOH 2,5 mM DHM	2,46 ± 0,76 (s _r = 26,03 %)	2,10 ± 0,36 (s _r = 14,45 %)

Statistika: Studentův nepárový t-test: $p > 0,05$ v porovnání s kontrolou. Jako kontrola sloužila skupina myší, které byl podán gaváží do žaludku roztok 30% EtOH. Výsledky jsou vyjádřeny jako medián koncentrace ± SEM (n = 5); s_r = relativní směrodatná odchylka.

5 Diskuze

Nadměrný příjem alkoholu se stal jedním ze závažných celosvětových problémů. Vysoká konzumace alkoholu s sebou přináší mnoho patologických stavů a je spojena například s kardiovaskulárními onemocněními, rakovinou či s onemocněním jater. Mnohé studie se tímto problémem zabývají a stále se hledají a vyvíjí nové látky, které by zmírňovaly projevy kocoviny a abstinence či látky, které by působily přímo hepatoprotektivně. Mezi látky, o kterých se v této souvislosti hovoří nejčastěji, se řadí flavonoidy. Flavonoidy jsou sekundární metabolity rostlin vykazující širokou škálu pozitivních účinků na lidský organismus. Mají například antioxidační, antimutagenní, protizánětlivé, antibakteriální či právě hepatoprotektivní vlastnosti.

Nejznámější flavonoidní sloučeninou, která působí proti účinkům alkoholu, je dihydromyricetin. V tradiční medicíně byl dihydromyricetin (ve formě čajů) využíván při léčbě intoxikace alkoholem a proti kocovině. V odborné literatuře se touto problematikou zabývá studie [3], podle které DHM urychluje metabolismus alkoholu. Vzhledem k tomu, že dosud není znám mechanismus účinků DHM na metabolismus ethanolu, bylo cílem této diplomové práce zjistit, zda DHM ovlivňuje alkoholdehydrogenasu, jeden z nejdůležitějších enzymů zapojených do biotransformace EtOH. Pro objasnění mechanismu byl zkoumán vliv dihydromyricetinu na ADH na třech úrovních: ochrana aktivity samotného enzymu, jeho exprese a modulace enzymové aktivity ADH.

Jako model byly zvoleny izolované hepatocyty z nepremedikovaného a z ethanolem premedikovaného potkana. Po optimalizaci podmínek kultivace byly hepatocyty vystaveny kombinované expozici EtOH a DHM. Míra poškození buněk pak byla hodnocena na základě MTT testu a stanovení markerů jaterního poškození – aktivit alaninaminotransferasy a aspartátaminotransferasy. Nejprve bylo sledováno množství uvolněné ALT a AST na základě enzymové aktivity a pro ověření výsledků byla také proměřena koncentrace ALT na proteinové úrovni metodou ELISA. Poté byl sledován vliv DHM na expresi ADH a jeho schopnost modulovat aktivitu tohoto enzymu. Na závěr byl sledován komplexní vliv DHM na rychlost metabolismu ethanolu *in vivo* v myším modelu.

Po izolaci primárních hepatocytů z nepremedikovaného a z ethanolem premedikovaného potkana byla pro další postup v experimentální části nutná optimalizace jejich kultivačních podmínek. Nejprve byla hledána vhodná koncentrace ethanolu, který byl přidáván do kultivačního media. Cílem bylo dosáhnout koncentrace, která již bude trvale

ovlivňovat vlastnosti hepatocytů a navozovat hepatocelulární poškození. Jako modelová sloučenina byl zvolen LPS. LPS je pro svou schopnost navodit prostředí oxidativního stresu vedoucí k apopticko-nekrotickým změnám u hepatocytů pro tyto účely běžně využíván [120]. Bylo tedy testováno několik koncentrací EtOH a na základě výsledků stanovené životnosti pomocí MTT testu, dle pozorování buněk pod mikroskopem a dle porovnání životnosti se vzorky, kde byly hepatocyty kultivovány v přítomnosti LPS, byla koncentrace ethanolu 300 mM vyhodnocena jako nejvhodnější, jelikož již při této koncentraci docházelo k trvalému ovlivnění vlastností hepatocytů.

V odborné literatuře bylo nalezeno velké rozpětí používaných koncentrací EtOH, které jsou přidávány do kultivačního media k hepatocytům. Nejčastěji se používají koncentrace do hodnoty 200 mM [121]. Jednotlivé studie a tato práce se pak liší například v počtu nanesených buněk či v samotné premedikaci potkanů. Je možné, že námi izolované hepatocyty z ethanolem premedikovaného potkana, tedy již exponované ethanolu, se pravděpodobně adaptovaly na pravidelné dávky, byly odolnější vůči působení EtOH a zřejmě měly i větší regenerační kapacitu než hepatocyty izolované z nepremedikovaného potkana, tudíž bylo zapotřebí použití vyšší koncentrace EtOH než v publikovaných studiích [122].

Následně byla optimalizována koncentrace DHM, který byl přidáván do kultivačního media. Jako nejvhodnější koncentrace DHM bylo zvoleno koncentrační rozmezí 1–100 μM . Obdobné hodnoty lze nalézt i v odborné literatuře. Například ve studii, kde byly zkoumány antiproliferativní a proapoptické vlastnosti DHM na lidské buňky rakoviny žaludku, byla používána koncentrace DHM 25–100 μM [123].

