

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2020

Adéla Burianová

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Vybrané komponenty esenciálních olejů jako
aktivátory aryluhlovodíkového receptoru**

Bakalářská práce

Adéla Burianová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2020

Vedoucí práce: doc. Ing. Radim Vrzal, Ph.D

Podklad pro zadání BAKALÁŘSKÉ práce studenta

PŘEDKLÁDÁ:	ADRESA	OSOBNÍ ČÍSLO
BURIANOVÁ Adéla	Geislerova 18, Olomouc - Hodolany	R17780

TÉMA ČESKY:

Vybrané komponenty esenciálních olejů jako aktivátory aryluhlovodíkového receptoru

TÉMA ANGLICKY:

Selected components of essential oils as arylhydrocarbon receptor activators

VEDOUcí PRÁCE:

doc. Ing. Radim Vrzal, Ph.D. - KBB

ZÁSADY PRO VYPRACOVÁNÍ:

- 1) Vypracování rešerše na téma bakalářské práce
- 2) Stanovení aktivity aryluhlovodíkového receptoru metodou reporter gene assay
- 3) Vypracování bakalářské práce a multimediální prezentace k obhajobě bakalářské práce

SEZNAM DOPORUČENÉ LITERATURY:

- Bartonkova I, Dvorak Z: Essential oils of culinary herbs and spices display agonist and antagonist activities at human aryl hydrocarbon receptor AhR, Food and Chemical Toxicology 111, 2018
- Ehrlich A, Kerkvliet N: Is chronic AhR activation by rapidly metabolized ligands safe for the treatment of immune-mediated diseases? Current opinion in Toxicology 2, 2017
- Články publikované v odborných periodících

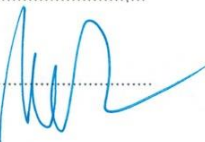
Podpis vedoucího práce:



Datum:

7.11.2018

Podpis vedoucího pracoviště:



Datum:

7.11.18

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc. et Ph.D.

Bibliografické údaje

Jméno a příjmení: Adéla Burianová

Název práce: Vybrané komponenty esenciálních olejů jako aktivátory aryluhlovodíkového receptoru

Typ práce: Bakalářská práce

Pracoviště: Katedra buněčné biologie a genetiky, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci

Vedoucí práce: doc. Ing. Radim Vrzal, Ph.D

Rok obhajoby práce: 2020

Klíčová slova: AhR, esenciální oleje, MTT assay, Reporter Gene Assay

Počet stran: 58

Počet příloh: 0

Jazyk: Český

Souhrn: Esenciální oleje jsou koncentrované hydrofobní kapaliny obsahující nejen sekundární metabolity rostlin, které díky svým rozmanitým vlastnostem a biologické aktivitě našly využití v mnoha odvětvích včetně kulinářství. Je známo, že některé esenciální oleje, které se používají právě v kulinářství, jsou schopné interagovat s aryluhlovodíkovým receptorem, který se účastní regulace mnoha fyziologických procesů v organismu. Vzhledem k tomu, že esenciální oleje jsou mnohasložkové směsi, je důležité identifikovat AhR-aktivní komponenty. Bakalářská práce je zaměřena na studium vlivu vybraných složek esenciálních olejů na transkripční aktivitu aryluhlovodíkového receptoru. K testování byly vybrány látky (1S)-(+)-3-carene, terpinolen, terpinen-4-ol, (+)-aromadendren, myristicin, cuminol, methylsalicylát, β -myrcen, borneol a camphen. Pro určení rozmezí netoxických koncentrací testovaných látek byl použit MTT test. Vliv těchto látek na transkripční aktivitu AhR byl zkoumán za využití metody Reporter Gene Assay ve dvou módech: agonistickém a antagonistickém. Z testovaných látek byly jako parciální agonisté AhR hodnoceny myristicin a cuminol. Antagonistická aktivita byla pozorována v případě myristicinu při použití v kombinaci s modelovým ligandem TCDD, ale v přítomnosti modelového ligandu FICZ pokles indukce pozorován nebyl. Ovšem pro lepší porozumění probíhajícím interakcím a jejich případné využití by bylo potřeba dalšího výzkumu.

Bibliographical identification

Author's first name and surname: Adéla Burianová

Title: Selected components of essential oils as aryl hydrocarbon receptor activators

Type of thesis: Bachelor

Department: Department of Cell Biology and Genetics, Faculty of Science, Palacky University, Olomouc

Supervisor: doc. Ing. Radim Vrzal, Ph.D

The year of presentation: 2020

Keywords: AhR, Essential oils, MTT assay, Reporter Gene Assay

Number of pages: 58

Number of appendices: 0

Language: Czech

Summary: Essential oils are concentrated hydrophobic liquids containing not only secondary metabolites of plants that, due to their diverse properties and biological activity, have found use in many sectors, including culinary. It is known, that some of the essential oils of culinary herbs and spices, can interact with the aryl hydrocarbon receptor, which is involved in regulation of many physiological processes of the organism. Since essential oils are multicomponent mixtures, it is important to identify AhR-active constituents. The bachelor thesis is focused on effects of selected components of essential oils on transcriptional activity of aryl hydrocarbon receptor. Compounds selected for testing were (1S)-(+)-3-carene, terpinolene, terpinen-4-ol, (+)-aromadendrene, myristicin, cuminol, methyl salicylate, β -myrcene, borneol and camphene. For determination of non-toxic concentrations of tested substances, MTT test was used. The effect of selected components on transcriptional activity of AhR was monitored using Reporter Gene Assay in two modes: agonist and antagonist mode. Of the tested substances myristicin and cuminol were identified as partial agonists of AhR. An antagonistic effect on AhR was observed in case of myristicin when used in combination with the model ligand TCDD, but in the presence of the model ligand FICZ, no induction decrease was observed. However, for better understanding of ongoing interactions and their possible use, further research would be needed.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením doc. Ing. Radima Vrzala, Ph.D. za použití literárních zdrojů uvedených v seznamu literatury.

V Olomouci dne:

.....

Adéla Burianová

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli doc. Ing. Radimu Vrzalovi, PhD. za odborné vedení, věcné připomínky, čas a rady, které mi v průběhu zpracování bakalářské práce věnoval. Poděkování patří také kolektivu Laboratoře molekulární toxikologie a molekulární farmakologie za ochotnou pomoc. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat své rodině, která mě v průběhu celého studia podporoval.

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Cíl práce.....	2
3	Biotransformace.....	3
3.1	I. fáze biotransformace.....	3
3.2	II. fáze biotransformace.....	5
3.3	III. fáze biotransformace.....	6
4	Jaderné receptory jako regulátory enzymů metabolizujících xenobiotika.....	7
4.1	Aryluhlovodíkový receptor.....	8
5	Receptorová teorie.....	11
6	Esenciální oleje.....	13
7	Materiál a metody.....	20
7.1	Materiál.....	20
7.1.1	Biologický materiál.....	20
7.1.2	Použité chemikálie.....	20
7.1.3	Testované látky.....	21
7.1.4	Složení použitých roztoků.....	21
7.1.5	Seznam laboratorních přístrojů a zařízení.....	22
7.2	Metodika.....	23
7.2.1	Kultivace buněk.....	23
7.2.2	Pasážování buněk.....	23
7.2.3	Počítání buněk.....	23
7.2.4	Vysévání buněk.....	24
7.2.5	Příprava zásobních roztoků použitých látek.....	24
7.2.6	MTT test.....	25
7.2.7	Reporter Gene Assay.....	26
8	Výsledky.....	28
8.1	Testování vlivu vybraných látek na viabilitu buněk buněčné linie AZ-AhR.....	28
8.2	Testování vlivu vybraných látek na transkripční aktivitu AhR.....	30
8.2.1	Aktivace transkripční aktivity AhR (agonistický mód).....	30
8.2.2	Inhibice transkripční aktivity AhR (antagonistický mód).....	34
9	Diskuze.....	38
10	Závěr.....	40
11	Literatura.....	41

Seznam symbolů a zkratk

ABC	ATP vazebná doména (ATP-binding cassette)
AhRR	AhR represor
ARNT	AhR jaderný translokátor
ATP	adenosintrifosfát
bHLH	bazický helix-smyčka-helix (basic-helix-loop-helix)
CAR	konstitutivní androstanový receptor
CYP	cytochrom P450
dFICZ	6,12-diformylindolo[3,2-b]carbazol
DMEM	komerční médium (Dulbecco's Modified Eagle's medium)
DMSO	dimethylsulfoxid
DRE	dioxinový responzivní element (dioxin response element)
EtOH	ethanol
FBS	fetální bovinní sérum
FICZ	6-formylindolo[3,2-b]carbazol
FXR	farnesoidní X receptor
GSTs	glutathion-S-transferasy
HAHs	halogenové deriváty aromatických uhlovodíků
Hsp90	protein teplotního šoku o velikosti 90 kD (heat shock protein 90)
HygB	hygromycin B
LBD	ligand vazebná doména (ligand binding domain)
MDR	transportéry mnohočetné lékové rezistence (multidrug resistance pumps)
MHG	mikrovlnná hydrodifúze a gravitace (microwave hydrodiffusion and gravity)
MSD	mikrovlnná difúze parou (microwave steam diffusion)
MTT	methylnitrotetrazoliová sůl
NADPH	nikotinamidadeninindinukleotid fosfát
NATs	N-acetyltransferasy
OAT	transportéry organických aniontů
OATP	transportní peptidy organických aniontů
OCT	transportéry organických kationtů

p23	kochaperonový protein o velikosti 23 kDa
PAHs	polycyklické aromatické uhlovodíky
PAS	Per-ARNT-Sim doména
PBS	fosfátový pufr s přidavkem chloridu sodného
PXR	pregnanový X receptor
RAR	receptor pro kyselinu trans-retinovou
RXR	receptor pro kyselinu cis-retinovou
SLC	přenašeče hydrofilních látek (solute carrier transporters)
SULTs	sulfotransferasy
TAD	transaktivační doména
TCDD	2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin
UGTs	UDP-glukuronosyltransferasy
UT	negativní kontrola
VDR	receptor pro vitamín D
XRE	xenobiotický responzivní element (xenobiotic response element)
XAP2	X asociovaný protein 2

Seznam obrázků a grafů

Obr. 1: Schéma regulace biotransformace.

Obr. 2: Schéma signální dráhy aryluhlovodíkového receptoru.

Obr. 3: Struktura testovaných látek.

Graf 1: Viabilita buněčné linie AZ-AhR po aplikaci testovaných látek.

Graf 2: Viabilita buněčné linie AZ-AhR po aplikaci testovaných látek 2.

Graf 3: Vliv testovaných látek na transkripční aktivitu AhR po 4 h. Agonistický mód.

Graf 4: Vliv testovaných látek na transkripční aktivitu AhR po 4 h. Agonistický mód 2.

Graf 5: Vliv testovaných látek na transkripční aktivitu AhR po 24 h. Agonistický mód.

Graf 6: Vliv testovaných látek na transkripční aktivitu AhR po 24 h. Agonistický mód 2.

Graf 7: Vliv testovaných látek na transkripční aktivitu AhR v přítomnosti FICZ. Antagonistický mód.

Graf 8: Vliv testovaných látek na transkripční aktivitu AhR v přítomnosti FICZ. Antagonistický mód 2.

Graf 9: Vliv testovaných látek na transkripční aktivitu AhR v přítomnosti TCDD. Antagonistický mód.

Graf 10: Vliv testovaných látek na transkripční aktivitu AhR v přítomnosti TCDD. Antagonistický mód 2.

Seznam tabulek

Tab.1: Příprava zásobních roztoků testovaných látek o koncentraci $100 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Tab. 2: Příprava zásobních roztoků o koncentracích 1, 10 a $50 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ředěním.

1 Úvod

Esenciální oleje jsou koncentrované hydrofobní kapaliny rostlinného původu, jejichž hlavní funkcí je ochrana proti patogenům, býložravcům a lákání opylovačů. Esenciální oleje jsou mnohasložkové směsi, které disponují rozmanitými biologickými aktivitami, díky kterým našly široké využití v kulinářství, zemědělství, kosmetickém a potravinářském průmyslu i medicíně. Tradice využití aromatických rostlin a jejich olejů sahá až ke starověkým civilizacím. V průběhu času byla vyvinuta celá řada extrakčních metod, mezi které patří např. destilace, extrakce nebo moderní metody využívající mikrovlny. V dnešní době je v gastronomii hojně využíváno bylinek a koření, které obsahují esenciální oleje, což ale vede k zvýšenému příjmu těchto olejů v potravě.

Na metabolisme lipofilních cizorodých látek v tělech organismů se z velké části podílí biotransformační procesy. Proces biotransformace je rozdělen do tří fází, v jejichž průběhu dochází, za účasti široké škály enzymů, k přeměně xenobiotik na hydrofilnější, snadněji vylučitelné produkty. Jedním z nejvýznamnějších mechanismů regulace biotransformačních enzymů je transkripční regulace prostřednictvím jaderných receptorů. Jaderné receptory jsou ligandy aktivované transkripční faktory, mezi které patří i aryluhlovodíkový receptor (AhR). AhR se po interakci s příslušným ligandem váže do specifických oblastí DNA a spouští transkripci genů kódující některé biotransformační enzymy (CYP1A1, CYP1A2 a další). Mimo to je AhR zapojen do řady dalších biologických procesů včetně regulace buněčného cyklu, imunitní odpovědi, apoptózy a dalších.

Je známo, že některé z esenciálních olejů, obsažených v bylinách a koření, jsou schopny ovlivňovat transkripční aktivitu AhR a tudíž by mohly způsobovat nežádoucí změny AhR-dependentních fyziologických procesů nebo naopak najít využití při selektivní modulaci aktivity AhR. Jelikož esenciální oleje jsou mnohasložkové směsi, je důležité identifikovat, které komponenty jsou zodpovědné za interakci s tímto receptorem.

2 Cíl práce

Cílem bakalářské práce bylo zjistit vliv vybraných komponentů esenciálních olejů na transkripční aktivitu AhR. Pro dosažení výsledků bylo nutné pomocí MTT testu stanovit, zda vybrané komponenty esenciální olejů nepůsobí ve zvolených koncentracích toxicky na buněčnou linii AZ-AhR a pomocí metody Reporter Gene Assay sledovat, zda testované látky mají vliv na transkripční aktivitu aryluhlovodíkového receptoru.

3 Biotransformace

Lidský organismus je otevřeným systémem, který ze svého okolí přijímá širokou škálu chemických látek. Mnoho z těchto látek je v těle využíváno pro výstavbu endogenních sloučenin nebo jako zdroj energie. Vedle toho je lidský organismus vystavován i cizorodým látkám tzv. xenobiotikům (Skálová *et al.*, 2011; Knejzlík *et al.*, 2000).

Xenobiotika mohou být látky jak přírodního, tak syntetického původu, které se v těle normálně nevyskytují a nejsou potřebné pro jeho zdravý vývoj, ani využitelné jako zdroje energie. Mezi xenobiotika se řadí léčiva, drogy, látky znečišťující životní prostředí, potravinářské přídatné látky a mnoho dalších.

U většiny eukaryotických organismů včetně člověka došlo v průběhu evoluce k vývoji detoxifikačního mechanismu umožňujícího eliminaci xenobiotik (Vrzal *et al.*, 2004). Bez schopnosti metabolického rozkladu těchto cizorodých látek by docházelo k jejich akumulaci, což by mohlo vést k ireverzibilnímu poškození organismu až jeho smrti (Croom, 2012).

Metabolismus xenobiotik se sestává z transportních procesů a biotransformačních reakcí, probíhajících za účasti velkého množství enzymů. Většina těchto cizorodých látek má lipofilní charakter a v průběhu biotransformace dochází k jejich strukturním přeměnám, vedoucím ke vzniku hydrofilních metabolitů, které jsou snadněji vylučitelné (Skálová *et al.*, 2011; Vrzal *et al.*, 2004). U člověka probíhá tento metabolický proces především v játrech, vzniklé metabolity se z hepatocytů dostávají do krve nebo žluči a následně jsou v moči, stolici, případně potu vylučovány z těla (Sevior *et al.*, 2012; Knejzlík *et al.*, 2000).

Proces biotransformace se formálně dělí do tří fází. Za účasti hydrolytických, oxidačních a redukčních enzymů dochází v první fázi ke vnesení či odkrytí funkční skupiny ve struktuře xenobiotik. Tyto funkční skupiny jsou schopny reagovat s enzymy druhé fáze biotransformace, což umožňuje konjugaci přeměňovaného xenobiotika s malou polární endogenní molekulou, za vzniku hydrofilního produktu. Transport vzniklých metabolitů z buněk přes membránu bývá označován jako třetí fáze biotransformace (Dostálek *et al.*, 2006; Skálová. *et al.*, 2011).

3.1 I. fáze biotransformace

V I. fázi biotransformace probíhá modifikace xenobiotik zavedením nebo odkrytím polární funkční skupiny ($-OH$, $-NH_2$, $-SH$, $-C=O$ a $-COOH$). V jejím průběhu dochází ke vzniku polárnějších produktů oxidací (aromatická a alifatická hydroxylace, epoxidace, dealkylace, N-hydroxylace, deaminace), redukcí (redukce dehalogenací, redukcí azo- a nitro-sloučenin) nebo hydrolytickými reakcemi (Vrzal *et al.*, 2004; Dostálek *et al.*,

2006). Produkty těchto reakcí jsou následně schopny konjugovat s aminy, kyselinami a alkoholy v II. fázi biotransformace (Knejzlík *et al.*, 2000). Xenobiotika, která již v základní molekule obsahují některou ze zmíněných reaktivních skupin, mohou v nezměněné formě rovnou vstupovat do II. fáze biotransformace (Dostálek *et al.*, 2006).

Mezi nejdůležitější enzymy účastníci se I. fáze biotransformace patří enzymatický systém cytochromu P450. Z chemického hlediska se jedná o hemoproteiny, které obsahují ve svých molekulách nekovalentně vázaný protoporfyrin IX. Redukované formy těchto hemoproteinů jsou při navázání CO schopny absorbovat elektromagnetické vlnění o vlnové délce 450 nm, z čehož vychází číselné označení v názvu tohoto cytochromu (Knejzlík *et al.*, 2000; Skálová *et al.*, 2011).

Systém cytochromu P450 zahrnuje velkou skupinu enzymů, jejichž společným znakem je výskyt thiolátového aniontu (pocházejícího z cysteinu) jako pátého ligandu na přítomném hemu. Jednotlivé enzymy tohoto systému se vzájemně liší svými apoproteiny, což se odráží v různé substrátové specifitě jednotlivých forem (Dostálek *et al.*, 2006).

V lidském genomu bylo dosud charakterizováno 57 genů kódujících CYP, tyto geny jsou dále rozděleny do 18 rodin a 45 podrodin (Sevior *et al.*, 2012). Enzymy nadrodiny CYP jsou do rodin, podrodin a na jednotlivé izoformy rozděleny na základě stupně homologie v aminokyselinových sekvencích apoproteinů. Enzymy patřící do jedné rodiny jsou shodné alespoň v 40 % aminokyselinových sekvencí. V případě, že podobnost v sekvencích těchto proteinů je vyšší než 60–70 % spadají tyto enzymy do jedné podrodiny (Skálová *et al.*, 2011; Hodgson, 2004).

Enzymy cytochromu P450 jsou schopny katalyzovat přeměnu až 200 000 různých substrátů (Lewis *et al.*, 1998). Kromě exogenních látek (léčiv, potravinových aditiv a dalších xenobiotik) patří mezi substráty i některé endogenní látky (steroidy, mastné kyseliny, prostaglandiny) (Dostálek *et al.*, 2006).

Ačkoliv je u člověka známo 18 rodin CYP, pouze tři z nich se primárně podílejí na metabolismu xenobiotik (CYP1, CYP2 a CYP3), přičemž pouze šest základních forem cytochromu P450 (CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 a CYP3A4) se podílí na biotransformaci asi 98 % všech xenobiotik (Hodgson, 2004; Dostálek *et al.*, 2006). Mezi enzymy účastníci se přeměny xenobiotik bývají někdy řazeny i členové rodiny CYP4, které se účastní metabolismu komponent plastických hmot, herbicidů a některých rozpouštědel (Dostálek *et al.*, 2006; Gonzalez, 1998). Zbývající CYP rodiny se podílejí převážně na biosyntéze steroidních hormonů a při zpracovávání dalších endogenních substrátů (Dostálek *et al.*, 2006).

Enzymy patřící do tohoto systému byly identifikovány ve všech studovaných prokaryotických i eukaryotických organismech (Skálová *et al.*, 2011). V lidském těle jsou tyto enzymy exprimovány ve většině tkání a specializovaných buněk, ale jejich nejvyšší hladina se vyskytuje v játrech. Uvnitř eukaryotních buněk se tyto enzymy nacházejí vázané na cytosolické straně hladkého endoplazmatického retikula, v menší míře potom i v membráně mitochondrií (Skálová *et al.*, 2011; Vrzal *et al.*, 2004).

Cytochrom P450 vykazuje monooxygenasovou aktivitu a z enzymologického hlediska můžeme tuto skupinu enzymů řadit mezi NADPH–O₂ dependentní monooxygenasy, patřící pod oxidoreduktasy. Monooxygenace je oxidační reakce, při které je jeden z atomů molekuly kyslíku inkorporován do struktury substrátu a druhý je redukován za vzniku molekuly vody. Donorem dvou elektronů, využitých k redukci cytochromu P450, je nikotinamidadenin dinukleotid fosfát (NADPH). Při reakci substrátu s cytochromem P450 vznikají: monooxygenovaný produkt, molekula vody a NADP⁺ (Hodgson, 2004; Dostálek *et al.*, 2006).

Kromě cytochromu P450 se biotransformačních reakcí I. fáze účastní i řada dalších enzymů, například flavinové monooxygenasy, monoaminoxidasy, alkoholdehydrogenasy, aldehyddehydrogenasy a další (Knejzlík *et al.*, 2000; Vrzal *et al.*, 2004).

3.2 II. fáze biotransformace

Druhá fáze biotransformace bývá označována jako konjugační nebo také syntetická. Tato fáze zahrnuje syntetické metabolické reakce, při kterých dochází k interakci tzv. konjugačního činidla s funkční skupinou produktu I. fáze biotransformace nebo xenobiotika, které takovouto skupinu již obsahuje ve své základní struktuře (Knejzlík *et al.*, 2000; Dostálek *et al.*, 2006). Vznikající konjugační produkty jsou až na pár výjimek, polárnější, méně toxické a snadněji vylučitelné než vstupující meziproduct.

Již zmiňovaná konjugační činidla jsou endogenní látky zahrnující cukry, aminokyseliny, glutathion, sulfát a další (Hodgson, 2004). Mezi nejčastěji se vyskytující konjugační činidla patří glycin, glutamin, kyselina glukuronová, kyselina octová a kyselina sírová (Dostálek *et al.*, 2006). Většina enzymů účastnících se II. fáze biotransformace se řadí mezi transferasy a konkrétně se jedná o UDP-glukuronosyltransferasy (UGTs), sulfotransferasy (SULTs), N-acetyltransferasy (NATs), glutathion-S-transferasy (GSTs) a různé methyltransferasy (Jancova *et al.*, 2010).

Konjugační reakce většinou vyžadují metabolickou aktivaci prostřednictvím meziproductu o vysoké energii. Podle toho, který z reaktantů je aktivován, můžeme tyto reakce

rozdělit na dva typy. Do I. typu zahrnujeme reakce aktivovaných konjugačních činidel se substráty. Mezi reakce tohoto typu patří konjugace se sacharidy, sulfatace, methylace, acetylace a další. Reakce, při kterých dochází ke vzniku konjugovaného produktu interakcí aktivovaného substrátu s konjugačním činidlem, spadají pod reakce II. typu. Do této skupiny můžeme zahrnout konjugace s aminokyselinami a glutathionem (Hodgson, 2004; Knejzlík *et al.*, 2000).

3.3 III. fáze biotransformace

Dříve byl proces biotransformace formálně dělen pouze na dvě fáze. Dnes se ale hovoří i o III. fázi, která představuje transport biotransformačních produktů ven z buněk (Vrzal *et al.*, 2004). Přenos látek přes lipidovou dvojvrstvu je zprostředkováván přenašeči umístěnými v membránách. Většina těchto transportérů přenáší převážně endogenní látky, avšak existují i transportní proteiny přesouvající převážně xenobiotika, tyto přenašeče jsou označovány jako tzv. lékové transportéry (Skálová *et al.*, 2011). Odvod produktů II. fáze biotransformace z buněk je ochranným mechanismem, bránícím zvyšování intercelulárních koncentrací těchto toxických látek (Sevior *et al.*, 2012; Knejzlík *et al.*, 2000).

Nejnámějším transportérem účastnícím se III. fáze biotransformace je P-glykoprotein (Vrzal *et al.*, 2004; Skálová *et al.*, 2011). Jedná se o ABC transportér (ATP-binding cassette transporters) patřící do skupiny MDR pump (multidrug resistance pumps). ABC transportéry jsou efluxní transportéry, které hydrolyzou ATP získávají energii, která je následně využita pro přenos xenobiotik přes membrány (Lin *et al.*, 2015; Mollazadeh *et al.*, 2018). Za fyziologických podmínek se P-glykoprotein účastní vylučování lipofilních látek z buněk, zatímco v nádorových buňkách je nadměrně exprimován a zapříčiňuje transport protinádorových léčiv z buněk zpět do extracelulárních prostor (Mollazadeh *et al.*, 2018). Tento transportér byl poprvé identifikován v roce 1976 v membránách nádorových buněk, kde způsoboval rezistenci vůči řadě cytotoxických léčiv (Köhle *et Bock*, 2009; Skálová *et al.*, 2011).

Dalšími lékovými přenašeči patřícími do rodiny ABC transportérů jsou MRP2 a BCRP, které se účastní eliminace hydrofilních konjugátů lipofilních látek (Skálová *et al.*, 2011).

Vedle ABC transportérů se III. fáze biotransformace účastní i někteří ze zástupců rodiny přenašečů hydrofilních látek zkráceně SLC (solute carrier transporters). Do této rodiny patří transportní peptidy organických aniontů (OATP), transportéry organických aniontů (OAT), transportéry organických kationtů (OCT) a další (Skálová *et al.*, 2011). Transportní peptidy organických aniontů přenáší amfipatické organické látky a mimo jiné se podílejí na vylučování konjugátů s kyselinou glukurovou, sulfátem a glutathionem z buněk (Vrzal *et al.*, 2004).

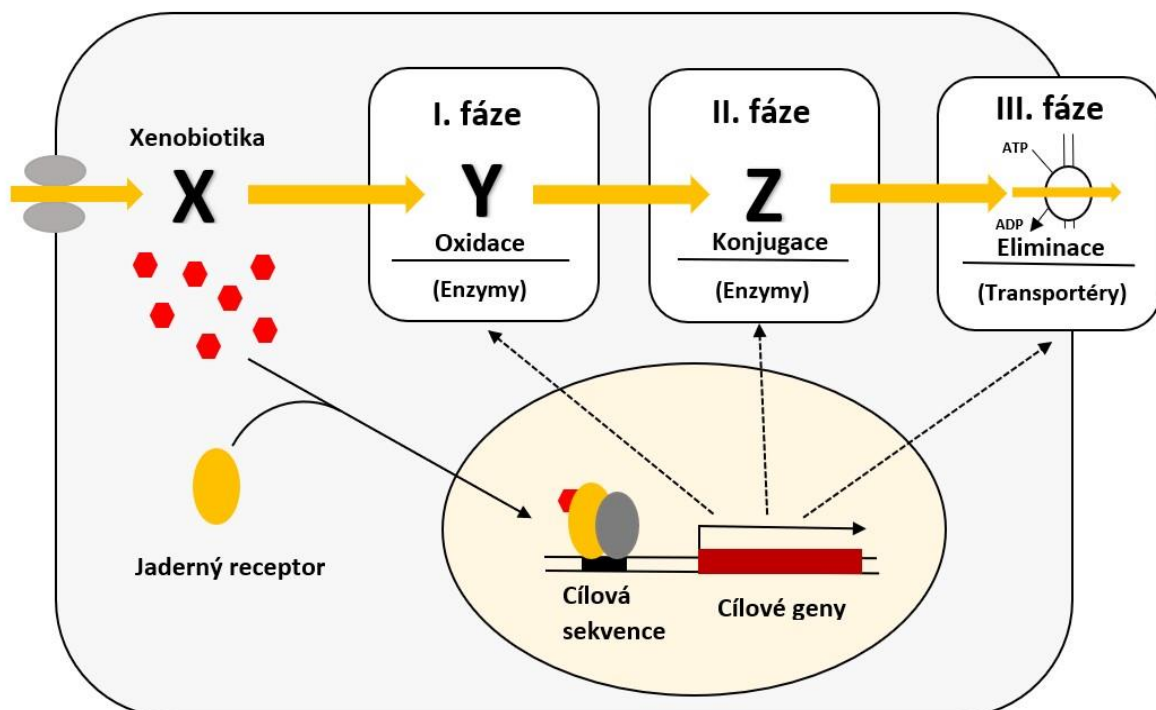
4 Jaderné receptory jako regulátory enzymů metabolizujících xenobiotika

V odpovědi na působení cizorodých látek na organismus může docházet ke zvýšení aktivity specifických enzymů neboli k jejich indukci. Indukce těchto biotransformačních enzymů může být spojena se zvýšenou expresí příslušných genů, stabilizací mRNA nebo sníženou degradací těchto enzymů. Nejvýznamnějším mechanismem, regulujícím enzymy metabolizující xenobiotika, je transkripční regulace prostřednictvím jaderných receptorů (Obr.1) (Skálová *et al.*, 2011).

Jaderné receptory jsou ligandy aktivované transkripční faktory regulující expresi genů, které se účastní široké škály fyziologických dějů, mezi které patří embryonální vývoj, udržení homeostázy, buněčná smrt a další (Nakata *et al.*, 2006; Escriva *et al.*, 2004). V cytoplasmě dochází k aktivaci jaderného receptoru vazbou s ligandem následované translokací vzniklého komplexu do jádra. Po vazbě komplexu do specifických oblastí DNA dochází ke spuštění transkripce příslušných genů (Vrzal *et al.*, 2004; Urquhart *et al.*, 2007).

Mezi jaderné receptory účastnící se regulace enzymů metabolizujících xenobiotika patří aryluhlovodíkový receptor (AhR), pregnanový X receptor (PXR), konstitutivní androstanový receptor (CAR), receptory pro kyselinu cis- a trans-retinovou (RXR a RAR), receptor pro vitamín D (VDR), farnesoidní X receptor (FXR) a další (Nakata *et al.*, 2006; Vrzal *et al.*, 2004).

Pro potřeby této bakalářské práce bude největší pozornost věnována AhR.



Obr. 1: Schéma regulace biotransformace (Nakresleno podle Nakata *et al.*, 2006).

4.1 Aryluhlovodíkový receptor

Aryluhlovodíkový receptor (AhR), jinými názvy také dioxinový receptor nebo receptor pro polyaromatické uhlovodíky, je ligand-dependentní transkripční faktor, který se zapojuje do regulace exprese široké škály genů (Denison *et al.*, 2003; Kewley *et al.*, 2004; Skálová *et al.*, 2011). Kromě toho, že se AhR podílí na metabolizaci xenobiotik, účastní se také regulace mnoha buněčných a biologických procesů včetně proliferace a diferenciací buněk, regulace buněčného cyklu, reparace DNA, imunitní odpovědi, apoptózy a dalších (Denison *et al.*, 2003; Skálová *et al.*, 2011).

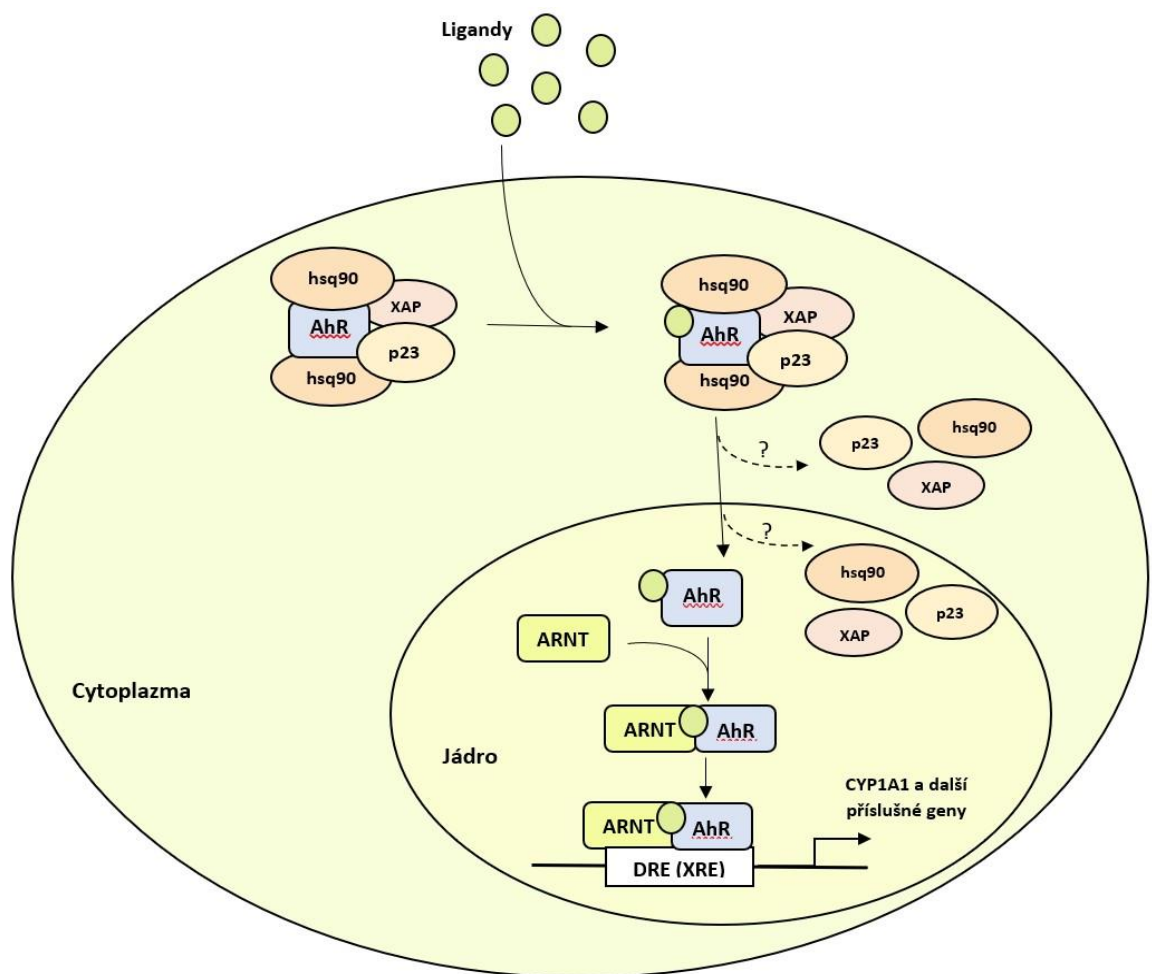
Existence AhR byla předpokládána již v 60. letech 20. století, ale až v roce 1976 se Alanu Polandovi a jeho kolegům podařilo tento receptor, za využití radioaktivně značeného TCDD, identifikovat (Poland *et al.*, 1976; Skálová *et al.*, 2011).

Lidský gen pro AhR je lokalizován na chromozomu 7 a kóduje protein o velikosti 848 aminokyselin (Vrzal *et al.*, 2004). AhR patří do bHLH/PAS (basic-helix-loop-helix/Per-ARNT-Sim) genové rodiny, kam spadají i příbuzné proteiny: AhR jaderný translokátor (ARNT) a AhR represor (AhRR), které se také účastní regulace genové exprese (Hahn, 2002; Nakata *et al.*, 2006; Vrzal *et al.*, 2004). Strukturně se AhR skládá ze tří hlavních domén: bHLH doména, PAS doména (A a B) a v C'-terminální části se nacházející transaktivační doména (TAD). Nejbližší k N'-koncové části proteinu se nachází bHLH doména, složená ze dvou α -šroubovic, které jsou od sebe odděleny nespíralovitou smyčkou. Tato doména zprostředkovává tvorbu dimeru a také zabezpečuje vazbu na specifické sekvence DNA (Yi *et al.*, 2018; Vrzal *et al.*, 2004). Domény PAS A a PAS B se účastní interakce s ligandy, ARNT, Hsp90 a dalšími proteiny. Transaktivační doména, typicky obsahující mnoho glutaminových zbytků, funguje jako mediátor při transkripční aktivaci cílových genů (Yi *et al.*, 2018; Skálová *et al.*, 2011).

V neaktivní formě se AhR nachází v cytosolu jako součást multiproteinového komplexu, složeného mimo AhR ještě ze dvou molekul chaperonového proteinu Hsp90 (heat shock protein 90) a proteinů XAP2 a p23 (Denison *et al.*, 2003; Skálová *et al.*, 2011). Předpokládá se, že po vazbě ligandu nastává konformační změna AhR, při které dochází k odkrytí jaderné lokalizační sekvence, což vede k translokaci komplexu do jádra. V jádře dochází k okamžité interakci komplexu ligand-AhR s ARNT za vzniku heterodimeru, který je schopný se následně vázat do specifických promotorových oblastí, obsahující specifickou sekvenci 5'-GCGTG-3'. Tyto oblasti jsou označovány jako DRE (dioxin response elements) a XRE (xenobiotic response elements). Vazbou dimeru do těchto cílových oblastí dochází

k iniciaci transkripce příslušných genů (Obr. 2) (Yi *et al.*, 2018; Denison *et Nagy*, 2003; Vrzal *et al.*, 2004; Skálová *et al.*, 2011).