Po optimalizaci kultivace hepatocytů byla v této diplomové práci v dalším kroku stanovována životnost buněk. Míra toxicity testovaných látek byla určena několika způsoby. Stanovení životnosti hepatocytů pomocí MTT testu poskytlo očekávané výsledky (viz obrázek 11, str. 56 a obrázek 12, str. 57). MTT test má však své limity. U tohoto stanovení záleží nejenom na toxicitě dané látky ale i na počtu původně nanesených hepatocytů. Velkou roli zde hraje např. chyba v aplikaci při nasazování hepatocytů či zda buňky nebyly odsáty ze dna při opakované výměně media. U skupin, které se svou životností nebudou pravděpodobně příliš lišit (například kontrolní skupina a skupina, která byla kultivována v mediu s DHM o výsledné koncentraci 1 μM), pak nemusí být kvůli kultivaci a stanovení na 24-WP rozdíly jejich viability odhaleny, jelikož práce na 24-WP jsou náchylnější k výše zmíněným chybám než například práce na 6-WP. U samotného MTT

stanovení závisí vznik purpurového zabarvení na metabolické aktivitě buněk, konkrétně pak na aktivitě mitochondriální dehydrogenasy. Mitochondriální dehydrogenasa je ovšem při počínající apoptose zvýšeně aktivní. Pokud by se životnost měřila až o několik hodin později, hodnoty životnosti by pravděpodobně začaly klesat. Z toho můžeme usuzovat, že se životnost stanovená pomocí MTT testu může přechodně zvyšovat. Z tohoto důvodu byly jako další markery poškození hepatocytů použity stanovení katalytické koncentrace ALT a AST v mediu. Tyto enzymy se objevují v mediu jen v případě, že dojde k jejich uvolnění při ztrátě integrity buňky a rozpadu hepatocytu. Přestože má MTT test řadu nedostatků je stále pro svou jednoduchost a rychlost hojně používán.

Výsledky stanovení katalytické koncentrace ALT a AST pomocí komerčních testů (viz obrázky 13–16, str. 58–61) potvrzují také výsledky stanovené pomocí MTT testu (viz obrázek 11, str. 56 a obrázek 12, str. 57). Oproti stanovení MTT si lze všimnout větších rozdílů mezi jednotlivými skupinami, což by mohlo souviset se skutečností, že tato stanovení proběhla v mediu, které bylo odebráno z 6-WP (viz výše). I v tomto případě může hrát kritickou roli nanesení samotných hepatocytů, jelikož koncentrace ALT i AST přímo závisí na množství hepatocytů. Dále lze potvrdit, že DHM působí hepatoprotektivně v závislosti na dávce. Tyto výsledky jsou v souladu také s několika studiemi. Bylo například zjištěno, že DHM chrání hepatocyty před apoptosou [124]. Také v *in vivo* studiích DHM výrazně potlačuje nárůst hodnot ALT, AST i LDH [125].

Pro potvrzení protektivních vlastností DHM by bylo dále vhodné také stanovit tzv. hodnotu „LDH leakage“, což je podíl extracelulární a celkové aktivity LDH, a aktivitu kaspasy 3, což je proteasa účastnící se apoptosy. Tyto hodnoty jsou dalšími markery hepatotoxicity v kultuře hepatocytů a v mnohých studiích slouží jako doplňující stanovení.

Neočekávané výsledky pak přineslo kvantitativní stanovení ALT metodou ELISA (viz obrázek 17, str. 62 a obrázek 18, str. 63). Ethanol (300 mM) přidávaný do kultivačního media k hepatocytům působil zřejmě protektivně, protože u této skupiny vzorků byly stanoveny nižší hodnoty koncentrace ALT než u vzorků, které byly kultivovány v mediu bez EtOH. Tyto výsledky potvrzuje studie [126], která hodnotila účinek ethanolu na apoptosu a nekrosu v primární kultuře lidských i potkaních hepatocytů. Nízké koncentrace EtOH (1–10 mM) pak skutečně snížily množství uvolněného LDH z hepatocytů. Tento protektivní efekt souvisí se schopností ethanolu snížit peroxidaci bazálních lipidů v buňkách [126]. Na obrázku 18 (str. 63) lze dále většinou pozorovat nižší hodnoty koncentrace ALT u potkana, který byl premedikován ethanollem oproti nepremedikovanému potkanovi. Tento efekt je

pravděpodobně způsoben faktem, že se hepatocyty exponované ethanolu adaptovaly na pravidelné dávky a vykazují větší regenerační kapacitu (viz výše).

Nejednoznačné výsledky mohou být přisuzovány interindividuální variabilitě jedinců. Izolace hepatocytů byla provedena vždy pouze z jednoho nepremedikovaného a z jednoho ethanolem premedikovaného potkana. Z toho důvodu je třeba uvažovat biologickou interindividuální variabilitu jedinců. Tímto faktorem je metabolismus cizorodých látek ovlivněn a účinky alkoholu se tak u jednotlivých potkanů mohou navzájem lišit. Abychom co nejvíce eliminovali chybu, byli vždy použiti potkani stejného kmene, věku i váhy. Dále byla izolace a kultivace hepatocytů i následné experimenty prováděné na hepatocytech uskutečněny několikrát, přičemž jednotlivé hodnoty všech stanovení a samotný stav jak jater, tak hepatocytů byly vždy shodné.

Pro účely zjištění inhibičního a indukčního efektu DHM na ADH bylo nezbytné stanovení koncentrace proteinu pomocí vhodné techniky. Bylo testováno několik metod stanovení, přičemž pravděpodobně nejpřesnější výsledky poskytuje modifikovaná Lowryho metoda (viz kap. 3.3.9, str. 46). V testovaných vzorcích se koncentrace proteinu shoduje s jinými již publikovanými výsledky [127].

V dalších experimentech byl ověřován předpoklad, že DHM zvyšuje aktivitu ADH na úrovni množství enzymu. Pro sledování indukce alkoholdehydrogenasy byla zvolena metoda Western blot s následnou imunodetekcí. Z výsledků tohoto experimentu (viz obrázek 19, str. 64) lze usoudit, že nedochází k významnému zvýšení exprese ADH v hepatocytech vůči kontrolnímu vzorku (hepatocyty kultivované v mediu bez testovaných látek) vlivem DHM. Nebyla nalezena žádná publikovaná data, která by tyto výsledky potvrdila či vyvrátila.

V další části této diplomové práce byla měřena již samotná aktivita ADH. Nejprve byl zjišťován vliv DHM na aktivitu ADH ve vzorcích hepatocytů v závislosti na DHM a EtOH, látek přidaných do kultivačního media. Z výsledků (viz obrázek 20, str. 65 a obrázek 21, str. 66) je zřejmé, že DHM nemá vliv na aktivitu ADH za podmínek *ex vivo*.

Následně byla zjišťována aktivita komerční koňské ADH. Koňská alkoholdehydrogenasa byla zvolena z toho důvodu, že se jedná o hojně experimentálně prostudovaný enzym, jsou známy jeho terciární a kvarterní struktury apoenzymu, holoenzymu i různých mutantních forem. Tento enzym je tak v současné době používán jako modelový enzym ADH [71]. V této práci bylo sledováno ovlivnění tvorby redukovaného kofaktoru NAD^+ v závislosti na koncentraci DHM. Dle výsledků (viz obrázek 22, str. 67)

lze konstatovat, že u koncentrací DHM 10 a 100 μM nebyl zjištěn žádný vliv na aktivitu alkoholdehydrogenasy. Určitá inhibice je patrná až při vysoké koncentraci DHM (1000 μM).

Tyto výsledky jsou v rozporu se studií, kdy DHM zvyšoval aktivitu ADH i ALDH, a tím urychloval metabolismus alkoholu [4]. V další studii DHM opět zvyšuje aktivitu ADH, a to až o 60 % ve srovnání s kontrolou [128].

V poslední části předkládané práce byla měřena koncentrace EtOH a acetaldehydu v krvi myší, které byly premedikovány buď samotným ethanolem (30% EtOH) nebo v kombinaci ethanolu a DHM (30% EtOH a 0,8 g/l DHM). Výsledky (viz tabulka 2, str. 68) jsou shodné s dosud nepublikovanými daty, která stanovila koncentraci EtOH a acetaldehydu v krvi myší v pěti různých časech. V obou těchto experimentech nebyl zaznamenán vliv DHM na rychlost metabolismu alkoholu. Tyto výsledky jsou opět v rozporu se studiemi [128], kde bylo zjištěno, že DHM má schopnost snižovat obsah alkoholu v krvi. Je diskutováno, že DHM zvyšuje rychlost odbourávání alkoholu v krvi na 1–2 hodiny, přičemž v našem případě i po 80 minutách byla koncentrace EtOH bez ohledu na premedikaci DHM stále poměrně vysoká. Pokud by dihydromyricetin skutečně urychloval metabolismus alkoholu, mohlo by se jednat o účinný přípravek pro zmírnění kocoviny rychlým snížením acetaldehydu v krvi. Dále byla v této studii [128] měřena také aktivita glutathion-*S*-transferasy, u které došlo ke snížení enzymové aktivity při koncentracích DHM vyšších než 0,6 g/l. Je tedy možné, že námi použitá koncentrace je až příliš vysoká, což by mohla být příčina, proč DHM v námi provedeném experimentu neovlivňuje ADH či ALDH. Bylo by vhodné experiment zopakovat s použitím nižší koncentrace (např. 0,4 g/l) DHM [128].

Závěrem lze shrnout, že dle získaných výsledků nesouvisí hepatoprotektivní účinky DHM při intoxikaci alkoholem s ovlivněním ADH na žádné úrovni. Přesné mechanismy hepatoprotektivního účinku DHM tak nejsou stále zcela objasněny. Ukazuje se, že tato vlastnost je však pravděpodobně způsobena snížením oxidačního stresu, jak již bylo zmíněno [126]. Schopnost DHM vylučovat radikály jako faktor související s hepatoprotektivní aktivitou by tak měla být předmětem dalších studií.