Aktivace AhR indukuje syntézu biotransformačních monooxygenas cytochromu P450 (CYP1A1, CYP1A2 a CYP1B1) a také některých konjugačních enzymů jako například glutathion S-transferas, UDP-glucuronosyltransferas, NADPH-chinon oxidoreduktas a dalších (Nakata *et al.* 2006 Janošek; *et al.*, 2006). Nicméně enzymy rodiny CYP hrají klíčovou roli nejen při detoxikaci xenobiotik, ale svým působením mohou jejich toxicitu a mutagenní potenciál i naopak zvyšovat, jedná se o tzv. metabolickou aktivaci (Janošek *et al.*, 2006; Skálová *et al.*, 2011; Nakata *et al.*, 2006).



Obr. 2: Schéma signální dráhy aryluhlovodíkového receptoru (Nakresleno podle Kewley *et al.*, 2004; Denison *et Nagy*, 2003).

Kromě genů účastnících se biotransformace iniciuje AhR také expresi genu pro represor aryluhlovodíkového receptoru. AhRR je protein, který vykazuje vysokou sekvenční podobnost s AhR. Tento represor potlačuje transkripční aktivitu AhR tím, že se kompetitivně váže s ARNT, za vzniku komplexu, který interaguje s DRE a XRE oblastmi bez zpuštění exprese příslušných genů. Tento mechanismus umožňuje regulaci AhR pomocí negativní zpětné vazby a tím chrání organismus před důsledky nadměrné transkripční stimulace silnými agonisty AhR (Nguyen *et Bradfield*, 2008; Vrzal *et al.*, 2004; Nakata *et al.*, 2006).

Dříve byl AhR považován za sirotčí receptor, ale dnes už je známa široká škála exogenních i endogenních ligandů (Vrzal *et al.*, 2004; Yi *et al.*, 2018). Mezi endogenní ligandy patří deriváty kyseliny arachidonové, bilirubin, metabolity hemu, eikosanoidy, deriváty tryptofanu, equilenin a další látky (Yi *et al.*, 2018; Skálová *et al.*, 2011).

I některé fotooxidační produkty tryptofanu (např. 6-formylindolo[3,2-b]carbazol (FICZ) a 6,12-diformylindolo[3,2-b]carbazol (dFICZ)), vznikající v důsledku působení UV záření, vykazují vysokou afinitu k AhR a jsou schopny tento receptor aktivovat a tím spouštět AhR-dependentní genovou expresi (Denison *et Nagy*, 2003; Nguyen *et Bradfield*, 2008).

Exogenní ligandy zahrnují látky jak syntetického, tak přírodního původu. Většina ligandů AhR, které vznikají v důsledku antropogenní činnosti, patří mezi polycyklické aromatické uhlovodíky (PAHs) (např. 3-metylcholanthren, benzo[a]pyren, dibenzofurany a benzantracen) a halogenové deriváty aromatických uhlovodíků (HAHs) (např. dioxiny, polyhalogenované dibenzofurany a bifenyly). Mezi dioxiny se řadí i 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD), který je ligandem AhR s největší potencí ze všech HAHs a často je považován za modelový exogenní ligand AhR (Denison *et Nagy*, 2003; Skálová *et al.*, 2011). Většina klasických exogenních ligandů AhR vykazuje společné strukturní znaky: jedná se o hydrofobní, planární polycyklické molekuly (Vrzal *et al.*, 2004).

Přirozeně se v přírodě vyskytující aktivátory AhR patří nejčastěji mezi sekundárními metabolity rostlin (flavonoidy, karotenoidy a fenolické látky). Tyto látky se do těl organismů dostávají převážně v potravě a vyskytují se v různých druzích zeleniny (např. indol-3-karbinol obsažený v brokolici a růžičkové kapustě), ovoci, bylinkách a čaji. V tomto případě se ale často jedná spíše o nízkoafinitní ligandy AhR (Denison *et Nagy*, 2003; Nguyen *et Bradfield*, 2008; Vrzal *et al.*, 2004).

5 Receptorová teorie

Receptory tvoří klíčovou část systému chemické komunikace, kterou všechny mnohobuněčné organismy využívají pro koordinaci činnosti svých buněk a orgánů (Rang *et al.*, 2015). Přijetí signálu buňkou probíhá prostřednictvím receptoru, který rozpoznává a váže příslušnou signální molekulu, což může vést k aktivaci jedné nebo více intercelulárních signálních drah. Na konci signálních drah se nachází efektorový systém, který reaguje na přichodzí signál odpovídající změnou v chování buňky (Alberts *et al.*, 2015).

Touha farmakologů objasnit odlišné účinky léčiv na různé tkáně vedla k vývoji klasické receptorové teorie (Pallotta, 1991; Stephenson, 1956). Za otce této teorie jsou považováni fyziolog John Newport Langley a imunolog a bakteriolog Paul Ehrlich, kteří nezávisle na sobě přišli s receptorovým konceptem, který popisuje vztah mezi léčivem, receptory a buněčnou odpovědí (Prüll *et al.*, 2009). O kvantifikaci tohoto konceptu se zasloužil Alfred Joseph Clark, který ve své práci uvádí, že buněčná odpověď je přímo úměrná obsazenosti receptoru (Stephenson, 1956).

Dnes už je známo, že obsazení receptoru ligandem může nebo nemusí vést k aktivaci receptoru. Tendence určitého ligandu vázat se na receptor je dána afinitou ligandu k receptoru, zatímco tendence ligandu po navázání tento receptor aktivovat se označuje jako účinnost (angl. efficiency) nebo také vnitřní aktivita (intrinsic activity) (Rang *et al.*, 2015; Ehlert, 2015).

Poměrně jednoduchým přístupem, který umožňuje vysvětlit, proč se agonisté i antagonisté vážou na receptory, ale pouze agonisté je jsou schopni aktivovat, je tzv. dvoustavový model. Na rozdíl od předcházejících receptorových teorií jsou zde vazba ligandu na receptor a aktivace receptoru považovány za dva na sebe navazující, ale samostatné děje, a kromě afinity tu je zařazena účinnost jako další parametr (Leff, 1995; Buchwald, 2017; Tripathi, 2013).

Dvoustavový model je založen na předpokladu, že receptor se může nacházet ve dvou konformačních stavech: klidovém R (resting) a aktivovaném R* (activated), které mohou z jednoho na druhý přecházet. Tyto dva stavy receptorů se nacházejí ve vzájemné rovnováze a pokud není v systému přítomný ligand, rovnováha je silně posunuta směrem ke klidovému stavu (Leff, 1995; Rang *et al.*, 2015; Tripathi, 2013). V rámci tohoto modelu můžeme výše zmíněnou účinnost prezentovat jako podíl obsazených aktivovaných receptorů a všech obsazených receptorů. Čím má ligand vyšší účinnost, tím více preferuje vazbu na aktivovanou formu receptoru (Ehlert, 2015). Ligandy můžeme dělit do několika skupin:

Agonisté (full agonists) vykazují silnou preferenci vazby na receptory v aktivovaném stavu, rovnováha se přesouvá směrem k R^* , až se postupně skoro všechny receptory nacházejí v aktivovaný konformační stavu. Vazba agonistů na receptor vyvolává maximální odpověď.

Parciální agonisté také vykazují preferenci vazby na aktivovaný konformační stav, ale nižší než agonisté. Rovnováha je jen mírně posunuta k R^* , což vede ke zvýšení jejich počtu v systému. Parciální agonisté se váží na obě formy receptorů a vznikající buněčná odpověď není maximální.

Pokud se ligandy vážou se stejnou afinitou na klidový i aktivovaný stav, jedná se o **antagonisty** daného receptoru. V tomto případě zůstává rovnováha mezi těmito stavy zachována. Jelikož při této rovnováze se většina receptoru nachází v klidové formě, většina ligandů se váže právě na R stav, což nevede k vyvolání buněčné odpovědi.

Vyšší afinitu ke klidové konformaci receptorů mají **inverzní antagonisté**, kteří svým působením posouvají rovnováhu ještě více na stranu R (Leff, 1995; Rang *et al.*, 2015; Tripathi, 2013).

Problémem dvoustavového modelu je dnes už dobře známý fakt, že receptory mají mnohem větší konformační flexibilitu a jsou schopny nabývat více než jeden ze dvou stavů. Různé konformační stavy mohou být preferovaně stabilizovány různými ligandy a v závislosti na tom může docházet ke spouštění různých transdukčních signálních drah a následně také k vyvolání odlišných buněčných odpovědí (Rang *et al.*, 2015; Tripathi, 2013).

6 Esenciální oleje

Rostliny jsou schopny syntetizovat dva typy olejů. Prvním typem jsou rostlinné oleje skládající se z esterů glycerolu a mastných kyselin (triacylglyceroly). Esenciální oleje jsou druhým typem rostlinných olejů a jedná se o směsi těkavých, organických sloučenin, které přispívají k chuti a vůni rostliny (Tisserand *et* Young, 2013).

Esenciální oleje obsahují sekundární metabolity rostlin a hrají důležitou roli v rostlinné obraně: mohou působit antibakteriálně, antivirovicky, antimykoticky a odpuzovat hmyz a býložravce. Nicméně tyto aromatické látky dokážou i naopak lákat hmyz, který se podílí na roznášení pylu a semen (Bakkali *et al.*, 2008). Díky svým vlastnostem jsou esenciální oleje a jejich složky využívány v zemědělství (pesticidy), při výrobě parfémů, kosmetiky, hygienických potřeb, čistících prostředků, v přírodním lékařství a v kulinářství jako dochucovadla a konzervanty. Mnohé z těchto éterických látek vykazují biologickou aktivitu i v tělech živočichů a představují nedostatečně prozkoumaný a do značné míry nevyužitý zdroj látek pro vývoj léčiv (Li *et al.*, 2013; Bakkali *et al.*, 2008).

Éterické oleje jsou produkovány tzv. aromatickými rostlinami, mezi které můžeme zařadit zástupce z mnoha rostlinných čeledí (např. miříkovité, hvězdnicovité, hluchavkovité a další). Esenciální oleje mohou být syntetizovány v různých rostlinných částech a orgánech, například v květech (růže), listech (máta), semenech (fenykl), plodech (citrón), dřevě (cedr) a kůře (skořice) (Tisserand *et* Young, 2013; Moghaddam *et* Mehdizadeh, 2017). Vzniklé látky jsou ukládány v sekrečních a epiteliálních buňkách, dutinách, kanálcích a žláznatých trichomech (Bakkali *et al.*, 2008).

Esenciální oleje jsou za normálních podmínek, až na několik výjimek, bezbarvé nebo slabě zbarvené průhledné kapaliny. Jedná se převážně o hydrofobní látky, které jsou rozpustné v tucích, alkoholech a většině organických rozpouštědel (Bakkali *et al.*, 2008; Tisserand *et* Young, 2013; Moghaddam *et* Mehdizadeh, 2017).

Tyto oleje jsou velice komplexní přírodní směsi, které se nejčastěji skládají z 20-60 chemických individuí o různých koncentracích. Většinou jsou charakterizovány dvěma nebo třemi hlavními složkami o vyšší koncentraci (20-70 %) a množstvím dalších komponentů v mnohem nižším zastoupení (Bakkali *et al.*, 2008). Jednotlivé oleje se liší ve svých vůních, chutích a vlastnostech, což je způsobeno právě přítomností různých složek a jejich rozdílným zastoupením (Tongnuanchan *et* Benjakul, 2014). Koncentrace jednotlivých komponent, ze kterých se esenciální olej skládá, je závislá na řadě vnitřních a vnějších faktorů. Mezi tyto faktory spadají genetické predispozice, stáří rostliny, fáze růstu, fyziologie rostliny, ale i externí faktory jako místo růstu, počasí, složení půdy, hnojení a další (Tisserand *et* Young, 2013;

Moghaddam *et* Mehdizadeh, 2017). Dokonce i rostliny patřící do jednoho druhu, rostoucí ve stejných podmínkách, mohou produkovat esenciální oleje lišící se svými hlavními složkami, a tedy také ve svých vlastnostech. Podle složení esenciálních olejů můžeme rostliny v rámci jednoho druhu rozdělit na tzv. chemotypy (Tisserand *et* Young, 2013).

Hlavní skupiny látek, ze kterých se esenciální oleje skládají zahrnují terpeny, terpenoidy a některé další aromatické i alifatické látky, které jsou všechny charakterizované poměrně nízkou molekulovou hmotností (Bakkali *et al.*, 2008). Terpeny a terpenoidy jsou definovány jako látky složené z izoprenových jednotek (2-methyl-1,3-butadien). Tato skupina látek zahrnuje cyklické i lineární struktury s různým stupněm nasycení a různými substituenty. Esenciální oleje v největší míře obsahují monoterpeny (C₁₀) a seskviterpeny (C₁₅), v nižších koncentracích se tam vyskytují i hemiterpeny (C₅), diterpeny (C₂₀), triterpeny (C₃₀) a tetraterpeny (C₄₀). Méně často, než terpeny se pak v esenciálních olejích nacházejí aromatické deriváty fenylypropanu (Bakkali *et al.*, 2008; Tongnuanchan *et* Benjakul, 2014; Moghaddam *et* Mehdizadeh, 2017). Většina hlavních složek vzniká v rámci jedné ze tří biosyntetických drah. Mevalonátová cesta vede ke vzniku seskviterpenů, metylerythritol fosfátovou dráhou se tvoří mono- a diterpeny a fenylypropanoidy jsou tvořeny v dráze kyseliny šikimové (Başer *et* Buchbauer, 2010).

Aromatické rostliny a jejich oleje jsou už po tisíce let používány jako kadidla, parfémy, kosmetika, ale také v lékařství a kulinářství. Umění extrakce a použití široké škály aromatických látek, získávaných z přírodních zdrojů, se v průběhu času vyvíjelo a zdokonalovalo, přičemž jeho počátek sahá až k nejstarším civilizacím. Starověkou tradici využití aromatických rostlin při péči o zdraví mají Čína i Indie, ovšem největší slávu v souvislosti s využitím aromatických rostlin zaznamenal Egypt (Lawless, 2002; Guenther, 1948).

První autentický popis zisku esenciálních olejů destilací je připisován katalánskému fyzikovi Arnaldu de Villanova, který představil umění destilace Evropě (Guenther, 1948; Lawless, 2002). Destilace se stala nejvíce rozšířenou metodou extrakce esenciálních olejů. Hydrodestilace umožňuje, za využití vařící vody, získat ve vodě nerozpustné přírodní produkty s vysokým bodem varu. Modernějším přístupem je destilace s vodní parou, což je šetnější metoda s poměrně vysokou výtěžností. (Tongnuanchan *et* Benjakul, 2014; Tisserand *et* Young, 2013). Přestože je destilace vodní parou nejčastěji používanou metodou extrakce, má tato technika řadu nevýhod, mezi které můžeme zařadit např. chemické modifikace olejů způsobené vysokými teplotami a ztráty silně těkavých a ve vodě rozpustných složek (Moghaddam *et* Mehdizadeh, 2017).

Další metodou je extrakce pomocí rozpouštědla, která je vhodná pro rostlinné materiály, které nejsou tolerantní k vysokým teplotám (květy). Nevýhodou této metody může být kontaminace výsledného oleje zbylým rozpouštědlem (Tongnuanchan *et* Benjakul, 2014). Pro řešení problémů extrakce rozpouštědlem bylo navrženo použití superkritických kapalin jako alternativního media pro extrakci. Oxid uhličitý se v prostředí vysokého tlaku mění na kapalinu, která může být využita jako inertní medium pro získání aromatických látek i z rostlinných materiálů, které jsou vysokými teplotami poškozovány. Výhodou je také, že výsledný produkt není znečištěn CO₂, protože ten se při normálním atmosférickém tlaku a teplotě vrací do plynného skupenství a odpařuje se. Ovšem poměrně nízká výtěžnost a vysoká spotřeba energie dělá z této metody ekonomicky nevýhodnou možnost (Tongnuanchan *et* Benjakul, 2014; Moghaddam *et* Mehdizadeh, 2017).

S řešením nevýhod konvenčních přístupů přišly metody využívající mikrovlnný ohřev jako např. mikrovlnná hydrodifúze a gravitace (microwave hydrodiffusion and gravity; MHG), mikrovlnná difúze parou (microwave steam diffusion; MSD). Jedná se o metody, které kombinují mikrovlnný ohřev a suchou destilaci, prováděnou za atmosférického tlaku a bez použití vody nebo jakéhokoliv rozpouštědla. Tyto metody nabízejí poměrně vysokou výtěžnost, vyšší rychlost, jednodušší manipulaci, nižší energetický vklad a představují tak ekonomicky a environmentálně šetrné přístupy (Farhat *et al.*, 2010; Tongnuanchan *et* Benjakul, 2014).

Produkty extrakce se můžou v závislosti na zvolené metodě lišit v jejich kvalitě, kvantitě, čistotě a složení. Extrakční metoda musí být vhodně zvolena podle účelu, pro který má být esenciální olej použit (Bakkali *et al.*, 2008; Moghaddam *et* Mehdizadeh, 2017).

Některé z esenciálních olejů, pocházejících z kulinářských bylin a koření, ovlivňují transkripční aktivitu AhR a byli mezi nimi identifikováni agonisté, parciální agonisté i antagonisté tohoto receptoru. Protože esenciální oleje jsou vícesložkové směsi jejich účinek na AhR zahrnuje společné působení jednotlivých komponent. Větší porozumění interakcím mezi esenciálními oleji (jejich konkrétními složkami) a jadernými receptory by mohlo být předmětem zájmu o jejich vliv na střevní imunitu a další děje souvisejících s aktivací AhR. Mezi komponenty esenciálních olejů patří i deset vybraných složek popsanych níže (Obr. 3). Řada z těchto sloučenin jsou minoritní komponenty esenciálního oleje muškátového oříšku, který je parciálním agonistou AhR, ovšem žádná z jeho hlavních komponent aktivátorem AhR není (Bartoňková *et*. Dvořák, 2018).

V rámci této bakalářské práce byl testován vliv těchto vybraných látek na transkripční aktivitu aryluhlovodíkového receptoru.