6 Souhrn

Tato diplomová práce se věnovala studiu vlivu dihydromyricetinu na biotransformační enzym alkoholdehydrogenasu. Provedené experimenty poskytly tyto výsledky:

- Podařilo se optimalizovat kultivační podmínky hepatocytů izolovaných z nepremedikovaného a z ethanolem premedikovaného potkana v prostředí EtOH a DHM.
- Byla sledována míra poškození hepatocytů způsobená EtOH v přítomnosti DHM, přičemž nebyl zjištěn žádný významný trend protektivního působení DHM.
- Metodou ELISA (stanovení ALT) byl zjištěn protektivní účinek ethanolu v hepatocytech kultivovaných v mediu obsahujícím EtOH a DHM.
- Vlivem DHM nedošlo k indukci exprese ADH v hepatocytech.
- DHM neovlivňuje aktivitu ADH při pokusech s purifikovaným enzymem ani ve vzorcích hepatocytů.
- DHM nevykazuje vliv na rychlost metabolismu ethanolu v myším modelu.

Seznam použité literatury

- [1] World Health Organization, *Global status report on alcohol and health, 2014*. (2014).
- [2] S. McGuire, "Scientific report of the 2015 dietary guidelines advisory committee. Washington DC: US Departments of Agriculture and Health and Human Services, 2015", *Adv. Nutr.*, roč. 7, č. 1, s. 202–204, (2016).
- [3] Y. Shen a kol., "Dihydromyricetin as a novel anti-alcohol intoxication medication", *J. Neurosci.*, roč. 32, č. 1, s. 390–401, (2012).
- [4] J. Liang a R. W. Olsen, "Alcohol use disorders and current pharmacological therapies: the role of GABA(A) receptors", *Acta Pharmacol. Sin.*, roč. 35, č. 8, s. 981–993, (2014).
- [5] A. N. Panche, A. D. Diwan a S. R. Chandra, "Flavonoids: an overview", *J. Nutr. Sci.*, roč. 5, č. 47, s. 1–15, (2016).
- [6] P. Hodek, P. Trefil a M. Stiborová, "Flavonoids potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450", *Chem. Biol. Interact.*, roč. 139, č. 1, s. 1–21, (2002).
- [7] V. Mahadevan, "Anatomy of the liver", *Surg. Oxf. Int. Ed.*, roč. 29, č. 12, s. 589–592, (2011).
- [8] O. Naňka, M. Elišková a O. Eliška, *Přehled anatomie*, 3. vyd., Praha: Galén, Karolinum, (2009).
- [9] V. K. Kapoor, "Liver Anatomy", *Medscape*, roč. 15, č. 8, s. 37–49, (2017).
- [10] G. J. Tortora a B. Derrickson, *Principles of anatomy and physiology*, 12. vyd., Hoboken: John Wiley & Sons, (2010).
- [11] J. Dooley a S. Sherlock, *Sherlock's diseases of the liver and biliary system*, 12. vyd., Chichester: Wiley-Blackwell, (2011).
- [12] F. Martini, *Anatomy & physiology*, 9. vyd., San Francisco: Benjamin Cummings, (2005).
- [13] W. F. Ganong, *Přehled lékařské fyziologie*, 20. vyd., Praha: Galén, (2005).

- [14] K. Decker, "Biologically active products of stimulated liver macrophages (Kupffer cells)", *Eur. J. Biochem.*, roč. 192, č. 2, s. 245–261, (1990).
- [15] J. Poisson a kol., "Liver sinusoidal endothelial cells: Physiology and role in liver diseases", *J. Hepatol.*, roč. 66, č. 1, s. 212–227, (2017).
- [16] E. Wisse a kol., "On the function of pit cells, the liver-specific natural killer cells", *Semin. Liver Dis.*, roč. 17, č. 4, s. 265–286, (1997).
- [17] F. Winau a kol., "Ito cells are liver-resident antigen-presenting cells for activating T cell responses", *Immunity*, roč. 26, č. 1, s. 117–129, (2007).
- [18] A. L. Mescher a L. C. U. Junqueira, *Junqueira's basic histology: text and atlas*, 14. vyd., San Francisco: McGraw Hill Education, (2016).
- [19] S. Goldfischer a J. Bernstein, "Lipofuscin (aging) pigment granules of the newborn human liver", *J. Cell Biol.*, roč. 42, č. 1, s. 253–261, (1969).
- [20] A. Treyer a A. Müsch, "Hepatocyte polarity", *Compr. Physiol.*, roč. 3, č. 1, s. 243–287, (2013).
- [21] P. Gissen a I. M. Arias, "Structural and functional hepatocyte polarity and liver disease", *J. Hepatol.*, roč. 63, č. 4, s. 1023–1037, (2015).
- [22] H. Kono a kol., "Diphenyleneiodonium sulfate, an NADPH oxidase inhibitor, prevents early alcohol-induced liver injury in the rat", *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, roč. 280, č. 5, s. 1005–1012, (2001).
- [23] M. D. Wheeler, "Endotoxin and Kupffer cell activation in alcoholic liver disease", *Natl. Inst. Alcohol Abuse Alcohol.*, roč. 27, č. 4, s. 300–306, (2003).
- [24] R. Bataller a D. A. Brenner, "Liver fibrosis", *J. Clin. Invest.*, roč. 115, č. 2, s. 209–218, (2005).
- [25] S. L. Friedman, "Hepatic stellate cells: protean, multifunctional and enigmatic cells of the liver", *Physiol. Rev.*, roč. 88, č. 1, s. 125–172, (2008).
- [26] L. D. DeLeve, "Liver sinusoidal endothelial cells and liver regeneration", *J. Clin. Invest.*, roč. 123, č. 5, s. 1861–1866, (2013).
- [27] A. M. Rappaport a kol., "Subdivision of hexagonal liver lobules into a structural and functional unit; role in hepatic physiology and pathology", *Anat. Rec.*, roč. 119, č. 1, s. 11–

33, (1954).

[28] L. C. Junqueira a kol., *Základy histologie*, 1.vyd., Jinočany: H & H, (1997).

[29] S. Saito a kol., "A rat model of a repeat 70% major hepatectomy", *J. Surg. Res.*, roč. 134, č. 2, s. 322–326, (2006).

[30] S. Gowda a kol., "A review on laboratory liver function tests", *Pan Afr. Med. J.*, roč. 3, č. 17, s. 1–11, (2009).

[31] B. R. Thapa a A. Walia, "Liver function tests and their interpretation", *Indian J. Pediatr.*, roč. 74, č. 7, s. 663–671, (2007).

[32] J. K. Limdi a G. M. Hyde, "Evaluation of abnormal liver function tests", *Postgrad. Med. J.*, roč. 79, č. 932, s. 307–312, (2003).

[33] L. C. Claridge a kol., "Gilbert's syndrome", *Br. Med. J.*, roč. 2, č. 2, s. 701–712, (1968).

[34] F. Lahmi a kol., "Dubin-Johnson syndrome presenting after acute viral hepatitis", *Gastroenterol. Hepatol. Bed Bench*, roč. 4, č. 3, s. 164–166, (2011).

[35] L. J. Casarett, J. Doull a C. D. Klaassen, *Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons*, 6. vyd., New York: McGraw-Hill Medical Pub. Division, (2001).

[36] Z. Knejzlík, J. Káš a T. Ruml, "Mechanismus vstupu xenobiotik do organismu a jejich detoxikace", *Chem. Listy*, roč. 20, č. 94, s. 913–918, (2000).

[37] M. Stiborová a kol., "Study of enzymes metabolizing environmental pollutants as a means of modulating their biodegradation [Enzymy metabolizující kontaminanty životního prostředí]", *Chem. Listy*, roč. 2004, č. 98, s. 823–830, (2004).

[38] J. I. Boullata a V. T. Armenti, *Handbook of drug-nutrient interactions*, 2. vyd., New York: Human Press, (2010).

[39] F. Kratz, "Albumin as a drug carrier: design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles", *J. Control. Release*, roč. 132, č. 3, s. 171–183, (2008).

[40] M. Stiborová, "Studium enzymů biotransformujících xenobiotika jako nástroj k poznání mechanismu působení karcinogenů a konstrukce kancerostatik nové generace", *Sborník Z Multiobor. Semin. Otevřená Věda*, s. 1–21, (2005).

[41] W. N. Aldridge a M. W. Anders, "Bioactivation of foreign compounds biochemical",

- J. Appl. Toxicol.*, roč. 6, č. 5, s. 379–389, (1986).
- [42] W. B. Jakoby, J. R. Bend a J. Caldwell, *Metabolic basis of detoxication: metabolism of functional groups*, 1. vyd., New York: Academic Press, (1982).
- [43] O. Barbier a kol., "Effect of heavy metals on and handling by the kidney", *Nephron Physiol.*, roč. 99, č. 4, s. 105–110, (2005).
- [44] C. M. Stowe a G. L. Plaa, "Extrarenal excretion of drugs and chemicals", *Annu. Rev. Pharmacol.*, roč. 8, č. 1, s. 337–356, (1968).
- [45] U. A. Meyer, "Overview of enzymes of drug metabolism", *J. Pharmacokinet. Biopharm.*, roč. 24, č. 5, s. 449–459, (1996).
- [46] D. R. Krishna a U. Klotz, "Extrahepatic metabolism of drugs in humans", *Clin. Pharmacokinet.*, roč. 26, č. 2, s. 144–160, (1994).
- [47] C. Ioannides, *Enzyme systems that metabolise drugs and other xenobiotics*, 1. vyd., New York: J. Wiley, (2002).
- [48] S. Kebamo, S. Tesema a B. Geleta, "The role of biotransformation in drug discovery and development", *J. Drug. Metab. Toxicol.*, roč. 6, č. 5, s. 10–23, (2015).
- [49] P. Hodek a kol., "Chemopreventive compounds-view from the other side", *Chem. Biol. Interact.*, roč. 180, č. 1, s. 1–9, (2009).
- [50] P. Jančová, P. Anzenbacher a E. Anzenbacherova, "Phase II drug metabolizing enzymes", *Biomed. Pap.*, roč. 154, č. 2, s. 103–116, (2010).
- [51] S. N. de Wildt a kol., "Glucuronidation in humans. Pharmacogenetic and developmental aspects", *Clin. Pharmacokinet.*, roč. 36, č. 6, s. 439–452, (1999).
- [52] N. Gamage a kol., "Human sulfotransferases and their role in chemical metabolism", *Toxicol. Sci.*, roč. 90, č. 1, s. 5–22, (2005).
- [53] K. Kurogi a kol., "Ethanol sulfation by the human cytosolic sulfotransferases: a systematic analysis", *Biol. Pharm. Bull.*, roč. 35, č. 12, s. 2180–2185, (2012).
- [54] W. W. Weber, S. N. Cohen a M. S. Steinberg, "Purification and properties of *N*-acetyltransferase from mammalian liver", *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, roč. 151, č. 2, s. 734–741, (1968).
- [55] H. Sies, "Glutathione and its role in cellular functions", *Free Radic. Biol. Med.*,

roč. 27, č. 9, s. 916–921, (1999).