(1S)-(+)-3-Caren

(1S)-(+)-3-Caren, systematickým názvem ((1S)-3,7,7-trimethylbicyklo[4.1.0]hept-3-en), je bicyklický monoterpen, který je jednou z hlavních esenciálních složek olejů z borovic (tzv. terpentýnů), kde tvoří důležitou složku obrany proti hmyzu (Başer *et* Buchbauer, 2010; Hall *et al.*, 2011). Jako součást těchto olejů bývá používán při léčbě infekcí horních dýchacích cest, ovšem ve větším množství může konkrétně 3-caren působit dráždivě (Tongnuanchan *et* Benjakul, 2014). Kromě toho je tato látka jednou z hlavních složek esenciálních olejů získávaných ze šalvěje, pepře a pupenů černého rybízu (Tongnuanchan *et* Benjakul, 2014).

Esenciální oleje muškátového oříšku existují ve dvou chemotypech, které se svým složením podstatně liší. V East Indian chemotypu je 3-Carene obsažen v 0,5-1,5 %, naopak v oleji West Indian chemotypu vůbec zastoupen není (Tongnuanchan *et* Benjakul, 2014).

Terpinolen

Terpinolen, celým chemickým názvem 4-isopropyliden-1-methylcyklohexen, je monocyklický monoterpen, který vykazuje antioxidační, antimykotickou, larvicidní a protinádorovou aktivitu (Aydin *et al.*, 2013; Tongnuanchan *et* Benjakul, 2014). V nejvyšší koncentraci se vyskytuje v esenciálním oleji pastináku (40,3-69,0 %), dále pak v olejích z listů kurkumy a také je jednou ze složek tea tree oleje (Başer *et* Buchbauer, 2010; Tongnuanchan *et* Benjakul, 2014). V rámci esenciálního oleje muškátového oříšku terpinolen tvoří 0,6–2,6 % v chemotypu East Indian a 1,4-1,7 % v oleji chemotypu West Indian (Tongnuanchan *et* Benjakul, 2014).

Terpinen-4-ol

Terpinen-4-ol je systematicky nazýván 4-methyl-1-(1-methylethyl)-3-cyklohexen-1-ol a jedná se o monocyklický monoterpenoid, který vykazuje *in vitro* protinádorovou aktivitu a protizánětlivý účinek, založený na inhibici produkce mediátorů zánětu jako například TNF- α , IL-1 β , IL-8 a dalších (Calcabrini *et al.*, 2004; Başer *et* Buchbauer, 2010). Tato látka je hlavní složkou tea tree oleje (30-48 %), který je získávaný z rostliny *Melaleuca alternifolia* a byl již domorodými Australany tradičně využíván na léčbu modřin a kožních infekcí (Calcabrini *et al.*, 2004; Tongnuanchan *et* Benjakul, 2014). Mimo to je terpinen-4-ol obsažen například v esenciálních olejích majoránky, bazalky a plodů jalovce. Obsah této látky v oleji z muškátového oříšku činí 1,0-10,9 % v chemotypu East Indian a 3,0-6,4 % v chemotypu West Indian (Tongnuanchan *et* Benjakul, 2014).

(+)-Aromadendren

(+)-Aromadendren, systematickým názvem (1aR,4aR,7R,7aR,7bS)-1,1,7-trimethyl-4-methyliden-2,3,4a,5,6,7,7a,7b-oktahydro-1aH-cyklopropa[e]azulen, je tricyklický seskvi-terpen, který je důležitou složkou esenciálního oleje eukalyptu, který je používán jako antiseptikum a také při léčbě kašle, rýmy, bolesti v krku a dalších infekcí. I samotný aromadendren vykazuje silné antibakteriální účinky (Mulyaningsih *et al.*, 2010; Tongnuanchan *et Benjakul*, 2014).

Myristicin

Myristicin celým chemickým názvem 5-allyl-1-methoxy-2,3-methylendioxybenzen je fenylypropanoid, který je důležitou složkou esenciálního oleje muškátového oříšku (chemotyp East Indian 3,3-13,5 %, chemotyp West Indian 0,5-0,9 %), mimo to se vyskytuje např. v petrželi, černém pepři a mrkvi (Yang *et al.*, 2015; Tongnuanchan *et Benjakul*, 2014). Rostliny obsahující myristicin bývají v tradiční medicíně využívány při léčbě revmatismu, cholery, psychóz, žaludečních křečí, nevolnosti a úzkosti. Při požití většího množství může myristicin mít psychotropní účinky a způsobit otravu (Yang *et al.*, 2015).

Tato látka vykazuje různé farmakologické vlastnosti, včetně protizánětlivých, antimikrobiálních a antiproliferačních účinků (Zhu *et al.*, 2019). Myristicin je schopen inhibovat benzo[a]pyrenem indukovanou karcinogenezi a indukovat glutathion S-transferasu a některé enzymy CYP rodiny (Jeong *et Yun*, 1995; Yun *et al.*, 2003). Dva hlavní metabolity, vznikající při biotransformaci myristicinu jsou 5-allyl-1-methoxy-2,3-dihydroxybenzen, kde se na oxidaci podílí především CYP3A4 a CYP1A2 a 1'-hydroxymyristicin, kde přeměnu nejspíše katalyzují CYP1A1, CYP1B1, CYP2C9, a CYP3A5 (Yun *et al.*, 2003; Zhu *et al.*, 2019). Některé ze vznikající metabolitů vykazují vyšší toxicitu než samotný myristicin, dochází zde k metabolické aktivaci (Zhu *et al.*, 2019).

Cuminol

Cuminol, jiným názvem také 4-isopropylbenzyl alkohol, je součástí esenciálního oleje z semen kmínu (0,2-2,2 %). Tato sloučenina má antioxidační vlastnosti a bylo prokázáno, že zvyšuje sekreci inzulínu (Liu *et al.*, 2017; Tongnuanchan *et Benjakul*, 2014).

β-Myrcen

Systematický název pro β-myrcen je 7-methyl-3-methylen-1,6-oktadien a jedná se o silně hydrofobní acyklický monoterpen, který se nachází v esenciálních olejích řady rostlin včetně rozmarýnu, chmele, vavřínu, citronové trávy a dalších. Tato sloučenina má analgetické, antimutagenní a antioxidační vlastnosti (Santos *et al.*, 2009; Fabbri *et al.*, 2018). V nižších koncentracích se β-myrcen vyskytuje i v esenciálním oleji muškátového oříšku: v chemotypu East Indian 0,3-4,0 % a v oleji získaného z rostlin typu West Indian 2,2-3,4 % (Tongnuanchan *et al.*, 2014).

Methylsalicylát

Z chemického hlediska se jedná o fenolickou látku se systematickým názvem ethylester kyseliny 2-hydroxybenzkarboxylové (Tongnuanchan *et al.*, 2014). Je to methylovaný derivát kyseliny salicylové, která je důležitým fytohormonem účastnícím se odpovědi na stres (Liu *et al.*, 2018). Methylsalicylát vyniká svými antipyretickými, analgetickými a antirevmatickými účinky. Využití našel jako pesticid, rozpouštědlo, ale také v kosmetickém, farmaceutickém průmyslu a v kulinářství jako konzervační látka a dochucovadlo (Li *et al.*, 2018). Ovšem při požití většího množství může způsobit otravu (Tongnuanchan *et al.*, 2014). Methylsalicylát je možné získat z esenciálních olejů pocházejících např. z větvi některých zástupců rodu libavka (*Gaultheria*) nebo břízy (Tongnuanchan *et al.*, 2014).

Borneol

Borneol je bicyklický monoterpenoid se systematickým názvem (1R,4R)-1,7,7-trimethylbicyklo[2.2.1]heptan-2-ol (Başer *et al.*, 2010). Tuto éterickou látku lze získat extrakcí například z některých rostlin rodu hvězdnicovité (např. *Blumea balsamifera*) a kafrovníku lékařského (Chen *et al.*, 2019). Borneol je využíván v klasické Čínské medicíně pod názvem „bingpian“ pro utišení bolesti a otoku (Wang *et al.*, 2017). Je klasifikován jako tzv. kurýrní nebo vodící látka, která je schopna vést další léčivé složky k cílovým orgánům a tkáním, zejména v horní části těla (mozek) (Chang *et al.*, 2018; Chen *et al.*, 2019).

Camphen

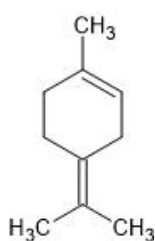
Camphen, systematickým názvem 2,2-dimethyl-3-methylenbicyklo[2.2.1]heptan, je bicyklický monoterpenoid, který je součástí esenciálních olejů z řady rostlin včetně jedle, borovice, tymiánu a rozmarýnu. V malém množství je obsažen i v esenciálním oleji ze semen muškátového oříšku (asi 0,2 %) (Piras *et al.*, 2012; Tongnuanchan *et al.*, 2014). Oleje

obsahující camphen mají spasmolytické, antibakteriální vlastnosti a fungují jako expektorans, díky čemuž jsou využívány při léčbě kašle a infekcí dýchacích cest. Ovšem největšího využití našel camphen v lihovarském průmyslu (Başer *et* Buchbauer, 2010).

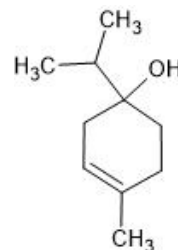
Struktury testovaných látek



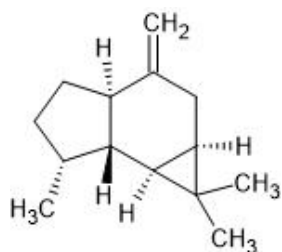
(1S)-(+)-3-Carene



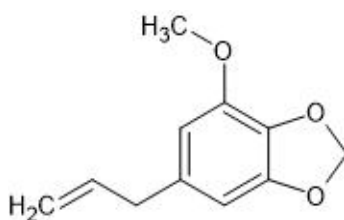
Terpinolen



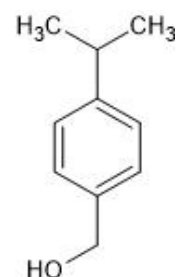
Terpinene-4-ol



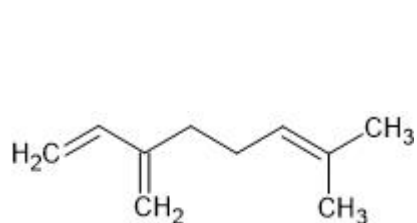
(+)-Aromadendren



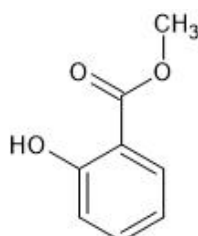
Myristicin



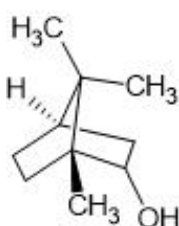
Cuminol



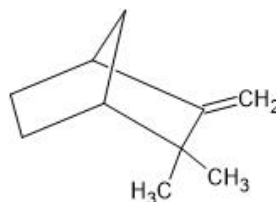
β -Myrcen



Methylsalicylát



Borneol



Camphen

Obr. 3: Struktura testovaných látek (nakresleno podle: PubChem. [online][navštíveno 20.3.2020] Dostupné z <https://pubchemdocs.ncbi.nlm.nih.gov/>).

7 Materiál a metody

7.1 Materiál

7.1.1 Biologický materiál

Pro hodnocení transkripční aktivity AhR byla použita stabilně transfekovaná reportérova buněčná linie AZ-AhR. Tato buněčná linie vznikla transfekcí HepG2 buněk (katalogové číslo ECACC – 85011430), odvozených od lidského hepatocelulárního karcinomu, plazmidem pGL-4.27-DRE. Plazmid pGL-4.27-DRE nese dioxin rezponzivní elementy, které jsou připojeny k luciferázovému reportérovému genu (Novotná *et al.*, 2011).

7.1.2 Použité chemikálie

- 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) (LGC Standards)
- 6-formylindolo[3,2-b]carbazol (FICZ) (Sigma Aldrich, SML1489)
- Adenosin-5´trifosfát (ATP) (Sigma Aldrich, A9062)
- D-Luciferin (Sigma Aldrich, L9504)
- Dimethyl sulfoxid (DMSO) (Lach-Ner, 20022-CT0)
- Dithiothreitol (DTT) (Sigma Aldrich, 43819)
- Ethanol (BC chemservis, 28131210)
- Fetální bovinní sérum (FBS) (Sigma Aldrich, F7524)
- Fosfátový pufr: Dulbecco´s Phosphate Buffer Saline (PBS) (Biosera, LM-S2041)
- Heptahydrát síranu hořečnatého ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) (Sigma Aldrich, M5921)
- Hygromycin B (HygB) (Santa Cruz Biotechnology, SC-29067)
- Koenzym A (Sigma Aldrich, C4780)
- Kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA) (Sigma Aldrich, E6511)
- L-glutamin (SERANA, RGL-001)
- Lyzační pufr: Reporter Lysis 5x Buffer (Promega, E3971)
- Médium DMEM: Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium – High glucose (Sigma Aldrich, D6546)
- Methyltetrazoliová sůl (MTT) (Sigma Aldrich, M2128)
- Neesenciální aminokyseliny (Sigma Aldrich, M7145)
- Tris-acetát (Sigma Aldrich, T8280)
- Triton X-100 (Serva, 37 240)
- Trypanová modř (Sigma Aldrich, T6146)
- Trypsin-EDTA 0,25% (Biosera, LM-T1720)

7.1.3 Testované látky

- (1S)-(+)-3-Caren (Sigma-Aldrich, 441619)
((1S)-3,7,7-trimethylbicyklo[4.1.0]hept-3-en)
- Terpinolen (Sigma-Aldrich, 86485)
4-isopropyliden-1-methylcyklohexen
- Terpinen-4-ol (Sigma-Aldrich, 11584)
4-methyl-1-(1-methylethyl)-3-cyklohexen-1-ol
- (+)-Aromadendren (Sigma-Aldrich, 11067)
1aR,4aR,7R,7aR,7bS)-1,1,7-trimethyl-4-methyliden-2,3,4a,5,6,7,7a,7b-
oktahydro-1aH-cyklopropa[e]azulen
- Myristicin (Sigma-Aldrich, 09237)
5-allyl-1-methoxy-2,3-methylendioxybenzen
- Cuminol (Sigma-Aldrich, 196037)
4-isopropylbenzyl alkohol
- β -Myrcen (Sigma-Aldrich, 64643)
7-methyl-3-methylen-1,6-oktadien
- Methylsalicylát (Sigma-Aldrich, M6752)
ethylester kyseliny 2-hydroxybenzkarboxylové
- Borneol (Santa Cruz Biochemicals, SC-239408)
(1R,4R)-1,7,7-trimethylbicyklo[2.2.1]heptan-2-ol
- Camphen (Santa Cruz Biochemicals, SC-257213)
2,2-dimethyl-3-methylenbicyklo[2.2.1]heptan

7.1.4 Složení použitých roztoků

Kultivační médium:

- 500 ml DMEM
- 50 ml FBS
- 5 ml Neesenciální aminokyseliny
- 5 ml L-glutamin

Substrát pro luciferázu

- 5 mg D-Luciferinu
- 10 mg ATP
- 5 mg Koenzym A
- 168 mg DTT

- 1,32 ml Tris-acetát
- 1,23 mg/6,6 μ l 0,5 mol \cdot l⁻¹ EDTA
- 3,03 mg/1,23 ml 100 mmol \cdot l⁻¹ MgSO₄ \cdot 7H₂O
- Doplněno destilovanou vodou do 30 ml

7.1.5 Seznam laboratorních přístrojů a zařízení

- Inkubátor (NB-203XL, N-Biotek)
- Laboratorní houpačka (Rocker-Shaker MR-12, Biosan)
- Laminární flowbox (Class II Type A2, Esco Labculture)
- Mikroskop (IMT-2, Olympus)
- Spektrofotometr (Infinite M200, Tecan)
- Vodní lázeň (LCB-11D, LabTech)
- Vortex (Relax top D-91126, Heidolph)

7.2 Metodika

7.2.1 Kultivace buněk

Buněčná linie AZ-AhR byla kultivována s DMEM médiem, obohaceným o FBS, neesenciální aminokyseliny a L-glutamin, v plastové kultivační láhvi o ploše 75 cm². Kultivační láhev byla umístěna v inkubátoru, kde byla udržována teplota 37 °C, koncentrace CO₂ 5 % a vysoká vlhkost vzduchu. Každou třetí pasáž bylo do média přidáno antibiotikum Hygromycin B o výsledné koncentraci 0,3 mg·l⁻¹.

7.2.2 Pasážování buněk

Před provedením pasáže byl zkontrolován morfologický vzhled buněk pod mikroskopem. Pasáž byla prováděna každé 2-3 dny, podle aktuální míry konfluence. Pasážování buněk bylo prováděno ve sterilních podmínkách v laminárním boxu. Nejprve bylo z kultivační lahve odsáto staré médium. Pro promytí bylo na buňky přidáno asi 5 ml fosfátového pufru, který byl poté také odsán. Na buňky byl aplikován 1 ml trypsinu a kultivační láhev byla umístěna na tři minuty do inkubátoru. Trypsin způsobil rozrušení mezibuněčných kontaktů a kontaktů buněk s kultivačním povrchem. Po uplynutí tří minut byla kultivační láhev přesunuta z inkubátoru opět do laminárního boxu. Poklepáním na boční stěnu kultivační lahve byly buňky uvolněny a přidáním 9 ml média byla aktivita trypsinu zastavena. Opakovaným nasáváním sérologickou pipetou byla vytvořena homogenní suspenze buněk, která byla přenesena do 15ml zkumavky. Část suspenze byla vrácena zpět do kultivační lahve a doplněna médiem na výsledných 16 ml pro další kultivaci.

7.2.3 Počítání buněk

Koncentrace buněk byla hodnocena pomocí Trypan Blue Exclusion Assay za využití Bürkerovy komůrky. Trypan Blue Exclusion Assay umožňuje odlišit živé a mrtvé buňky v buněčné suspenzi. Tato metoda je založená na skutečnosti, že membrána živých buněk je intaktní, a tudíž nepropustí do svých intracelulárních prostor trypanovou modř. Zatímco mrtvé buňky se v důsledku prostupu barviva přes membránu zbarví modře (Strober, 2015).

Z homogenní buněčné suspenze bylo do mikrozkušavky odebráno 10 µl a následně bylo přidáno 90 µl trypanové modři. Vzniklá suspenze byla opatrně promíchána a nanášena do Bürkerovy komůrky. Takto připravená komůrka byla umístěna pod mikroskop.

Bürkerova komůrka je systémem trojitých čar rozdělena na 9 čtvercových ploch, kdy nad každou touto čtvercovou plochou se nachází prostor o objemu 0,1 mm³. Spočítáním živých

buněk v 2 x 5 čtvercích (celkově 10 čtverců ze dvou komůrek) a následným přepočtem zohledňujícím faktor ředění lze určit koncentraci buněk v původní suspenzi. Počet buněk v 1 ml buněčné suspenze byl zjištěn dosazením do vzorce: $n = x \cdot 10^5$, kdy x je průměrný počet živých buněk v jednom tomto čtverci Bürkerovy komůrky.