[56] W. M. Atkins a kol., "The catalytic mechanism of glutathione-*S*-transferase (GST). Spectroscopic determination of the pKa of Tyr-9 in rat alpha 1-1 GST", *J. Biol. Chem.*, roč. 268, č. 26, s. 188–191, (1993).

[57] H. K. Seitz a F. Stickel, "Molecular mechanisms of alcohol-mediated carcinogenesis", *Nat. Rev. Cancer*, roč. 7, č. 7, s. 599–611, (2007).

[58] H. K. Seitz a F. Stickel, "Acetaldehyde as an underestimated risk factor for cancer development: role of genetics in ethanol metabolism", *Genes Nutr.*, roč. 5, č. 2, s. 121–128, (2010).

[59] A. I. Cederbaum, "Alcohol metabolism", *Clin. Liver Dis.*, roč. 16, č. 4, s. 667–685, (2012).

[60] S. Zakhari, "Alcohol metabolism and epigenetics changes", *Alcohol Res. Curr. Rev.*, roč. 35, č. 1, s. 6–16, (2013).

[61] S. Zakhari, "Overview: how is alcohol metabolized by the body?", *Natl. Inst. Alcohol Abuse Alcohol.*, roč. 29, č. 4, s. 245–254, (2006).

[62] T. M. Leung a N. Nieto, "CYP2E1 and oxidant stress in alcoholic and non-alcoholic fatty liver disease", *J. Hepatol.*, roč. 58, č. 2, s. 395–398, (2013).

[63] Y. Lu a A. I. Cederbaum, "CYP2E1 and oxidative liver injury by alcohol", *Free Radic. Biol. Med.*, roč. 44, č. 5, s. 723–738, (2008).

[64] F. Bardag-Gorce a kol., "The effect of ethanol-induced cytochrome P4502E1 on the inhibition of proteasome activity by alcohol", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, roč. 279, č. 1, s. 23–29, (2000).

[65] J. A. Handler a R. G. Thurman, "Redox interactions between catalase and alcohol dehydrogenase pathways of ethanol metabolism in the perfused rat liver", *J. Biol. Chem.*, roč. 265, č. 3, s. 1510–1515, (1990).

[66] E. Quertemont, "Genetic polymorphism in ethanol metabolism: acetaldehyde contribution to alcohol abuse and alcoholism", *Mol. Psychiatry*, roč. 9, č. 6, s. 570–581, (2004).

[67] T. Hamamoto, S. Yamada a C. Hirayama, "Nonoxidative metabolism of ethanol in the pancreas; implication in alcoholic pancreatic damage", *Biochem. Pharmacol.*, roč. 39,

č. 2, s. 241–245, (1990).

[68] L. Gustavsson, "Phosphatidylethanol formation: specific effects of ethanol mediated via phospholipase D", *Alcohol Alcohol.*, roč. 30, č. 4, s. 391–406, (1995).

[69] H. K. Seitz a U. A. Simanowski, "Alcohol and carcinogenesis", *Annu. Rev. Nutr.*, roč. 8, č. 13, s. 99–119, (1988).

[70] M. Varela-Rey a kol., "Alcohol, DNA methylation, and cancer", *Alcohol Res. Curr. Rev.*, roč. 35, č. 1, s. 25–35, (2013).

[71] A. Kotrbová a P. Kotrba, "Molekulární charakterizace mikrobiálních NAD(P) a Zn-dependentních alkoholdehydrogenas", *Chem. Listy*, roč. 101, č. 78, s. 372–383, (2007).

[72] D. P. Agarwal a H. W. Goedde, "Pharmacogenetics of alcohol metabolism and alcoholism", *Pharmacogenetics*, roč. 2, č. 2, s. 48–62, (1992).

[73] S. Trivic a L. Vladimír, "Structure and function of yeast alcohol dehydrogenase", roč. 65, č. 4, s. 123–132, (2000).

[74] D. E. Harry a T. W. Kimmerer, "Molecular genetics and physiology of alcohol dehydrogenase in woody plants", *For. Biotechnol.*, roč. 43, č. 3, s. 251–272, (1991).

[75] J. H. Kagi a B. L. Vallee, "The role of zinc in alcohol dehydrogenase. The effect of metal-binding agents on the structure of the yeast alcohol dehydrogenase molecule", *J. Biol. Chem.*, roč. 235, č. 13, s. 3188–3192, (1960).

[76] R. R. Crichton, *Biological inorganic chemistry: a new introduction to molecular structure and function*, 2. vyd., Amsterdam: Elsevier, (2012).

[77] A. Wedel a H. W. Ziegler-Heitbrock, "The C/EBP family of transcription factors", *Immunobiology*, roč. 193, č. 4, s. 171–185, (1995).

[78] H. J. Edenberg, "Regulation of the mammalian alcohol dehydrogenase genes", *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, roč. 64, č. 32, s. 295–341, (2000).

[79] H. Jornvall a J. O. Hoog, "Nomenclature of alcohol dehydrogenases", *Alcohol Alcohol.*, roč. 30, č. 2, s. 153–161, (1995).

[80] H. K. Seitz a C. M. Oneta, "Gastrointestinal alcohol dehydrogenase", *Nutr. Rev.*, roč. 56, č. 2, s. 52–60, (1998).

[81] D. P. Abriola a kol., "Active site of human liver aldehyde dehydrogenase",

Biochemistry, roč. 26, č. 18, s. 5679–5684, (1987).

[82] M. A. Schuckit, "Genetic aspects of alcoholism", *Ann. Emerg. Med.*, roč. 15, č. 9, s. 991–996, (1986).

[83] R. F. Suddendorf, "Research on alcohol metabolism among Asians and its implications for understanding causes of alcoholism", *Public Health Rep.*, roč. 104, č. 6, s. 615–620, (1989).

[84] N. A. Pikaar, M. Wedel a R. J. Hermus, "Influence of several factors on blood alcohol concentrations after drinking alcohol", *Alcohol Alcohol.*, roč. 23, č. 4, s. 289–297, (1988).

[85] P. G. Pietta, "Flavonoids as antioxidants", *J. Nat. Prod.*, roč. 63, č. 7, s. 1035–1042, (2000).

[86] L. R. Ferguson, "Role of plant polyphenols in genomic stability", *Mutat. Res.*, roč. 475, č. 1–2, s. 89–111, (2001).

[87] S. Kumar a A. K. Pandey, "Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview", *Sci. World J.*, roč. 2013, č. 56, s. 150–166, (2013).

[88] D. Betteridge, "What is oxidative stress?", *Metabolism.*, roč. 49, č. 2, s. 3–8, (2000).

[89] G. J. Burton a E. Jauniaux, "Oxidative stress", *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.*, roč. 25, č. 3, s. 287–299, (2011).

[90] J. R. Frandsen a P. Narayanasamy, "Neuroprotection through flavonoid: enhancement of the glyoxalase pathway", *Redox Biol.*, roč. 14, č. 5, s. 465–473, (2017).

[91] D. Procházková, I. Boušová a N. Wilhelmová, "Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids", *Fitoterapia*, roč. 82, č. 4, s. 513–523, (2011).

[92] M. Kawai a kol., "Flavonoids and related compounds as anti-allergic substances", *Allergol. Int.*, roč. 56, č. 2, s. 113–123, (2007).

[93] Y. Xie a kol., "Antibacterial activities of flavonoids: structure-activity relationship and mechanism", *Curr. Med. Chem.*, roč. 22, č. 1, s. 132–149, (2015).

[94] T. N. Kaul, E. J. Middleton a P. L. Ogra, "Antiviral effect of flavonoids on human viruses", *J. Med. Virol.*, roč. 15, č. 1, s. 71–79, (1985).

[95] M. Serafini, I. Peluso a A. Raguzzini, "Flavonoids as anti-inflammatory agents", *Proc. Nutr. Soc.*, roč. 69, č. 3, s. 273–278, (2010).

- [96] M. K. Chahar a kol., "Flavonoids: a versatile source of anticancer drugs", *Pharmacogn. Rev.*, roč. 5, č. 9, s. 1–12, (2011).
- [97] C. F. Skibola a M. T. Smith, "Potential health impacts of excessive flavonoid intake", *Free Radic. Biol. Med.*, roč. 29, č. 3, s. 375–383, (2000).
- [98] F. A. Resende a kol., "Mutagenicity of flavonoids assayed by bacterial reverse mutation (Ames) test", *Molecules*, roč. 17, č. 5, s. 5255–5268, (2012).
- [99] P. C. Hollman a M. B. Katan, "Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man", *Biomed. Pharmacother.*, roč. 51, č. 8, s. 305–310, (1997).
- [100] C. Rice-Evans, "Flavonoid antioxidants", *Curr. Med. Chem.*, roč. 8, č. 7, s. 797–807, (2001).
- [101] P. Batra a A. K. Sharma, "Anti-cancer potential of flavonoids: recent trends and future perspectives", *Biotech.*, roč. 3, č. 6, s. 439–459, (2013).
- [102] R. Čermák a S. Wolffram, "The potential of flavonoids to influence drug metabolism and pharmacokinetics by local gastrointestinal mechanisms", *Curr. Drug Metab.*, roč. 7, č. 7, s. 729–744, (2006).
- [103] Y. Chen a kol., "Simultaneous action of the flavonoid quercetin on cytochrome P450 (CYP) 1A2, CYP2A6, *N*-acetyltransferase and xanthine oxidase activity in healthy volunteers", *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, roč. 36, č. 8, s. 828–833, (2009).
- [104] I. Boušová a kol., "Naturally occurring flavonoids as inhibitors of purified cytosolic glutathione-*S*-transferase", *Xenobiotica*, roč. 42, č. 9, s. 872–879, (2012).
- [105] S. Bhuiya a kol., "Inhibitory effects of the dietary flavonoid quercetin on the enzyme activity of zinc(II)-dependent yeast alcohol dehydrogenase: spectroscopic and molecular docking studies", *Int. J. Biol. Macromol.*, roč. 95, č. 56, s. 177–184, (2017).
- [106] E. J. Choi a kol., "Four flavonoids from *Echinosophora koreensis* and their effects on alcohol metabolizing enzymes", *Arch. Pharm. Res.*, roč. 32, č. 6, s. 851–855, (2009).
- [107] T. M. Kitson a K. E. Kitson, "The effect of quercetin, a widely distributed flavonoid in food and drink, on cytosolic aldehyde dehydrogenase: a comparison with the effect of diethylstilboestrol", *Biochim. Biophys. Acta.*, roč. 1481, č. 2, s. 247–254, (2000).
- [108] W. Keung, "Biochemical studies of a new class of alcohol dehydrogenase inhibitors from *Radix puerariae*", *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, roč. 17, č. 6, s. 1254–1260, (1993).