7.2.4 Vysévání buněk

Vysévání buněk bylo prováděno ve sterilních podmínkách laminárního boxu. Pro metody MTT a Reporter gene assay byly buňky vysévány na 96 jamkové destičky, kdy do každé jamky bylo vyséváno 25 000 buněk ve 100 μ l média. Následně byla kultivační destička uložena v inkubátoru do dalšího dne (37 °C, 5% CO₂).

7.2.5 Příprava zásobních roztoků použitých látek

Látky (1S)-(+)-3-carene, terpinolen, terpinen-4-ol, (+)-aromadendren, myristicin, cuminol a methylsalicylát byly ředěny 96% ethanolem na zásobní roztok o koncentraci 100 mg·ml⁻¹ dle tabulky (Tab. 1.).

Tab.1: Příprava zásobních roztoků testovaných látek o koncentraci 100 mg·ml⁻¹.

Látka	Hustota dané látky [g·ml ⁻¹]	Objem dané látky [μ l]	Objem 96% ethanolu [μ l]	Celkový objem [ml]
(1S)-(+)-3-carene	0,865	115,6	884,4	1
terpinolen	0,861	116,1	883,9	1
terpinen-4-ol	0,934	107,0	893,0	1
(+)-aromadendren	0,912	109,6	890,4	1
myristicin	1,1437	43,7	456,3	0,5
cuminol	0,982	101,8	898,2	1
methylsalicylát	1,174	85,2	914,8	1

Zásobní roztok β -myrcenu ($d = 0,791 \text{ g}\cdot\text{ml}^{-1}$) o koncentraci 100 mg·ml⁻¹ byl připraven obdobným způsobem, ale protože se daná látka nerozpouštěla v ethanolu, byl pro její rozpuštění použit dimethylsulfoxid. Smícháním 12,64 μ l β -myrcenu a 87,36 μ l DMSO jsem připravila 100 μ l zásobního roztoku β -myrcenu o koncentraci 100 mg·ml⁻¹.

Borneol a camphen byly dodány v krystalické formě, takže jejich zásobní roztoky o koncentraci 100 mg·ml⁻¹ byly připraveny rozpuštěním 100 mg těchto látek a doplněním na 1 ml 96% ethanolem.

U všech deseti látek byly roztoky o koncentracích 50, 10 a 1 mg·ml⁻¹ připraveny postupným ředěním roztoku o koncentraci 100 mg·ml⁻¹ dle tabulky (Tab. 2.).

Tab. 2: Příprava zásobních roztoků o koncentracích 1, 10 a 50 mg·ml⁻¹ ředěním.

Výsledná koncentrace [mg·ml ⁻¹]	Objem roztoku o dané koncentraci	Objem rozpouštědla (ethanolu/DMSO) [μl]	Výsledný objem [μl]
50	50 μl 100 mg·ml ⁻¹	50	100
10	10 μl 100 mg·ml ⁻¹	90	100
1	10 μl 10 mg·ml ⁻¹	90	100

7.2.6 MTT test

Princip MTT testu

Jedná se o test životnosti buněk, který byl použit pro stanovení cytotoxicity testovaných látek. Tento test je založen na faktu, že živé buňky mají funkční metabolismus, konkrétně, že mají aktivní mitochondriální dehydrogenasy. Pomocí těchto enzymů jsou živé buňky schopny redukovat žlutě zbarvený MTT roztok na ve vodě nerozpustný fialově zbarvený formazan, čehož mrtvé buňky schopny nejsou. Množství vznikajícího formazanu je úměrné počtu živých buněk (Stockert *et al.*, 2012; Riss *et al.*, 2013).

Provedení MTT testu

První den byly buňky vysety na 96 jamkovou destičku.

Druhý den bylo z jamek odsáto médium a do vybraných jamek bylo aplikováno 100 μl média s jednotlivými testovanými látkami o výsledných koncentracích 1, 10 a 100 μg·ml⁻¹. Každá testovaná látka v každé z koncentrací byla aplikována do tří jamek. Pozitivní kontrola se sestávala z 100 μl 2% Tritonu X-100 v médiu. Jako negativní kontrola bylo použito 100 μl 0,1% roztoku rozpouštědla (96% ethanol, u β-myrcenu DMSO) v médiu. Obě kontroly byly také aplikovány v triplikátu. Následně proběhla 24hodinová inkubace.

Při testování látek myristicinu, cuminolu a β-myrcenu byl v prvních dvou experimentech zaznamenán výraznější pokles viability v nejvyšších koncentracích, a proto byla pro zbylé experimenty do testování zařazena i koncentrace 50 μg·ml⁻¹.

Po 24hodinové inkubaci bylo médium z destičky vyklepnuto a do každé jamky bylo přidáno 100 μl roztoku MTT o koncentraci 0,3 mg·ml⁻¹. Roztok MTT o této koncentraci byl připraven smícháním 1 ml MTT roztoku o koncentraci 3 mg·ml⁻¹ a 9 ml 1x PBS. Destička byla

následně inkubována asi 30-60 minut, dokud nebyly pozorovány vznikající fialové krystaly formazanu.

Po inkubaci byla destička opět vyklepnuta a do jamek bylo aplikováno 100-150 μl dimethyl sulfoxidu, v závislosti na intenzitě vznikajícího fialového zbarvení. Po úplném rozpuštění krystalů formazanu byla spektrofotometricky měřena absorbance při 570 nm.

7.2.7 Reporter Gene Assay

Princip Reporter Gene Assay

Reportérové geny jsou používány pro studium genové exprese a buněčných pochodů, které jsou na genovou expresy vázány. Námi využívaná Reporter Gene Assay je bioluminiscenční metoda, která je založena na reakci enzymu luciferázy, který je syntetizován v důsledku aktivace AhR, s luminiscenčním substrátem luciferinem za vzniku oxyluciferinu. Tento proces je doprovázen vývojem luminiscence, kdy intenzita vznikajícího záření je úměrná luciferázové aktivitě a tím také aktivaci receptoru (Bornstein *et al.*, 1994; Allard *et al.*, 2008).

V této práci byly vybrané látky testovány pomocí Reporter Gene Assay ve dvou tzv. módech: agonistickém a antagonistickém. V agonistickém módu bylo zjišťováno, zda testované látky působí jako aktivátory AhR. V antagonistickém módu byly testované látky aplikovány v kombinaci s vybranými ligandy AhR a bylo pozorováno, zda jsou tyto látky schopny aktivaci AhR inhibovat.

Provedení Reporter Gene Assay

První den byly buňky vysety na 96 jamkovou destičku.

Agonistický mód

Druhý den bylo médium z jamek odsáto a na buňky bylo aplikováno 100 μl média s testovanými látkami o koncentracích 1, 10, 50 a 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Jako pozitivní kontrola bylo použito 100 μl TCDD o koncentraci 5 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ v médiu. Negativní kontrola se sestávala z 100 μl 0,1% roztoku rozpouštědla (96% ethanol, u β -myrcenu DMSO) v médiu. Obě kontroly i testované látky byly aplikovány v tetraplikátu. Při měření v agonistickém módu byly buňky s testovanými látkami inkubovány po dva různé časové úseky: 4 a 24 hodin.

Po uplynutí inkubační doby (4 h nebo 24 h) byla destička vyklepnuta a do každé jamky bylo aplikováno 25 μl lyzačního puftru. Následně byla destička uložena nejméně na 20 minut do $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po rozmražení bylo 5 μl lyzátu z každé jamky přeneseno do bílé 96 jamkové

destičky určené pro měření luminiscence. K lyzátu bylo přidáno 30 μl substrátu pro luciferázu. Pomocí spektrofotometru byla ve speciálním programu měřena intenzita luminiscence.

Antagonistický mód

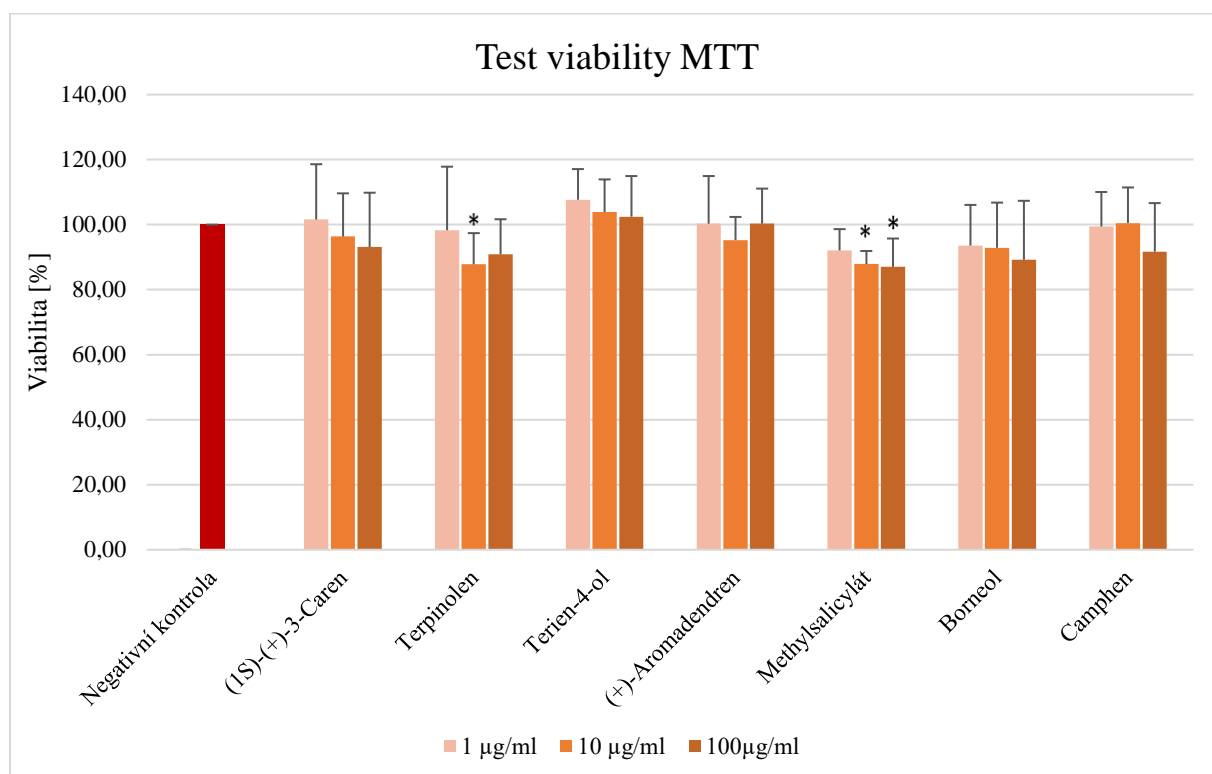
Po odsátí média bylo do jamek aplikováno 100 μl média s testovanými látkami o koncentracích 1, 10, 50 a 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ v kombinaci s jedním z vybraných ligandů AhR: TCDD o výsledné koncentraci 13,5 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ nebo FICZ o výsledné koncentraci 22,6 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Jako negativní kontrola bylo využito 100 μl 0,1% roztok rozpouštědla (96% ethanol, u β -myrcenu DMSO) v médiu. Pozitivní kontrola se sestávala z 100 μl 0,1% roztok rozpouštědla (96% ethanol, u β -myrcenu dimethyl sulfoxid) a 13,5 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ TCDD nebo 22,6 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ FICZ v médiu. Zbývající část postupu byla provedena stejně jako v případě agonistického módu.

8 Výsledky

Cílem této práce bylo zjistit vliv vybraných složek esenciálních olejů: (1S)-(+)-3-carenu, terpinolenu, terpinen-4-olu, (+)-aromadendrenu, myristicinu, cuminolu, methylsalicylátu, β -myrcenu, borneolu a camphenu na transkripční aktivitu aryluhlovodíkového receptoru.

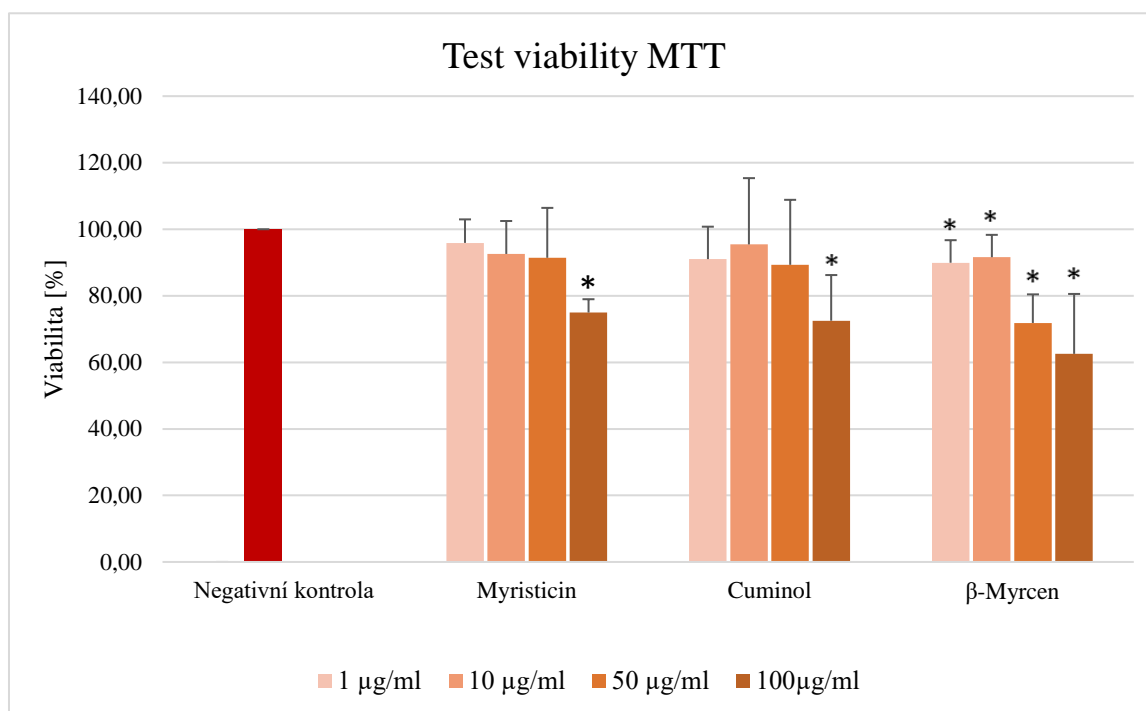
8.1 Testování vlivu vybraných látek na viabilitu buněk buněčné linie AZ-AhR

Byl pozorován vliv testovaných látek na životaschopnost buněk buněčné linie AZ-AhR. Cytotoxicita byla stanovena pomocí MTT testu. Buňky byly inkubovány s látkami o koncentracích 1, 10 a 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a jejich cytotoxicita byla stanovena po 24 hodinách. Testování bylo provedeno v šesti nezávislých experimentech, pokaždé v triplicátu. Jako pozitivní kontrola byl zvolen 2% Tritonu X-100. Změna viability buněk byla vztažena k negativní kontrole, kterou tvořil 0,1% roztok ethanolu (v případě β -myrcenu 0,1% DMSO).



Graf 1: Viabilita buněčné linie AZ-AhR po aplikaci testovaných látek.

Buněčná linie AZ-AhR byla inkubována 24 h s testovanými látkami: (1S)-(+)-3-carenem, terpinolenem, terpinen-4-olem, (+)-aromadendrenem, methylsalicylátem, borneolem a camphenem o koncentracích 1, 10 a 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a negativní kontrolou (0,1% EtOH). Úroveň viability byla vztažena k negativní kontrole, která představuje 100% viabilitu. Hodnoty v grafu představují průměrnou viabilitu \pm směrodatnou odchylku z šesti nezávislých experimentů. Hodnoty označené [*] se významně liší od hodnot negativní kontroly ($p < 0,05$).



Graf 2: Viabilita buněčné linie AZ-AhR po aplikaci testovaných látek 2.

Buněčná linie AZ-AhR byla inkubována 24 h s testovanými látkami: myristicinem, cuminolem a β -myrcenem o koncentracích 1, 10, 50 a 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a negativní kontrolou (0,1% EtOH; pro β -myrcen 0,1% DMSO). Úroveň viability byla vztažena k negativní kontrole, která představuje 100% viabilitu. Hodnoty v grafu představují průměrnou viabilitu \pm směrodatnou odchylku ze čtyř nezávislých experimentů. Hodnoty označené [*] se významně liší od hodnot negativní kontroly ($p < 0,05$).

U látek znázorněných v grafu 1 ((1S)-(+)-3-carene, terpinolen, terpinen-4-ol, (+)-aromadendren, methylsalicylát, borneol a camphen) nebyl, s výjimkou methylsalicylátu, pozorován koncentračně závislý pokles viability buněk, který by byl statisticky významný.

U látek myristicinu, cuminolu a β -myrcenu (Graf 2) byl v prvních dvou experimentech pozorován výraznější pokles životaschopnosti v koncentraci 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a proto byla do testování přidána koncentrace 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Testování těchto látek ve všech čtyřech koncentracích proběhlo v dalších čtyřech nezávislých experimentech.

V koncentracích 1, 10 a 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ byl u myristicinu a cuminolu pozorován mírný pokles životaschopnosti, který však nebyl statisticky významný. Signifikantní pokles byl dosažen až v koncentraci 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, kdy se hodnoty viability přiblížily 70 %. V případě β -myrcenu došlo k významnému snížení životaschopnosti ve všech čtyřech koncentracích: 1, 10, 50 a 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, přičemž koncentrace 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ způsobila pokles viability na 72 % a koncentrace 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ na 63 %.

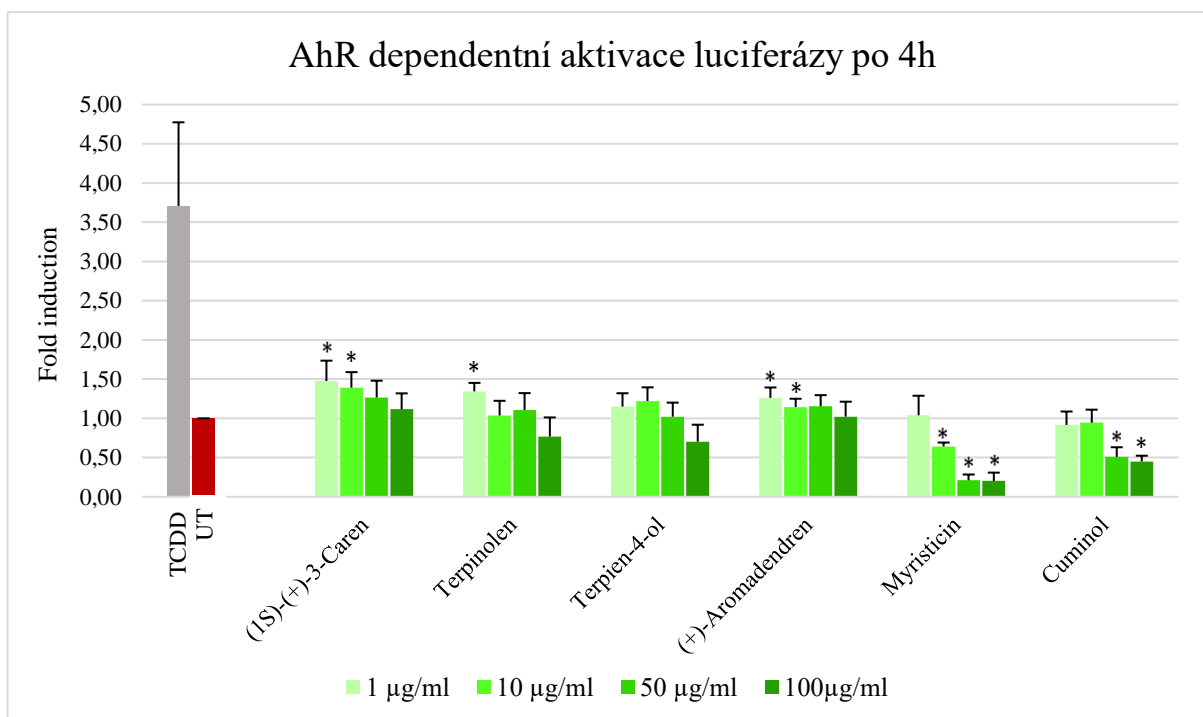
U ani jedné z testované látky v žádné z testovaných koncentrací nedošlo ke snížení viability pod 60 %. Na základě výsledků MTT testu byly pro další testování použity všechny látky v rozmezí koncentrací 1–100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

8.2 Testování vlivu vybraných látek na transkripční aktivitu AhR

8.2.1 Aktivace transkripční aktivity AhR (agonistický mód)

V agonistickém módu byla sledována schopnost testovaných látek aktivovat AhR. Transkripční aktivita AhR byla stanovena pomocí metody Reporter Gene Assay.

Buněčná linie AZ-AhR byla s testovanými látkami inkubována po dobu dvou časových úseků: 4 nebo 24 hodin. Negativní kontrola (UT) byla tvořena 0,1% ethanolem (v případě β -myrcenu 0,1% DMSO), pozitivní kontrolou byl 5 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ TCDD. Výsledné hodnoty byly vyjádřeny jako fold induction neboli násobek indukce oproti negativní kontrole. Testování bylo provedeno v pěti nezávislých experimentech, kdy reagentie byly aplikovány v tetraplikátu.



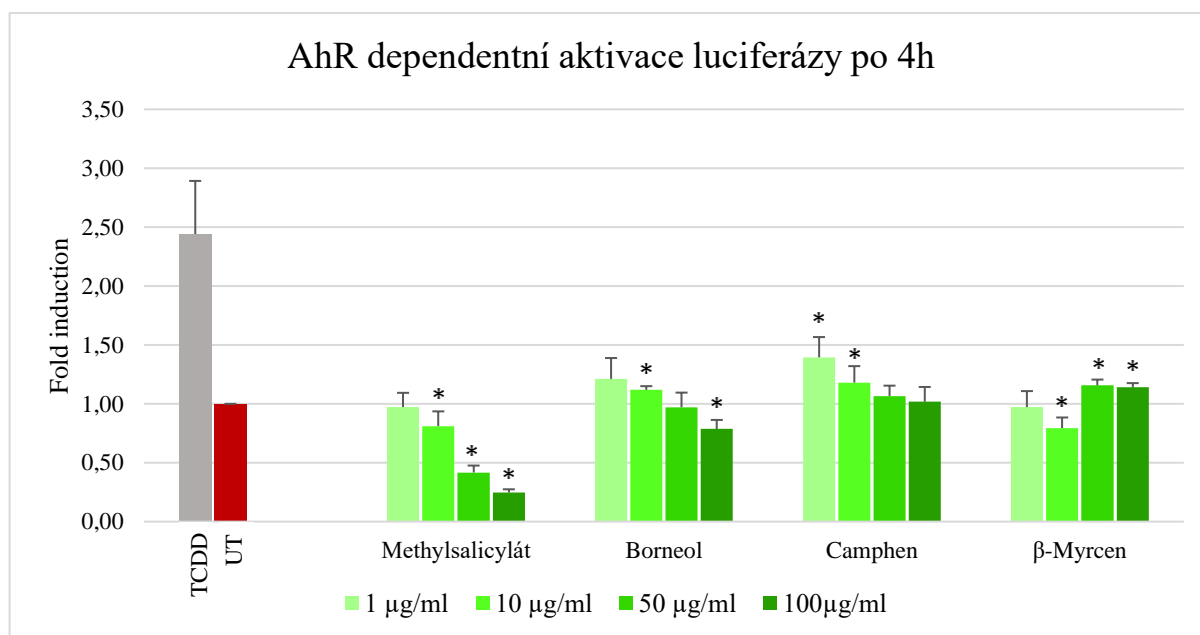
Graf 3: Vliv testovaných látek na transkripční aktivitu AhR po 4 h. Agonistický mód.

Buněčná linie AZ-AhR byla inkubována 4 h s testovanými látkami: (1S)-(+)-3-carenem, terpinolenem, terpinen-4-olem, (+)-aromadendrenem, myristicinem a cuminolem o koncentracích 1, 10, 50 a 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, negativní kontrolou UT (0,1% EtOH) a pozitivní kontrolou (5 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ TCDD). Úroveň transkripční aktivity byla vztažena k negativní kontrole a vyjádřena jako fold induction. Hodnoty v grafu představují průměrnou fold induction \pm směrodatnou odchylku z pěti nezávislých experimentů. Hodnoty označené [*] se významně liší od hodnot negativní kontroly ($p < 0,05$).

Při 4hodinové inkubaci je z grafů (Graf 3 a Graf 4) patrné, že transkripční aktivita má s rostoucí koncentrací klesající tendenci, pro většinu látek, s výjimkou β -myrcenu.

Působením (1S)-(+)-3-carenu, (+)-aromadendrenu (Graf 3) a camphenu (Graf 4) došlo k zvýšení fold induction nad hodnotu 1 v koncentracích 1, 10 a 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (v případě (1S)-(+)-3-carenu i 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), z čehož u všech těchto tří látek se v koncentracích 1 a 10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ jednalo o statisticky významný rozdíl oproti negativní kontrole. (+)-Aromadendren a camphen v koncentraci 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ dosáhli hodnot blízkých hodnotám negativní kontroly. Nejvýraznější nárůst transkripční aktivity byl pozorován u (1S)-(+)-3-carenu v koncentraci 1 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ kdy hodnota fold induction stoupla na 1,48, což odpovídá necelým 40 % hodnoty pozitivní kontroly TCDD.

Terpinolen, terpinen-4-olen (Graf 3) a borneol (Graf 4) vykazují mírný na koncentraci závislý pokles transkripční aktivity AhR, kdy u borneolu v nejvyšší koncentraci 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ tato hodnota dosáhla statistické významnosti.



Graf 4: Vliv testovaných látek na transkripční aktivitu AhR po 4 h. Agonistický mód 2.

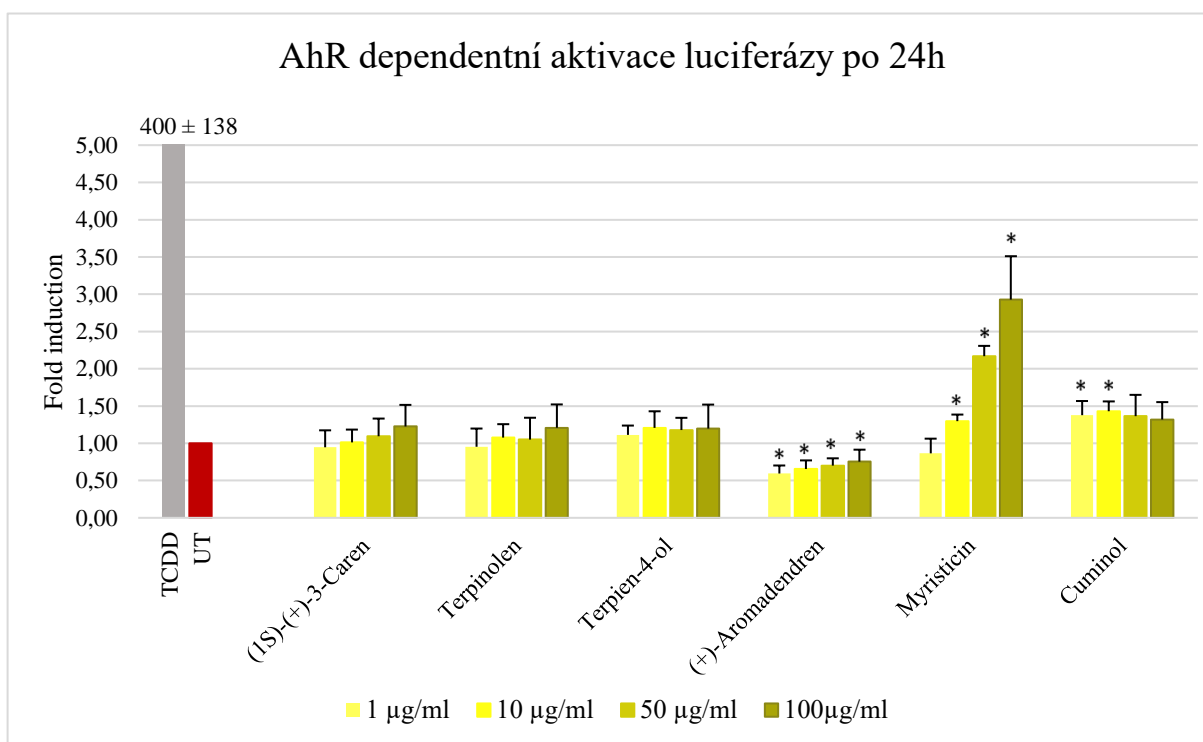
Buněčná linie AZ-AhR byla inkubována 4 h s testovanými látkami: methylsalicylátem, borneolem, camphenem a β -myrcenem o koncentracích 1, 10, 50 a 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, negativní kontrolou UT (0,1% EtOH; pro β -myrcen 0,1% DMSO) a pozitivní kontrolou (5 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ TCDD). Úroveň transkripční aktivity byla vztažena k negativní kontrole a vyjádřena jako fold induction. Hodnoty v grafu představují průměrnou fold induction \pm směrodatnou odchylku z pěti nezávislých experimentů. Hodnoty označené [*] se významně liší od hodnot negativní kontroly ($p < 0,05$).

Myristicin, cuminol (Graf 3) a methylsalicylát (Graf 4) vyvolaly koncentračně závislý pokles AhR-zprostředkované luciferázové aktivity, který dosáhl hodnot 0,20, 0,45 a 0,25 pro nejvyšší koncentrace těchto látek.

β -Myrcen (Graf 4) nevykazoval výraznější vliv na změnu aktivace AhR.

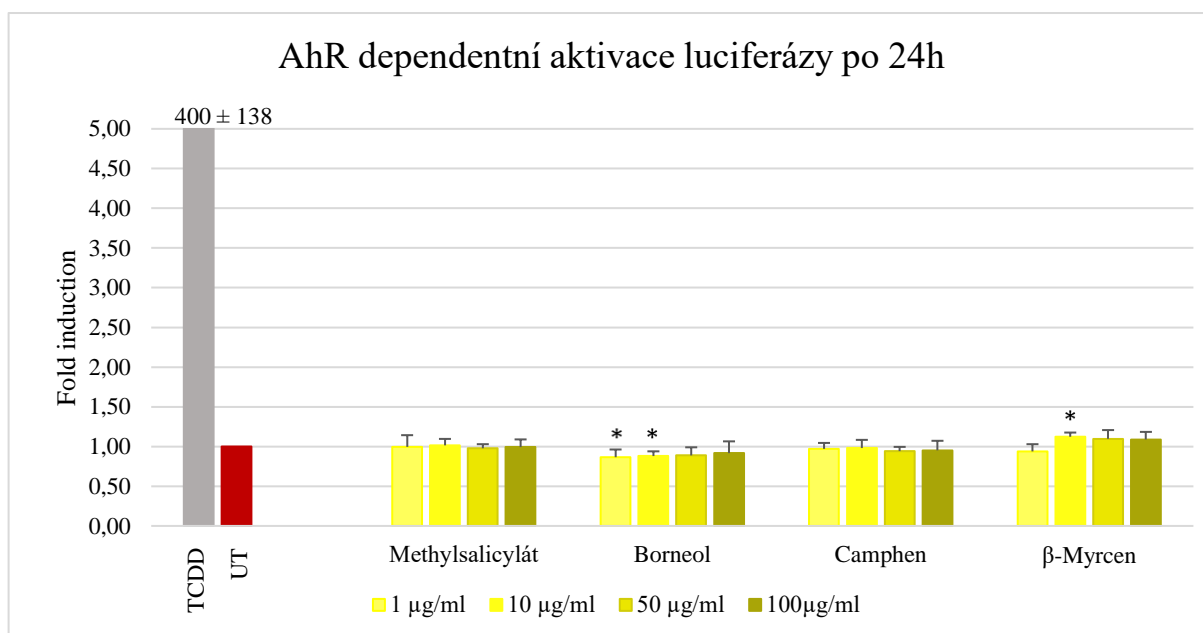
Při inkubaci po dobu 24 hodin, byl pozorovaný vliv většiny testovaných látek na transkripční aktivitu AhR méně výrazný než v případě kratší 4 h inkubace (Graf 5 a Graf 6).

Statisticky signifikantní a na koncentraci závislý nárůst aktivace receptoru byl pozorován u myristicinu (Graf 5) v koncentracích 10, 50 a 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, kdy v nejvyšší koncentraci došlo ke zvýšení na hodnotu 2,93 fold induction, ovšem tento nárůst představuje pouze asi 0,7 % indukce způsobené pozitivní kontrolou TCDD, kde průměrná hodnota fold induction dosáhla 400.



Graf 5: Vliv testovaných látek na transkripční aktivitu AhR po 24 h. Agonistický mód.

Buněčná linie AZ-AhR byla inkubována 24 h s testovanými látkami: (1S)-(+)-3-carenem, terpinolenem, terpien-4-olem, (+)-aromadendrenem, myristicinem a cuminolem o koncentracích 1, 10, 50 a 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, negativní kontrolou UT (0,1% EtOH) a pozitivní kontrolou (5 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ TCDD). Úroveň transkripční aktivity byla vztažena k negativní kontrole a vyjádřena jako fold induction. Hodnoty v grafu představují průměrnou fold induction směrodatnou odchylku z pěti nezávislých experimentů. Hodnoty označené [*] se signifikantně liší od hodnot negativní kontroly ($p < 0,05$).



Graf 6: Vliv testovaných látek na transkripční aktivitu AhR po 24 h. Agonistický mód 2.

Buněčná linie AZ-AhR byla inkubována 24 h s testovanými látkami: methylsalicylátem, borneolem, camphenem a β-myrcenem o koncentracích 1, 10, 50 a 100 µg·ml⁻¹, negativní kontrolou UT (0,1% EtOH; pro β-myrcen 0,1% DMSO) a pozitivní kontrolou (5 nmol·l⁻¹ TCDD). Úroveň transkripční aktivity byla vztažena k negativní kontrole a vyjádřena jako fold induction. Hodnoty v grafu představují průměrnou fold induction ± směrodatnou odchylku z pěti nezávislých experimentů. Hodnoty označené [*] se signifikantně liší od hodnot negativní kontroly (p<0,05).

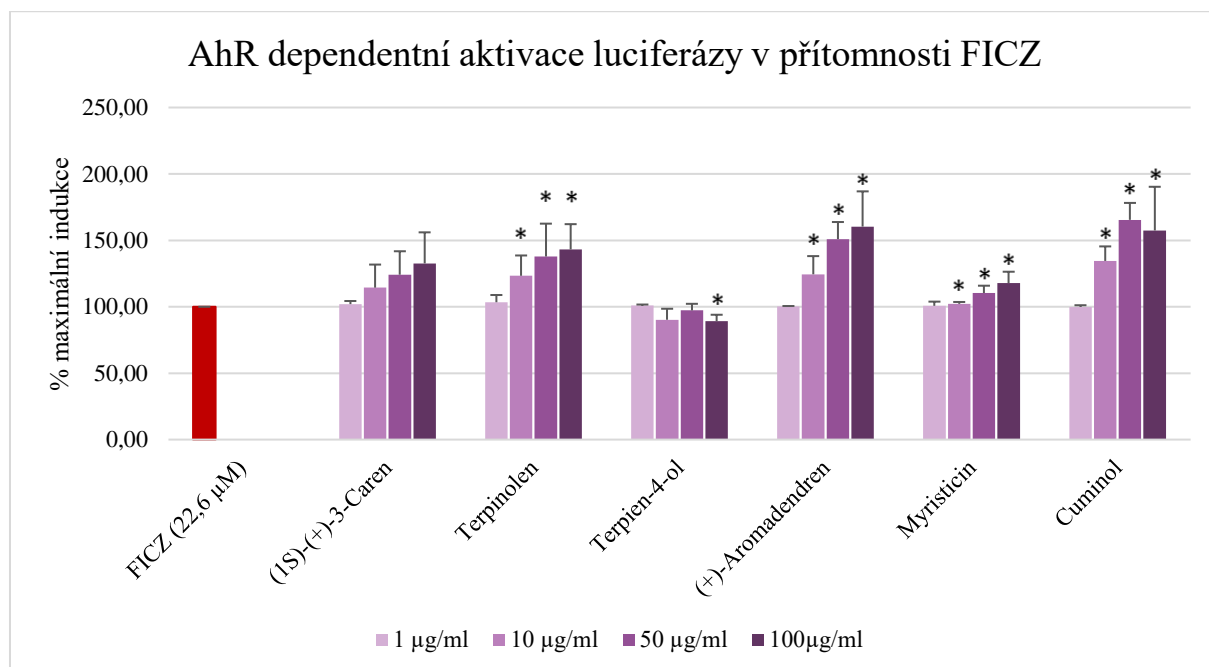
V případě (1S)-(+)-3-carenu, terpinolenu, terpinen-4-olu (Graf 5), methylsalicylátu, borneolu, camphenu a β-myrcenu (Graf 6) nebylo pozorováno výraznější odchýlení od hodnot negativní kontroly.

(+)-Aromadendren (Graf 5) vykazoval ve všech čtyřech koncentracích statisticky významné snížení oproti negativní kontrole, s rostoucí koncentrací se indukce přibližovala hodnotě fold induction 1. Naopak u cuminolu (Graf 5) jsou hodnoty ve všech čtyřech koncentracích oproti hodnotě kontroly zvýšené, nejvíce v koncentracích 1 a 10 µg·ml⁻¹, kde se jedná o statisticky signifikantní výsledky. Nicméně účinek není koncentračně závislý.

8.2.2 Inhibice transkripční aktivity AhR (antagonistický mód)

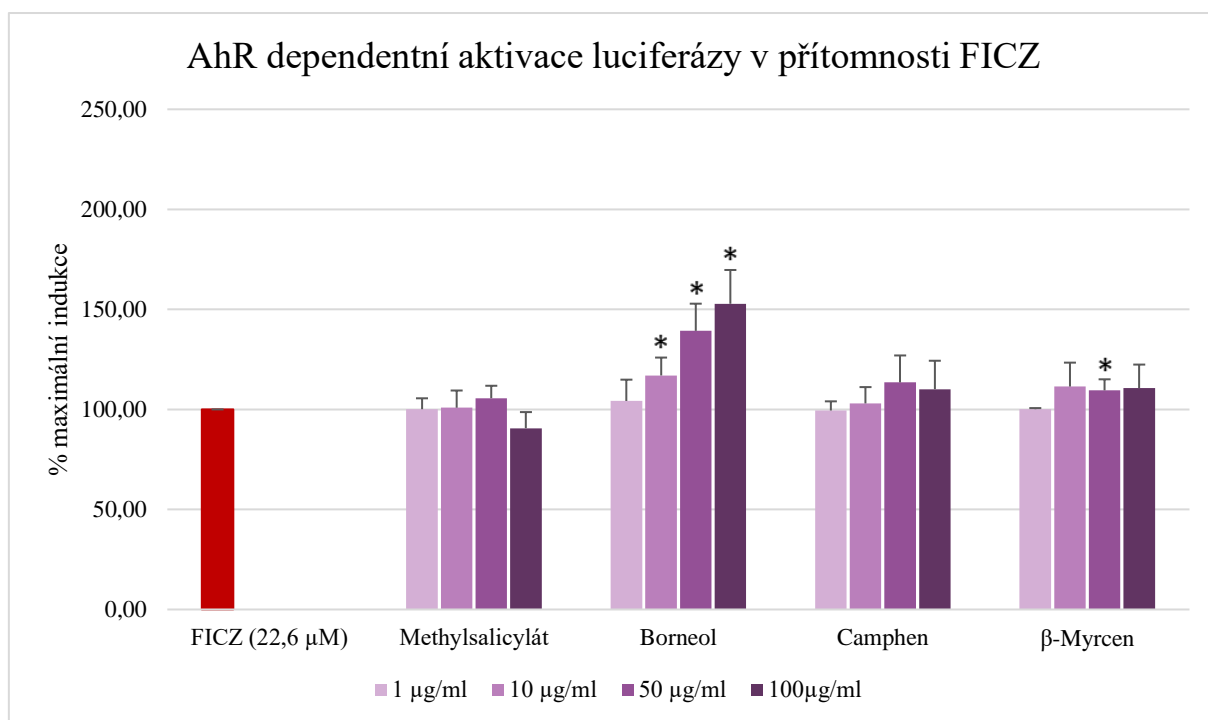
V antagonistickém módu byla sledována schopnost testovaných látek inhibovat transkripční aktivitu AhR v přítomnosti modelového aktivátoru. Transkripční aktivita AhR byla stanovena pomocí metody Reporter Gene Assay.

Buněčná linie AZ-AhR byla inkubována po dobu 24 h s testovanými látkami v kombinaci s jedním z aktivátorů AhR: endogenní ligand FICZ ($22,6 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) nebo exogenní ligand TCDD ($13,5 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$). Negativní kontrolu UT tvořil opět 0,1% ethanol (v případě β -myrcenu 0,1% DMSO), pozitivní kontrola se sestávala z 0,1% rozpouštědla a $22,6 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ FICZ nebo $13,5 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ TCDD. Výsledné hodnoty byly vztaženy k pozitivní kontrole, kdy indukce pozitivní kontroly odpovídala 100 %. Testování bylo opět provedeno v pěti nezávislých experimentech a reagentie byly aplikovány v tetraplikátu.



Graf 7: Vliv testovaných látek na transkripční aktivitu AhR v přítomnosti FICZ. Antagonistický mód.

Buněčná linie AZ-AhR byla inkubována 24 h s testovanými látkami: (1S)-(+)-3-carenem, terpinolenem, terpien-4-olem, (+)-aromadendrenem, myristicinem a cuminolem o koncentracích 1, 10, 50 a 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ za přítomnosti $22,6 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ FICZ, negativní kontrolou UT (0,1% EtOH) a pozitivní kontrolou ($22,6 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ FICZ; 0,1% EtOH). Úroveň transkripční aktivity byla vztažena k pozitivní kontrole, která představuje 100% indukci. Hodnoty v grafu představují průměrnou indukci \pm směrodatnou odchylku z pěti nezávislých experimentů. Hodnoty označené [*] se signifikantně liší od hodnot negativní kontroly ($p < 0,05$).



Graf 8: Vliv testovaných látek na transkripční aktivitu AhR v přítomnosti FICZ. Antagonistický mód 2.

Buněčná linie AZ-AhR byla inkubována 24 h s testovanými látkami: methylsalicylátem, borneolem, camphenem a β -myrcenem o koncentracích 1, 10, 50 a 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ za přítomnosti 22,6 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ FICZ, negativní kontrolou UT (0,1% EtOH; pro β -myrcen 0,1% DMSO) a pozitivní kontrolou (22,6 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ FICZ; 0,1% EtOH nebo pro β -myrcen 0,1% DMSO). Úroveň transkripční aktivity byla vztažena k pozitivní kontrole, která představuje 100% indukci. Hodnoty v grafu představují průměrnou indukci \pm směrodatnou odchylku z pěti nezávislých experimentů. Hodnoty označené [*] se významně liší od hodnot negativní kontroly ($p < 0,05$).

Většina testovaných látek měla v kombinaci s endogenním ligandem FICZ tendenci aktivaci spíše zvyšovat oproti hodnotám pozitivní kontroly (Graf 7 a Graf 8).

Terpinolen, (+)-aromadendren, myristicin, cuminol (Graf 7) a borneol (Graf 8) koncentračně-závisle zesilovaly účinek ligandu FICZ, a to statisticky významně.

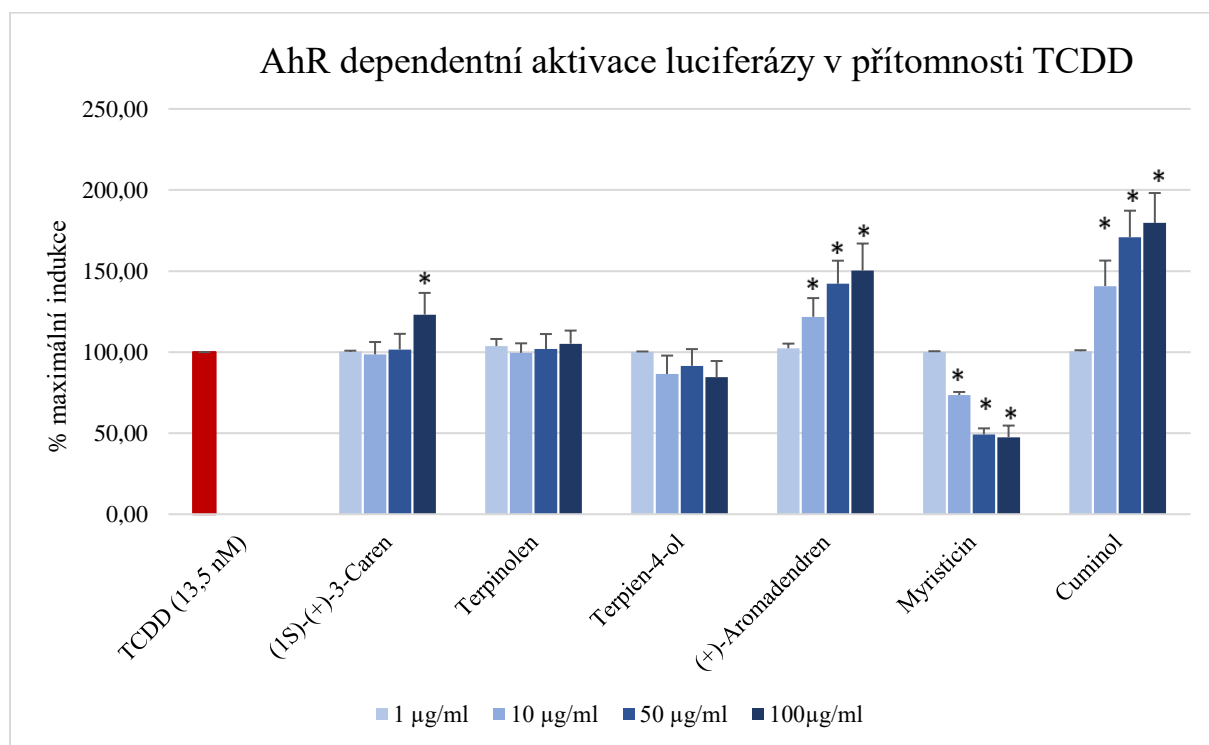
V koncentracích 10, 50 a 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ vykazoval nesignifikantní nárůst aktivity pouze (1S)-(+)-3-carene (Graf 7), ostatní látky (terpinen-4-ol, Graf 7; methylsalicylát, camphen a β -myrcen, Graf 8) byly inaktivní.

V případě testování za přítomnosti exogenního ligandu TCDD, byly zjištěné výsledky pro většinu testovaných látek velmi podobné výsledkům z testování v kombinaci s FICZ, výjimkou byli terpinolen a myristicin (Graf 9 a Graf 10).

U (+)-aromadendrenu, cuminolu (Graf 9) a borneolu (Graf 10) byl pozorován, podobně jako v kombinaci z FICZ, na koncentraci závislé zesílení aktivace modelovým ligandem na signifikantně významné hodnoty v koncentracích 10, 50 a 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, z čehož v případě cuminolu v koncentraci 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ došlo ke zvýšení až na hodnotu 180 %.

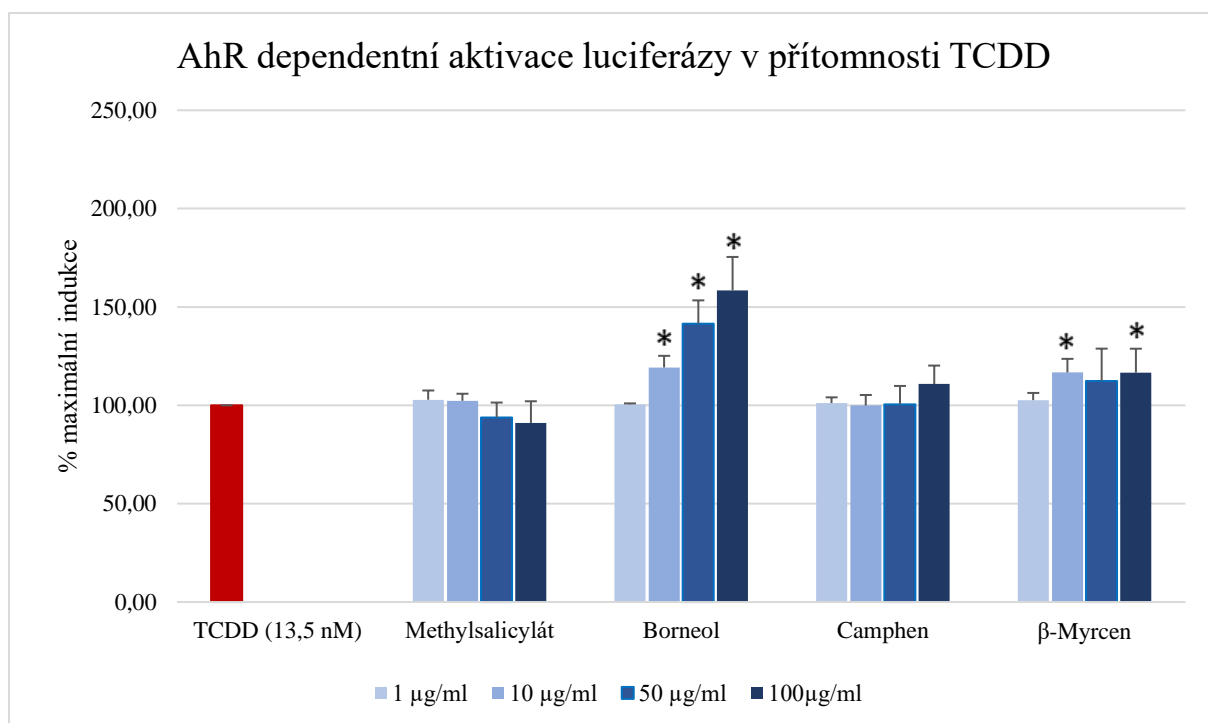
V případě (1S)-(+)-3-carenu (Graf 9) byl sledován nárůst na statisticky významnou hodnotu pouze v koncentraci 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Působení terpinolenu (který v přítomnosti FICZ způsoboval signifikantní nárůst), terpien-4-olu (Graf 9), camphenu a methylsalicylátu (Graf 10) mělo nulový účinek na TCDD-indukovanou luciferázovou aktivitu.



Graf 9: Vliv testovaných látek na transkripční aktivitu AhR v přítomnosti TCDD. Antagonistický mód.

Buněčná linie AZ-AhR byla inkubována 24 h s testovanými látkami: (1S)-(+)-3-carenem, terpinolenem, terpien-4-olem, (+)-aromadendrenem, myristicinem a cuminolem o koncentracích 1, 10, 50 a 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ za přítomnosti 13,5 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ TCDD, negativní kontrolou UT (0,1% EtOH) a pozitivní kontrolou (13,5 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ TCDD; 0,1% EtOH). Úroveň transkripční aktivity byla vztažena k pozitivní kontrole, která představuje 100% indukci. Hodnoty v grafu představují průměrnou indukci \pm směrodatnou odchylku z pěti nezávislých experimentů. Hodnoty označené [*] se signifikantně liší od hodnot negativní kontroly ($p < 0,05$).



Graf 10: Vliv testovaných látek na transkripční aktivitu AhR v přítomnosti TCDD. Antagonistický mód 2.

Buněčná linie AZ-AhR byla inkubována 24 h s testovanými látkami: methylsalicylátem, borneolem, camphenem a β -myrcenem o koncentracích 1, 10, 50 a 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ za přítomnosti 13,5 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ TCDD, negativní kontrolou UT (0,1% EtOH; pro β -myrcen 0,1% DMSO) a pozitivní kontrolou (13,5 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ TCDD; 0,1% EtOH nebo pro β -myrcen 0,1% DMSO). Úroveň transkripční aktivity byla vztažena k pozitivní kontrole, která představuje 100% indukci. Hodnoty v grafu představují průměrnou indukci \pm směrodatnou odchylku z pěti nezávislých experimentů. Hodnoty označené [*] se signifikantně liší od hodnot negativní kontroly ($p < 0,05$).

Myristicin (Graf 9), který v kombinaci s FICZ způsoboval signifikantní nárůst aktivity, v tomto případě vykazoval statisticky významné snížení indukce v koncentracích 10, 50 a 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, z čehož v koncentracích 50 a 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ došlo k poklesu pod 50 %.

9 Diskuze

V rámci bakalářské práce byl studován vliv vybraných složek esenciálních olejů na transkripční aktivitu aryluhlovodíkového receptoru. Pro tento účel byla využita stabilně transfekovaná reportérova buněčná linie AZ-AhR. K testování byly vybrány látky (1S)-(+)-3-carene, terpinolen, terpinen-4-ol, (+)-aromadendren, myristicin, cuminol, methylsalicylát, β -myrcen, borneol a camphen, které jsou minoritními složkami esenciálních olejů využívaných, mimo jiné, v kulinářství. Aryluhlovodíkový receptor má v lidském organismu velmi komplexní roli a látky přijímané v potravě, které mají schopnost tento receptor aktivovat, mohou způsobovat interakci léků s potravinami, zasahovat do fyziologie člověka a ovlivňovat jeho zdraví. Větší porozumění vzájemnému působení mezi těmito složkami potravy a AhR, může najít využití při modulaci aktivity tohoto jaderného receptory a ovlivnění fyziologických procesů na AhR závislých (Bartoňková *et. Dvořák*, 2018).

V agonistickém módu při inkubaci po dobu 4 h vykazovala většina testovaných látek spíše antagonistické chování vůči AhR. Ovšem při delší inkubaci 24 h již pokles aktivace AhR pozorován nebyl. A proto usuzuji, že antagonismu podobný jev pozorovaný v případě 4 h inkubace byl nejspíše způsoben přítomností nějakého rychle-metabolizovaného ligandu v médiu. Při sledování agonistického působení testovaných látek při inkubaci po dobu 24 h byla v případě myristicinu a cuminolu zaznamenána zvýšená transkripční aktivita AhR a tyto dvě látky považuji na základě získaných výsledků za parciální agonisty aryluhlovodíkového receptoru. Myristicin způsoboval na koncentraci závislé zesílení aktivace receptoru, kdy v nejvyšší testované koncentraci $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ se hodnoty fold induction přiblížily 3. Ovšem tento výsledek je při srovnání s hodnotou 400 fold induction, které dosáhl modelový agonista TCDD, téměř zanedbatelný. Je známo, že působením myristicinu dochází ke zvýšení indukce CYP1A1 v buňkách myšího hepatocelulárního karcinomu, ovšem nebylo potvrzeno, že je myristicin schopný se vázat do LBD AhR. Na základě těchto zjištění se předpokládá, že indukce CYP1A1 myristicinem probíhá AhR-nezávislou cestou (Jeong *et al.*, 1997), což je ovšem v rozporu se mnou získanými výsledky. V případě cuminolu byl nárůst indukce ještě nižší než u myristicinu a nebyl koncentračně závislý, ovšem ve vyšších koncentracích mohl být výsledek ovlivněn poklesem životnosti buněk. Pomocí MTT testu bylo zjištěno, že v koncentraci $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ způsoboval cuminol snížení viability buněk buněčné linie AZ-AhR na hodnoty kolem 70 %. Zbylé látky při testování v agonistickém módu nezpůsobovaly žádné výraznější změny transkripční aktivity AhR.

Vliv testovaných látek na AhR byl zjišťován také v antagonistickém módu, kdy byly látky testovány v kombinaci s modelovým exogenním ligandem TCDD nebo s modelovým

endogenním ligandem FICZ. U látek (1S)-(+)-3-carenu, (+)-aromadendrenu, cuminolu a borneolu, bylo pozorováno na koncentraci závislé zesílení účinků modelových ligandů a hodnoty maximální indukce dosahovaly více než 100 %. K tomuto jevu mohlo docházet například prostřednictvím modulace skrze posttranslační modifikace nebo třeba společnou vazbou testované látky a modelového ligandu do vazebné domény AhR. Většina testovaných látek, s výjimkou terpinolenu a myristicinu, se svým vlivem nelišila v závislosti na přítomném modelovém ligandu. Rozdílné působení terpinolenu a myristicinu v přítomnosti TCDD a FICZ může být způsobeno rozdílnými vlastnostmi těchto ligandů. Příkladem vlastností, ve kterých se tyto dva ligandy liší může být to, že FICZ má vyšší afinitu k AhR než TCDD, což souvisí s rozdílnou interakcí těchto látek s aminokyselinami v LBD, kdy FICZ tvoří s AhR stabilnější komplex (Chitralla *et al.*, 2018). Mimo to je FICZ schopný indukovat AhR-dependenční luciferázovou aktivaci s vyšší potencí než TCDD (Farmahin *et al.*, 2014). V případě myristicinu je nutné brát v potaz jeho vliv na viabilitu buněk, který byl zjištěný pomocí MTT testu, kdy v koncentraci 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ způsoboval snížení životaschopnosti buněk na hodnoty kolem 75 %. Reálné zesílení aktivace v kombinaci s ligandem FICZ by tedy bylo ještě vyšší než zjištěné, a naopak pozorovaný pokles maximální indukce v přítomnosti TCDD by reálně nebyl tak výrazný. Snížení aktivace AhR způsobené myristicinem by mohlo být vysvětleno tím, že se jedná o parciálního agonistu. Parciální agonisté působí v přítomnosti agonistů (např. TCDD) jako funkční antagonisté, dochází zde ke kompetici o vazebné místo receptoru a vznikající buněčná odpověď není maximální (Rang *et al.*, 2015). Zbylé testované látky nevykazovaly v antagonistickém módu žádný vliv na transkripční aktivitu AhR.

Na základě získaných výsledků usuzuji, že z testovaných látek mají na transkripční aktivitu AhR vliv myristicin a v malé míře také cuminol, které jsem zařadila mezi parciální agonisty tohoto receptoru. Ovšem pro lepší porozumění interakcím těchto látek s AhR by bylo třeba dalších studií.

10 Závěr

V rámci bakalářské práce jsem se věnovala testování vlivu vybraných složek esenciálních olejů na transkripční aktivitu aryluhlovodíkového receptoru, s cílem detekovat aktivátory AhR mezi těmito látkami.

Literární rešerše se soustředila na proces biotransformace a úlohu jaderných receptorů v regulaci enzymů účastnících se metabolismu xenobiotik se zaměřením na AhR, jeho strukturu, funkci a mechanismus aktivace. Bylo zde zahrnuto pojednání o receptorové teorii a vysvětlení dvoustavového modelu podstatného pro porozumění různých vztahů mezi receptory a jejich ligandy. Na závěr byla pozornost věnována vlastnostem, využití a možnostem izolace esenciálních olejů v historických souvislostech. Byla zde zahrnuta i charakteristika konkrétních testovaných komponent esenciálních olejů.

V experimentální části byla nejprve hodnocena cytotoxicita vybraných testovaných látek v daném koncentračním rozmezí pomocí MTT testu. Následně byl sledován vliv těchto látek na transkripční aktivitu AhR za využití metody Reporter Gene Assay ve dvou módech: agonistickém a antagonistickém. Při testování v agonistickém módu byla pozorována zvýšená aktivace AhR u cuminolu a myristicinu. V případě cuminolu došlo k nejvyššímu nárůstu odpovídajícímu 1,4 násobku negativní kontroly v koncentraci $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. U myristicinu byl v nejvyšší testované koncentraci $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ zaznamenáno zesílení indukce odpovídající 2,9 násobku negativní kontroly. U myristicinu byla v antagonistickém módu při testování v přítomnosti TCDD pozorována inhibice odpovědi vyvolané dioxinem, kdy v koncentraci $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ došlo ke snížení na 48 % maximální indukce. Ovšem v kombinaci s modelovým ligandem FICZ myristicin naopak indukci zvyšoval. Zbylé látky neměli výrazný agonistický ani antagonistický vliv na AhR.

Na základě získaných výsledků jsou cuminol a myristicin hodnoceny jako parciální agonisté AhR, nicméně pro případné využití těchto látek v souvislosti s jejich vlivem na AhR by bylo potřeba dalšího výzkumu.

11 Literatura

Alberts B., Johnson A., Lewis J., Morgan D., Raff M., Roberts K., Walter P. (2015): Molecular biology of the cell. Sixth edition. Garland Science, Taylor and Francis Group, New York.

Aydin E., Türkez H., Taşdemir S. (2013): Anticancer and Antioxidant Properties of Terpinolene in Rat Brain Cells. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology* 64(3): 415-424.

Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M. (2008): Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology* 46(2): 446-475.

Bartoňková I. Dvořák Z. (2018): Essential oils of culinary herbs and spices display agonist and antagonist activities at human aryl hydrocarbon receptor AhR. *Food and Chemical Toxicology* 111: 374-384.

Başer K. H. C., Buchbauer G. (2010): Handbook of essential oils: science, technology, and applications. Boca Raton: CRC Press/Taylor & Francis, New York.

Buchwald P. (2017): A three-parameter two-state model of receptor function that incorporates affinity, efficacy, and signal amplification. *Pharmacology Research & Perspectives*, 5(3).

Calcabrini A., Stringaro A., Toccaceli L., Meschini S., Marra M., Colone M., Salvatore G., Mondello F., Arancia G., Molinari A. (2004): Terpinen-4-ol, The Main Component of *Melaleuca Alternifolia* (Tea Tree) Oil Inhibits the In Vitro Growth of Human Melanoma Cells. *Journal of Investigative Dermatology* 122(2): 349-360.

Chang T. L., Liou P. S., Cheng P. Y., Chang H. N., Tsai P. T. (2018): Borneol and Luteolin from *Chrysanthemum morifolium* Regulate Ubiquitin Signal Degradation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 66(31): 8280-8290.

Chen Z., Xu Q., Shan Ch., Shi Y., Wang Y., Chang R. Ch., Zheng G. (2019): Borneol for Regulating the Permeability of the Blood-Brain Barrier in Experimental Ischemic Stroke: Preclinical Evidence and Possible Mechanism. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2019: 1-15.

Chitrala K. N., Yang X., Nagarkatti P., Nagarkatti M. (2018): Comparative analysis of interactions between aryl hydrocarbon receptor ligand binding domain with its ligands: a computational study. *BMC Structural Biology* 18(1):15.

Croom, E. (2012): Metabolism of xenobiotics of human environments. *Progress in Molecular Biology and Translation Science* 112: 31–88.

Denison M. S., Nagy S. R. (2003): Activation of the Aryl Hydrocarbon Receptor by Structurally Diverse Exogenous and Endogenous Chemicals. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 43(1): 309-334.

Dostálek M., Janoštková E, Juřica J., Zahradníková L. (2006): *Farmakokinetika*. 1. vydání, Grada Publishing, Praha.

Duisken M., Benz D., Peiffer T., Blomeke B., Hollender J. (2005): Metabolism of Δ^3 -Carene by Human Cytochrome P450 Enzymes: Identification and Characterization of Two New Metabolites. *Current Drug Metabolism* 6(6): 593-601.

Ehlert, F. J. (2015): *Affinity and Efficacy: the Components of Drug-Receptor Interactions*. World Scientific, Singapore.

Escriva H., Bertrand S., Laudet V. (2004): The evolution of the nuclear receptor superfamily. *Essays in Biochemistry*: 40: 11-26.

Fabbri, J., Maggiore M. A., Pensel P. E., Albani C. M., Denegri G. M., Elissondo M. C. (2018): Could Beta-Myrcene Be an Alternative to Albendazole for the Treatment of Experimental Cystic Echinococcosis? *Acta Tropica* 187: 5-12.

Farhat A., Fabiano-Tixier A., Visinoni F., Romdhane M., Chemat F. (2010): A surprising method for green extraction of essential oil from dry spices: Microwave dry-diffusion and gravity. *Journal of Chromatography A* 1217(47): 7345-7350.

Farmahin R., Crump D., Kennedy S. W. (2014): Sensitivity of avian species to the aryl hydrocarbon receptor ligand 6-formylindolo [3,2-b] carbazole (FICZ). *Chemico-Biological Interactions* 221: 61-69.

Gonzalez F. J. (1998): The study of xenobiotic-metabolizing enzymes and their role in toxicity in vivo using targeted gene disruption. *Toxicology Letters* 102-103: 161-166.

Guenther E. (1948): *The Essential Oils: History - Origin in Plant - Production - Analysis*. D. Van Nostrand Company, New York, Toronto, London.

Hahn M. E. (2002): Aryl hydrocarbon receptors: diversity and evolution. *Chemico-Biological Interactions* 141(1-2): 131-160.

Hall D. E., Robert J. A., Keeling Ch. I., Domanski D., Quesada A. L., Jancsik S., Kuzyk M. A., Hamberger B., Borchers Ch. H., Bohlmann J. (2011): An integrated genomic, proteomic and biochemical analysis of (+)-3-carene biosynthesis in Sitka spruce (*Picea sitchensis*) genotypes that are resistant or susceptible to white pine weevil. *The Plant Journal* 65(6): 936-948.

Hodgson, E. (2004): *A textbook of modern toxicology*. Third Edition, John Wiley & Sons, Inc. Publication, Canada.

Jancova P., Anzenbacher P., Anzenbacherova E. (2010): Phase II drug metabolizing enzymes. *Biomedical Papers* 154(2): 103-116.

Janošek J., Hilscherová K., Bláha L., Holoubek I. (2006): Environmental xenobiotics and nuclear receptors—Interactions, effects and in vitro assessment. *Toxicology in Vitro* 20(1): 18-37.

Jeong H. G., Lee S. S., Kim H. K., Yang K. H. (1997): Murine Cyp1a-1 Induction in Mouse Hepatoma Hepa-1C1C7 Cells by Myristicin. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 233(3): 619-622.

Jeong H. G., Yun C. (1995): Induction of Rat Hepatic Cytochrome P450 Enzymes by Myristicin. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 217(3): 966-971.

Kewley R. J., Whitelaw M. L., Chapman-Smith A. (2004): The mammalian basic helix–loop–helix/PAS family of transcriptional regulators. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 36(2): 189-204.

Knejzlík Z., Káš J., Ruml T. (2000): Mechanismus vstupu xenobiotik do organismu a jejich detoxikace. *Chemické Listy* 94: 913–918.

Köhle Ch., Bock K.W. (2009): Coordinate regulation of human drug-metabolizing enzymes, and conjugate transporters by the Ah receptor, pregnane X receptor and constitutive androstane receptor. *Biochemical Pharmacology* 77(4): 689-699.

Lawless J. (2002): *The Encyclopedia of Essential Oils: The Complete Guide to the Use of Aromatic Oils In Aromatherapy, Herbalism, Health, and Well Being*. First edition, Red Wheel/Weiser, San Francisco.

Leff P. (1995): The two-state model of receptor activation. *Trends in Pharmacological Sciences* 16(3): 89-97.

Lewis D.F.V., Watson E., Lake B.G. (1998): Evolution of the cytochrome P450 superfamily: sequence alignments and pharmacogenetics. *Mutation Research* 410: 245–270.

Li Y., Li Q., Wang Y., Oh J., Jin S., Park Y., Zhou T., Zhao B., Raun W., Jung M. J. (2018): A reagent-assisted method in SERS detection of methyl salicylate. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 195: 172-175.

Li Z., Njateng G. S. S., He W., Zhang H., Gu J., Chen S., Du Z. (2013): Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oil from the Edible Aromatic Plant *Aristolochia delavayi*. *Chemistry & Biodiversity* 10(11): 2032-2041.

Lin L., Yee S. W., Kim R. B., Giacomini K. M. (2015): SLC transporters as therapeutic targets: emerging opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery* 14(8): 543-560.

Liu B., Kaurilind E., Jiang Y., NiinemetS Ü., Schnitzler J. P. (2018): Methyl salicylate differently affects benzenoid and terpenoid volatile emissions in *Betula pendula*. *Tree Physiology* 38(10): 1513-1525.

Liu M., Amini A., Ahmad Z. (2017): Safranal and its analogs inhibit *Escherichia coli* ATP synthase and cell growth. *International Journal of Biological Macromolecules* 95: 145-152.

Moghaddam M., Mehdizadeh L. (2017): *Chemistry of Essential Oils and Factors Influencing Their Constituents*. *Soft Chemistry and Food Fermentation*, Elsevier 2017: 379-419.

Mollazadeh S., Sahebka A., Hadizadeh F., Behravan J., Arabzadeh S. (2018): Structural and functional aspects of P-glycoprotein and its inhibitors. *Life Sciences* 214: 118-123.

Mulyaningsih S., Sporer F., Zimmermann S., Reichling J., Wink M. (2010): Synergistic properties of the terpenoids aromadendrene and 1,8-cineole from the essential oil of *Eucalyptus globulus* against antibiotic-susceptible and antibiotic-resistant pathogens. *Phytomedicine* 17(13):1061-1066.

Nakata K., Tanaka Y., Nakano T., Adachi T., Tanaka H., Kaminuma T., Ishikawa T. (2006): Nuclear Receptor-Mediated Transcriptional Regulation in Phase I, II, and III Xenobiotic Metabolizing Systems. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 21(6): 437-457.

Nguyen L. P., Bradfield Ch. A. (2008): The Search for Endogenous Activators of the Aryl Hydrocarbon Receptor. *Chemical Research in Toxicology* 21(1): 102-116.

Novotná A., Pávek P., Dvořák Z. (2011): Novel Stably Transfected Gene Reporter Human Hepatoma Cell Line for Assessment of Aryl Hydrocarbon Receptor Transcriptional Activity: Construction and Characterization. *Environmental Science & Technology* 45(23): 10133-10139.

Piras A., Rosa A., Marongiu B., Atzeri A., Dessì M. A., Falconieri D, Porcedda S. (2012): Extraction and Separation of Volatile and Fixed Oils from Seeds of *Myristica fragrans* by Supercritical CO₂: Chemical Composition and Cytotoxic Activity on Caco-2 Cancer Cells. *Journal of Food Science* 77(4): C448-C453.

Poland, A., Glover, E., Kende, A. S. (1976): Stereospecific, high affinity binding of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin by hepatic cytosol. Evidence that the binding species is receptor for induction of aryl hydrocarbon hydroxylase. *J Biol Chem.* 251(16): 4936-4946.

Prüll C., Maehle A., Halliwell R. F. (2009): *A Short History of the Drug Receptor Concept.* Palgrave Macmillan, New York.

Rang H. P., Ritter J. M., Flower R. J., Henderson G. (2015): *Rang & Dale's Pharmacology.* 8th Edition, Elsevier, Churchill Livingstone, London.

Santos P. M., Sá-Correia I. (2009): Adaptation to β -myrcene catabolism in *Pseudomonas* sp. M1: An expression proteomics analysis. *PROTEOMICS* 9(22): 5101-5111.

Sevior D. K., Pelkonen O., Ahokas J. T. (2012): Hepatocytes: The powerhouse of biotransformation. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 44(2): 257-261.

Skálová L., Boušová I., Machala M., Pávek P., Podlipná R., Souček P., Szotáková B., Vondráček J., Wsól V. (2011): *Metabolismus léčiv a jiných xenobiotik.* Karolinum, Praha.

Sogawa K., Fujii-Kuriyama Y. (1997): Ah Receptor, a Novel Ligand-Activated Transcription Factor. *Journal of Biochemistry* 122(6): 1075-1079.

Stephenson R. P. (1956): A MODIFICATION OF RECEPTOR THEORY. *British Journal of Pharmacology and Chemotherapy* 11(4): 379-393.

Stockert Juan C., Blázquez-Castro A., Cañete M., W. Horobin R., Villanueva Á. (2012): MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. *Acta Histochemica* 114(8): 785-796.

Strober W. (2015): Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Current Protocols in Immunology*, 111(1): A3.B.1–A3.B.3.

Tisserand R., Young R. (2013): Essential oil safety: a guide for health care professionals. Second edition, Elsevier, Churchill Livingstone, Edinburgh.

Tiwari, M., Kakkar P. (2009): Plant derived antioxidants – Geraniol and camphene protect rat alveolar macrophages against t-BHP induced oxidative stress. *Toxicology in Vitro* 23(2): 295-330.

Tongnuanchan P., Benjakul S. (2014): Essential Oils: Extraction, Bioactivities, and Their Uses for Food Preservation. *Journal of Food Science* 79(7): R1231-R1249.

Tripathi, K. D. (2013): Essentials of medical pharmacology. Seventh edition, Jaypee Brothers Medical Publishers (P), New Delhi.

Urquhart B. L., Tirona R. G., Kim R. B. (2007): Nuclear Receptors and the Regulation of Drug-Metabolizing Enzymes and Drug Transporters: Implications for Interindividual Variability in Response to Drugs. *The Journal of Clinical Pharmacology* 47(5): 566-578.

Vrzal R., Ulrichová J., Dvořák Z. (2004): Aromatic hydrocarbon receptor status in the metabolism of xenobiotics under normal and pathophysiological conditions. *Biomedical Papers* 148(1): 3-10.

Wang S., Zhang D., Hu J., Jia Q., Xu W., Su D., Song H., Xu Z., Cui J., Zhou M., Yang J., Xiao J. (2017): A clinical and mechanistic study of topical borneol-induced analgesia. *EMBO Molecular Medicine* 9(6): 802-815.

Yang A., He X., Chen J., He L., Jin Ch., Wang L., Zhang L., An L. (2015): Identification and characterization of reactive metabolites in myristicin-mediated mechanism-based inhibition of CYP1A2. *Chemico-Biological Interactions* 237: 133-140.

Yi T., Wang J., Zhu K., Tang Y., Huang S., Shui X., Ding Y., Chen C., Lei W. (2018): Aryl Hydrocarbon Receptor: A New Player of Pathogenesis and Therapy in Cardiovascular Diseases. *BioMed Research International* 2018: 1-11.

Yun C., Lee H. S., Lee H., Yim S. Kim K., Kim E., Yea S., Guengerich F. P. (2003): Roles of human liver cytochrome P450 3A4 and 1A2 enzymes in the oxidation of myristicin. *Toxicology Letters* 137(3): 143-150.

Zhu X., Wang Y., Yang X., Xiao X., Zhang T., Yang X., Qin H., Li F. (2019): Metabolic Activation of Myristicin and Its Role in Cellular Toxicity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 67(15): 4328-4336.