- [109] F. Wang a kol., "Effects of beverages on alcohol metabolism: potential health benefits and harmful impacts", *Int. J. Mol. Sci.*, roč. 17, č. 3, s. 354–354, (2016).
- [110] J. Zhang a kol., "Recent update on the pharmacological effects and mechanisms of dihydromyricetin", *Front. Pharmacol.*, roč. 9, č. 24, s. 1204–1204, (2018).
- [111] T. K. Hyun a kol., "Hovenia dulcis - an Asian traditional herb", *Planta Med.*, roč. 76, č. 10, s. 943–949, (2010).
- [112] X. Kou a N. Chen, "Pharmacological potential of ampelopsin in Rattan tea", *Food Sci. Hum. Wellness*, roč. 1, č. 1, s. 14–18, (2012).
- [113] H. Li a kol., "The versatile effects of dihydromyricetin in health", *Evid. Based Complement. Altern. Med.*, roč. 6, č. 1, s. 1–10, (2017).
- [114] I. A. Lobo a R. A. Harris, "GABA(A) receptors and alcohol", *Pharmacol. Biochem. Behav.*, roč. 90, č. 1, s. 90–94, (2008).
- [115] P. Moldeus, J. Hogberg a S. Orrenius, "Isolation and use of liver cells", *Methods Enzymol.*, roč. 52, č. 7, s. 60–71, (1978).
- [116] H. Farghali a kol., "Muramyl dipeptide and carbon tetrachloride hepatotoxicity in rats: involvement of plasma membrane and calcium homeostasis in protective effect", *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.*, roč. 8, č. 8, s. 469–477, (1986).
- [117] T. Mosmann, "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays", *J. Immunol. Methods*, roč. 65, č. 1, s. 55–63, (1983).
- [118] X. J. Huang a kol., "Aspartate aminotransferase (AST/GOT) and alanine aminotransferase (ALT/GPT) detection techniques", *Sensors*, roč. 6, č. 7, s. 756–782, (2006).
- [119] O. H. Lowry a kol., "Protein measurement with the Folin phenol reagent", *J. Biol. Chem.*, roč. 193, č. 1, s. 265–275, (1951).
- [120] N. K. Canová a kol., "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*, roč. 18, č. 1, s. 63–74, (2008).
- [121] K. Henzel a kol., "Toxicity of ethanol and acetaldehyde in hepatocytes treated with ursodeoxycholic or tauroursodeoxycholic acid", *Biochim. Biophys. Acta*, roč. 2, č. 1, s. 37-

45, (2004).

[122] G. K. Michalopoulos, "Liver regeneration", *J. Cell Physiol.*, roč. 213, č. 2, s. 286–300, (2007).

[123] F. J. Ji a kol., "Dihydromyricetin induces cell apoptosis via a p53-related pathway in AGS human gastric cancer cells", *Genet. Mol. Res.*, roč. 14, č. 4, s. 15564–15571, (2015).

[124] L. Jiang a kol., "Dihydromyricetin enhances the chemo-sensitivity of nedaplatin via regulation of the p53/Bcl-2 pathway in hepatocellular carcinoma cells", *Pub. L. Sci.*, roč. 10, č. 4, s. 357–368, (2015).

[125] T. Murakami a kol., "Hepatoprotective activity of tocha, the stems and leaves of *Ampelopsis grossedentata*, and ampelopsin", *Biofactors*, roč. 21, č. 4, s. 175–178, (2004).

[126] R. Castilla a kol., "Dual effect of ethanol on cell death in primary culture of human and rat hepatocytes", *Alcohol Alcohol.*, roč. 39, č. 4, s. 290–296, (2004).

[127] K. K. Mohammad a kol., "The Role of TNF- α in aflatoxin B-1 induced hepatic toxicity in isolated perfused rat liver model", *Acta Med. Iran.*, roč. 55, č. 7, s. 417–421, (2017).

[128] M. Kim a kol., "Hepatic detoxification activity and reduction of serum alcohol concentration of *Hovenia dulcis* from Korea and China", *Korean J. Med. Crop Sci.*, roč. 8, č. 3, s. 225–233, (2000).

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

Jméno a příjmení (s adresou)	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka