

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Screening vlivu komponent vybraných
esenciálních olejů na aktivitu
aryluhlovodíkového receptoru**

Diplomová práce

Bc. Adéla Marcalíková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2020

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

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
Přírodovědecká fakulta
Akademický rok: 2018/2019

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE
(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Adéla MARCALÍKOVÁ**
Osobní číslo: **R18933**
Studijní program: **N1501 Biologie**
Studijní obor: **Molekulární a buněčná biologie**
Název tématu: **Screening vlivu komponent vybraných esenciálních olejů na aktivitu aryluhlovodíkového receptoru**
Zadávací katedra: **Katedra buněčné biologie a genetiky**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1) Vypracování rešerše na téma diplomové práce 2) Stanovení aktivity aryluhlovodíkového receptoru metodou reporter gene assay 3) Detekce indukce exprese CYP1A1 po aplikaci vybraných komponent esenciálních olejů 4) Vypracování diplomové práce a multimediální prezentace k obhajobě diplomové práce

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné 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

Vedoucí diplomové práce:

doc. Ing. Radim Vrzal, Ph.D.

Katedra buněčné biologie a genetiky

Datum zadání diplomové práce:

12. října 2018

Termín odevzdání diplomové práce:

31. července 2020

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.
děkan

L.S.

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA BUNĚČNÉ BIOLIE A GENETIKY
Šteklanova 27, 782 01 Olomouc
tel. +420 58 563 1111
23

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.
vedoucí katedry

V Olomouci dne

Bibliografické údaje

Jméno a příjmení autora: Bc. Adéla Marcalíková

Název práce: Screening vlivu komponent vybraných esenciálních olejů na aktivitu aryluhlovodíkového receptoru

Typ práce: diplomová

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

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

Rok obhajoby práce: 2020

Souhrn: Aryluhlovodíkový receptor (AhR) je ligandy-aktivovaný transkripční faktor, který je tradičně znám jako receptor zprostředkující toxické účinky environmentálních polutantů, přestože v poslední době se ukazuje, že má význam i ve fyziologii, např. pro imunitu či homeostázu kůže. Cílem této diplomové práce je prozkoumat aktivitu jednotlivých komponent jasmínového esenciálního oleje, u kterého byla dříve popsána plně agonistická aktivita vůči AhR, a u vybrané komponenty dále charakterizovat její vztah k AhR. Pomocí Reporter Gene Assay bylo popsáno šest aktivních látek – indol, eugenol, jasmon, jasmonolakton, linalool a farnesen. Jasmon, látka s antagonistickými účinky, byla vybrána pro další analýzy. Látka byla testována vůči dvěma zavedeným ligandům – 2,3,7,8-tetrachlordibenzo-p-dioxinu (TCDD) a 6-formylindol[3,2-b]karbazolu (FICZ). Konzistentně s daty z Reporter gene assay, jasmon snižoval účinky indukované pomocí TCDD, jak bylo zjištěno metodami Real-time PCR, Western blotting, Glo-Assay a chromatinové imunoprecipitace. Oproti tomu stejný efekt nebyl pozorován v kombinaci s FICZ – v tomto případě se antagonistické účinky projevíly pouze při užití metody Reporter gene assay. To naznačuje, že se jasmon dá využít jako látka působící proti perzistentním ligandům AhR.

Klíčová slova: aryluhlovodíkový receptor, esenciální oleje, jasmínový esenciální olej, jasmon, antagonismus

Počet stran: 64

Počet příloh: 1

Jazyk: CZ

Bibliographical identification

Author's first name and surname: Bc. Adéla Marcalíková

Title: Screening of selected essential oils' components for aryl hydrocarbon receptor activity

Type of thesis: master

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

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

The year of presentation: 2020

Summary: Aryl hydrocarbon receptor (AhR) is a ligand-activated transcription factor that has been traditionally known as a receptor that mediates toxic effects of environmental pollutants, though lately it has been shown that it also has a role in physiology, e. g. in immunity or skin homeostasis. The aim of the diploma thesis is to investigate the activity of individual components of the jasmine essential oil, which has been shown previously to have AhR-full agonist properties, with the goal to explore properties of a selected component in relation to AhR. By the means of Reporter gene assay, six AhR-active compounds have been described – indole, eugenol, jasmone, jasmonolactone, linalool and farnesene. Jasmone, a compound with antagonistic properties, was chosen for further analysis. The compound was tested against established ligands – 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) and 6-formylindolo[3,2-b]carbazole (FICZ). Consistently with reporter gene assay, jasmone decreased the effects induced by TCDD as assayed by the means of Real-time PCR, Western blotting, Glo-Assay and Chromatin immunoprecipitation. On the other hand, this was not observed in combination with FICZ, as jasmone antagonized this ligand only in Reporter gene assay. This suggests that jasmone could be used as a compound acting against persistent AhR ligands.

Keywords: aryl hydrocarbon receptor, essential oils, jasmine essential oil, jasmone, antagonism

Number of pages: 64

Number of appendices: 1

Language: CZ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením doc. Ing. Radima Vrzála, Ph.D. a za použití uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci dne.....

.....
Adéla Marcalíková

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucímu práce, doc. Ing. Radimu Vrzalovi, Ph.D., za odborné vedení, trpělivost a vstřícnost. Mé díky patří rovněž kolektivu Laboratoře molekulární farmakologie a toxikologie za jejich ochotu pomoci během mého působení na pracovišti.

Děkuji za finanční podporu internímu grantu Univerzity Palackého PrF-2020-006.

Obsah

1.	Úvod	1
2.	Cíle práce.....	2
3.	Literární přehled	3
3.1.	Arylhlovodíkový receptor.....	3
3.1.1.	Signální dráha AhR	4
3.1.2.	Role v biotransformaci	6
3.1.3.	Role v kůži.....	6
3.1.4.	Role v gastrointestinálním systému	8
3.2.	Esenciální oleje.....	9
3.2.1.	Jasmínový esenciální olej	10
3.2.2.	Biologická aktivita a význam složek jasmínového esenciálního oleje	12
3.3.	Terapeutický potenciál AhR.....	14
4.	Materiál a metody	15
4.1.	Biologický materiál	15
4.2.	Použité chemikálie, soupravy a roztoky	15
4.3.	Seznam použitých přístrojů a zařízení	19
4.4.	Použité experimentální a vyhodnocovací postupy	20
4.4.1.	Reporter gene assay	20
4.4.2.	MTT assay	20
4.4.3.	Real-time PCR.....	21
4.4.4.	Western blotting (WB)	22
4.4.5.	P450-Glo CYP1A1 assay	22
4.4.6.	Chromatinová imunoprecipitace (ChIP).....	23
5.	Výsledky.....	25
5.1.	Analýza aktivity složek jasmínového esenciálního oleje	25
5.1.1.	Stanovení životaschopnosti po ošetření AhR-aktivními látkami.....	28
5.2.	Analýza antagonistických účinků jasmonu	31
5.2.1.	Vliv na transkripční aktivitu indukovanou různými ligandy	31
5.2.2.	Vliv na expresi CYP1A1	33
5.2.3.	Vliv na aktivitu CYP1A1	35
5.2.4.	Vliv na expresi AhR a ARNT.....	35
5.2.5.	Cross-talk s hypoxickou signalizací	37
5.2.6.	Vliv na vazbu do promotoru CYP1A1	39
6.	Diskuze.....	41
7.	Závěr.....	45

8.	Literatura	46
9.	Přílohy	64

Seznam symbolů a zkratek

AA/Bis	Akrylamid-bisakrylamid
AhR	Aryluhlovodíkový receptor (aryl hydrocarbon receptor)
AhRR	Aryl hydrocarbon receptor represor
AIP	Aryl hydrocarbon receptor interacting protein
AP-1	Activation protein 1
APS	Persíran amonný
ARNT	Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator
BaP	Benzo[a]pyren
bHLH	Basic helix-loop-helix
BSA	Telecí sérový albumin (bovinne serum albumin)
CYP	Cytochrom P450
DFX	Desferrioxamin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiotreitol
EC80	80% efektivní koncentrace
EDTA	Kyselina ethylendiamintetraoctová
FBS	Fetální telecí sérum (fetal bovinne serum)
FICZ	6-formylindol[3,2-b]karbazol
GABA _A	Gamma-aminobutyric acid receptor A
GAPDH	Glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenáza
HIF	Hypoxia inducible factor
HSP90	Heat shock protein 90 kDa
I3C	Indol-3-karbinol
IC50	50% inhibiční koncentrace
ICZ	Indol[3,2-b]karbazol
IL-22	Interleukin-22
ITE	Methylester kyseliny 2-(1'-H-indol-3'-karbonyl)-thiazol-4-karboxylové
LBD	Ligand-vazebná doména
MTT	Methylthiazolyldifenyltetrazolium bromid
Nrf2	Nuclear factor erythroid 2-related factor 2
NT	Netestováno
PAS	Per-ARNT-Sim
PBS	Phosphate buffered saline
PIC	Protease inhibitor coctail

PPAR	Receptor pro peroxizomové proliferátory
SDS	Dodecylsírán sodný
Sp1	Specificity protein 1
TAD	Transaktivační doména
TBS	Tris buffered saline
TCDD	2,3,7,8-tetrachlordibenzo-p-dioxin
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
TRP	Transient receptor potential
UPL	Universal probe library
VEGF-A	Vaskulární endotelový růstový faktor
XRE	Xenobiotic response element

Seznam obrázků

Obrázek 1: Struktura AhR.....	3
Obrázek 2: Signální dráha AhR.....	5
Obrázek 3: Tvorba FICZ.....	7
Obrázek 4: Produkty získávané z přírodního materiálu	10
Obrázek 5: Transkripční aktivita AhR v buněčné linii AZ-AhR po 4 h inkubace s minoritními složkami jasmínového esenciálního oleje.....	26
Obrázek 6: Transkripční aktivita AhR v buněčné linii AZ-AhR po 24 h inkubace s minoritními složkami jasmínového esenciálního oleje.....	27
Obrázek 7: Viabilita buněčné linie AZ-AhR po 4 h inkubace s AhR-aktivními složkami jasmínového esenciálního oleje..	29
Obrázek 8: Viabilita buněčné linie AZ-AhR po 24 h inkubace s AhR-aktivními složkami jasmínového esenciálního oleje..	30
Obrázek 9: Inhibice indukované transkripční aktivity AhR po 4 h inkubace s jasmonem v buněčné linii AZ-AhR.....	32
Obrázek 10: Inhibice indukované transkripční aktivity AhR po 24 h inkubace s jasmonem v buněčné linii AZ-AhR.	33
Obrázek 11: Bazální a indukovaná exprese CYP1A1 po ošetření jasmonem v buněčné linii HepG2 po 24 h na úrovni RNA.	34
Obrázek 12: Bazální a indukovaná exprese CYP1A1 po ošetření jasmonem v buněčné linii HepG2 po 24 h na úrovni proteinu.....	34
Obrázek 13: Bazální a indukovaná aktivita CYP1A1 po ošetření jasmonem v buněčné linii HepG2 po 24 h na úrovni RNA	35
Obrázek 14: Ovlivnění exprese AhR jasmonem samotným či v kombinaci s TCDD nebo FICZ v buněčné linii HepG2 po 24 h na úrovni RNA.	36
Obrázek 15: Ovlivnění exprese AhR jasmonem samotným či v kombinaci s TCDD nebo FICZ v buněčné linii HepG2 po 24 h na úrovni proteinu.	36
Obrázek 16: Ovlivnění exprese ARNT jasmonem samotným či v kombinaci s TCDD nebo FICZ v buněčné linii HepG2 po 24 h na úrovni RNA.	37
Obrázek 17: Ovlivnění exprese ARNT jasmonem samotným či v kombinaci s TCDD nebo FICZ v buněčné linii HepG2 po 24 h na úrovni proteinu.	37
Obrázek 18: Bazální a indukovaná exprese VEGF-A po ošetření jasmonem v buněčné linii HepG2 po 24 h na úrovni RNA	38
Obrázek 19: Vliv jasmonu na expresi CYP1A1, AhR a ARNT při koinkubaci s desferrioxaminem v buněčné linii HepG2 po 24 h na úrovni RNA	39

Obrázek 20: Analýza vazby AhR do promotoru CYP1A1 po ošetření jasmonem v buněčné linii HepG2 po 90 min.	40
Obrázek 21: Reprezentativní snímek analýzy vazby AhR do promotoru CYP1A1 po ošetření jasmonem v buněčné linii HepG2 po 90 min	40

Seznam tabulek

Tabulka 1: Složení jasmínového oleje.....	11
Tabulka 2: Klasifikace testovaných látek ve vztahu k AhR.....	28
Tabulka 3: 50% inhibiční koncentrace jasmonu	32

1. Úvod

Lidské tělo přichází denně do styku s nepřeberným množstvím exogenních látek, které ho mohou různým způsobem ovlivňovat. Tyto látky mohou své účinky na buněčné úrovni realizovat prostřednictvím různých proteinů. Četným cílem exogenních látek, jinak řečeno xenobiotik, je aryluhlovodíkový receptor. Ten může být aktivován řadou látek, od environmentálních polutantů přes přírodní látky až po mikrobiální metabolity. Přestože byl tento protein původně popsán jako xenoreceptor zprostředkující účinky 2,3,7,8-tetrachlordibenzo-p-dioxinu a jiných polutantů a jeho fyziologická role byla nejasná, je dnes více než evidentní, že má velký význam v homeostázi kůže, trávicího traktu či v imunitním systému. Deregulace signalizace tímto receptorem se zde, dle současných poznatků, může projevovat například rozvojem autoimunitních chorob.

V této souvislosti lze však uvažovat i o využití receptoru jako terapeutického cíle, za předpokladu, že dané látky nebudou vykazovat toxické účinky, které jsou pro řadu tzv. klasických ligandů tohoto receptoru charakteristické. Jelikož byla popsána řada ligandů mezi flavonoidy a jinými přírodními látkami, je příhodné v tomto směru obrátit pozornost k rostlinám a produktům jejich metabolismu.

Tato práce si klade za cíl prozkoumat terapeutický potenciál AhR-aktivních přírodních látek obsažených v esenciálních olejích.

2. Cíle práce

Cílem této práce je analýza vlivu minoritních složek jasmínového esenciálního oleje na transkripční aktivitu aryluhlovodíkového receptoru metodou Reporter gene assay, dále pak charakterizace vlastností vybrané komponenty esenciálního oleje ve vztahu k receptoru – hodnocení schopnosti indukovat typický cílový gen cytochrom P450 1A1, a dále analýza vlivu dané složky na aryluhlovodíkový receptor a jeho dimerizačního partnera.

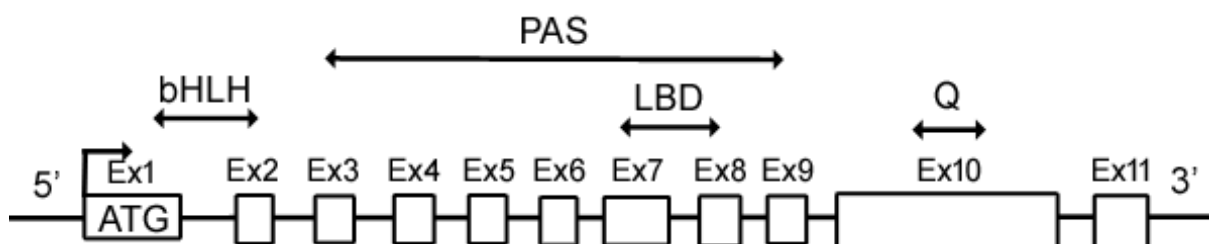
3. Literární přehled

3.1. Arylhydroxidový receptor

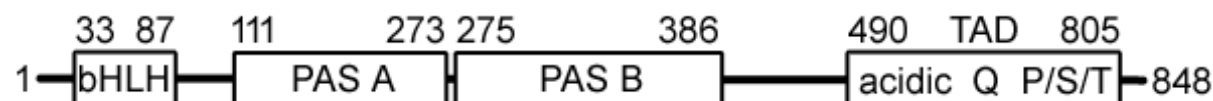
Arylhydroxidový receptor (AhR) je ligandy-aktivovaný transkripční faktor, který náleží do rodiny Per-ARNT-Sim (PAS) proteinů, jež se podílí na integraci podnětů z prostředí (Gu et al., 2000). AhR byl původně identifikován jako receptor zprostředkující toxické účinky 2,3,7,8-tetrachlordibenzo-p-dioxinu (TCDD), vedlejšího produktu syntézy herbicidu 2,4,5-trichlorfenoxyoctové kyseliny (Poland *et al.*, 1976).

Gen kódující receptor je lokalizován na chromozomu 7p21 (Ema *et al.*, 1994) a je tvořen celkem 11 exony (obrázek 1A). Receptor je exprimován takřka ve všech tkáních, přičemž nejvyšší množství je v plicích, placentě a slezině (Yamamoto *et al.*, 2004). Je obecně přijímáno, že míra exprese AhR v dané tkáni reflektuje využití této signální dráhy (Abel *et Haarmann-Stemmann*, 2010). Vysoká exprese v tkáních, které přicházejí do styku s podněty z vnějšího prostředí, vypovídá o jeho chemoprotektivní funkci.

A



B



Obrázek 1: Struktura AhR. A – struktura lokusu (upraveno podle Cauchi *et al.*, 2001), B – struktura proteinu (upraveno podle Schulte *et al.*, 2017). PAS – Per-ARNT-Sim doména, bHLH – basic helix-loop-helix doména, LBD – ligand-vazebná doména, Q – sekvence bohatá na glutamin, Ex1–11 – exony 1–11, ATG – START kodon, TAD – transaktivní doména, acidic – sekvence kyselých aminokyselin, P/S/T – sekvence bohatá na prolin/serin/threonin.

AhR je tvořen 848 aminokyselinovými zbytky a skládá se z několika funkčních domén (obrázek 1B). Domény mají význam pro interakci s jinými proteiny (viz kapitola 3.1.1.). V N-koncové části se nachází tzv. bHLH (basic helix-loop-helix) doména – tvoří ji sekvence bazických aminokyselin, následovaná dvěma α -helixy propojenými smyčkou, která zprostředkovává vazbu na DNA. Tato doména je konzervovaná napříč eukaryoty a je přítomna v proteinech účastnících se různých vývojových procesů (Jones, 2004). Součástí N-terminální části je také jaderný lokalizační a jaderný exportní signál (Ikuta *et al.*, 1998). Dalšími funkčními prvky receptoru jsou dvě PAS domény, PAS-A a PAS-B, ty se společně s bHLH doménou účastní dimerizace s ARNT (aryl hydrocarbon nuclear translocator) (Gu *et al.*, 2000). Rovněž HSP90 (heat shock protein 90) vyžaduje pro vazbu bHLH a PAS domény (Fukunaga *et al.*, 1995). PAS-B se účastní vazby ligandu (Fukunaga *et al.*, 1995). C-koncová zóna, tzv. transaktivační, obsahuje sekvenci bohatou na kyselé aminokyseliny, na glutamin a na prolin/serin/threonin, kde dochází k vazbě koaktivátorů (Jain *et al.*, 1994; Ko *et al.*, 1997). Různé ligandy způsobují v různých buněčných typech asociaci s různými koaktivátory (Zhang *et al.*, 2008).

AhR váže hydrofobní nízkomolekulární látky exogenního původu širokého spektra chemické struktury, od planárních aromatických uhlovodíků (halogenovaných a polyaromatických), jež jsou považovány za tzv. klasické ligandy, až po přírodní látky či metabolity arachidonové kyseliny (Denison *et al.*, 2003). Mnoho ligandů se nachází mezi přírodními polyfenoly, jako jsou resveratrol, quercetin nebo kurkumin. Tyto látky vykazují jak agonistické, tak antagonistické účinky včetně selektivních modulačních účinků (Xue *et al.*, 2017).

Receptor byl dlouho považován za tzv. sirotčí receptor, tedy receptor s neznámým či neexistujícím fyziologickým ligandem, přestože práce o přítomnosti tryptofanových fotoproduktů se silnou afinitou vůči AhR, tedy potenciálními ligandy, se datují do 80. let minulého století (Rannug *et al.*, 1987). V roce 1995 pak byla popsána sloučenina, která má z nich nejvyšší afinitu, 6-formylindol[3,2-b]karbazol (FICZ) (Rannug *et al.*, 1995). Význam tryptofanových fotoproduktů jako přirozených ligandů začal být obecně přijímán až mnohem později (Nguyen *et al.*, 2008). Methylester kyseliny 2-(1'-H-indol-3'-karbonyl)-thiazol-4-karboxylové (ITE), který byl izolován z prasečí plicní tkáně, je díky jeho velké afinitě vůči AhR rovněž považován za potenciální endogenní ligand, jeho význam v organismu je však zatím nejistý (Song *et al.*, 2002; Henry *et al.*, 2006). K endogenním, ale nízkofinitním látkám vázajícím se na AhR patří takové látky jako indigo, indirubin nebo kynurenin (Hubbard *et al.*, 2015a).

3.1.1. Signální dráha AhR

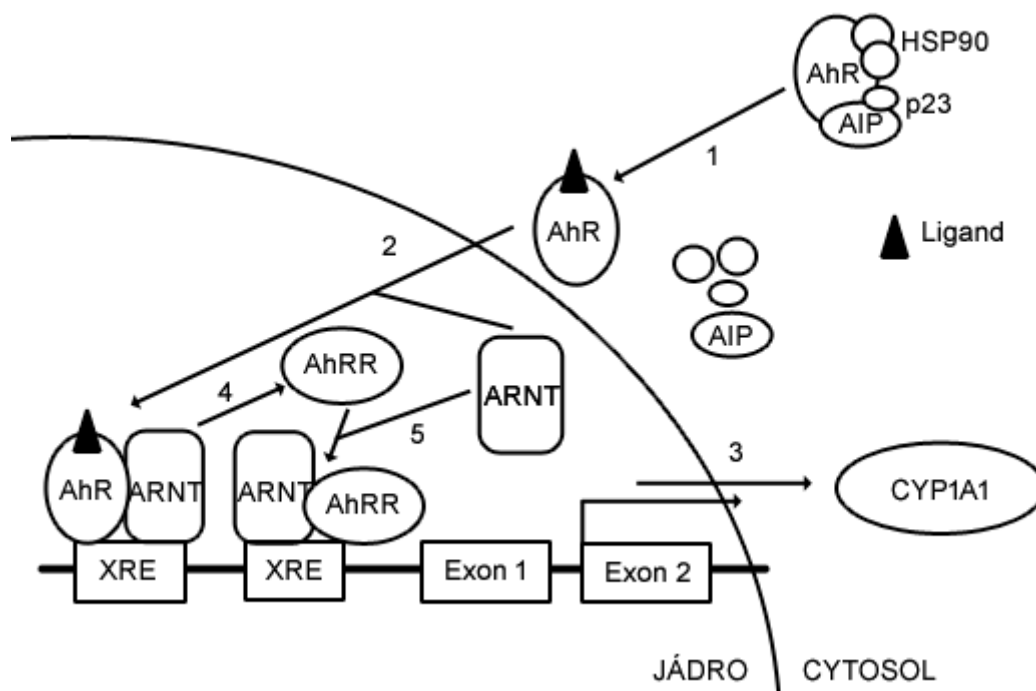
AhR je přítomen v cytosolu v komplexu s dvěma HSP90, AIP (AhR interacting protein) a p23. AIP se podílí na ochraně receptoru před ubiquitinací (Kazlaukas *et al.*, 2000). HSP90 brání samovolné vazbě AhR na DNA a umožňuje vazbu ligandu (Pongratz *et al.*, 1992), ko-chaperon p23 umožňuje

AhR reagovat na ligand (Kazlauskas *et al.*, 1999). Společně se pak komplex HSP90 a p23 účastní intracelulární lokalizace AhR (Kazlauskas *et al.*, 2001).

Vazbou ligandu na receptor dochází k translokaci do jádra a dimerizaci s ARNT, společně pak spouští transkripci cílových genů receptoru (obrázek 2). Heterodimer AhR-ARNT rozeznává sekvenci 5'-T/NGCGTG-3' (kde „N“ značí kterýkoliv nukleotid), nazývanou XRE (xenobiotic response element) přičemž AhR se váže do 5'-T/NGC-3', zatímco ARNT do 5'-GTG-3' (Swanson *et al.*, 1995). Signální dráha je ukončena proteasomální degradací receptoru (Davarinis *et al.*, 1999).

Gen pro cytochrom P450 1A1 (CYP1A1) je prototypem cílového genu AhR (Whitlock, 1999). AhR též reguluje expresi represoru AhRR (AhR repressor), čímž negativně zpětnovazebně reguluje vlastní signalizaci. Děje se tak kompeticí s AhR o vazbu na ARNT, jelikož je AhRR strukturně podobný AhR s výjimkou domény PAS-B, která u AhRR chybí, a nemůže tak vázat ligand (Mimura *et al.*, 1999). Dalším cílovým genem s podobnou funkcí je TCDD-indukovatelná poly-ADP-ribóza-polymeráza (Ma *et al.*, 2001), která se účastní transkripční represe AhR (MacPherson *et al.*, 2013).

Mimo tuto klasickou, tzv. kanonickou dráhu, funguje AhR též jako E3-ubikvitin ligáza v komplexu CUL4B (Ohtake *et al.*, 2007).



Obrázek 2: Signální dráha AhR (upraveno podle Monostory *et al.*, 2009). Vazbou ligandu na receptor dochází k disociaci přidružených proteinů (1), AhR vstupuje do jádra a v komplexu s ARNT spouští transkripci cílového genu (2), zde genu pro CYP1A1, čímž dochází ke zvýšení hladiny mRNA a následně i proteinu CYP1A1 (3). Dimer AhR s ARNT rovněž indukuje expresi represoru AhRR (4), který dimerizuje s AhR namísto ARNT a další transkripce je utlumena (5).

AhR – aryluhvodíkový receptor, AhRR – AhR represor, XRE – xenobiotic response element, HSP90 – heat-shock protein 90, AIP – AhR interacting protein.

3.1.2. Role v biotransformaci

AhR indukuje koordinovaně regulovanou skupinu detoxifikačních genů, takzvanou aryluhlovodíkovou genovou baterii, do které lze zařadit enzymy I. fáze biotransformace, jako CYP1A1 a 1A2, NAD(P)H:chinon oxidoreduktázu a aldehyddehydrogenázu 3, a též enzymy II. fáze, jako UDP-glukuronosyltransferázu 1A6 a glutathion-S-transferázu A1 (Nebert *et al.*, 2000). Indukce těchto enzymů je typická pro expozici řadou toxických environmentálních polutantů, jako jsou polychlorované dibenzo-p-dioxiny, dibenzofurany a bifenyly. Závislost mezi chemickou strukturou těchto látek a jejich aktivitou na receptoru vedla k ustavení konceptu tzv. toxických ekvivalenčních faktorů pro odhad rizik spojených s expozicí (Safe, 2008).

AhR reguluje expresi rodiny 1 cytochromů P450, jmenovitě 1A1 (Whitlock, 1999), 1A2 (Li *et al.*, 1998) a 1B1 (Sutter *et al.*, 1994). Geny pro CYP1A2 a 1B1 vznikly z 1A1 genovou duplikací – 1A2 před 380 miliony let, zatímco evolučně starší 1B1 v období před 400–600 miliony let (Nelson *et al.*, 1996). Geny CYP1A1 a CYP1A2 spolu sdílí dvousměrný promotor (Jorge-Nebert *et al.*, 2010). Substrátová specifita CYP1A1 a CYP1B1 se částečně překrývá – podílí se na metabolismu planárních polyaromatických uhlovodíků, zatímco CYP1A2 se spíše účastní metabolismu arylaminů a heterocyklických aminů (Shimada, 2006). Pro CYP1A2 je charakteristická téměř výhradní jaterní exprese, zatímco CYP1A1 a 1B1 jsou exprimovány v řadě mimojaterních tkání. CYP1A1 je exprimován hlavně v plicích a průdušnici, CYP1B1 má vysokou expresi v prostatické tkáni, děložce, ledvinách či slezině (Bièche *et al.*, 2007). Enzymy metabolizují řadu xenobiotik, jako je kofein, theofylin, paracetamol, lidokain či warfarin (Shimada, 2006). Endogenními substráty těchto enzymů jsou eikosanoidy (Nebert *et Karp*, 2008), melatonin (Härtter *et al.*, 2001) nebo estrogény (Zhu *et Lee*, 2005).

K agonistům AhR patří produkt spalování benzo[a]pyren (BaP) (Denison *et Wilkinson*, 1985). AhR se metabolickou aktivací pomocí CYP1A1 podílí na jeho karcinogenitě (Shimizu *et al.*, 2000).

3.1.3. Role v kůži

O významu AhR v kůži není pochyb už od spojení expozice TCDD s rozvojem chlorakné (Suskind, 1985). Kennedy *et al.* (2013) uvádí, že TCDD pozměňuje expresi 40 % genů v klastru na chromozomu 1, které se podílejí na diferenciaci pokožky.

Receptor je v kůži exprimován v různých buněčných typech – keratinocytech, melanocytech, fibroblastech či sebocytech, a rovněž také v rozptýlených imunitních buňkách, jako jsou Langerhansovy buňky, žírné buňky a $\gamma\delta$ T-lymfocyty (Esser *et al.*, 2013). V keratinocytech je signalizace receptorem nezbytná k jejich správné diferenciaci (van de Bogaard *et al.*, 2015). Mimoto TCDD indukuje přeměnu mazových žláz do tkáně podobné keratinocytům (Ju *et al.*, 2011). Aktivace AhR vede také k indukci aktivity tyrosinázy, enzymu podílejícímu se na tvorbě melaninu, a rovněž zvyšuje množství melaninu v melanocytech (Luecke *et al.*, 2010). AhR má vliv na integritu ochranné kožní bariéry (Haas *et al.*, 2016).

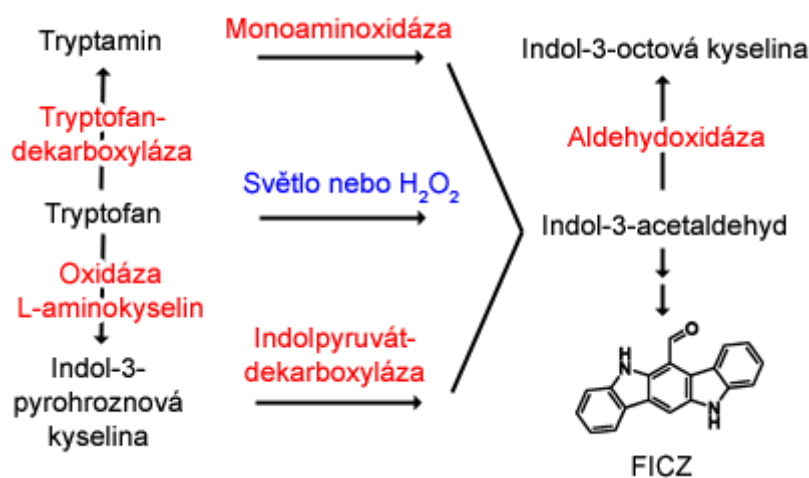
FICZ, pravděpodobný fyziologický ligand receptoru, má pro AhR signalizaci (nejen) v kůži velký význam. Jeho přítomnost byla prokázána v extraktech z imortalizovaných keratinocytů ozářených UVB zářením (Fritsche *et al.*, 2007), tvorbu FICZ *in vivo* potvrzuje i skutečnost, že metabolity FICZ byly detekovány v lidské moči (Smirnova *et al.*, 2016). FICZ se tvoří spontánně z tryptofanu po ozáření viditelným světlem či UV zářením a je substrátem pro CYP1A1, 1A2 a 1B1, čímž dochází k transientní aktivaci AhR (Wincent *et al.*, 2009). Již byly popsány i potenciální dráhy tvorby FICZ na světle nezávislé (Smirnova *et al.*, 2016, obrázek 3).

Ligandy AhR mohou produkovat také mikroorganismy osidlující kůži. Patogenní kvasinky rodu *Malassezia* (*Malassezia* sp.) jsou schopny vytvářet FICZ, indol[3,2-b]karbazol (ICZ) a indirubin. Také u jiných produktů těchto kvasinek byla prokázána aktivace AhR, jmenovitě u malassezinu a pityriacitrinu (Magiatis *et al.*, 2013).

AhR se zdá být slibným terapeutickým cílem pro léčbu zánětlivých onemocnění kůže. Uhelný dehet, jenž se historicky používal pro léčbu atopického ekzému, aktivuje AhR, indukuje diferenciaci epidermálních buněk, obnovuje tvorbu proteinů kožní bariéry a snižuje typické projevy ekzému (van de Bogaard *et al.*, 2013). Podobné projevy byly pozorovány při aplikaci FICZ či klinicky užívaného sójového dehtu (Tsuji *et al.*, 2017). Také indol-3-aldehyd, mikrobiální metabolit tryptofanu, snižuje zánět spojený s atopickým ekzémem a jeho přítomnost je asociována s fyziologickým stavem kůže (Yu *et al.*, 2019).

FICZ snižuje zánět v kožním štěpu pacientů s lupénkou, zatímco antagonist AhR, sloučenina CH-223191 zánět zvyšuje. Zánětlivou reakci, dle Di Meglio *et al.* (2014), zde zprostředkovávají především keratinocyty, z menší části kožní fibroblasty.

V současné době je vyvíjen přípravek s názvem tapinarof pro léčbu atopického ekzému (Peppers *et al.*, 2019) a lupénky (Robbins *et al.*, 2019), u něhož je deklarován mechanismus účinku skrz AhR.



Obrázek 3: Tvorba FICZ (upraveno podle Rannug *et Rannug*, 2018). Červeně jsou zaznačeny enzymy účastníci se reakcí, modře další faktory ovlivňující chemické přeměny.

3.1.4. Role v gastrointestinálním systému

Vysoká exprese AhR je v tenkém střevě, sestupném tračniku a konečníku (Frericks *et al.*, 2007). AhR se podílí na diferenciaci intestinálních epiteliálních buněk, jako jsou enterocyty a pohárkové buňky, z kmenových buněk ve střevních kryptách (Metidji *et al.*, 2018). Aktivace AhR se projevuje zvýšením počtu pohárkových buněk, které zajišťují tvorbu mucinu, zatímco delece receptoru vede k jejich ztrátě (Yin *et al.*, 2019). Určitou funkci má AhR nejen v pohárkových, ale i v Panethových buňkách, jenž sekretují různé obranné látky (Park *et al.*, 2018). Aktivita AhR je klíčová také pro přirozené lymfoidní buňky ROR γ ⁺, které se usazují ve shlucích lymfoidní tkáně, tzv. cryptopatches, a indukují tvorbu izolovaných lymfoidních folikulů ve střevech (Kiss *et al.*, 2011). Receptor se dále podílí na udržování intraepiteliálních lymfocytů – T-lymfocytů rozestých mezi buňkami epitelu střeva (Li *et al.*, 2011). AhR se dále podílí se na fyziologickém stavu sliznic tlustého střeva tím, že napomáhá udržovat integritu těsných spojů (Yu *et al.*, 2018).

V trávicím traktu hrají důležitou roli ligandy přijímané ve stravě – řada AhR-aktivních látek pochází z košťálové zeleniny (*Brassica* sp.). Prekurzorem takových sloučenin, tzv. glukosinolátů, je glukobrassicin. První krok tvorby je katalyzován myrosinázou, enzymem, který se uvolňuje z rostlinných pletiv mechanickým rozmělněním. Dalšími neenzymatickými reakcemi vznikají za různých podmínek indol-3-karbinol (I3C), 3,3'-diindolylmethan a ICZ. Všechny tyto produkty jsou silnými ligandy AhR (Loub *et al.*, 1975; Bjeldanes *et al.*, 1991). Flavonoidy, polyfenolické látky obsažené v lidském jídelníčku v podobě ovoce a zeleniny (Ross *et al.*, 2002), také vykazují spektrum agonistických a antagonistických aktivit, přestože jsou jejich účinky slabší než u glukosinolátů (Zhang *et al.*, 2003). Typickými příklady takových látek jsou quercetin a kaempferol (Ciolino *et al.*, 1999).

Řadu ligandů produkují rovněž střevní mikroorganismy (Lamas *et al.*, 2018). K mikrobiálním ligandům AhR se tak řadí takové látky, jako je indol a 3-methylindol (Hubbard *et al.*, 2015b), indol-3-acetát a tryptamin (Jin *et al.*, 2014), kyselina indol-3-mléčná (Cervantes-Barragan *et al.*, 2017), indol-3-pyruvát (Aoki *et al.*, 2018), indol-3-aldehyd a indol-3-acetaldehyd (Zelante *et al.*, 2013). Producenty ligandů AhR jsou *Lactobacillus* sp. (Zelante *et al.*, 2013, Lamas *et al.*, 2016), *Peptostreptococcus russellii* (Włodarska *et al.*, 2017) a *Propionibacterium freudenreichii* (Fukumoto *et al.*, 2014). Produkce indolu byla zaznamenána u celé řady střevních bakterií, kupříkladu u *Escherichia coli*, *Clostridium* sp., *Bacteroides* sp., *Enterococcus faecalis* a dalších, rody *Clostridium* a *Bacteroides* produkují i řadu dalších ligandů AhR jako 3-methylindol, indol-3-acetát a indol-3-mléčnou kyselinu, na přítomnosti posledních dvou se podílí třeba i *Bifidobacterium* sp. (Roager *et al.*, 2018).

Expres AhR je snížena u pacientů trpících chronickými střevními záněty (Monteleone *et al.*, 2011), i zde lze tak uvažovat o využití AhR jak terapeutického cíle. Ke studiu chronických střevních zánětů se využívá hlodavčích modelů s chemicky vyvolanou kolitidou, nejčastěji dextran-sulfátem sodným či trinitrobenzensulfonovou kyselinou (Randhawa *et al.*, 2014). Příkladem může být

preklinická studie, ve které podáním lignanu magnololu myším došlo ke zvýšení sérové hladiny tryptofanových metabolitů, jež jsou aktivátory AhR, což ve výsledku vedlo ke zmírnění kolitidy indukované dextransulfátem sodným (Zhao *et al.*, 2017). Zánět je rovněž možné zmírnit přítomností bakterií, které dovedou metabolizovat tryptofan na ligandy AhR, či v přítomnosti ligandů AhR samotných (Lamas *et al.*, 2016). Podání FICZ také zmírnilo příznaky chemicky indukované kolitidy u myši, což bylo provázeno sníženou hladinou interferonu γ a indukcí interleukinu-22 (IL-22), zatímco podání antagonisty, 2-methyl-2H-pyrazol-3-karboxylové kyseliny, vedlo k prohloubení projevů kolitidy a k nižší úrovni IL-22 (Monteleone *et al.*, 2011). AhR je totiž nezbytný pro expresi interleukinu-22 Th17 buňkami (Veldhoen *et al.*, 2008), patří mezi cílové geny AhR (Yeste *et al.*, 2014).

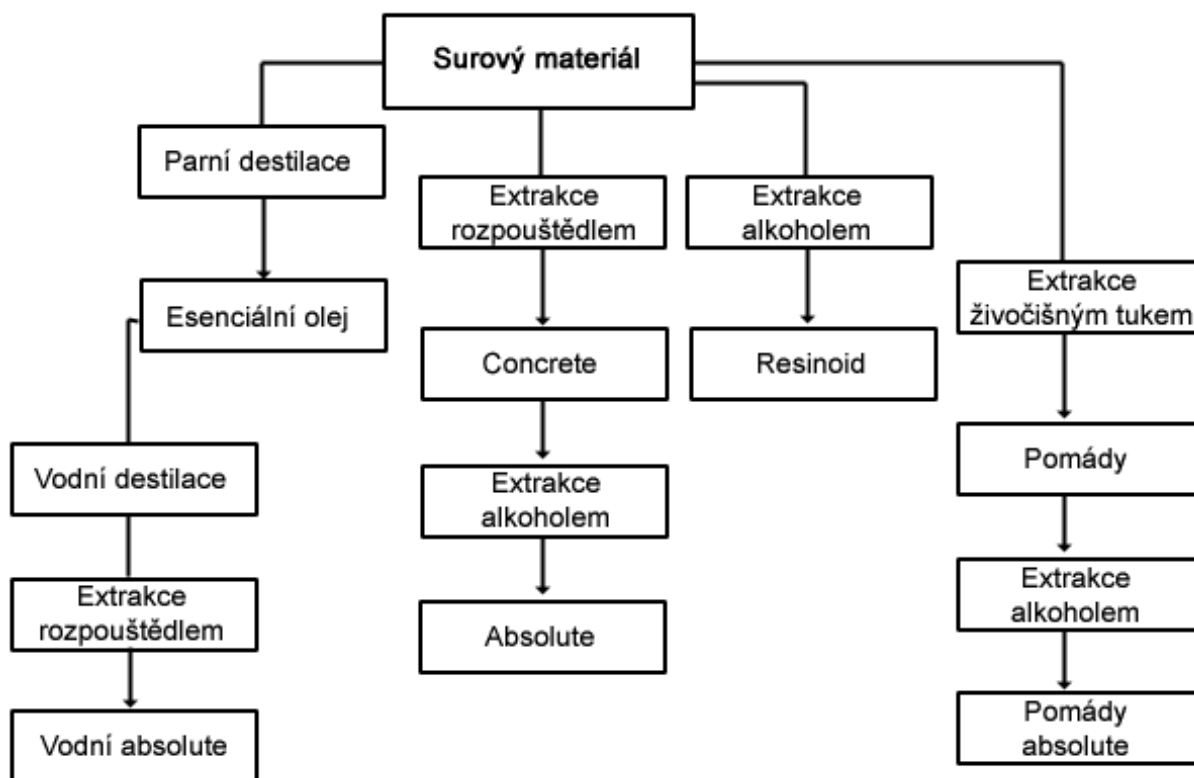
Zmírnění projevů indukované kolitidy u myši způsobil také flavonoid alpinetin díky aktivaci AhR spojenou s diferenciací regulačních T-lymfocytů (Lv *et al.*, 2018), jelikož se AhR na diferenciaci těchto lymfocytů podílí, a to různým způsobem v závislosti na použitém ligandu (Quintana *et al.*, 2008).

3.2. Esenciální oleje

Esenciální oleje nacházejí využití v potravinářství, ve výrobě parfémů, kosmetiky a prostředků do domácnosti, v tabákovém průmyslu či v alternativním léčení (de Groot *et al.*, 2016a). Norma ISO 9235:2013 definuje esenciální olej jako „produkt získaný ze surového přírodního materiálu rostlinného původu parní destilací, mechanickými procesy z epikarpu citrusových plodů či suchou destilací, a to po oddělení případné vodné fáze fyzikálními procesy“. Tato poměrně úzká definice esenciálního oleje omezuje přípravu esenciálních olejů na konkrétní způsoby produkce, tedy destilaci a lisování za studena, jinak se produkt nedá považovat za esenciální olej (obrázek 4).

Esenciální oleje obvykle obsahují 2–3 hlavní komponenty, zastoupené ve vysoké koncentraci, které jsou doprovázeny 20–60 dalšími látkami v malých množstvích (Bakkali *et al.*, 2008). Zejména jsou zde zastoupeny dvě skupiny sekundárních metabolitů rostlin – terpeny a fenylypropanoidy (Tisserand *et al.*, 2014). Tyto molekuly mohou obsahovat řadu různých funkčních skupin.

Terpeny vznikají spojováním tzv. izoprenových jednotek. Pokud je navíc v molekule obsažen kyslík, mluvíme o tzv. terpenoidech. Monoterpeny tvoří až 90 % obsahu esenciálních olejů (Bakkali *et al.*, 2008), zatímco diterpeny a terpeny s vyšším počtem izoprenových jednotek se v esenciálních olejích vyskytují jen zřídka. Typickými příklady terpenů obsažených v esenciálních olejích jsou (+)-limonen a α -pinen (Tisserand *et al.*, 2014). Fenylypropanoidy jsou produkty tzv. šikimátové dráhy, jejich prekurzorem je fenylalanin nebo tyrosin. Příkladem fenylypropanoidních látek je např. kyselina skořicová nebo safrol (Tisserand *et al.*, 2014). V esenciálních olejích dále mohou být v menších množstvích obsaženy také dusíkaté a sírné látky, jako jsou glukosinoláty a isothiokyanáty (Bakkali *et al.*, 2008).



Obrázek 4: Produkty získávané z přírodního materiálu (upraveno podle Weiss, 1997b).

U esenciálních olejů byly pozorovány účinky anxiolytické (de Sousa *et al.*, 2015), protizánětlivé (de Lavor *et al.*, 2018), protinádorové (Lesgards *et al.*, 2014), analgetické (de Cássia da Silveira e Sá *et al.*, 2017) či antimikrobiální (Chouhan *et al.*, 2017).

Esenciální oleje jsou široce využívány k průmyslovému ochucování nápojů a potravin. K dochucování nealkoholických nápojů, ale i cukroviněk, pečiva, dezertů či mléčných výrobků, se používají hlavně oleje z citrusových plodů, zázvoru, skořice, hřebíčku a máty. Produkce alkoholických nápojů využívá též esenciální oleje z bylin. Velké využití nacházejí esenciální oleje také v rychlém občerstvení, zde se užívají oleje z koření jako koriandr, pepř, paprika sladká, bobkový list, kardamom či bazalka (Brud, 2015).

3.2.1. Jasmínový esenciální olej

Jasmín (*Jasminum* sp.) je rod z čeledi olivovníkovitých (*Oleaceae*). V rámci rodu existuje mnoho druhů, pro výrobu esenciálních olejů se však používá zejména jasmín velkokvětý (*Jasminum grandiflorum* L.) a jasmín arabský (*Jasminum sambac* (L.) Aiton) (de Groot *et* Schmidt, 2017).

Jasmínový olej lze získat extrakcí rozpouštědly, hlavně tekutým CO₂. Při tomto procesu (obrázek 4) se nejdříve vytvoří tzv. concrete promytím květů rozpouštědlem. Ten se poté nechá destilovat, aby se odstranilo rozpouštědlo, kterým bývá nejčastěji hexan či petroléter. Samotný olej se pak získá pomocí alkoholu, výsledným produktem je tzv. absolute (též absolue) (Weiss, 1997a), jenž kromě vonných složek obsahuje i látky lipidového charakteru (de Groot *et* Schmidt, 2016b). Absolute

tak obsahuje řadu netěkavých látek, které se jinak v esenciálních olejích nevyskytují, jako je fytol, indol či benzenoidy, poměr těkavých látek je naopak snížen (Tisserand *et* Young, 2014).

Destilace, jež se pro přípravu esenciálních olejů běžně používá, není vhodná kvůli riziku rozkladu některých látek obsažených v jasmínových květech (de Groot *et* Schmidt, 2017). Alternativně lze olej připravit tzv. enfleuráží, avšak tento proces je značně pracný (Weiss, 1997a). V případě jasmínového oleje se tedy nejedná o esenciální olej v pravém slova smyslu. Jednotlivé komponenty jasmínového oleje a jejich procentuální zastoupení je popsáno v tabulce 1.

Jasmínový olej má antioxidační účinky (Wei *et* Shibamoto, 2007; Wang *et al.*, 2017). Působí proti bakteriím *Campylobacter jejuni* a *Listeria monocytogenes* (Friedman *et al.*, 2002). Rovněž působí cytotoxicky proti nádorovým buněčným liniím PC-3 a A549, méně pak vůči MCF-7 (Zu *et al.*, 2010). Jasmín má široké využití v asijské lidové medicíně a tradičním indickém lékařství ajurvěda (Arun *et al.*, 2016). V kulinářství se jasmín využívá hlavně v podobě čaje. Květy lze dále použít k dochucování jiných čajů či dezertů, a to hlavně v podobě sirupu, k dochucování se užívá i jasmínový esenciální olej (Lim, 2014). Jasmínový olej má přesto nejširší užití v parfémářství a aromaterapii (de Groot *et* Schmidt, 2017).

Tabulka 1: Složení jasmínového oleje. (Kompletní seznam složek viz příloha 1.)

Složka	Obsah [%]
Fytol	14,48
Benzylacetát	13,45
Benzylbenzoát	10,72
Isofytol	7,09
Skvalen	6,08
Fytylacetát	5,37
Geranylinalool	4,37
Linalool	3,75
Kyselina linolenová	3,37
Kyselina palmitová	2,52
(E,E)- α -farnesen	2,43
Trans-jasmon	2,35
Methylinolenát	2,10
Eugenol	1,91
Cis-jasmon	1,74
Indol	1,33
Z-jasmonolakton	1,32
Benzylalkohol	1,27
Epoxykvalen	1,80

3.2.2. Biologická aktivita a význam složek jasmínového esenciálního oleje

TERPENOIDY

Monoterpeny

Linalool se vyskytuje jako vonná složka v až 60 % prostředků používaných v domácnosti (Rastogi *et al.*, 2001). Výčet jeho biologických účinků je široký – byla u něj zjištěna protinádorová aktivita (Loizzo *et al.*, 2007; Gu *et al.*, 2010; Cherg *et al.*, 2014), protizánětlivé účinky (Huo *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2014) a antimikrobiální účinky (Hsu *et al.*, 2013; Duarte *et al.*, 2016). Linalool je také ligandem receptoru pro peroxizomové proliferátory α (PPAR α) (Jun *et al.*, 2014).

Jasmon je těkavý rostlinný hormon rodiny jasmonátů, které jsou studovány jako potenciální protinádorová terapie (Flescher, 2005). I konkrétně u jasmonu byly zjištěny protinádorové účinky (Kubo *et al.*, 1995; Rotem *et al.*, 2005; Yeruva *et al.*, 2009). Jeho působením dále dochází k potenciaci odpovědi receptoru pro kyselinu γ -aminomáselnou třídy A (GABA_A) (Hossain *et al.*, 2014) a také ovlivňuje Ca²⁺-ATPázu sarkoplasmatického retikula v kosterním svalstvu (Starling *et al.*, 1994).

Jasmonolakton, podobně jako jasmon, způsobuje potenciaci odpovědi receptorů GABA_A, ač v menší míře (Hossain *et al.*, 2014).

Seskviterpeny

Farnesen má pro některé rostliny význam při lákání opylovačů (Nieuwenhuizen *et al.*, 2014) a je reakcí na napadení hmyzem (Köllner *et al.*, 2009), zatímco u hmyzu má funkci varovného feromonu (Bowers *et al.*, 1972). Funkci feromonu má rovněž u myši (Novotny *et al.*, 1990). Farnesen je dále inhibítorem enzymů CYP2C9, 2D6 a 3A4 (Ganzera *et al.*, 2006).

Diterpeny

Fytol se v rostlinách vyskytuje jako součást molekuly chlorofylu a vykazuje široké spektrum biologické aktivity, od antimikrobiálních účinků po protizánětlivé (Islam *et al.*, 2018). Je ligandem PPAR α (Goto *et al.*, 2005) a jeho metabolity jsou také ligandy retinoidního X receptoru (Kitareewan *et al.*, 1996). Porucha metabolismu fytolu vede k vzniku neurologického onemocnění Refsumovy nemoci (van den Brink *et al.*, 2006).

Isofytol je využíván jako vonná komponenta v kosmetice (McGinty *et al.*, 2010).

Fytylacetát se objevuje jako složka v některých přírodních pryskyřicích a esenciálních olejích z nich vyrobených (Burdock, 2010).

Geranylinalool se používá jako vonná složka do prostředků do domácnosti, kosmetiky a toaletních potřeb (Lapczynski *et al.*, 2008).

Triterpeny

Skvalen, meziprodukt syntézy cholesterolu, který je ve vysoké míře obsažen ve žraločích játrech a olivovém oleji. Je spojován s protinádorovým působením (Newmark, 1999). Skvalen se

využívá pro přípravu emulzí, jako adjuvantní látka ve vakcínách či jako systém pro doručení léčiv do místa účinku (Reddy *et Couvreur*, 2009). Je ligandem PPAR α (Hoang *et al.*, 2016).

Epoxykvalen je rovněž meziproduktem biosyntézy sterolů (Rabelo *et al.*, 2017).

FENYLPROPANOIDY

Eugenol se v zubařské praxi využívá ve směsi s oxidem zinečnatým jako cement (Lee *et al.*, 2016). Eugenol není schváleným léčivem, ale může být obsažen v některých volně prodejných medikamentech (Guggenheimer, 2002). Na buněčné úrovni eugenol cílí na AhR (Kalmes *et al.*, 2006; Bartoňková *et Dvořák*, 2018), receptor pro estrogény (Howes *et al.*, 2002) a androgeny (Ogawa *et al.*, 2010), a na receptory z rodiny TRP (transient receptor potential)-kationtových kanálů (Calixto *et al.*, 2005). Eugenol je také inhibitorem monoaminoxidázy A a B (Tao *et al.*, 2005).

BENZENOIDY

Benzylalkohol se užívá jako konzervační prostředek v injekčních medikamentech (Novak *et al.*, 1972). Krémy s obsahem benzylalkoholu se úspěšně používají k hubení vši (Meinking *et al.*, 2010).

Benzylacetát se vyskytuje jako vonná složka v řadě rostlin (Knudsen *et al.*, 2006). U včel má funkci varovného feromonu (Wang *et Tan*, 2019). Benzylacetát nachází široké užití jako vonná složka v kosmetických produktech (McGinty *et al.*, 2012).

Lokálně podávaný benzylbenzoát se používá pro léčbu svrabu (Buffet *et Dupin*, 2003). Byla u něj zjištěna estrogenní aktivita *in vitro* (Charles *et Darbre*, 2009).

MASTNÉ KYSELINY A JEJICH ESTERY

Kyselina linolenová je ligandem farnesoidního X receptoru (Zhao *et al.*, 2004). Její isomer γ -linolenová kyselina je pak ligandem PPAR γ (Jiang *et al.*, 2000).

Kyselina palmitová je ligandem PPAR α (Murakami *et al.*, 1999).

Methylinolenát je rostlinný metabolit sloužící pro lákání hmyzu (Ozawa *et al.*, 2008). Je aktivátorem proteinkinázy C (Fan *et al.*, 1990).

DUSÍKATÉ LÁTKY

Indol je široce rozšířený mikrobiální metabolit, který jsou schopny využívat i eukaryotní organismy (Lee *et al.*, 2015). Je ligandem AhR specificky působícím na lidskou formu receptoru (Hubbard *et al.*, 2015b). Indol může být významný pro signalizaci pomocí AhR v lidském organismu vzhledem k tomu, že koncentrace indolu jakožto produktu degradace tryptofanu ve střevech dosahuje hodnot v řádu jednotek milimolů (Darkoh *et al.*, 2015).

3.3. Terapeutický potenciál AhR

Imunosupresivní účinky TCDD jsou známy již dlouhou dobu (Vos *et Moore*, 1974). Ačkoli jsou tyto účinky TCDD obvykle vnímány jako projev imunotoxicity, existují preklinické studie, ve kterých imunosuprese navozená TCDD působí u experimentálních zvířat pozitivně proti rozvoji autoimunitních chorob (Quintana *et al.*, 2008; Kerkvliet *et al.*, 2009; Takamura *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2016; Huang *et al.*, 2018). Ehrlich *et Kerkvliet* (2017) přicházejí s myšlenkou využití ligandů AhR, které sdílejí s TCDD imunosupresivní účinky, avšak nepřinášejí toxické projevy spojené s použitím prakticky nemetabolizovatelného ligandu. Tyto látky by měly vyvolávat totožnou biologickou odpověď, jako TCDD, zároveň by měly být ale snadno a rychle degradovatelné a neměly by mít tendenci se v těle akumulovat. Schopnost napodobit účinky TCDD byla již dříve demonstrována u ITE (Henry *et al.*, 2010) a benzimidazoisochinolinů (Punj *et al.*, 2014).

U některých esenciálních olejů z bylin a koření byla prokázána schopnost aktivace aryluhlovodíkového receptoru (Bartoňková *et Dvořák*, 2018). Zatímco u olejů, které vykazovaly parciálně agonistické a antagonistické účinky se podařilo identifikovat složku zodpovědnou za tuto aktivitu mezi majoritními (> 10 % objemu) komponenty oleje, u esenciálních olejů vykazujících plně agonistickou aktivitu (kmín římský, jasmín, vanilka, bobkový list) taková složka nebyla identifikována. Cílem této práce tedy bylo prozkoumat minoritní (1–10 % objemu) komponenty jasmínového esenciálního oleje, zda se mezi nimi nachází látky aktivující aryluhlovodíkový receptor, a prozkoumat jejich potenciální využití coby výše popsaná mimetika TCDD.

4. Materiál a metody

4.1. Biologický materiál

Adherentní lidské nádorové buněčné linie:

- Linie AZ-AhR konstruovaná z buněčné linie HepG2 odvozené od hepatocelulárního karcinomu jater, stabilně transfekovaná reportérovým plasmidem obsahujícím 4 kopie XRE z myšího genu pro CYP1A1 a luciferázový reportérový gen (Novotná *et al.*, 2011).

Buněčná linie AZ-AhR byla kultivována v Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) obohaceném o 10 % (v/v) fetálního telecího séra (FBS), 1 % (v/v) neesenciálních aminokyselin a 2 mmol \times l⁻¹ glutaminu. Jednou týdně byla prováděna selekce transfekovaných buněk hygromycinem B ve finální koncentraci 200 μ g \times ml⁻¹.

- Linie HepG2 odvozená od hepatocelulárního karcinomu jater (ECCAC 85011430)

Buněčná linie HepG2 byla pěstována v médiu DMEM obohaceném o 10 % (v/v) FBS, 1 % (v/v) neesenciálních aminokyselin a 2 mmol \times l⁻¹ glutaminu.

Všechny buněčné linie byly pěstovány v inkubátoru při 37 °C v atmosféře se stálou vlhkostí a 5 % CO₂.

4.2. Použité chemikálie, soupravy a roztoky

Použité chemikálie

- TCDD (ULTRA Scientific, 48599)
- BaP (Sigma, B1760)
- FICZ (Sigma, SML149)
- α -linolenová kyselina (Santa Cruz Biotechnology, sc-205545)
- Benzylalkohol (Sigma, 305197)
- Mesylátová sůl desferrioxaminu (Sigma, D9533)
- Epoxyskvalen (Sigma, 41719)
- Eugenol (Santa Cruz Biotechnology, sc-203043)
- Farnesen (Santa Cruz Biotechnology, sc-294585)
- Geranylinalool (Santa Cruz Biotechnology, sc-228246)
- Indol (Santa Cruz Biotechnology, sc-257606)
- Isofytol (Santa Cruz Biotechnology, sc-228373)
- Jasmine absolute (Pranarom International)
- Jasmonolakton (Haihang Industry, 25524-95-2)
- Jasmon (Santa Cruz Biotechnology, sc-250208)
- Linalool (Santa Cruz Biotechnology, sc-250250)

- Methyllinolenát (Santa Cruz Biotechnology, sc-280983)
- Palmitová kyselina (Santa Cruz Biotechnology, sc-203175)
- Fytylacetát (Santa Cruz Biotechnology, sc-296086)
- Skvalen (Santa Cruz Biotechnology, sc-281155)
- DMEM (Sigma D6546)
- FBS (Sigma, F6178)
- L-glutamin (Biosera, XC-T1715)
- Roztok neesenciálních aminokyselin, 10× (Sigma, M7145)
- Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS) (Serva, BDL-001-500ML)
- Trypsin-EDTA (Sigma, T4049)
- Roztok hygromycinu B (50 mg × ml⁻¹ v PBS) (Santa Cruz Biotechnology, sc-29067)
- Dimethylsulfoxid (DMSO) (Sigma, D8418)
- Trypanová modř (Sigma-Aldrich, T6146)
- Reporter Lysis Buffer, 5× (Promega, E3971)
- D-luciferin (Santa Cruz Biotechnology, sc-207478A)
- Koenzym A (Sigma-Aldrich, C4780)
- Kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA) (Sigma-Aldrich, E9884)
- ATP (Sigma-Aldrich, A9062)
- Tris (Bio Basic, TB0194)
- Ledová kyselina octová (99,8 %) (Penta, 607-002-00-6)
- Heptahydrát síranu hořečnatého (LACHEMA, a. s.)
- Triton X-100 (Sigma-Aldrich, X100)
- Methylthiazolyldifenyltetrazolium bromid (MTT) (Sigma-Aldrich, M2128)
- Tri-Reagent (Molecular Research Center, Inc., TR 118)
- Chloroform (Sigma-Aldrich ,C2432)
- Isopropanol (Sigma, I9516)
- Ethanol absolutní (Penta, 71380-11000)
- Voda bez RNáz (Sigma, W4502)
- Náhodné primery 6 (New England Biolabs, S1230S)
- Light Cycler 480 Probes Master (Roche Diagnostics, 04 887 301 001)
- Pufr pro M-MuLV reverzní transkriptázu (New England Biolabs, M0253L)
- Inhibitor RNáz (New England Biolabs, M0307L)
- dATP (Takara, 4026)
- dCTP (Takara, 4028)
- dGTP (Takara, 4027)

- dTTP (Takara, 4029)
- LightCycler 480 SYBR Green I Master (Roche, 04 707 516 001)
- Inhibitor fosfatáz (Roche, 04 906 837 001)
- Inhibitor proteáz (Thermo Scientific, 78430)
- Bradfordovo činidlo, 5× (Serva, 39222.03)
- Akrylamid-bisakrylamid (AA/Bis) (40%, 29:1) (Bio Basic, 0007)
- Resolving gel buffer (Bio-Rad, 161-0798)
- Stacking gel buffer (Bio-Rad, 161-0799)
- Dodecylsírán sodný (SDS) (Sigma-Aldrich, L3771)
- N,N,N',N'-tetramethylethylenediamin (TEMED) (Bio Basic, TB0508)
- Persírán amonný (APS) (Sigma, A3678)
- Glycerol (Sigma-Aldrich, G2025)
- Bromfenolová modř (Sigma-Aldrich, B0126)
- Dithiotreitol (DTT) (Sigma-Aldrich, 43819)
- Precision Plus Protein Dual Color Standards (Bio-Rad, 161-0374)
- 10× Tris/Glycine/SDS Buffer (Bio-Rad, 161-0732)
- 10× TG Buffer (Bio-Rad, 161-0734)
- Methanol (Penta, 603-001-00-X)
- Ponceau S (Biotium, 22001)
- Tris Buffered Saline (TBS) (Thermo Scientific, 28358)
- Tween 20 (Sigma-Aldrich, P1379)
- Hovězí sérový albumin (BSA) (Sigma, A2153)
- Nízkoúčné mléko (Laktino)
- Re-blot Plus Strong Antibody Stripping Solution (Millipore, 2504)
- Chemiluminiscenční substrát WesternSure PREMIUM (LI-COR, 926-95000)
- Formaldehyd (Sigma-Aldrich, 47608)
- Agaróza (Serva, 11380.02)
- Low melting point agaróza (Promega, V3841)
- GelRed (Biotium, 41003)
- 100 bp DNA Ladder (Promega, G210a)
- DNA nanášecí barvivo, 6× (Thermo Scientific, r0611)
- Tris Acetát EDTA (TAE) pufr, 10× (Sigma, T9650)

- Protilátky
 - Anti-AhR (Santa Cruz Biotechnology, sc-133088)
 - Anti-ARNT (Santa Cruz Biotechnology, sc-17812)
 - Anti-CYP1A1 (Santa Cruz Biotechnology, sc-393979)
 - Anti- β -aktin (Cell Signaling Technology, 3700)
 - Anti-myší (Cell Signaling Technology, 7076)
 - Anti-AhR (D5S6H, ChIP-validated) (Cell Signaling Technology, 83200)
- Primery (Generi Biotech)
 - CYP1A1_F (CCAGGCTCCAAGAGTCCA)
 - CYP1A1_R (GATCTTGGAGGTGGCTGCT)
 - AhR_F (CAGAGTCTGGACAAGGAATTGA)
 - AhR_R (TCTGGAGGAATCTGGTCTGG)
 - CYP1A1_ChIP_F (AGCTAGGCCATGCCAAAT)
 - CYP1A1_ChIP_R (AAGGGTCTAGGTCTGCGTGT)
 - GAPDH_F (CTCTGCTCCTCCTGTTCGAC)
 - GAPDH_R (ACGACCAAATCCGTTGACTC)
- Sondy
 - CYP1A1 – UPL33 (Roche, 04 687 663 001)
 - AhR – UPL54 (Roche, 04 688 511 011)
 - ARNT (Roche, 102546)
 - GAPDH – UPL60 (Roche, 04 688 589 001)
 - VEGF-A (Roche, 140396)

Použité soupravy

- P450-Glo CYP1A1 Assay (Promega, V8752)
- SimpleChIP Plus Enzymatic Chromatin IP Kit (Magnetic Beads) (Cell Signaling Technology, 9005)

Použité roztoky a jejich příprava

- 0,4% (w/v) roztok trypanové modři v PBS
- 10% (w/w) roztok SDS
- 10% (w/w) roztok APS
- 75% (v/v) ethanol
- Lyzační pufr (pH 7,5): 50 mmol \times l⁻¹ HEPES, 5 mmol \times l⁻¹ EDTA, 150 mmol \times l⁻¹ NaCl, 1 % Triton X-100
- Nanášecí pufr, 2 \times (LB): 2,5 ml Stacking Gel Buffer; 4 ml 10% (w/w) SDS; 2 ml glycerol; 2 mg bromfenolová modř; 0,31 g DTT; doplní se deionizovanou vodou do 10 ml

- TBS-Tween: 50 ml 20× TBS; 950 ml deionizovaná voda; 0,5 ml Tween 20
- Transferový pufr: 100 ml 10× TG Buffer, 200 ml methanol, 700 ml deionizovaná voda
- 3 mg × ml⁻¹ MTT
- Substrát pro luciferázu: 5 mg D-luciferin; 10 mg ATP; 5 mg koenzym A; 168 mg DTT; 1,32 ml Tris-acetát (1 mol × l⁻¹, pH 7,8); 1,23 mg EDTA; 3,03 mg MgSO₄·7 H₂O

4.3. Seznam použitých přístrojů a zařízení

Použití přístroje:

- Blotovací aparatura Trans-Blot SD Cell (BioRad)
- CO₂ inkubátor NB-203XL (N-BIOTEK)
- Cella pro vertikální elektroforézu Mini-PROTEAN Tetra (BioRad)
- Kývačka MR-12 (Biosan)
- Rotátor RS-24 (Biosan)
- Laminární box Labculture Class II, Type A2 (Esco)
- Inverzní mikroskop IMT-2 (Olympus)
- Chemiluminiscenční skener pro western blotting C-DiGit Blot Scanner (LI-COR)
- Ultrazvuková lázeň Sonorex Digitec Ultrasonic baths DT-31 (BANDELIN electronic)
- Spektrofotometr Infinite m200 (Tecan)
- Spektrofotometr Nanodrop Lite (Thermo Scientific)
- Suchá lázeň Genius Dry Bath Incubator md-02n (Major Science)
- Vodní lázeň LCB-11D (Daihan Labtech)
- Zdroj napětí MP-500V (Cleaver Scientific Ltd.)
- Třepačka TS-100C (Biosan)
- Blok SC-24NC (Biosan)
- Dokumentační zařízení G:BOX (Syngene)
- Elektroforetická vana HU10 MINI (Scie-Plas)

Použitý software:

- Image Studio Digits Ver 3.1 (Li-Cor)
- i-control 1.11 (Tecan)
- Light Cyclor 480 SW 1.5 (Roche)
- Microsoft Excel 2010 (Microsoft)
- R 3.5.3 (R Foundation for Statistical Computing)

4.4. Použité experimentální a vyhodnocovací postupy

4.4.1. Reporter gene assay

Stanovení aktivity složek jasmínového esenciálního oleje. Buněčná linie AZ-AhR byla vyseta na 96jamkovou desku v množství 10 tis. buněk na jamku. Jasmínový esenciální olej byl aplikován ve finálních koncentracích 1, 10, 50, 100 a 250 $\mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$, jednotlivé obsahové složky tohoto oleje v koncentracích 1, 10, 50 a 100 $\mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$ po dobu 4 a 24 h. Jako negativní kontrola bylo použito rozpouštědlo (0,1% v/v abs. ethanol), jako pozitivní kontrola TCDD (5 $\text{nmol} \times \text{l}^{-1}$).

Stanovení antagonistických účinků jasmonu. Pro hodnocení antagonistických účinků byla linie AZ-AhR vyseta v množství 10 tis. buněk na jamku. Jasmon byl aplikován v koncentracích 1, 10, 50 a 100 $\mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$ v kombinaci se třemi různými agonisty AhR za 4 a 24 h: TCDD (20 $\text{nmol} \times \text{l}^{-1}$ pro 4 h inkubace a 13,5 $\text{nmol} \times \text{l}^{-1}$ pro 24 h inkubace), BaP (7 $\mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ pro 4 h inkubace a 15,8 $\mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ pro 24 h inkubace) a FICZ (8 $\text{nmol} \times \text{l}^{-1}$ pro 4 h inkubace a 22,6 $\mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ pro 24 h inkubace). Uvedené koncentrace představují 80% efektivní koncentraci (EC80) ligandu v daném čase; hodnoty EC80 byly dříve stanoveny v Laboratoři molekulární farmakologie a toxikologie.

Po uplynutí doby inkubace bylo kultivační médium odstraněno, buňky byly lyzovány přidáním 25 μl 1 \times pufru Reporter Lysis Buffer a zamražením (-80 °C) na minimálně 20 min. Po rozmražení bylo 5 μl lyzátu přeneseno do bílé 96 jamkové mikrotitrační desky a k tomuto objemu bylo přidáno 30 μl substrátu pro luciferázu a následně byla stanovena míra luminiscence na přístroji Tecan pomocí softwaru iControl 1.11.

Metoda byla provedena vždy v minimálně 3 nezávislých biologických opakováních a 4 technických opakováních.

4.4.2. MTT assay

Životaschopnost buněčné linie AZ-AhR po ošetření složkami jasmínového esenciálního oleje byla hodnocena metodou MTT. Pro toto testování byly vybrány pouze ty složky, které byly aktivní při stanovení metodou Reporter gene assay. Látky byly testovány v koncentracích 1, 10 a 100 $\mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$ po 24 h inkubace, v případě AhR-aktivních látek při 4 h byla provedena také inkubace po dobu 4 h. Jako negativní kontrola byl použit 0,1% v/v abs. ethanol, pozitivní kontrolou byl 1% Triton-X100.

Po ukončení inkubace bylo do jamek přidáno 100 μl roztoku MTT (0,3 $\text{mg} \times \text{l}^{-1}$ v PBS) a buňky byly ponechány při 37 °C minimálně 20 min, než se došlo k utvoření barevných krystalů. Poté byl roztok z jamek odstraněn a krystaly byly rozpuštěny ve 100 μl DMSO. Následně byla stanovena absorbance roztoku při 570 nm na přístroji Tecan pomocí softwaru iControl 1.11.

Stanovení životaschopnosti bylo provedeno v minimálně 4 biologických replikátech a 3 technických replikátech.

4.4.3. Real-time PCR

Izolace celkové RNA. Buněčná linie HepG2 byla vyseta v množství 1 mil. buněk na jamku. Treatment byl proveden aplikací jasmonu ($1, 10$ a $100 \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$) samotného či v kombinaci s $13,5 \text{ nmol} \times \text{l}^{-1}$ TCDD, $22,6 \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ FICZ nebo $200 \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ desferrioxaminu (DFX) po dobu 24 h (negativní kontrola 0,1% v/v abs. ethanol s 0,1% DMSO). Izolace byla provedena s použitím TriReagentu dle pokynů výrobce s drobnými úpravami. Byl aplikován 1 ml TriReagentu na 1 milion vyšetých buněk pro lýzu buněk a obsah byl přenesen do mikrozkušavky, kde byl nasáváním a vypouštěním pipetou dále homogenizován. Poté byl inkubován 10 min při laboratorní teplotě. K roztoku bylo přidáno 200 μl chloroformu a směs byla promíchána třepáním po dobu 1 min, následovala 5 min inkubace při laboratorní teplotě a centrifugace při $16\,700\times g$ po dobu 15 min při $4\text{ }^\circ\text{C}$. Do nové mikrozkušavky bylo přeneseno 500 μl vzniklé vodné fáze, k té byl přidán stejný objem isopropanolu a roztok byl intenzivně promíchán na vortexu po dobu 10 s. Následně byly vzorky inkubovány 7 min při laboratorní teplotě a odstředěny při $16\,700\times g$ 13 min při $4\text{ }^\circ\text{C}$. Dvakrát byl odstraněn supernatant, pelet byl promyt 1 ml chlazeného 75% (v/v) ethanolu a 5 min centrifugován při $16\,700\times g$ a $4\text{ }^\circ\text{C}$. Následně byl supernatant opět odstraněn a zbytky ethanolu byly odpařeny zahřátím vzorků v suché lázni při $65\text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 60 s. Pelet byl rozpuštěn v 50 μl vody zbavené RNáz, koncentrace a kvalita RNA byla stanovena spektrofotometricky s použitím přístroje NanoDrop.

Reverzní transkripce. Pro syntézu cDNA bylo použito 1000 ng RNA, naředěno do objemu 5 μl . K objemu byl přidán 1 μl náhodných hexamerů ($100 \text{ pmol} \times \mu\text{l}^{-1}$) a vzorky byly inkubovány 5 min při $65\text{ }^\circ\text{C}$ a následně prudce zchlazeny. K objemu bylo poté přidáno 6 μl reakční směsi (0,6 μl $200 \text{ U} \times \mu\text{l}^{-1}$ M-MuLV reverzní transkriptázy, 0,3 μl $40 \text{ U} \times \mu\text{l}^{-1}$ inhibitorů RNáz, 1,2 μl $10\times$ reakčního pufru, 0,6 μl $100 \text{ mmol} \times \text{l}^{-1}$ roztoku dNTPs, a 3,3 μl vody/1 vzorek). Reverzní transkripce proběhla 1 h inkubací při $42\text{ }^\circ\text{C}$, následně byly směsi inkubovány 10 min při $65\text{ }^\circ\text{C}$ pro zastavení reakce. Vzorky byly poté naředěny $10\times$.

Real-time PCR. Pro detekci genové exprese byly využity dva typy komerčních sond. Sonden Universal Probe Library (UPL) byly užity pro detekci exprese glycerinaldehyd-3-fosfátdehydrogenázy (GAPDH, UPL60), CYP1A1 (UPL33) a AhR (UPL54). Reakční směs byla v tomto případě připravena smícháním 5 μl $2\times$ Probes Master, 0,2 μl příslušné UPL sondy, 0,8 μl směsi primerů ($5 \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ forward + $5 \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ reverse primer) a 2 μl vody na 1 vzorek. Sonden RealTime Ready Assay byly využity pro detekci ARNT a vaskulárního endotelového růstového faktoru A (VEGF-A). Reakční směs byla připravena z 5 μl $2\times$ Probes Master, 0,5 μl příslušné sondy RealTime Ready Assay a 2,5 μl vody na 1 vzorek. K oběma typům reakční směsi byly přidány 2 μl vzorku cDNA. Amplifikace byla provedena za následujících podmínek: 1 cyklus preinkubace (10 min při $95\text{ }^\circ\text{C}$), 45 cyklů amplifikace (10 s při $95\text{ }^\circ\text{C}$, 30 s při $65\text{ }^\circ\text{C}$), 1 cyklus zchlazení (30 s při $40\text{ }^\circ\text{C}$). Data byla zpracována metodou $2^{-\Delta\Delta C_T}$ dle Livak *et* Schmittgen (2001).

Stanovení genové exprese pomocí Real-time PCR bylo provedeno ve 4 biologických replikátech, vlastní PCR pak ve 3 technických replikátech na vzorek.

4.4.4. Western blotting (WB)

Příprava vzorků a SDS-PAGE. Vyšetření buněk a jejich treatment byl proveden analogicky jako Real-time PCR, s výjimkou kombinace s DFX, která zde nebyla použita. Buňky byly lyzovány ve 100 μ l lyzačního pufru s přidávkou inhibitorů proteáz a fosfatáz a uchovávány na ledu. Byla provedena homogenizace ultrazvukem a mícháním na vortexu. Poté byly vzorky centrifugovány 13 min při 16 700 \times g a 4 °C a byl odebrán supernatant. Celková koncentrace proteinů byla změřena Bradfordovou metodou. Pro přípravu vzorků byl buněčný lyzát naředěn tak, aby obsahoval 25 μ g proteinů, a byl smíchán se stejným objemem 2 \times nanášecího pufru. Vzorky byly rozděleny v 8 % polyakrylamidovém gelu za denaturujících a redukcujících podmínek (dělicí gel: 1,9 ml 40% roztoku AA/Bis, 5,5 ml vody, 2,5 ml Resolving Gel Buffer, 100 μ l 10% SDS, 100 μ l 10% APS a 10 μ l TEMED; zaostřovací gel: 400 μ l 40% roztoku AA/Bis, 1 ml Stacking Gel Buffer, 2,6 ml vody, 40 μ l 10% SDS, 30 μ l 10% APS a 4 μ l TEMED) za konstantního proudu 30 mA na 1 gel.

WB. Proteiny byly přeneseny z gelu na polyvinylidendifluoridovou membránu polosuchým přenosem za použití transferového pufru. Přenos byl proveden za konstantního proudu 350 mA po dobu 1 h. Přítomnost proteinů na membráně byla ověřena reverzibilním barvením pomocí Ponceau S. Poté bylo provedeno blokování membrány 5% roztokem nízkotučného mléka v TBS-Tween po dobu 1 h na kývačce. Primární protilátka (CYP1A1 a AhR v ředění 1:500, ARNT 1:250 a β -aktin 1:5000; vše myšího původu) byla přidána do 5% roztoku BSA v TBS-Tween a inkubována při 4 °C přes noc na kývačce, s výjimkou β -aktinu, který byl inkubován při laboratorní teplotě 3 h. Následně byly membrány promyty TBS-Tween 3 \times po 5 minutách. Sekundární anti-myší protilátka byla použita v ředění 1:2000 v 2,5% roztoku mléka v TBS-Tween a inkubována 45 min za laboratorní teploty. Poté byly membrány znovu třikrát promyty TBS-Tween po 5 minutách. Na membrány byl aplikován chemiluminiscenční substrát po dobu 5 min a detekce byla provedena na chemiluminiscenčním skeneru Li-COR za použití softwaru Image Studio Digits Ver 3.1.

Stanovení množství proteinu pomocí WB bylo provedeno v 5 nezávislých biologických replikátech.

4.4.5. P450-Glo CYP1A1 assay

Indukce CYP1A1 v HepG2 byla stanovena pomocí soupravy P450-Glo CYP1A1 assay dle protokolu výrobce. Do 96jamkové destičky bylo vyseto 50 tisíc buněk na jamku. Buňky byly po dobu 24 h inkubovány s roztokem jasmonu ve finální koncentraci 1, 10 a 100 μ g \times ml⁻¹ samotné či v kombinaci s TCDD (13,5 nmol \times l⁻¹) nebo FICZ (22,6 μ mol \times l⁻¹), jako negativní kontrola byl použit 0,1% abs. ethanol. Po uplynutí doby inkubace bylo médium s látkami z jamek odsáto, buňky byly promyty sterilním PBS a poté byly inkubovány v 50 μ l média s proluminiscenčním substrátem luciferin-6'-chloroethyletherem (luciferin-CEE) ve finální koncentraci 100 μ mol \times l⁻¹ při 37 °C po dobu 3 h. Poté bylo 25 μ l média přepipetováno do bílé mikrotitrační destičky a přidáno 25 μ l detekčního

činidla a roztok byl inkubován 20 min ve tmě. Luminiscence byla měřena na přístroji Tecan pomocí programu iControl 1.11.

Stanovení indukce CYP1A1 byla provedena ve 3 biologických i technických replikátech.

4.4.6. Chromatinová imunoprecipitace (ChIP)

Analýza vazby AhR do promotoru CYP1A1 byla provedena s použitím soupravy SimpleChIP Plus Enzymatic Chromatin IP Kit (Magnetic Beads) dle pokynů výrobce s úpravami.

Zesíťování a příprava vzorků. Buněčná linie HepG2 byla vyseta v množství 6 mil. buněk na Petriho misku. Buňky byly ošetřeny 0,1% v/v abs. ethanolem (negativní kontrola) a jasmonem ($100 \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$) v kombinaci s TCDD ($13,5 \text{ nmol} \times \text{l}^{-1}$) nebo FICZ ($22,6 \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$), jako pozitivní kontrola sloužily vzorky TCDD a FICZ bez přídavku jasmonu. Inkubace trvala 90 min, po jejím uplynutí bylo do 4 ml média přidáno 108 μl formaldehydu. Po 9 min inkubace při laboratorní teplotě byla reakce zastavena přidáním 400 μl roztoku glycinu a inkubací dalších 5 min. Dále bylo médium z misek odstraněno a buňky byly dvakrát promyty chlazeným PBS, poté byly seškrábnuty do 1 ml PBS s přídavkem Protease Inhibitor Coctail (PIC). Vzorky byly centrifugovány 3 min při $2000 \times g$ při $4 \text{ }^\circ\text{C}$.

Příprava jader a digesce chromatinu. Supernatant byl odstraněn a buňky byly resuspendovány v 1 ml pufru A (250 μl 4 \times pufru A, 750 μl vody, 0,5 μl $1 \text{ mol} \times \text{l}^{-1}$ DTT, 5 μl 200 \times PIC na 1 vzorek). Vzorky byly ponechány na ledu po dobu 9 min a průběžně byly promíchávány převrácením mikrozkuvek každé 3 minuty. Následně byla provedena centrifugace při $3000 \times g$ při $4 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 3 min. Supernatant byl opět odstraněn a pelet byl resuspendován v 1 ml pufru B (275 μl 4 \times pufru B, 825 μl vody, 0,55 μl $1 \text{ mol} \times \text{l}^{-1}$ DTT) a vzorky byly znovu odstředěny při $3000 \times g$ $4 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 3 min. Pelet byl resuspendován ve 100 μl pufru B s 0,66 μl nukleázy a poté byla provedena digesce inkubací 20 min při $37 \text{ }^\circ\text{C}$ za stálého třepání ($1000 \text{ otáček} \times \text{min}^{-1}$). Reakce byla zastavena přídavkem 10 μl $0,5 \text{ mol} \times \text{l}^{-1}$ EDTA a zchlazením. Vzorky byly odstředěny 1 min při $13\ 000 \times g$ po dobu 1 min, pelet byl resuspendován ve 100 μl ChIP pufru (10 μl 10 \times ChIP pufru, 90 μl vody, 0,5 μl 200 \times PIC) a inkubován 9 min na ledu. Dále byla provedena sonikace vzorků – 5 \times po 30 s, následované vždy 30 s inkubace na ledu. Poté byla provedena centrifugace při $10\ 000 \times g$ a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 9 min. Supernatant byl ponechán a byl změřen výtěžek chromatinu.

Chromatinová imunoprecipitace. Vzorky chromatinu byly naředěny tak, aby v objemu 500 μl bylo obsaženo 5 μg chromatinu, libovolný vzorek byl připraven dvakrát a použil se jako kontrola specifity vazby protilátky (dále jen „vzorek IgG“). Ze všech vzorků bylo odebráno 10 μl jako vnitřní kontrola (2% input genomické DNA). K vzorkům bylo přidáno 5 μl primární protilátky proti AhR, k vzorku IgG pak 1 μl nespecifického IgG. Následně byly inkubovány při $4 \text{ }^\circ\text{C}$ na rotátoru přes noc. Poté bylo do všech vzorků přidáno 30 μl magnetických částic s navázaným proteinem G a byly inkubovány 1 h na rotátoru při $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Po inkubaci byly vzorky umístěny do magnetického separátoru, roztok byl odstraněn, magnetické částice byly promyty 500 μl pufru s nízkým obsahem solí

(80 μ l 10 \times ChIP pufru, 450 μ l vody) a inkubovány 5 min na rotátoru při 4 °C. Toto promytí bylo provedeno celkem 3 \times , následovalo promytí 800 μ l pufru s vysokým obsahem solí (80 μ l 10 \times ChIP pufru, 720 μ l vody, 56 μ l 5 mol \times l⁻¹ NaCl) za stejných podmínek. Po oddělení magnetických částic byl supernatant odstraněn.

Eluce navázaného chromatinu a rozrušení zesítování. Ke všem vzorkům včetně 2% inputu bylo přidáno 150 μ l 1 \times ChIP elučního pufru. 2 % input byl ponechán při laboratorní teplotě a ostatní vzorky byly inkubovány 30 min při 65 °C za třepání 1200 ot. \times min⁻¹. Poté byly imunoprecipitované vzorky umístěny do magnetického separátoru a supernatant s eluovaným chromatinem byl odebrán do nové mikrozkušavky. Ke všem vzorkům včetně 2% inputu bylo přidáno 6 μ l NaCl (5 mol \times l⁻¹) a 2 μ l proteinázy K (20 mg \times ml⁻¹) a byla provedena digesce 15 min při 65 °C za třepání 1200 ot. \times min⁻¹.

Přečištění DNA. Následně bylo přidáno 750 μ l DNA-vazebného pufru a roztoky byly promíchány. Tento objem byl postupně nanesen na kolonu a centrifugován 30 s při 16 700 \times g, proteklý objem byl odstraněn. Dále byla kolona promyta přidáním 650 μ l DNA wash pufru a centrifugací za stejných podmínek, zbytky roztoku byly odstraněny další centrifugací. DNA byla eluována použitím 45 μ l DNA elučního pufru a centrifugací 30 s při 16 700 \times g.

Real-time PCR. Reakční směs pro detekci obohacení promotoru CYP1A1 byla připravena smícháním 5 μ l SYBR Green I Master, 1 μ l směsi primerů (5 μ mol \times l⁻¹ forward + 5 μ mol \times l⁻¹ reverse primer) a 2 μ l vody, k níž byly přidány 2 μ l eluované DNA. Amplifikace byla provedena za těchto podmínek: 1 cyklus preinkubace (10 min při 95 °C), 40 cyklů amplifikace (15 s při 95 °C, 60 s při 65 °C), 1 cyklus zchlazení (30 s při 40 °C) a následná analýza teploty tání za účelem verifikace vzniku jednoho amplikonu. Real-time PCR byla provedena ve 4 technických replikátech, data byla zpracována metodou 2^{- $\Delta\Delta$ C_T} dle Livak *et* Schmittgen (2001) s normalizací vůči 2% inputu.

Agarózová elektroforéza. Pro ověření specifity amplifikace byla provedena PCR o 31 cyklech, ostatní podmínky jak byly uvedeny výše. PCR produkty byly smíchány s 6 \times nanášecím barvivem a rozděleny v agarózovém gelu s obsahem 1 % běžné agarózy a 1 % low-melting point agarózy v 0,5 \times TAE pufru s přídatkem barviva GelRed. Elektroforetická separace byla provedena za konstantního napětí 70 V. Amplikony byly vizualizovány pomocí přístroje G:BOX.

5. Výsledky

5.1. Analýza aktivity složek jasmínového esenciálního oleje

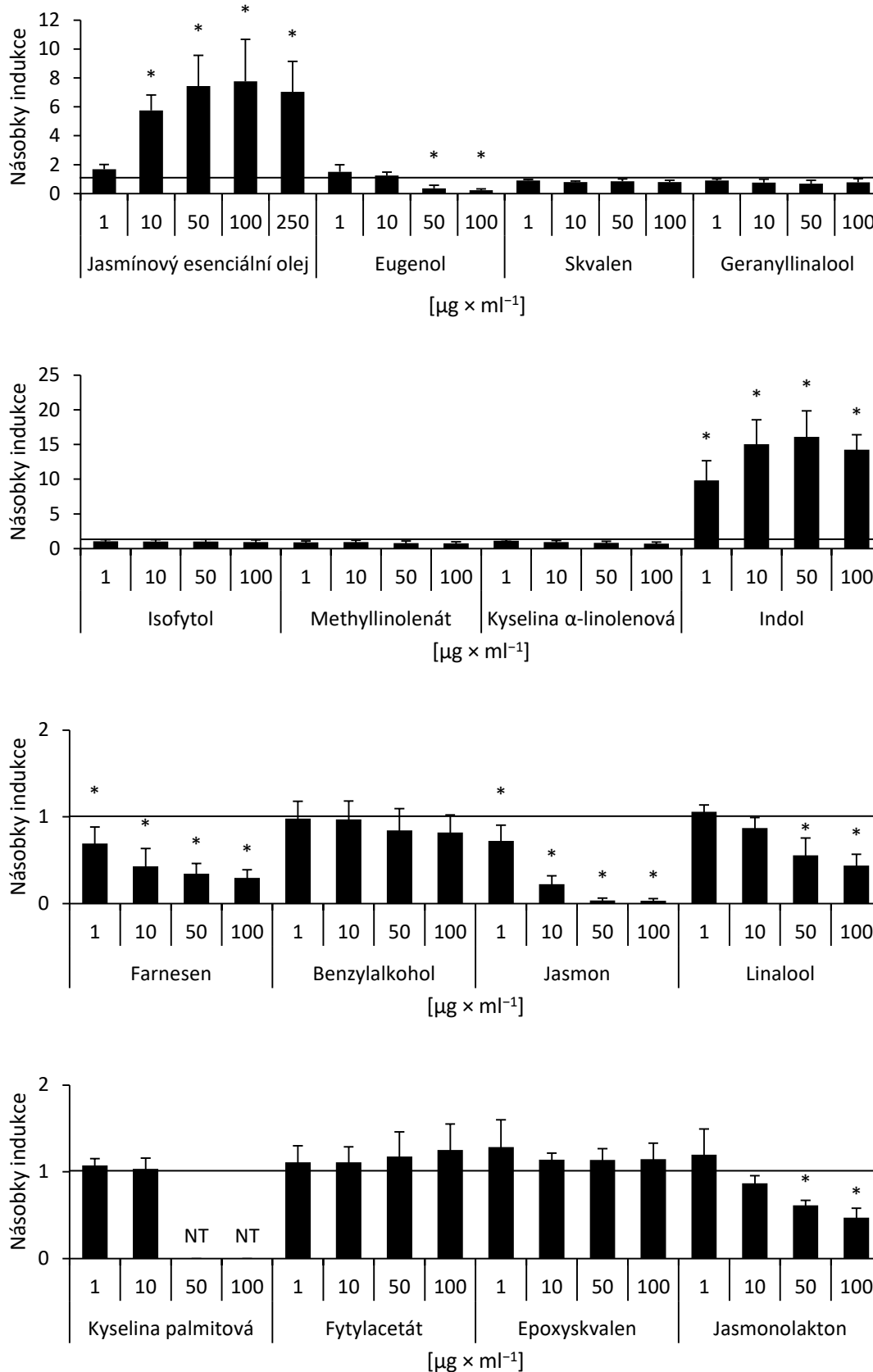
Stanovení vlivu jednotlivých složek na bazální aktivitu AhR

Jelikož mezi složkami jasmínového esenciálního oleje zastoupenými v podílu 10 a více procent nebyla nalezena složka zodpovědná za zjištěnou transkripční aktivitu, byla metodou Reporter gene assay analyzována transkripční aktivita AhR složek zastoupených v objemovém rozmezí 1-10 %. Analyzováno bylo celkem 15 látek, rovněž byly ověřeny účinky samotného jasmínového oleje. Látky byly testovány ve 4 koncentracích – 1, 10, 50 a 100 $\mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$, s výjimkou kyseliny palmitové, která ve dvou nejvyšších koncentracích nebyla ve vodě rozpustná.

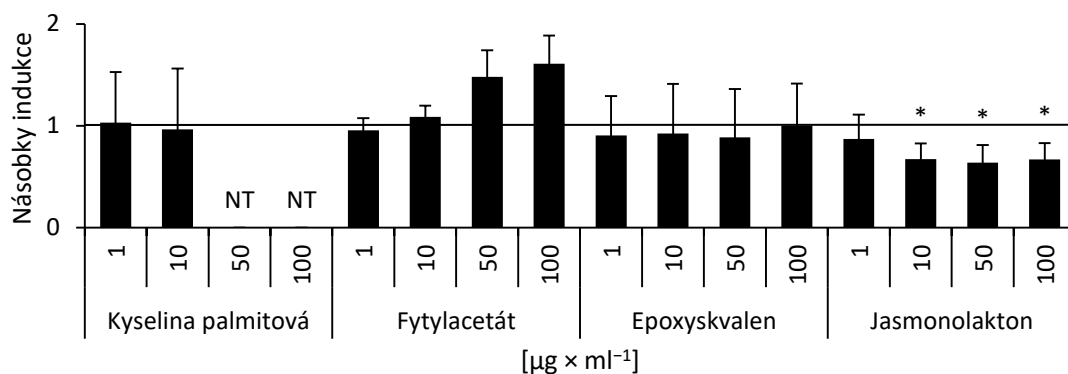
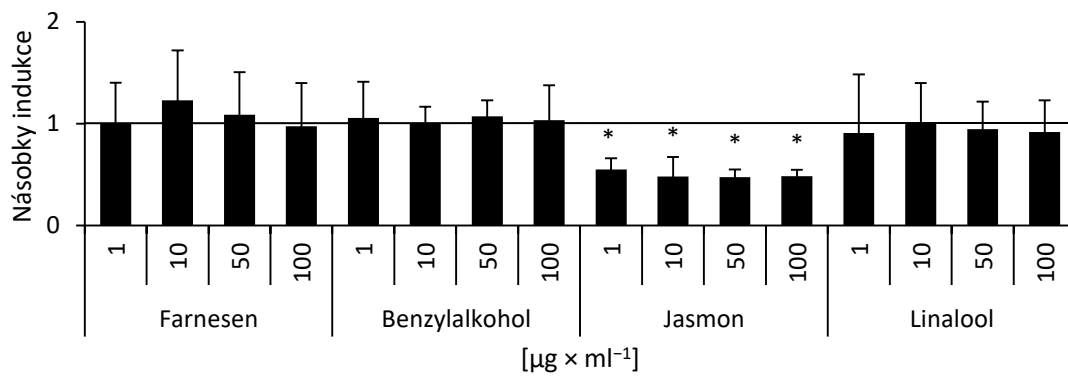
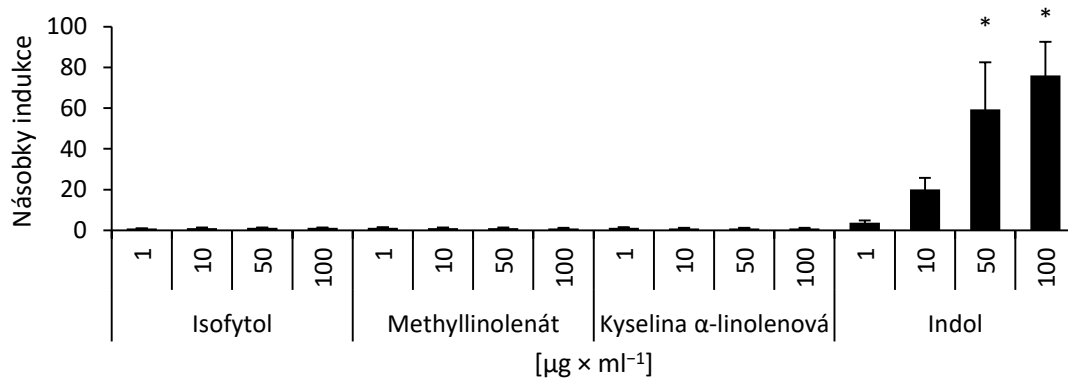
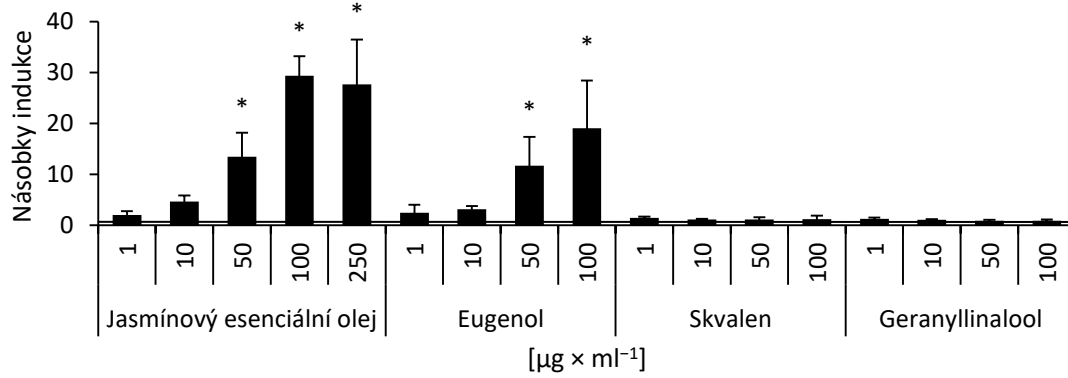
Látky byly testovány ve dvou časech – 24 h, jelikož tento čas byl použit v původní studii, a 4 h, pro zachycení možné krátkodobé aktivace AhR, na což bylo už dříve poukázáno (Štěpánková *et al.*, 2018). Jako pozitivní kontrola aktivace transkripce bylo použito TCDD (5 $\text{nmol} \times \text{l}^{-1}$), indukce tímto ligandem dosahovala průměrně $6,6 \times (\pm 2,1)$ [směrodatná odchylka] násobku negativní kontroly v případě 4 h inkubace a $2343 \times (\pm 964)$ v případě 24 h inkubace. Bazální hodnoty byly po 4 h inkubace asi $30 \times$ vyšší než při 24 h inkubacem, to je pravděpodobně způsobeno přítomností FICZ v médiu (Öberg *et al.*, 2005), který je při delší inkubaci takřka úplně metabolizován. Některé látky způsobovaly snížení této bazální aktivity, bez přítomnosti přidaného ligandu.

U dvou látek bylo zaznamenáno na dávce závislé zvýšení transkripční aktivity AhR oproti negativní kontrole – u indolu v obou časech, u eugenolu pouze po 24 h, zatímco při 4 h inkubace došlo ke snižování aktivity (obrázky 5 a 6). Indol lze tedy označit za plného agonistu, zatímco eugenol vykazuje účinky parciálního agonisty. Snížení transkripční aktivity oproti bazálním hodnotám bylo zaznamenáno po 4 h u farnesenu, jasmonu, linaloolu a jasmonolaktonu (obrázek 5), po 24 h byly tyto látky neaktivní (obrázek 6) s výjimkou jasmonu, kde došlo ke snížení bazální aktivity, které ale bylo na dávce nezávislé. Zbývající látky byly v tomto systému neaktivní.

Agonistické a antagonistické aktivity látek v kontextu 4 a 24 h inkubace jsou shrnuty v tabulce 2.



Obrázek 5: Transkripční aktivita AhR v buněčné linii AZ-AhR po 4 h inkubace s minoritními složkami jasmínového esenciálního oleje. Svislá čára značí hodnoty negativní kontroly. Data jsou vyjádřena jako průměr z 3–5 experimentů (\pm směrodatná odchylka) s vyloučením nerepresentativních hodnot, analyzováno metodou Reporter gene assay. Hvězdičky značí statistickou významnost ($P < 0,05$) proti negativní kontrole na základě analýzy variance s užitím Tukey HSD *post-hoc* testu. NT – netestováno.



Obrázek 6: Transkripční aktivita AhR v buněčné linii AZ-AhR po 24 h inkubace s minoritními složkami jasmínového esenciálního oleje. Svislá čára značí hodnoty negativní kontroly. Data jsou vyjádřena jako průměr z 3–5 experimentů (\pm směrodatná odchylka) s vyloučením nereprezentativních hodnot, analyzováno metodou Reporter gene assay. Hvězdičky značí statistickou významnost ($P < 0,05$) proti negativní kontrole na základě analýzy variance s užitím Tukey HSD *post-hoc* testu. NT – netestováno.

Tabulka 2: Klasifikace testovaných látek ve vztahu k AhR

Látka	Aktivita		Klasifikace
	4 h	24 h	
Eugenol	–	+	Parciální agonista
Skvalen	/	/	Neaktivní
Geranylinalool	/	/	Neaktivní
Isofytol	/	/	Neaktivní
Methylinolenát	/	/	Neaktivní
Kyselina α -linolenová	/	/	Neaktivní
Indol	+	+	Plný agonista
Farnesen	–	/	Antagonista
Benzylalkohol	/	/	Neaktivní
Jasmon	–	/	Antagonista
Linalool	–	/	Antagonista
Kyselina palmitová	/	/	Neaktivní
Fytylacetát	/	/	Neaktivní
Epoxykvalen	/	/	Neaktivní
Jasmonolakton	–	/	Antagonista

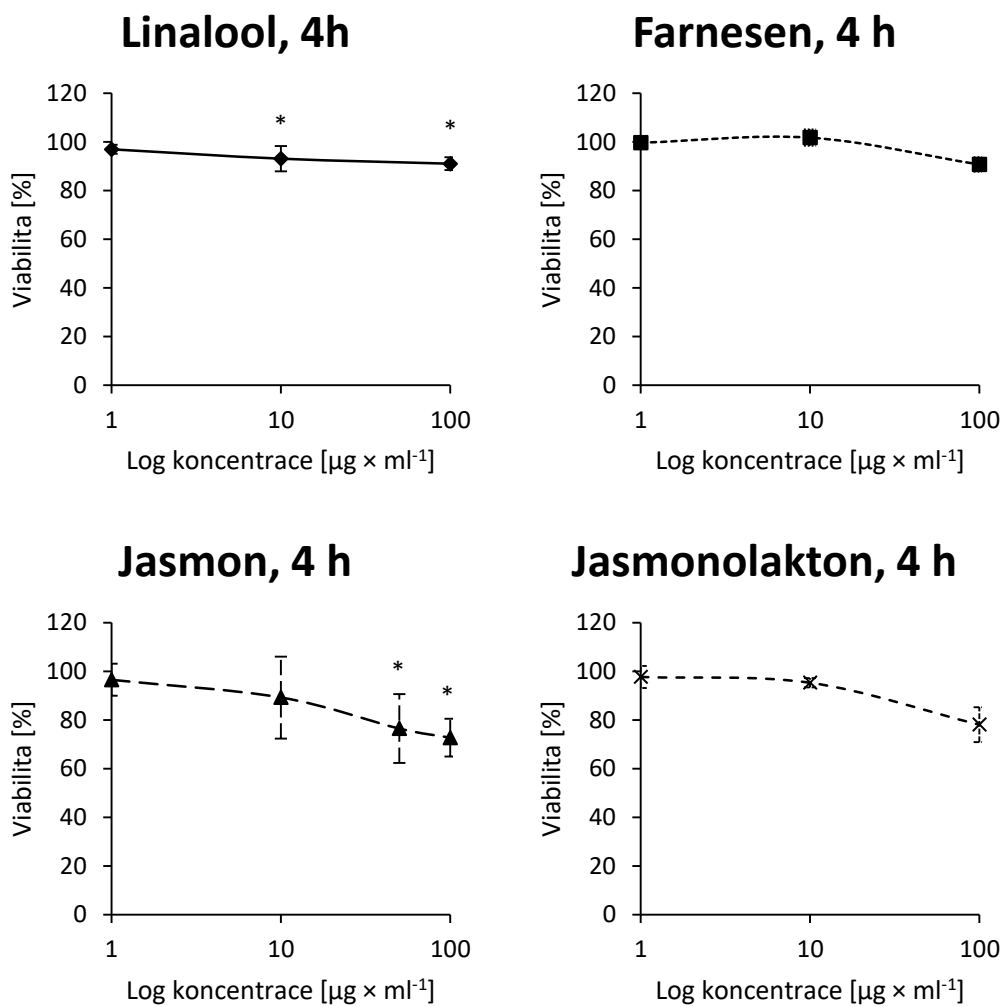
Vysvětlivky: (+) – aktivace, (–) – inhibice, (/) – bez aktivity.

5.1.1. Stanovení životaschopnosti po ošetření AhR-aktivními látkami

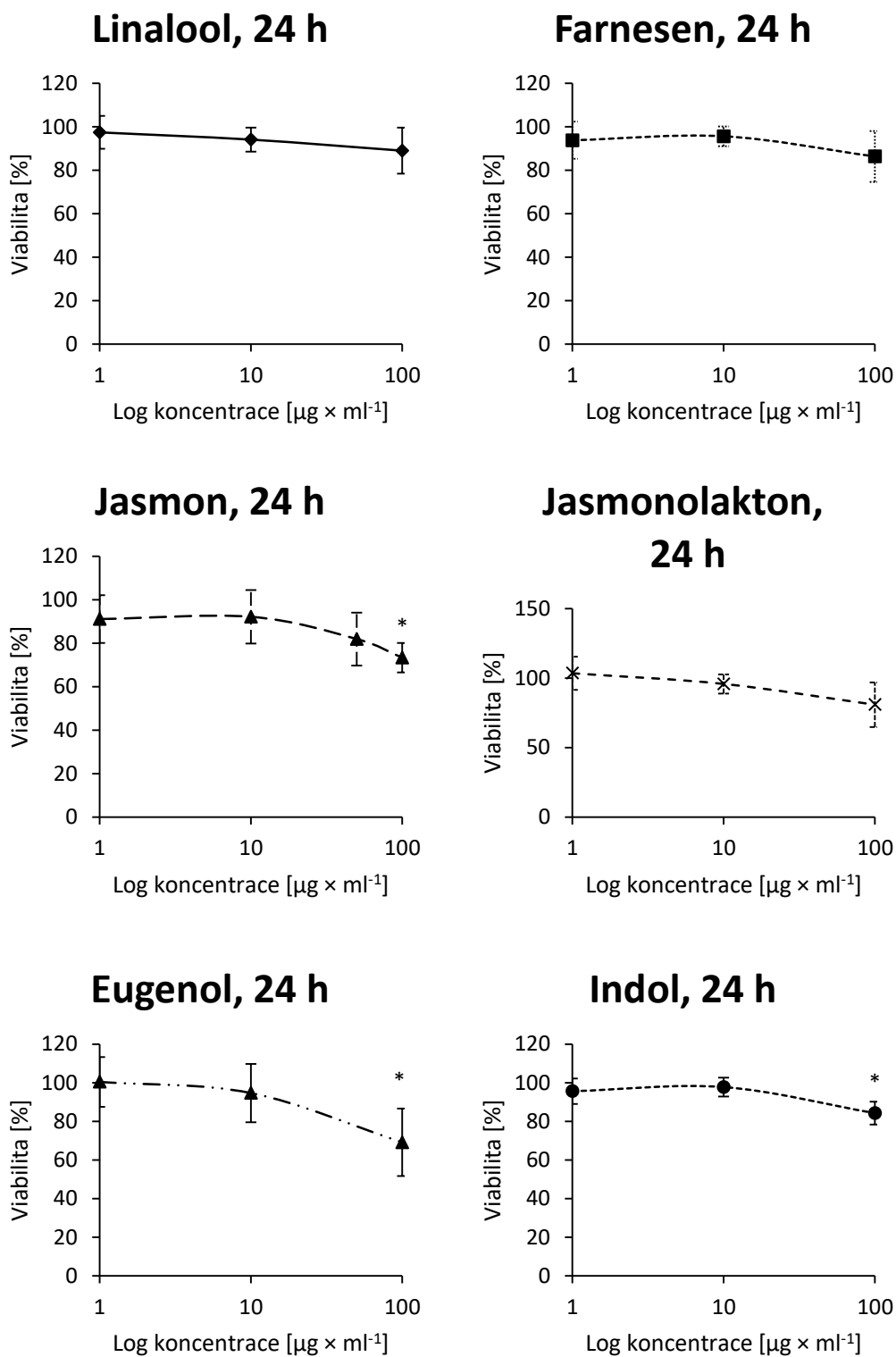
Látky, které byly metodou Reporter gene assay označeny za aktivní, byly dále podrobeny analýze viability metodou MTT v buněčné linii AZ-AhR, aby byl zohledněn případný vliv životaschopnosti buněk na změnu v transkripční aktivitě AhR. Pro stanovení viability byly použity stejné časy inkubace jako u Reporter gene assay – 24 h pro všechny látky, u látek aktivních při krátké inkubaci rovněž 4 h.

Po 4 h inkubace došlo k statisticky významnému snížení viability u všech látek, signifikanci však lze přisoudit nízkým odchylkám, jelikož u linaloolu a farnesenu došlo ke snížení viability nejvýše o desetinu negativní kontroly, a to i v maximální koncentraci $100 \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$ (obrázek 7). V případě jasmonu došlo ke snížení viability v nejvyšší koncentraci až o 30 %, v případě jasmolaktonu o pětinu.

Snížení viability o 30 % bylo dále zjištěno u eugenolu po 24 h u nejvyšší koncentrace této látky, stejně tak tomu bylo u jasmonu (obrázek 8). V případě indolu došlo k 15% poklesu viability u nejvyšší koncentrace.



Obrázek 7: Viabilita buněčné linie AZ-AhR po 4 h inkubace s AhR-aktivními složkami jasmínového esenciálního oleje. Data jsou vyjádřena jako průměr z 4–6 experimentů (\pm směrodatná odchylka) s vyloučením nerepresentativních hodnot, analyzováno metodou MTT. Hvězdičky značí statistickou významnost ($P < 0,05$) proti negativní kontrole na základě analýzy variance s užitím Tukey HSD *post-hoc* testu.



Obrázek 8: Viabilita buněčné linie AZ-AhR po 24 h inkubace s AhR-aktivními složkami jasmínového esenciálního oleje. Data jsou vyjádřena jako průměr z 5 experimentů (\pm směrodatná odchylka) s vyloučením nereprezentativních hodnot, analyzováno metodou MTT. Hvězdičky značí statistickou významnost ($P < 0,05$) proti negativní kontrole na základě analýzy variance s užitím Tukey HSD *post-hoc* testu.

5.2. Analýza antagonistických účinků jasmonu

Jelikož obě nalezené složky s agonistickou aktivitou, indol a eugenol, byly ve vztahu k AhR již dříve v literatuře popsány (Kalmes *et al.*, 2006; Hubbard *et al.*, 2015b; Bartoňková *et Dvořák*, 2018), byla pro další analýzu vybrána látka s nejvýraznějšími antagonistickými účinky – jasmon. Látka byla podrobena analýzám souvisejícími s různými aspekty antagonistického působení na receptor, aby se potvrdily či vyvrátily účinky zjištěné metodou Reporter gene assay.

Přestože ve vyšších koncentracích jasmonu docházelo k poklesu viability, byly tyto koncentrace i nadále užívány pro další analýzy, protože existují důkazy o tom, že jasmon na buněčné úrovni cílí na mitochondrie (Rotem *et al.*, 2005) a je tak možné, že MTT Assay jakožto metoda založená na mitochondriálním metabolismu poskytuje falešně pozitivní výsledky.

5.2.1. Vliv na transkripční aktivitu indukovanou různými ligandy

Jako první byla hodnocena schopnost jasmonu antagonizovat různé ligandy receptoru. Vybrány byly tři agonisté – TCDD, který je prototypem ligandu AhR a reprezentuje nemetabolizovatelnou toxickou sloučeninu, BaP, jež je rovněž toxickou látkou, která je ale v těle metabolizována, a FICZ, domnělý endogenní ligand s krátkým poločasem. Uvedené látky byly testovány v časech 4 h a 24 h, a to v koncentracích odpovídající EC80 v příslušných časech v buněčné linii AZ-AhR.

V případě TCDD ($20 \text{ nmol} \times \text{l}^{-1}$) během 4 h inkubace dosahovala průměrná indukce $10,5 \times (\pm 4,9)$ hodnoty negativní kontroly, při 24 h inkubace ($13,5 \text{ nmol} \times \text{l}^{-1}$ TCDD) byly hodnoty v průměru až $1995 \times (\pm 308)$ vyšší než negativní kontrola. K významnému poklesu transkripční aktivity po 4 h došlo při aplikaci jasmonu v koncentraci $10 \text{ } \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$ na asi 40 % (obrázek 9), po 24 h došlo k poklesu na 70 % indukované aktivity již v koncentraci $1 \text{ } \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$ (obrázek 10). V nejvyšší koncentraci $100 \text{ } \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$ klesla aktivita pod 1 % (v případě 4 h inkubace) a na 2,5 % (v případě 24 h inkubace).

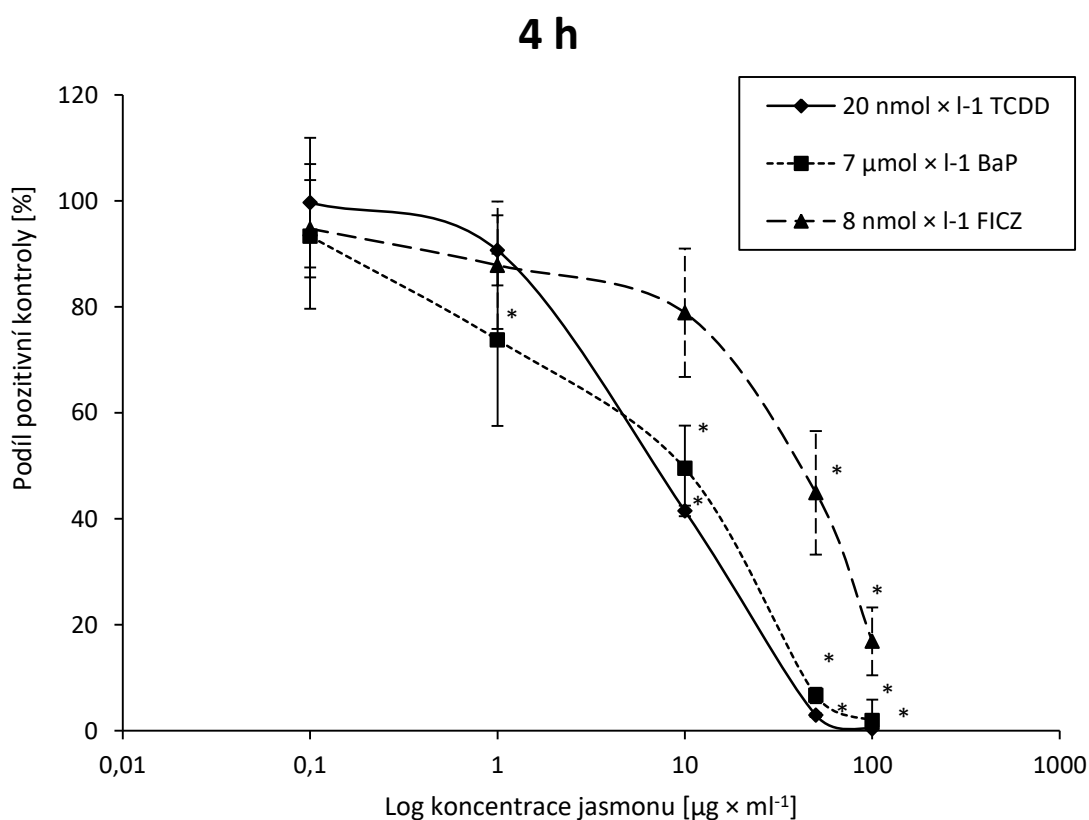
BaP v koncentraci $7 \text{ } \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ indukoval transkripční aktivitu po 4 h průměrně $7,6 \times (\pm 3,5)$, v koncentraci $15,8 \text{ } \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ to bylo $1203 \times (\pm 354)$. V případě BaP došlo k významnému poklesu transkripční aktivity v obou časech při koncentraci jasmonu $1 \text{ } \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$, a to o asi 30 % (4 h, obrázek 9) a 40 % (24 h, obrázek 10). Nejvyšší koncentrace jasmonu způsobila po 4 h pokles na necelá 2 % původně indukované aktivity, po 24 h na 12 %. Celkově byl profil podobný jako u TCDD.

U FICZ po 4 h ($8 \text{ nmol} \times \text{l}^{-1}$) byly zjištěny hodnoty indukce v průměru $16,0 \times (\pm 8,7)$ vyšší než hodnoty bazální, po 24 h ($22,6 \text{ } \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$) vyšší $3048 \times (\pm 818)$. Po 4 h inkubace došlo ke statisticky významnému poklesu transkripční aktivity až u koncentrace $50 \text{ } \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$, a to na 45 % (obrázek 9). V nejvyšší koncentraci jasmonu, $100 \text{ } \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$, klesla aktivita na 17 %. Při delší inkubaci byly antagonistické účinky jasmonu ještě méně výrazné – významné snížení aktivity AhR bylo zaznamenáno u koncentrace $10 \text{ } \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$, avšak pouze o pětinu, a v nejvyšší koncentraci jasmonu klesla transkripční aktivita pouze o polovinu (obrázek 10).

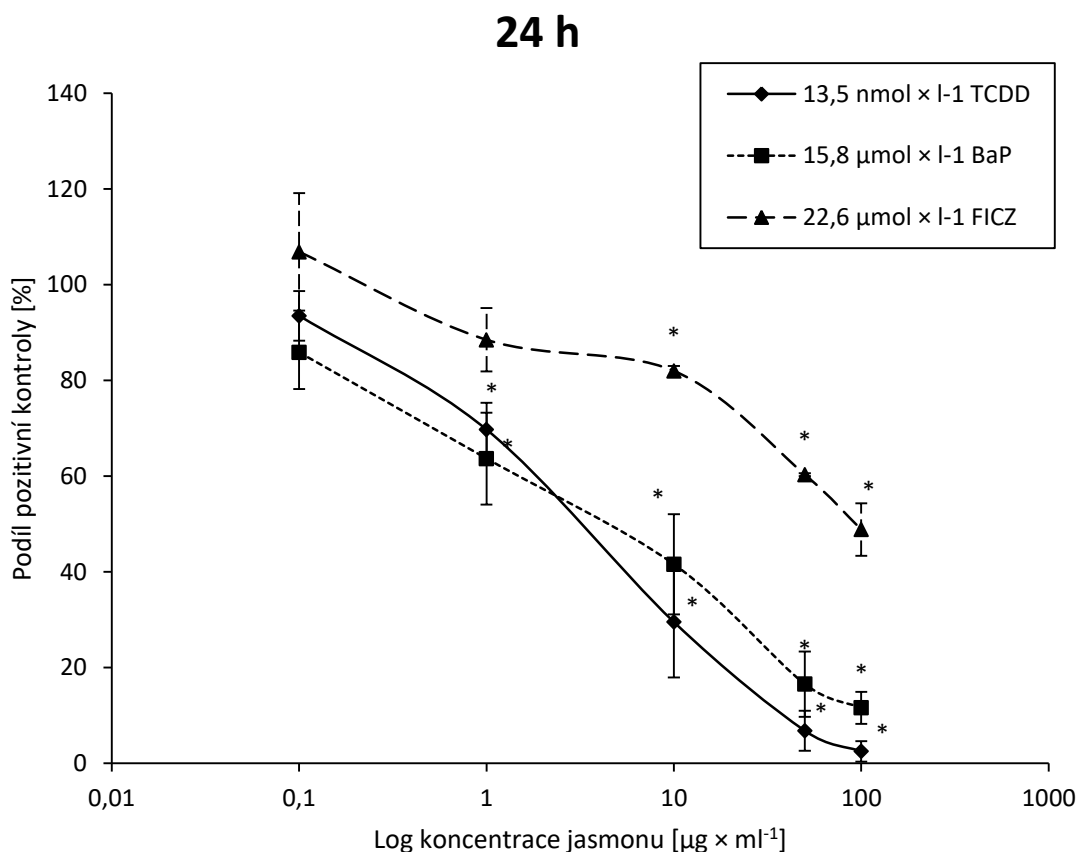
50% inhibiční koncentrace (IC50) pro jednotlivé ligandy v daném čase je uvedena v tabulce 3.

Tabulka 3: 50% inhibiční koncentrace jasmonu

Ligand	TCDD		BaP		FICZ	
Čas	4 h	24 h	4 h	24 h	4 h	24 h
Koncentrace ligandu	20 $\text{nmol} \times \text{l}^{-1}$	13,5 $\text{nmol} \times \text{l}^{-1}$	7 $\mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$	15,8 $\mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$	8 $\text{nmol} \times \text{l}^{-1}$	22,6 $\mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$
IC50 jasmonu (\pm směrodatná odchylka) [$\mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$]	7,1 ($\pm 2,0$)	2,6 ($\pm 1,5$)	2,7 ($\pm 1,2$)	2,5 ($\pm 1,1$)	27,6 ($\pm 15,4$)	93,7 ($\pm 24,5$)



Obrázek 9: Inhibice indukované transkripční aktivity AhR po 4 h inkubace s jasmonem v buněčné linii AZ-AhR. Data jsou vyjádřena jako průměr z 4–5 experimentů (\pm směrodatná odchylka) s vyloučením nerepresentativních hodnot, analyzováno metodou Reporter gene assay. Hvězdičky značí statistickou významnost ($P < 0,05$) proti příslušné pozitivní kontrole na základě analýzy variance s užitím Tukey HSD *post-hoc* testu.



Obrázek 10: Inhibice indukované transkripční aktivity AhR po 24 h inkubace s jasmonem v buněčné linii AZ-AhR. Data jsou vyjádřena jako průměr z 4–5 experimentů (\pm směrodatná odchylka) s vyloučením nerepresentativních hodnot, analyzováno metodou Reporter gene assay. Hvězdičky značí statistickou významnost ($P < 0,05$) proti příslušné pozitivní kontrole na základě analýzy variance s užitím Tukey HSD *post-hoc* testu.

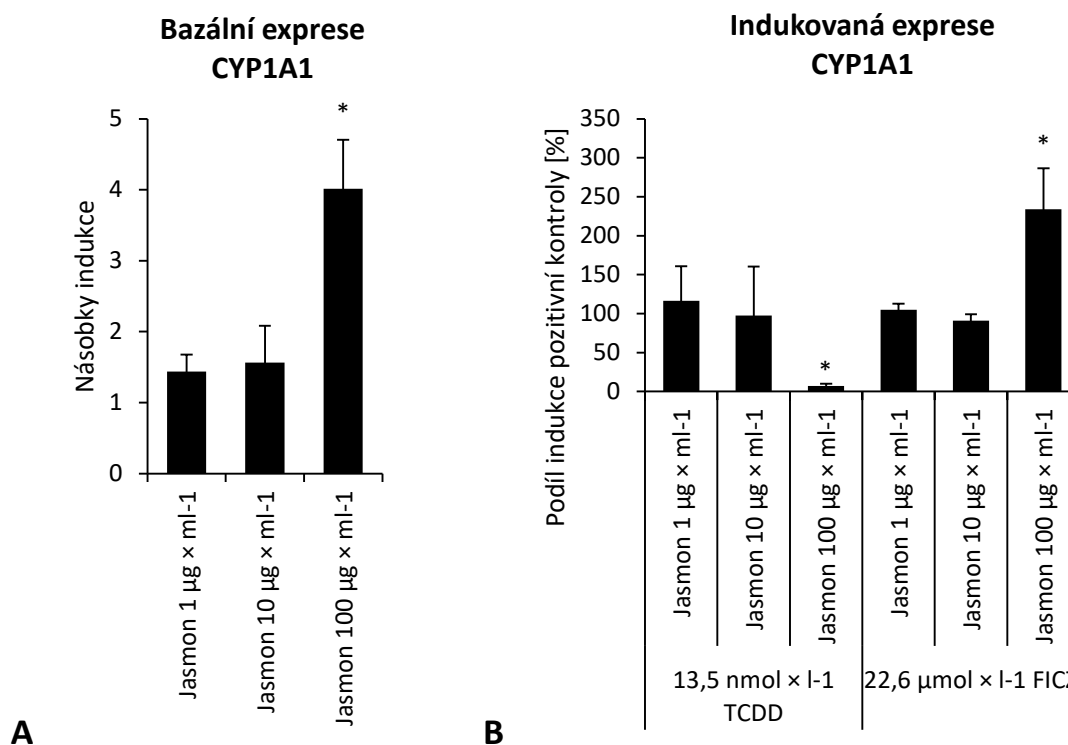
5.2.2. Vliv na expresi CYP1A1

Vliv jasmonu na typický cílový gen AhR, CYP1A1, byl studován také na RNA a proteinové úrovni. Byl sledován efekt jak na bazální expresi, tak na indukovanou pomocí TCDD a FICZ. Vzhledem k podobnosti účinků jasmonu na TCDD a BaP nebyl BaP k dalším analýzám používán. Exprese byla sledována po 24 h za použití TCDD o koncentraci $13,5 \text{ nmol} \times \text{l}^{-1}$ a FICZ o koncentraci $22,6 \text{ } \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$. Exprese daných genů byla sledována metodou Real-time PCR a Western blotting v buněčné linii HepG2 po 24 h inkubace.

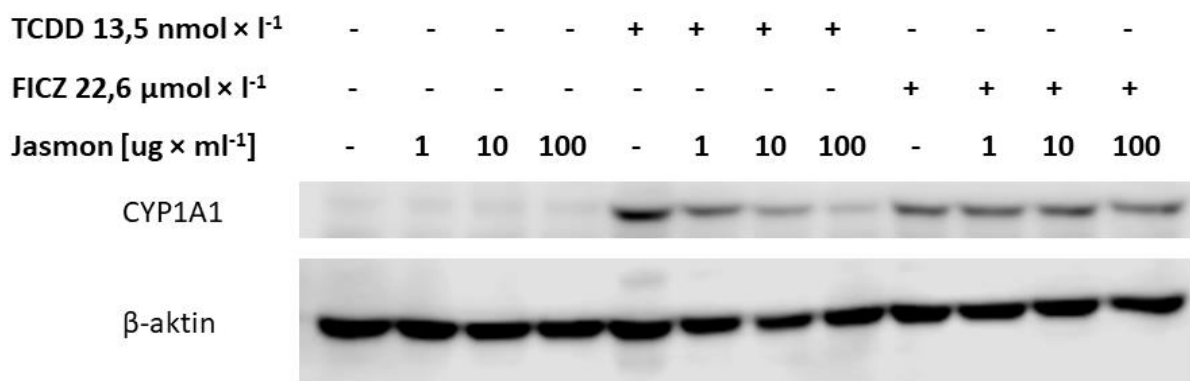
V rozporu s předchozími výsledky ze stanovení bazální transkripční aktivity AhR po 24 h (obrázek 6) došlo u nejvyšší koncentrace jasmonu ke čtyřnásobnému zvýšení hladiny RNA oproti negativní kontrole (obrázek 11A). Tento efekt se však neprojevil na úrovni proteinu (obrázek 12).

V případě indukované exprese pomocí TCDD dosahovala exprese CYP1A1 na úrovni RNA průměrně $204 \times (\pm 67)$ hodnot negativní kontroly. Zde došlo se zvyšující se koncentrací jasmonu k potlačení exprese CYP1A1, dle předpokladu (obrázek 11B), statisticky významné hodnoty dosáhl ovšem až v nejvyšší koncentraci jasmonu. Efekt byl, konzistentně s RNA, patrný také na úrovni proteinu (obrázek 12).

Při použití FICZ jako induktoru dosahovala exprese hodnot průměrně $389 \times (\pm 217)$ bazálních hodnot RNA. Zde se antagonistické účinky jasmonu neprojeví, naopak opět v nejvyšší koncentraci došlo k asi dvojnásobnému zvýšení exprese CYP1A1 oproti FICZ samotnému (obrázek 11B). Rovněž na úrovni proteinu se antagonistický charakter látky neprojevil, zvýšení hladiny proteinu však nebylo pozorováno (obrázek 12).



Obrázek 11: Bazální (A) a indukovaná (B) exprese CYP1A1 po ošetření jasmonem v buněčné linii HepG2 po 24 h na úrovni RNA. Data jsou vyjádřena jako průměr ze 4 experimentů (\pm směrodatná odchylka) s vyloučením nerepresentativních hodnot, analyzováno pomocí Real-time PCR. Hodnoty jsou normalizovány na expresi glycerinaldehyd-3-fosfátdehydrogenázy. Hvězdičky značí statistickou významnost ($P < 0,05$; proti negativní kontrole v případě bazální exprese, proti pozitivní kontrole v případě indukované exprese) na základě analýzy variance s užitím Tukey HSD *post-hoc* testu.

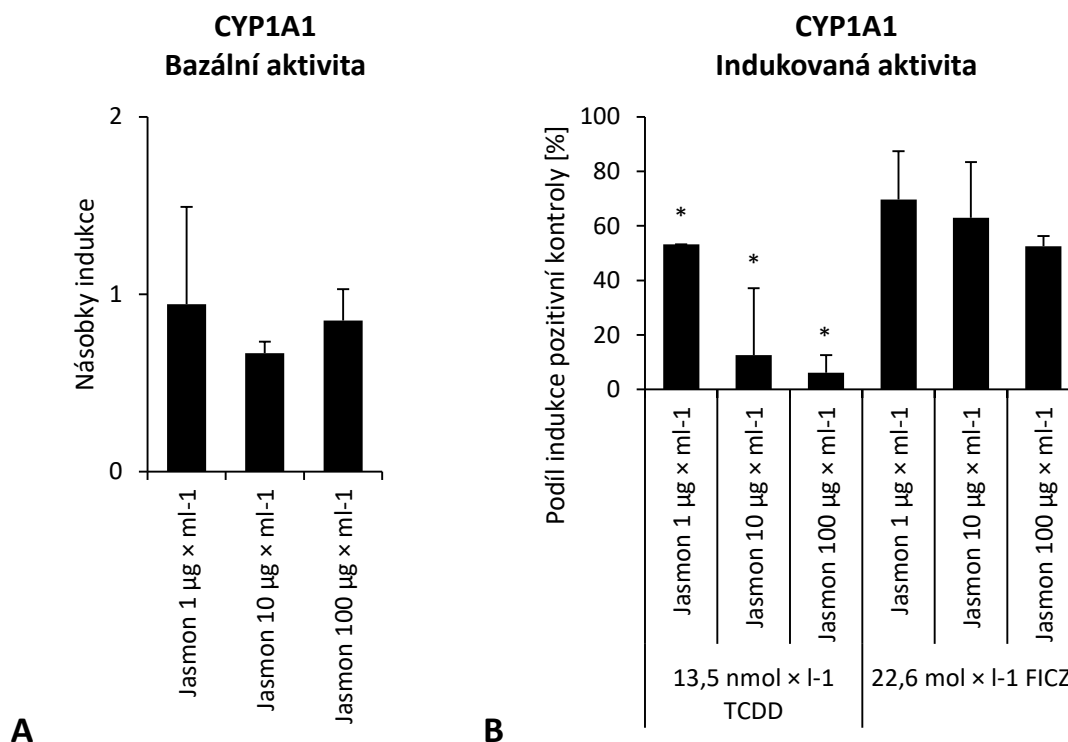


Obrázek 12: Bazální a indukovaná exprese CYP1A1 po ošetření jasmonem v buněčné linii HepG2 po 24 h na úrovni proteinu. Reprezentativní snímek. Provedeno celkem 5 experimentů, analyzováno metodou Western blotting. Normalizováno vůči expresi β -aktinu.

5.2.3. Vliv na aktivitu CYP1A1

Pro doplnění údajů o vlivu jasmonu na množství enzymu CYP1A1 byly antagonistické účinky jasmonu hodnoceny také podle vlivu na bazální a indukovanou aktivitu tohoto enzymu po 24 h inkubace.

Jasmon neměl efekt na bazální aktivitu CYP1A1 (obrázek 13A), zatímco aktivita indukovaná TCDD reflektovala předchozí nálezy. TCDD indukoval aktivitu CYP1A1 průměrně $135 \times (\pm 9)$. K signifikantnímu poklesu aktivity došlo ve všech testovaných koncentracích jasmonu, v nejvyšší koncentraci to bylo až na 3 % původní indukované aktivity (obrázek 13B). FICZ aktivitu indukoval $116 \times (\pm 38)$ oproti negativní kontrole. Na rozdíl od výsledků ze stanovení exprese CYP1A1 byl v tomto případě pozorován na dávce závislý pokles aktivity CYP1A1, pokles však nebyl statisticky významný. Přestože je toto ve shodě s transkripční aktivitou AhR, tak pokles lze pravděpodobně přisoudit snížené životaschopnosti buněk (jak bylo zjištěno metodou MTT, viz obrázek 9), jelikož metoda Reporter Gene Assay neumožňuje normalizaci měřené aktivity.

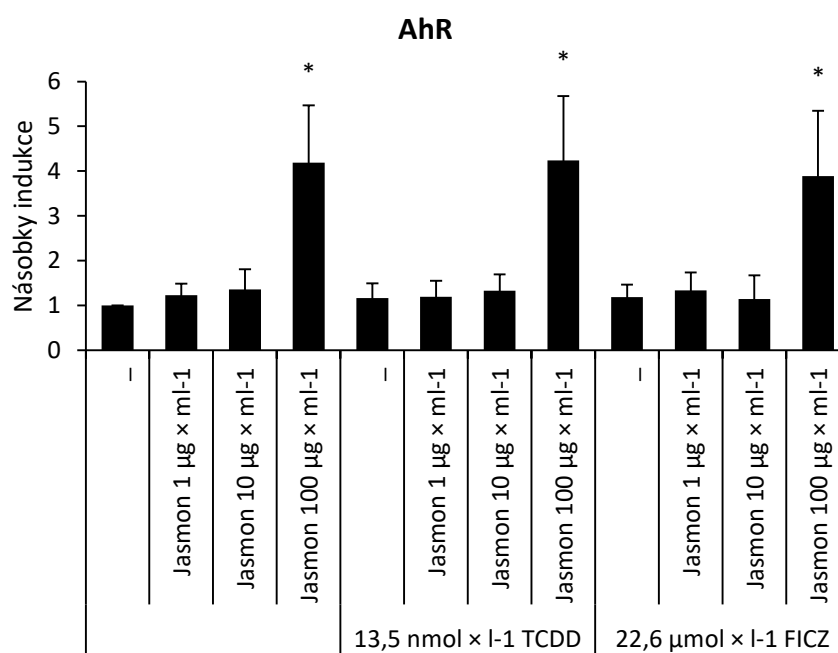


Obrázek 13: Bazální (A) a indukovaná (B) aktivita CYP1A1 po ošetření jasmonem v buněčné linii HepG2 po 24 h na úrovni RNA. Data jsou vyjádřena jako průměr z 3 experimentů (\pm směrodatná odchylka) s vyloučením nereprezentativních hodnot, analyzováno pomocí Glo-Assay. Hvězdičky značí statistickou významnost ($P < 0,05$; proti negativní kontrole v případě bazální aktivity, proti pozitivní kontrole v případě indukované aktivity) na základě analýzy variance s užitím Tukey HSD *post-hoc* testu.

5.2.4. Vliv na expresi AhR a ARNT

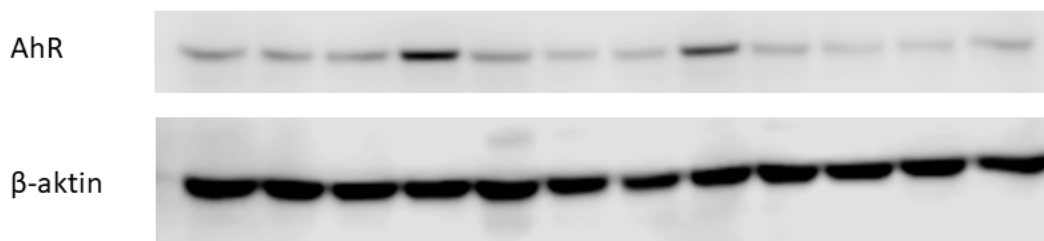
Dále byla testována hypotéza, zda jasmon neovlivňuje hladinu samotného AhR či ARNT, a to jak na transkripční, tak translační úrovni. Evaluována byla jak bazální exprese, tak indukovaná pomocí TCDD a FICZ.

Zatímco TCDD ani FICZ neměly na hladinu jak AhR, tak ARNT efekt, jasmon v nejvyšší koncentraci ($100 \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$) způsobil významné zvýšení hladiny AhR až o čtyřnásobek na úrovni RNA (obrázek 14). Tento efekt byl pozorován i na úrovni proteinu, s výjimkou kombinace $100 \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$ a FICZ (obrázek 15). Analogicky došlo ke zvýšení hladiny ARNT při této koncentraci jasmonu, ovšem v menší míře, zvýšení nebylo na úrovni RNA statisticky signifikantní (obrázek 16). Na úrovni proteinu byly detekovány 3 různé formy ARNT (obrázek 17), jež jsou pravděpodobně sestřihovými variantami ARNT (Gardella *et al.*, 2016). Mírné zvýšení množství RNA se do zvýšení množství proteinu nepromítlo.

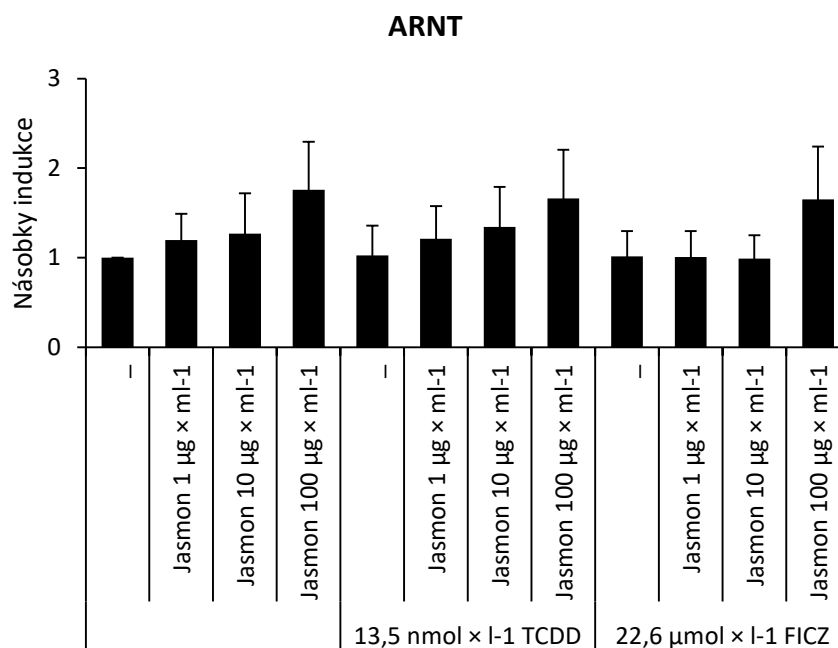


Obrázek 14: Ovlivnění exprese AhR jasmonem samotným či v kombinaci s TCDD nebo FICZ v buněčné linii HepG2 po 24 h na úrovni RNA. Data jsou vyjádřena jako průměr ze 4 experimentů (\pm směrodatná odchylka) s vyloučením nerepresentativních hodnot, analyzováno pomocí Real-time PCR. Hodnoty jsou normalizovány na expresi glycerinaldehyd-3-fosfátdehydrogenázy. Hvězdičky značí statistickou významnost ($P < 0,05$) proti negativní kontrole na základě analýzy variance s užitím Tukey HSD *post-hoc* testu.

TCDD $13,5 \text{ nmol} \times \text{l}^{-1}$	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
FICZ $22,6 \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
Jasmon [$\mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$]	-	1	10	100	-	1	10	100	-	1	10	100

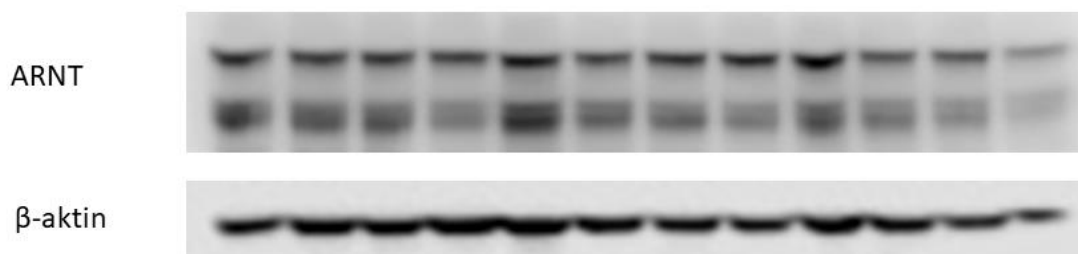


Obrázek 15: Ovlivnění exprese AhR jasmonem samotným či v kombinaci s TCDD nebo FICZ v buněčné linii HepG2 po 24 h na úrovni proteinu. Reprezentativní snímek. Provedeno celkem 5 experimentů, analyzováno metodou Western blotting. Normalizováno vůči expresi β -aktinu.



Obrázek 16: Ovlivnění exprese ARNT jasmonem samotným či v kombinaci s TCDD nebo FICZ v buněčné linii HepG2 po 24 h na úrovni RNA. Data jsou vyjádřena jako průměr ze 4 experimentů (\pm směrodatná odchylka) s vyloučením nereprezentativních hodnot, analyzováno pomocí Real-time PCR. Hodnoty jsou normalizovány na expresi glycerinaldehyd-3-fosfátdehydrogenázy.

TCDD 13,5 nmol \times l ⁻¹	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
FICZ 22,6 µmol \times l ⁻¹	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
Jasmon [μ g \times ml ⁻¹]	-	1	10	100	-	1	10	100	-	1	10	100



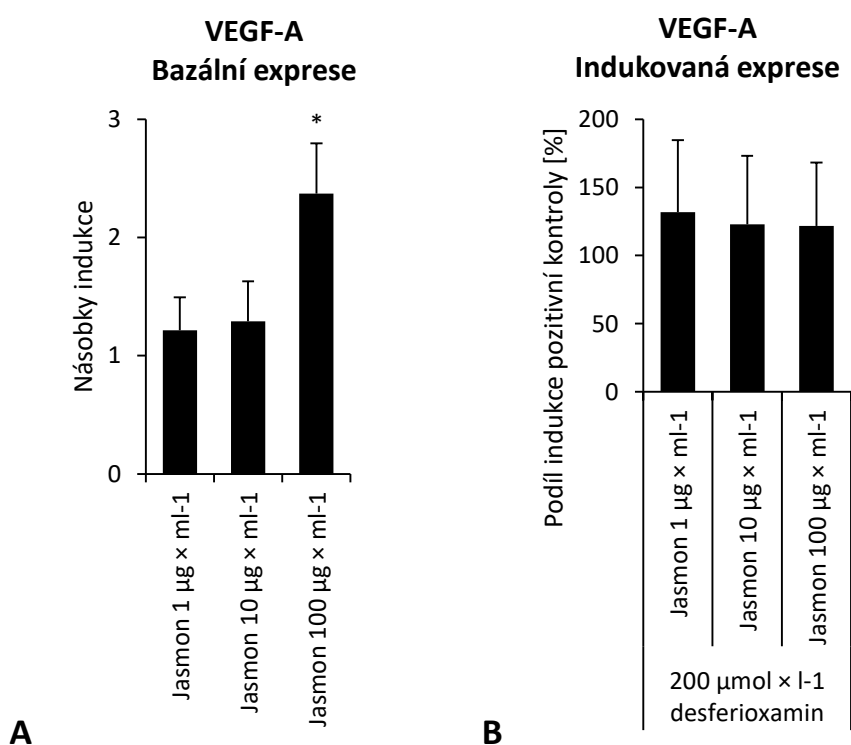
Obrázek 17: Ovlivnění exprese ARNT jasmonem samotným či v kombinaci s TCDD nebo FICZ v buněčné linii HepG2 po 24 h na úrovni proteinu. Repräsentativní snímek. Provedeno celkem 5 experimentů, analyzováno metodou Western blotting. Normalizováno vůči expresi β -aktinu.

5.2.5. Cross-talk s hypoxickou signalizací

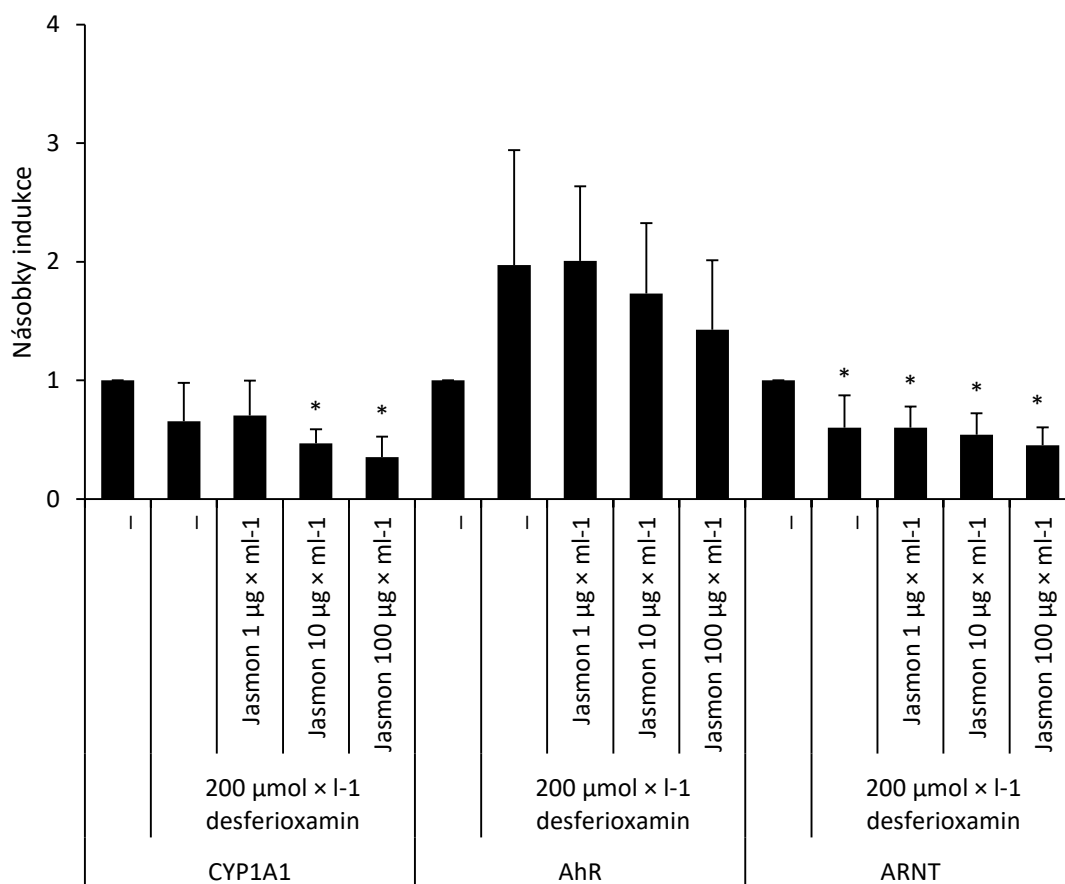
Dále byl hodnocen možný vliv hypoxické signální dráhy, reprezentované receptorem indukovaným hypoxií HIF-1 α , na signalizaci pomocí AhR, jelikož receptory spolu sdílí dimerizačního partnera ARNT, a při současné aktivaci obou drah tak může potenciálně docházet k vyčerpání tohoto proteinu a způsobovat pokles aktivace AhR. Jako mimetikum hypoxických podmínek byl použit DFX (200 μ mol \times l⁻¹), a aktivace HIF-1 α byla sledována pomocí indukce VEGF-A na transkripční úrovni.

Míra exprese VEGF-A byla sledována v buněčné linii HepG2 pomocí Real-time PCR po 24 h inkubace.

Jasmon způsobil dvojnásobné zvýšení exprese VEGF-A v nejvyšší koncentraci $100 \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$. DFX indukoval expresi VEGF-A průměrně pouze $2,1 \times (\pm 0,7)$ oproti bazálním hodnotám, jasmon na DFX-indukovanou expresi neměl žádný další vliv (obrázek 18). Dále byl hodnocen vliv DFX a jeho kombinace s jasmonem na geny CYP1A1, AhR a ARNT. DFX v případě CYP1A1 a ARNT způsobil mírný pokles hladiny RNA, přičemž u CYP1A1, ne však u ARNT, jasmon tento efekt dále podporoval. Naopak u AhR došlo účinkem DFX k asi dvojnásobnému zvýšení exprese na úrovni RNA, a se zvyšující se koncentrací jasmonu se množství RNA mírně snižovalo (obrázek 19).



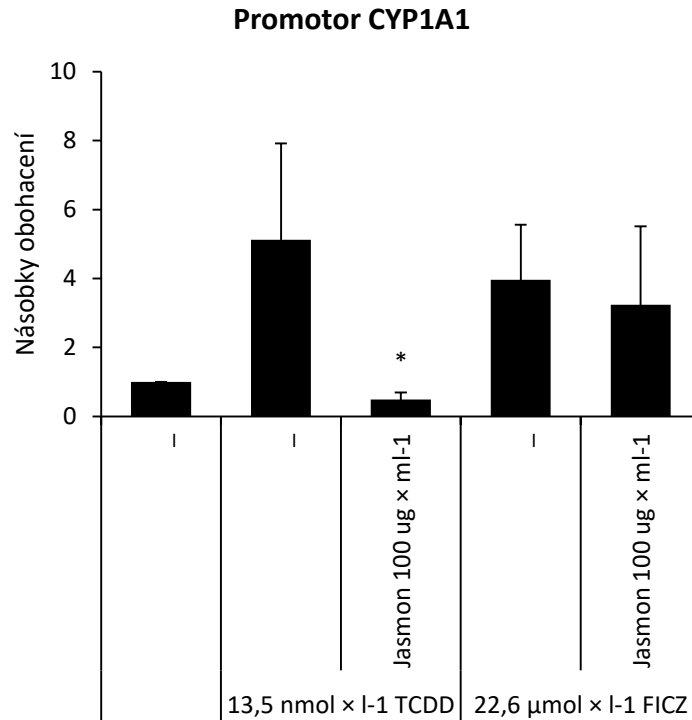
Obrázek 18: Bazální (A) a indukovaná (B) exprese VEGF-A po ošetření jasmonem v buněčné linii HepG2 po 24 h na úrovni RNA. Data jsou vyjádřena jako průměr z 4–6 experimentů (\pm směrodatná odchylka) s vyloučením nerepresentativních hodnot, analyzováno pomocí Real-time PCR. Hodnoty jsou normalizovány na expresi glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenázy. Hvězdičky značí statistickou významnost ($P < 0,05$; proti negativní kontrole v případě bazální exprese, proti pozitivní kontrole v případě indukované exprese) na základě analýzy variance s užitím Tukey HSD *post-hoc* testu.



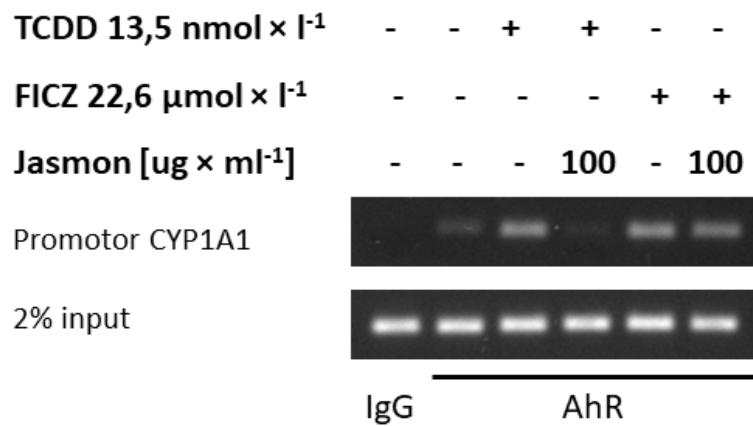
Obrázek 19: Vliv jasmonu na expresi CYP1A1, AhR a ARNT při koinkubaci s desferrioxaminem v buněčné linii HepG2 po 24 h na úrovni RNA. Data jsou vyjádřena jako průměr ze 4 experimentů (\pm směrodatná odchylka) s vyloučením nerepresentativních hodnot, analyzováno pomocí Real-time PCR. Hodnoty jsou normalizovány na expresi glycerinaldehyd-3-fosfátdehydrogenázy. Hvězdičky značí statistickou významnost ($P < 0,05$) proti negativní kontrole na základě analýzy variance s užitím Tukey HSD *post-hoc* testu.

5.2.6. Vliv na vazbu do promotoru CYP1A1

Metodou chromatinové imunoprecipitace byl hodnocen vliv jasmonu na míru vazby AhR do promotoru genu CYP1A1 indukovaného buď TCDD ($13,5 \text{ nmol} \times \text{l}^{-1}$), nebo FICZ ($22,6 \text{ } \mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$) po 90 min inkubace. I zde výsledky potvrzují předchozí zjištění – vlivem inkubace TCDD s $100 \text{ } \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$ jasmonem došlo k významnému snížení vazby, zatímco v kombinaci s FICZ efekt nebyl pozorován (obrázek 20 a 21).



Obrázek 20: Analýza vazby AhR do promotoru CYP1A1 po ošetření jasmonem v buněčné linii HepG2 po 90 min. Data jsou vyjádřena jako průměr z 5 experimentů (\pm směrodatná odchylka) s vyloučením nerepresentativních hodnot, stanoveno pomocí chromatinové imunoprecipitace. Hvězdičky značí statistickou významnost ($P < 0,05$) proti negativní kontrole na základě analýzy variance s užitím Tukey HSD *post-hoc* testu.



Obrázek 21: Reprezentativní snímek analýzy vazby AhR do promotoru CYP1A1 po ošetření jasmonem v buněčné linii HepG2 po 90 min. Provedeno celkem 5 experimentů. Precipitovaná DNA analyzována pomocí Real-time PCR s následnou vizualizací PCR produktů pomocí agaróзовé elektroforézy. Normalizováno vůči 2% inputu genomické DNA.

6. Diskuze

Tato práce se zabývá vlivem minoritních obsahových složek jasmínového esenciálního oleje na aryluhlovodíkový receptor. Ač byl tento receptor původně popsán jako mediátor toxických účinků TCDD a jiných syntetických environmentálních polutantů, tak je schopen vázat i celou řadu přírodních látek a stále více je zdůrazňována jeho fyziologická role v organismu. Jeho význam zejména ve fyziologii a patologii imunitního systému vedlo k úvahám o možnosti využít jej jako nový terapeutický cíl. Ehrlich *et* Kerkvliet (2017) například navrhuje hledání takových ligandů AhR, které by vyvolávaly podobně imunopresivní účinky jako TCDD, ale na rozdíl od TCDD by byly organismem plně odbouratelné a nepředstavovaly by riziko další toxicity spojené s jeho perzistentním charakterem.

Potenciální terapeutické využití AhR se ve většině případů zaměřovalo na aktivaci receptoru. Agonisté AhR se v preklinických studiích ukazují být užiteční v předcházení reakci štěpu proti hostiteli prostřednictvím indukce regulačních T-lymfocytů (Hauben *et al.*, 2008; Punj *et al.*, 2014). Přestože některé studie ukazují, že antagonisté AhR způsobují spíše zhoršení dané patologie (Di Meglio *et al.*, 2014), jiné preklinické modely úspěšně využívají i inaktivaci signalizace AhR. Například zmíněné bránění reakce štěpu proti hostiteli bylo popsáno i u knock-outu AhR a jeho farmakologické inhibice antagonistou (Dant *et al.*, 2017).

Mimo působení na regulační T-lymfocyty způsobují antagonisté AhR také inhibici diferenciace Th17 lymfocytů (Mohinta *et al.*, 2015). Přestože se taková inhibice AhR může projevat škodlivě ve vztahu k náchylnosti k infekci, existují patologie, kde je snižená aktivita těchto buněk žádoucí, např. u autoimunitních chorob jako revmatoidní artritida či Stillova nemoc dospělých (Waite *et* Skokos, 2012).

Své místo v této problematice má také StemRegenin 1, antagonist AhR, který je již v klinickém testování. StemRegenin 1 se ukázal jako užitečný nástroj pro expanzi hematopoetických kmenových buněk (Boitano *et al.*, 2010). Může také pomoci generovat megakaryocyty a následně tzv. pro-destičky (Strassel *et al.*, 2016), či dendritické buňky (Thordardottir *et al.*, 2014).

Ačkoli, v souvislosti s metabolismem ligandů AhR, je k dispozici minimum dat o chování jasmonu v organismu a jeho toxicitě, a nelze tak předpokládat, že je pro využití bezpečný, zvláště s ohledem k absenci jakýchkoli dat *in vivo*, je jasmon považován za jen mírně toxický po požití, s orální LD₅₀ u potkanů 5 g × kg⁻¹ (Lewis *et* Sax, 2004).

Antagonistický charakter ligandu je možné využít také ke kompetici s perzistentními toxickými ligandy a potlačováním jejich škodlivých účinků. Takový efekt byl například popsán na myších po podání antagonisty CH-223191, kdy byla tato látka schopná potlačovat účinky TCDD *in vivo* (Kim *et al.*, 2006). Jasmon, dle zde prezentovaných výsledků, účinně blokuje účinky toxických ligandů AhR, jako jsou TCDD a BaP, zatímco účinky fyziologického ligandu FICZ zůstávají ve většině případů nezměněny. To je vlastnost, která může být potenciálně výhodná pro zmírnění toxicity

zprostředkované AhR při expozici environmentálními polutanty. Otázkou nicméně zůstává, proč v souvislosti s jasmonem existují tak markantní rozdíly mezi těmito ligandy.

Již dříve byla předložena myšlenka, že ve vztahu k AhR je klíčovou vlastností délka aktivace AhR, tedy rozdíl mezi persistentní aktivací pomocí TCDD a transientní aktivací pomocí FICZ. Zde se ovšem ukazuje, že vysoké koncentrace FICZ, které by měly překlenout účinky jeho rychlého metabolismu, zřejmě nejsou řešením této otázky, s ohledem na to, že k aktivaci AhR i po 24 h pomocí FICZ dochází, ale antagonismus (s výjimkou Reporter gene assay) se neprojevuje. Na podobný jev poukázali Wheeler *et al.* (2014), kdy zkoumali reakci myši v modelu infekce virem chřipky na TCDD a FICZ. Zatímco TCDD způsobil očekávané změny v AhR-zprostředkované imunitní odpovědi, tj. v pulmonární neutrofilii, úrovni indukované syntázy oxidu dusnatého a odpovědi CD8⁺ T-lymfocytů, jednorázová dávka FICZ žádnou z těchto změn nezpůsobila. Při prodloužené aktivaci AhR dávkováním FICZ mikroosmotickými pumpami pak došlo ke změně jediného ze sledovaných parametrů, konkrétně k modulaci funkce T-lymfocytů, a to v podobné míře jako u TCDD. To potvrzuje zde prezentované výsledky, že krátkodobá aktivace AhR není tím hlavním důvodem rozdílných účinků těchto dvou ligandů.

Podobný panel ligandů jako v této diplomové práci byl použit v práci Boule *et al.* (2018). V této studii byl analyzován vliv různých ligandů AhR rovněž na myši model virové infekce chřipkou. Porovnáván byl efekt 4 ligandů – perzistentního, takřka nemetabolizovatelného TCDD, pomalu metabolizovaného polutantu PCB126, a dvou potenciálních endogenních ligandů AhR – FICZ a ITE, přičemž FICZ je metabolizován rychle, zatímco metabolismus ITE je neznámý, ale předpokládá se poločas delší než u FICZ. V tomto případě došlo k modulaci reakce na infekci u všech ligandů, avšak ne stejným způsobem – zatímco vliv TCDD, PCB126 a ITE byl v mnoha ohledech (odpověď CD8⁺ T-lymfocytů, úroveň IgG, množství Th1 a Thf lymfocytů) podobný, efekt FICZ byl odlišný. Na rozdíl od práce Wheeler *et al.* (2014) byly však tyto rozdíly přisouzeny transientní aktivaci FICZ, jelikož v CYP1A1 knock-out myších, ve kterých je rychlá metabolická inaktivace FICZ značně omezena, se tyto rozdíly smazávaly.

Bez ohledu na *in vivo* účinky, kde může v souvislosti s biologickou funkcí příslušných ligandů hrát roli mnoho faktorů, se FICZ ukazuje jako sloučenina s unikátními vazebnými vlastnostmi ve vztahu k AhR (Soshilov *et Denison*, 2014).

Mimo rozdílů v biologické aktivitě ligandů se nabízí vysvětlení, že je jasmon antagonistou specificky pro určité typy ligandů. To bylo popsáno v případě sloučeniny CH223191, která antagonizuje pouze TCDD a další halogenované aromatické uhlovodíky, ale ne polyaromatické uhlovodíky, flavonoidy a indirubin (Zhao *et al.*, 2010).

Jasmon byl v první fázi identifikován jako antagonist metodou Reporter gene assay. Při analýze genové exprese jak pomocí Real-time PCR, tak Western blottingu, však v nejvyšší koncentraci 100 $\mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$ způsobil zvýšení exprese CYP1A1. Tento efekt je charakteristický pro tzv. parciální agonisty/antagonisty, tedy látky, které v nižších koncentracích působí antagonisticky,

zatímco ve vysokých vykazuje agonistickou aktivitu, jak to ve vztahu k AhR bylo popsáno u řady látek, například u 3'-methoxy-4'-nitroflavonu (Zhou *et Gasiewicz*, 2003). Zvýšení exprese CYP1A1 bylo však pozorováno pouze v nepřítomnosti exogenního ligandu či při expresi indukované FICZ, kdy jasmon žádné antagonistické účinky nevykazoval, zatímco v přítomnosti TCDD ke zvýšené expresi CYP1A1 nedocházelo. Nejvyšší koncentrace jasmonu navíc neindukovala aktivitu CYP1A1. Vzhledem k těmto skutečnostem a také tomu, že stejná koncentrace jasmonu zvyšovala expresi AhR a v menší míře též ARNT, je pravděpodobnější, že kromě AhR má jasmon i jiný buněčný cíl.

Ke zvýšení exprese AhR došlo již na transkripční úrovni, lze tedy pomýšlet na indukci receptoru jiným regulátorem. Promotor AhR obsahuje několik responzivních elementů, mimo jiné pro transkripční faktory Sp1 (Specificity protein 1), AP-1 (Activation protein 1) či PPAR α (Takahashi *et al.*, 1994). Regulace exprese AhR transkripčním faktorem Sp1 byla již dříve popsána (Racky *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2015). Methyljasmonát, jiná sloučenina ze skupiny rostlinných hormonů jasmonátů, které je jasmon strukturně podobný, je schopen snižovat expresi AhR a jeho následnou vazbu do promotoru genu pro matrixovou metaloproteinázu 14 v nádorových liniích žaludku SGC-7901 a MKN-45 prostřednictvím Sp1 (Zheng *et al.*, 2013). Přestože zde jsou předkládána protichůdná data oproti práci této vědecké skupiny, je zřejmé, že látka strukturně blízká jasmonu je schopná ovlivnit AhR skrz Sp1, a nelze vyloučit, že tento efekt závisí na buněčném typu, ve kterém se odehrává. Sp1 se navíc podílí i na expresi CYP1A1 (Kobayashi *et al.*, 1996), a je tak možné vztáhnout vliv tohoto transkripčního faktoru i na zvýšení exprese tohoto enzymu.

V promotoru AhR je rovněž přítomen responzivní element pro PPAR, a PPAR α je schopen AhR indukovat (Fallone *et al.*, 2005; Villard *et al.*, 2007), stejně jako CYP1A1 (Sérée *et al.*, 2004; Villard *et al.*, 2011). PPAR α je, podobně jako AhR, aktivován množstvím látek různých struktur. Fallone *et al.* (2005) zjistili, že v buněčné linii Caco-2 ligand PPAR α (WY-14643) sám, či v kombinaci s ligandem AhR 3-methylcholantrenem, indukuje AhR. Kombinace těchto dvou látek pak měla v nižší koncentraci WY-14643 aditivní efekt na indukci CYP1A1, ve vyšší dokonce synergický. Naproti tomu v buněčné linii HepG2, ve které byla prováděna zde předkládaná studie, vedla aplikace klofibrátu, ligandu PPAR α , v kombinaci s látkou Sudan III, ligandem AhR, ke snížení exprese AhR (Shaban *et al.*, 2004), což mluví proti interakci těchto dvou signálních drah ve vztahu k up-regulaci CYP1A1, AhR a ARNT.

Rotem *et al.* (2005) popsali, že jasmonáty včetně jasmonu cílí na mitochondrie. S ohledem na to, že indukce AhR a CYP1A1 byla pozorována pouze v nejvyšší koncentraci jasmonu, která byla již na základě MTT stanovena jako poměrně cytotoxická, lze pomýšlet také na možný vliv volných radikálů uvolněných z mitochondrie. Tuto domněnku podporuje skutečnost, že desferrioxamin, který je, mimo funkci mimetika hypoxického prostředí, schopen také neutralizovat volné radikály (Hartley *et al.*, 1989), tento jev ruší. Již zmíněný methyljasmonát je v buněčné linii odvozené od adenokarcinomu plic A549 skutečně schopen produkci reaktivních kyslíkových intermediátů spustit (Kim *et al.*, 2004).

Na produkci volných radikálů je schopen reagovat transkripční faktor AP-1, který se podobně jako Sp1 může podílet na expresi AhR (Kobayashi *et al.*, 1996; Spink *et al.*, 1998). Indukce AP-1 byla implikována také v souvislosti s methyljasmonátem (Rotem *et al.*, 2003). V souvislosti s přítomností volných radikálů je možná i účast transkripčního faktoru Nrf2 (Nuclear factor erythroid 2-related factor 2), jehož responzivní element je rovněž v promotoru AhR přítomen (Shin *et al.*, 2007). Pro Nrf2 je navíc charakteristický značný cross-talk s AhR (Köhle *et al.*, 2007). Všechny tyto proteiny mohou navíc samozřejmě působit v kombinaci.

Jasmon, dle dosavadních výzkumů, je společně s dalšími jasmonáty slibnou protinádorovou látkou, u které byly popsány cytotoxické účinky na nádorové buněčné linie rakoviny děložního čípku (Kubo *et al.*, 1995), hormon-nezávislé prostatické rakovinné buňky (Yeruva *et al.*, 2008) a na leukemické buňky (Rotem *et al.*, 2005). Jako možný mechanismus účinku bylo navrženo poškození mitochondrií, konkrétně depolarizace mitochondriální membrány či uvolnění cytochromu c (Rotem *et al.*, 2005), nebo aktivace kaspázy 3 a receptoru pro tumor-nekrotický faktor 1 (Yeruva *et al.*, 2008). Role AhR v karcinogenezi je dlouho známá a existují snahy využít tento receptor jako potenciální terapeutický cíl (Kolluri *et al.*, 2017). Tato práce tak předkládá další, s AhR spojený, pohled na mechanismus působení této látky v nádorových buněčných liniích.

7. Závěr

V této diplomové práci byly analyzovány složky jasmínového esenciálního oleje pro jejich schopnost ovlivňovat transkripční aktivitu aryluhlovodíkového receptoru. Testovány byly minoritní komponenty, tj. složky zastoupené v množství 1–10 % objemu. Z celkem 15 látek se jich 6 ukázalo jako AhR-aktivní – indol, eugenol, farnesen, linalool, jasmon a jasmonolakton. Indol byl charakterizován jako látka s plně agonistickými účinky a eugenol jako parciální agonista, zbylé 4 látky vykazovaly vůči AhR antagonistické účinky.

Pro další zkoumání byl vybrán jasmon a byly analyzovány různé aspekty jeho antagonistického působení. Byla prokázána jeho schopnost snižovat transkripční aktivitu AhR indukovanou různými ligandy – TCDD, BaP a FICZ, ačkoliv u posledního zmíněného byl pokles jen mírný. Další analýzy antagonismu FICZ nepotvrdily – jasmon nezpůsoboval pokles exprese CYP1A1, typického cílového genu AhR, na transkripční a translační úrovni, stejně jako míru vazby AhR do promotoru CYP1A1, zatímco schopnost antagonizovat účinky TCDD byla ve všech zjišťovaných aspektech konzistentní s poklesem transkripční aktivity.

Jasmon se dále ukázal jako modulátor exprese AhR a jeho dimerizačního partnera ARNT, jelikož vysoká ($100 \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$) koncentrace jasmonu způsobovala zvýšení jejich exprese jak na úrovni RNA, tak proteinu. Rovněž bylo poukázáno na to, že tato látka může ovlivňovat hypoxickou signalizaci.

Uvedená data naznačují, že jasmon, jakožto látka, která antagonizuje AhR-zprostředkované účinky toxického environmentálního polutantu TCDD, ale zároveň neovlivňuje signalizaci domnělého fyziologického ligandu FICZ, má výhodné vlastnosti, které mohou být potenciálně terapeuticky využitelné například jako nástroj pro zvládání toxicity zprostředkované AhR.

8. Literatura

- Abel, J., Haarmann-Stemmann, T. (2010). An introduction to the molecular basics of aryl hydrocarbon receptor biology. *Biological Chemistry* 391, 1235–1248.
- Aoki, R., Aoki-Yoshida, A., Suzuki, C., Takayama, Y. (2018). Indole-3-Pyruvic Acid, an Aryl Hydrocarbon Receptor Activator, Suppresses Experimental Colitis in Mice. *The Journal Of Immunology* 201, 3683–3693.
- Arun, M., Satish, S., Anima, P. (2016). Phytopharmacological Profile of *Jasminum grandiflorum* Linn. (Oleaceae). *Chinese Journal Of Integrative Medicine* 22, 311–320.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils – A review. *Food And Chemical Toxicology* 46, 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.
- Bièche, I., Narjoz, C., Asselah, T., Vacher, S., Marcellin, P., Lidereau, R., Beaune, P., de Waziers, I. (2007). Reverse transcriptase-PCR quantification of mRNA levels from cytochrome (CYP)1, CYP2 and CYP3 families in 22 different human tissues. *Pharmacogenetics And Genomics* 17, 731–742.
- Bjeldanes, L. F., Kim, J. Y., Grose, K. R., Bartholomew, J. C., Bradfield, C. A. (1991). Aromatic hydrocarbon responsiveness-receptor agonists generated from indole-3-carbinol in vitro and in vivo: comparisons with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences* 88, 9543–9547.
- Boitano, A. E., Wang, J., Romeo, R., Bouchez, L. C., Parker, A. E., Sutton, S. E., Walker, J. R., Flaveny, C. A., Perdew, G. H., Denison, M. S., Schultz, P. G., Cooke, M. P. (2010). Aryl Hydrocarbon Receptor Antagonists Promote the Expansion of Human Hematopoietic Stem Cells. *Science* 329, 1345–1348.
- Boule, L. A., Burke, C. G., Jin, G.-B., Lawrence, B. P. (2018). Aryl hydrocarbon receptor signaling modulates antiviral immune responses: ligand metabolism rather than chemical source is the stronger predictor of outcome. *Scientific Reports* 8, 1–15.
- Bowers, W. S., Nault, L. R., Webb, R. E., Dutky, S. R. (1972). Aphid Alarm Pheromone: Isolation, Identification, Synthesis. *Science* 177, 1121–1122.
- Brud, W. S. (2015). Industrial Uses of Essential Oils. In *Handbook Of Essential Oils*, (Boca Raton: CRC Press), pp.843–853.
- Buffet, M., Dupin, N. (2003). Current treatments for scabies. *Fundamental And Clinical Pharmacology* 17, 217–225.
- Burdock, G. A. (2010). *Fenaroli's handbook of flavor ingredients* (Boca Raton: CRC Press).

- Calixto, J., Kassuya, C., Andre, E., Ferreira, J. (2005). Contribution of natural products to the discovery of the transient receptor potential (TRP) channels family and their functions. *Pharmacology & Therapeutics* 106, 179–208.
- Cauchi, S., Stücker, I., Solas, C., Laurent-Puig, P., Cénéé, S., Hémon, D., Jacquet, M., Kremers, P., Beaune, P., Massaad-Massade, L. (2001). Polymorphisms of human aryl hydrocarbon receptor (AhR) gene in a French population: relationship with CYP1A1 inducibility and lung cancer. *Carcinogenesis* 22, 1819–1824.
- Cervantes-Barragan, L., Chai, J. N., Tianero, M. D., Di Luccia, B., Ahern, P. P., Merriman, J., Cortez, V. S., Caparon, M. G., Donia, M. S., Gilfillan, S., Cella, M., Gordon, J. I., Hsieh, C.-S., Colonna, M. (2017). *Lactobacillus reuteri* induces gut intraepithelial CD4⁺ CD8 α ⁺ T cells. *Science* 357, 806–810.
- Ciolino, H. P., Daschner, P. J., Yeh, G. C. (1999). Dietary flavonols quercetin and kaempferol are ligands of the aryl hydrocarbon receptor that affect CYP1A1 transcription differentially. *Biochemical Journal* 340, 715–722.
- Dant, T. A., Lin, K. L., Bruce, D. W., Montgomery, S. A., Kolupae, O. V., Bommasamy, H., Bixby, L. M., Woosley, J. T., McKinnon, K. P., Gonzalez, F. J., Blazar, B. R., Vincent, B. G., Coghill, J. M., Serody, J. S. (2017). T-cell expression of AhR inhibits the maintenance of pTreg cells in the gastrointestinal tract in acute GVHD. *Blood* 130, 348–359.
- Darkoh, C., Chappell, C., Gonzales, C., Okhuysen, P., Schloss, P. D. (2015). A Rapid and Specific Method for the Detection of Indole in Complex Biological Samples. *Applied And Environmental Microbiology* 81, 8093–8097.
- Davarinos, N. A., Pollenz, R. S. (1999). Aryl Hydrocarbon Receptor Imported into the Nucleus following Ligand Binding Is Rapidly Degraded via the Cytosplasmic Proteasome following Nuclear Export. *Journal Of Biological Chemistry* 274, 28708–28715.
- de Cássia da Silveira e Sá, R., Lima, T., da Nóbrega, F., de Brito, A., de Sousa, D. (2017). Analgesic-Like Activity of Essential Oil Constituents: An Update. *International Journal Of Molecular Sciences* 18, 2233–2252
- de Groot, A. C., Schmidt, E. (2017). Essential Oils, Part VI: Sandalwood Oil, Ylang-Ylang Oil, and Jasmine Absolute. *Dermatitis* 28, 14–21.
- de Groot, A., Schmidt, E. (2016a). Essential Oils Part II: General Aspects. *Dermatitis* 27, 43–49.
- de Groot, A.C., Schmidt, E. (2016b). Essential Oils, Part III: Chemical composition. *Dermatitis* 27, 161–169.

- de Lavor, É. M., Fernandes, A. W. C., de Andrade Teles, R. B., Leal, A. E. B. P., de Oliveira Júnior, R. G., Gama e Silva, M., de Oliveira, A. P., Silva, J. C., de Moura Fontes Araújo, M. T., Coutinho, H. D. M., de Menezes, I. R. A., Picot, L., da Silva Almeida, J. R. G. (2018). Essential Oils and Their Major Compounds in the Treatment of Chronic Inflammation: A Review of Antioxidant Potential in Preclinical Studies and Molecular Mechanisms. *Oxidative Medicine And Cellular Longevity* 2018, 1–23.
- 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, 309–334.
- Denison, M. S., Wilkinson, C. F. (1985). Identification of the Ah receptor in selected mammalian species and induction of aryl hydrocarbon hydroxylase. *European Journal Of Biochemistry* 147, 429–435.
- de Sousa, D., Hocayen, P., Andrade, L., Andreatini, R. (2015). A Systematic Review of the Anxiolytic-Like Effects of Essential Oils in Animal Models. *Molecules* 20, 18620–18660.
- Di Meglio, P., Duarte, J. H., Ahlfors, H., Owens, N. D. L., Li, Y., Villanova, F., Tosi, I., Hirota, K., Nestle, F. O., Mrowietz, U., Gilchrist, M. J., et Stockinger, B. (2014). Activation of the Aryl Hydrocarbon Receptor Dampens the Severity of Inflammatory Skin Conditions. *Immunity* 40, 989–1001.
- Duarte, A., Luís, Â., Oleastro, M., Domingues, F. C. (2016). Antioxidant properties of coriander essential oil and linalool and their potential to control *Campylobacter* spp. *Food Control* 61, 115–122.
- Ehrlich, A. K., Kerkvliet, N. I. (2017). Is chronic AhR activation by rapidly metabolized ligands safe for the treatment of immune-mediated diseases? *Current Opinion In Toxicology* 2, 72–78.
- Ema, M., Matsushita, N., Sogawa, K., Ariyama, T., Inazawa, J., Nemoto, T., Ota, M., Oshimura, M., Fujii-Kuriyama, Y. (1994). Human Arylhydrocarbon Receptor: Functional Expression and Chromosomal Assignment to 7p211. *The Journal Of Biochemistry* 116, 845–851.
- Esser, C., Bagen, I., Weighardt, H., Haarmann-Stemmann, T., Krutmann, J. (2013). Functions of the aryl hydrocarbon receptor in the skin. *Seminars In Immunopathology* 35, 677–691.
- Fallone, F., Villard, P.-H., Decome, L., Séré, E., Méo, M. de, Chacon, C., Durand, A., Barra, Y., Lacarelle, B. (2005). PPAR α activation potentiates AhR-induced CYP1A1 expression. *Toxicology* 216, 122–128.
- Fan, X., Huang, X., Da Silva, C., Castagna, M. (1990). Arachidonic acid and related methyl ester mediate protein kinase C activation in intact platelets through the arachidonate metabolism pathways. *Biochemical And Biophysical Research Communications* 169, 933–940.
- Flescher, E. (2005). Jasmonates – a new family of anti-cancer agents. *Anti-Cancer Drugs* 16, 911–916.
- Frericks, M., Meissner, M., Esser, C. (2007). Microarray analysis of the AHR system: Tissue-specific flexibility in signal and target genes. *Toxicology And Applied Pharmacology* 220, 320–332.

- Friedman, M., Henika, P. R., Mandrell, R. E. (2002). Bactericidal Activities of Plant Essential Oils and Some of Their Isolated Constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. *Journal Of Food Protection* 65, 1545–1560.
- Fritsche, E., Schafer, C., Calles, C., Bernsmann, T., Bernshausen, T., Wurm, M., Hubenthal, U., Cline, J. E., Hajimiragha, H., Schroeder, P., Klotz, L.-O., Rannug, A., Furst, P., Hanenberg, H., Abel, J., Krutmann, J. (2007). Lightening up the UV response by identification of the arylhydrocarbon receptor as a cytoplasmatic target for ultraviolet B radiation. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences* 104, 8851–8856.
- Fukumoto, S., Toshimitsu, T., Matsuoka, S., Maruyama, A., Oh-oka, K., Takamura, T., Nakamura, Y., Ishimaru, K., Fujii-Kuriyama, Y., Ikegami, S., Itou, H., Nakao, A. (2014). Identification of a probiotic bacteria-derived activator of the aryl hydrocarbon receptor that inhibits colitis. *Immunology And Cell Biology* 92, 460–465.
- Fukunaga, B. N., Probst, M. R., Reisz-Porszasz, S., Hankinson, O. (1995). Identification of Functional Domains of the Aryl Hydrocarbon Receptor. *Journal Of Biological Chemistry* 270, 29270–29278.
- Ganzer, M., Schneider, P., Stuppner, H. (2006). Inhibitory effects of the essential oil of chamomile (*Matricaria recutita* L.) and its major constituents on human cytochrome P450 enzymes. *Life Sciences* 78, 856–861.
- Gardella, K. A., Muro, I., Fang, G., Sarkar, K., Mendez, O., Wright, C. W. (2016). Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT) isoforms control lymphoid cancer cell proliferation through differentially regulating tumor suppressor p53 activity. *Oncotarget* 7, 10710–10722.
- Goto, T., Takahashi, N., Kato, S., Egawa, K., Ebisu, S., Moriyama, T., Fushiki, T., Kawada, T. (2005). Phytol directly activates peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) and regulates gene expression involved in lipid metabolism in PPAR α -expressing HepG2 hepatocytes. *Biochemical And Biophysical Research Communications* 337, 440–445.
- Guggenheimer, J. (2002). Oral manifestations of drug therapy. *Dental Clinics Of North America* 46, 857–868.
- Gu, Y., Ting, Z., Qiu, X., Zhang, X., Gan, X., Fang, Y., Xu, X., Xu, R. (2010). Linalool preferentially induces robust apoptosis of a variety of leukemia cells via upregulating p53 and cyclin-dependent kinase inhibitors. *Toxicology* 268, 19–24.
- Gu, Y.-Z., Hogenesch, J. B., Bradfield, C. A. (2000). The PAS Superfamily: Sensors of Environmental and Developmental Signals. *Annual Review Of Pharmacology And Toxicology* 40, 519–561.
- Haas, K., Weighardt, H., Deenen, R., Köhrer, K., Clausen, B., Zahner, S., Boukamp, P., Bloch, W., Krutmann, J., Esser, C. (2016). Aryl Hydrocarbon Receptor in Keratinocytes Is Essential for Murine Skin Barrier Integrity. *Journal Of Investigative Dermatology* 136, 2260–2269.
- Hartley, A., Davies, M. J., Rice-Evans, C. (1989). Desferrioxamine and membrane oxidation: radical scavenger or iron chelator? *Biochemical Society Transactions* 17, 1002–1003.

- Härtter, S., Wang, X., Weigmann, H., Friedberg, T., Arand, M., Oesch, F., Hiemke, C. (2001). Differential Effects of Fluvoxamine and Other Antidepressants on the Biotransformation of Melatonin. *Journal Of Clinical Psychopharmacology* 21, 167–174.
- Hauben, E., Gregori, S., Draghici, E., Migliavacca, B., Olivieri, S., Woisetschläger, M., Roncarolo, M. G. (2008). Activation of the aryl hydrocarbon receptor promotes allograft-specific tolerance through direct and dendritic cell-mediated effects on regulatory T cells. *Blood* 112, 1214–1222.
- Henry, E. C., Bemis, J. C., Henry, O., Kende, A. S., Gasiewicz, T. A. (2006). A potential endogenous ligand for the aryl hydrocarbon receptor has potent agonist activity in vitro and in vivo. *Archives Of Biochemistry And Biophysics* 450, 67–77.
- Henry, E. C., Welle, S. L., Gasiewicz, T. A. (2010). TCDD and a Putative Endogenous AhR Ligand, ITE, Elicit the Same Immediate Changes in Gene Expression in Mouse Lung Fibroblasts. *Toxicological Sciences* 114, 90–100.
- Hoang, T. M. H., Nguyen, C. H., Le, T. T., Hoang, T. H. Q., Ngo, T. H. T., Hoang, T. L. A., Dang, D. H. (2016). Squalene isolated from *Schizochytrium mangrovei* is a peroxisome proliferator-activated receptor- α agonist that regulates lipid metabolism in HepG2 cells. *Biotechnology Letters* 38, 1065–1071.
- Hossain, S. J., Aoshima, H., Koda, H., Kiso, Y. (2014). Fragrances in Oolong Tea That Enhance the Response of GABA A Receptors. *Bioscience, Biotechnology, And Biochemistry* 68, 1842–1848.
- Howes, M.-J. R., Houghton, P. J., Barlow, D. J., Pocock, V. J., Milligan, S. R. (2002). Assessment of estrogenic activity in some common essential oil constituents. *Journal Of Pharmacy And Pharmacology* 54, 1521–1528.
- Hsu, C.-C., Lai, W.-L., Chuang, K.-C., Lee, M.-H., Tsai, Y.-C. (2013). The inhibitory activity of linalool against the filamentous growth and biofilm formation in *Candida albicans*. *Medical Mycology* 51, 473–482.
- Huang, Y., He, J., Liang, H., Hu, K., Jiang, S., Yang, L., Mei, S., Zhu, X., Yu, J., Kijlstra, A., Yang, P., Hou, S. (2018). Aryl Hydrocarbon Receptor Regulates Apoptosis and Inflammation in a Murine Model of Experimental Autoimmune Uveitis. *Frontiers In Immunology* 9, 1–15.
- Hubbard, T. D., Murray, I. A., Perdew, G. H. (2015a). Indole and Tryptophan Metabolism: Endogenous and Dietary Routes to Ah Receptor Activation. *Drug Metabolism And Disposition* 43, 1522–1535.
- Hubbard, T. D., Murray, I. A., Bisson, W. H., Lahoti, T. S., Gowda, K., Amin, S. G., Patterson, A. D., Perdew, G. H. (2015b). Adaptation of the human aryl hydrocarbon receptor to sense microbiota-derived indoles. *Scientific Reports* 5, 1–13.

- Huo, M., Cui, X., Xue, J., Chi, G., Gao, R., Deng, X., Guan, S., Wei, J., Soromou, L.W., Feng, H., Wang, D. (2013). Anti-inflammatory effects of linalool in RAW 264.7 macrophages and lipopolysaccharide-induced lung injury model. *Journal Of Surgical Research* 180, e47–e54.
- Charles, A. K., Darbre, P. D. (2009). Oestrogenic activity of benzyl salicylate, benzyl benzoate and butylphenylmethylpropional (Lilial) in MCF7 human breast cancer cells in vitro. *Journal Of Applied Toxicology* 29, 422–434.
- Cherng, J.-M., Shieh, D.-E., Chiang, W., Chiang, M.-Y., Chiang, L.-C. (2014). Chemopreventive Effects of Minor Dietary Constituents in Common Foods on Human Cancer Cells. *Bioscience, Biotechnology, And Biochemistry* 71, 1500–1504.
- Chouhan, S., Sharma, K., Guleria, S. (2017). Antimicrobial Activity of Some Essential Oils—Present Status and Future Perspectives. *Medicines* 4, 1–21.
- Ikuta, T., Eguchi, H., Tachibana, T., Yoneda, Y., Kawajiri, K. (1998). Nuclear Localization and Export Signals of the Human Aryl Hydrocarbon Receptor. *Journal Of Biological Chemistry* 273, 2895–2904.
- Islam, M. T., Ali, E. S., Uddin, S. J., Shaw, S., Islam, M. A., Ahmed, M. I., Chandra Shill, M., Karmakar, U. K., Yarla, N. S., Khan, I. N., Billah, M. M., Pieczynska, M. D., Zengin, G., Malainer, C., Nicoletti, F., Gulei, D., Berindan-Neogoe, I., Apostolov, A., Banach, M., Yeung, A. W. K., El-Demerdash, A., Xiao, J., Dey, P., Yele, S., Józwick, A., Strzałkowska, N., Marchewka, J., Rengasamy, K. R. R., Horbańczuk, J., Kamal, M. A., Mubarak, M. S., Mishra, S. K., Shilpi, J. A., Atanasov, A. G. (2018). Phytol: A review of biomedical activities. *Food And Chemical Toxicology* 121, 82–94.
- Jain, S., Dolwick, K. M., Schmidt, J. V., Bradfield, C. A. (1994). Potent transactivation domains of the Ah receptor and the Ah receptor nuclear translocator map to their carboxyl termini. *Journal Of Biological Chemistry* 269, 31518–31524.
- Jiang, W. G., Redfern, A., Bryce, R. P., Mansel, R. E. (2000). Peroxisome proliferator activated receptor- γ (PPAR- γ) mediates the action of gamma linolenic acid in breast cancer cells. *Prostaglandins, Leukotrienes And Essential Fatty Acids (Plefa)* 62, 119–127.
- Jin, U.-H., Lee, S.-O., Sridharan, G., Lee, K., Davidson, L. A., Jayaraman, A., Chapkin, R. S., Alaniz, R., Safe, S. (2014). Microbiome-Derived Tryptophan Metabolites and Their Aryl Hydrocarbon Receptor-Dependent Agonist and Antagonist Activities. *Molecular Pharmacology* 85, 777–788.
- Jones, S. (2004). An overview of the basic helix-loop-helix proteins. *Genome Biology* 5, 1–6.
- Jorge-Nebert, L. F., Jiang, Z., Chakraborty, R., Watson, J., Jin, L., McGarvey, S. T., Deka, R., Nebert, D. W. (2010). Analysis of human CYP1A1 and CYP1A2 genes and their shared bidirectional promoter in eight world populations. *Human Mutation* 31, 27–40.

- Jun, H.-jin, Lee, J. H., Kim, J., Jia, Y., Kim, K. H., Hwang, K. Y., Yun, E. J., Do, K.-R., Lee, S.-J. (2014). Linalool is a PPAR α ligand that reduces plasma TG levels and rewires the hepatic transcriptome and plasma metabolome. *Journal Of Lipid Research* 55, 1098–1110.
- Ju, Q., Fimmel, S., Hinz, N., Stahlmann, R., Xia, L., Zouboulis, C. C. (2011). 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin alters sebaceous gland cell differentiation in vitro. *Experimental Dermatology* 20, 320–325.
- Kalmes, M., Neumeyer, A., Rio, P., Hanenberg, H., Fritsche, E., Blömeke, B. (2006). Impact of the arylhydrocarbon receptor on eugenol- and isoeugenol-induced cell cycle arrest in human immortalized keratinocytes (HaCaT). *Biological Chemistry* 387, 1201–1207.
- Kazlauskas, A., Poellinger, L., Pongratz, I. (2000). The Immunophilin-like Protein XAP2 Regulates Ubiquitination and Subcellular Localization of the Dioxin Receptor. *Journal Of Biological Chemistry* 275, 41317–41324.
- Kazlauskas, A., Poellinger, L., Pongratz, I. (1999). Evidence That the Co-chaperone p23 Regulates Ligand Responsiveness of the Dioxin (Aryl Hydrocarbon) Receptor. *Journal Of Biological Chemistry* 274, 13519–13524.
- Kazlauskas, A., Sundstrom, S., Poellinger, L., Pongratz, I. (2001). The hsp90 Chaperone Complex Regulates Intracellular Localization of the Dioxin Receptor. *Molecular And Cellular Biology* 21, 2594–2607.
- Kennedy, L. H., Sutter, C. H., Leon Carrion, S., Tran, Q. T., Bodreddigari, S., Kensicki, E., Mohny, R. P., Sutter, T. R. (2013). 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin-Mediated Production of Reactive Oxygen Species Is An Essential Step in the Mechanism of Action to Accelerate Human Keratinocyte Differentiation. *Toxicological Sciences* 132, 235–249.
- Kerkvliet, N. I., Steppan, L. B., Vorachek, W., Oda, S., Farrer, D., Wong, C. P., Pham, D., Mourich, D. V. (2009). Activation of aryl hydrocarbon receptor by TCDD prevents diabetes in NOD mice and increases Foxp3⁺ T cells in pancreatic lymph nodes. *Immunotherapy* 1, 539–547.
- Kim, J., Lee, S., Oh, S., Han, S., Park, H., Yoo, M.-A., Kang, H. (2004). Methyl jasmonate induces apoptosis through induction of Bax/Bcl-Xs and activation of caspase-3 via ROS production in A549 cells. *Oncology Reports* 12, 1233–1238.
- Kim, S.-H., Henry, E. C., Kim, D.-K., Kim, Y.-H., Shin, K. J., Han, M. S., Lee, T. G., Kang, J.-K., Gasiewicz, T. A., Ryu, S. H., Suh, P. -G. (2006). Novel Compound 2-Methyl-2 H-pyrazole-3-carboxylic Acid (2-methyl-4- o -tolylazo-phenyl)-amide (CH-223191) Prevents 2,3,7,8-TCDD-Induced Toxicity by Antagonizing the Aryl Hydrocarbon Receptor. *Molecular Pharmacology* 69, 1871–1878.
- Kiss, E. A., Vonarbourg, C., Kopfmann, S., Hobeika, E., Finke, D., Esser, C., Diefenbach, A. (2011). Natural Aryl Hydrocarbon Receptor Ligands Control Organogenesis of Intestinal Lymphoid Follicles. *Science* 334, 1561–1565.

- Kitareewan, S., Burka, L. T., Tomer, K. B., Parker, C. E., Deterding, L. J., Stevens, R. D., Forman, B. M., Mais, D. E., Heyman, R. A., McMorris, T., Weinberger, C. (1996). Phytol metabolites are circulating dietary factors that activate the nuclear receptor RXR. *Molecular Biology Of The Cell* 7, 1153–1166.
- Knudsen, J. T., Eriksson, R., Gershenzon, J., Ståhl, B. (2006). Diversity and Distribution of Floral Scent. *The Botanical Review* 72, 1–120.
- Kobayashi, A., Sogawa, K., Fujii-Kuriyama, Y. (1996). Cooperative Interaction between AhR·Arnt and Sp1 for the Drug-inducible Expression of CYP1A1 Gene. *Journal Of Biological Chemistry* 271, 12310–12316.
- Köhle, C., Bock, K. W. (2007). Coordinate regulation of Phase I and II xenobiotic metabolisms by the Ah receptor and Nrf2. *Biochemical Pharmacology* 73, 1853–1862.
- Ko, H. P., Okino, S. T., Ma, Q., Whitlock, J. P. (1997). Transactivation domains facilitate promoter occupancy for the dioxin-inducible CYP1A1 gene in vivo. *Molecular And Cellular Biology* 17, 3497–3507.
- Köllner, T. G., Gershenzon, J., Degenhardt, J. (2009). Molecular and biochemical evolution of maize terpene synthase 10, an enzyme of indirect defense. *Phytochemistry* 70, 1139–1145.
- Kolluri, S. K., Jin, U.-H., Safe, S. (2017). Role of the aryl hydrocarbon receptor in carcinogenesis and potential as an anti-cancer drug target. *Archives Of Toxicology* 91, 2497–2513.
- Kubo, I., Morimitsu, Y. (1995). Cytotoxicity of Green Tea Flavor Compounds against Two Solid Tumor Cells. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry* 43, 1626–1628.
- Lamas, B., Natividad, J. M., Sokol, H. (2018). Aryl hydrocarbon receptor and intestinal immunity. *Mucosal Immunology* 11, 1024–1038.
- Lamas, B., Richard, M. L., Leducq, V., Pham, H.-P., Michel, M.-L., Da Costa, G., Bridonneau, C., Jegou, S., Hoffmann, T. W., Natividad, J.M., Brot, L., Taleb, S., Couturier-Maillard, A., Nion-Larmurier, I., Merabtene, F., Seksik, P., Bourrier, A., Cosnes, J., Ryffel, B., Beaugerie, L., Launay, J.-M., Langella, P., Xavier, R. J., Sokol, H. (2016). CARD9 impacts colitis by altering gut microbiota metabolism of tryptophan into aryl hydrocarbon receptor ligands. *Nature Medicine* 22, 598–605.
- Lapczynski, A., Bhatia, S. P., Letizia, C. S., Api, A. M. (2008). Fragrance material review on geranyl linalool. *Food And Chemical Toxicology* 46, S176–S178.
- Lee, J.-H., Wood, T. K., Lee, J. (2015). Roles of Indole as an Interspecies and Interkingdom Signaling Molecule. *Trends In Microbiology* 23, 707–718.
- Lee, J.-H., Lee, H.-H., Kim, K.-N., Kim, K.-M. (2016). Cytotoxicity and anti-inflammatory effects of zinc ions and eugenol during setting of ZOE in immortalized human oral keratinocytes grown as three-dimensional spheroids. *Dental Materials* 32, e93–e104.

- Lesgards, J.-F., Baldovini, N., Vidal, N., Pietri, S. (2014). Anticancer Activities of Essential Oils Constituents and Synergy with Conventional Therapies: A Review. *Phytotherapy Research* 28, 1423–1446.
- Lewis, R. J., Sax, N. I. (2004). *Sax's dangerous properties of industrial materials* (Hoboken, N. J.: J. Wiley).
- Lim, T. K. (2014). *Jasminum sambac*. In *Edible Medicinal And Non Medicinal Plants: Volume 8, Flowers*, (Dordrecht: Springer Netherlands), pp. 529–540.
- Livak, K. J., Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* 25, 402–408.
- Li, W., Harper, P. A., Tang, B.-K., Okey, A. B. (1998). Regulation of cytochrome P450 enzymes by aryl hydrocarbon receptor in human cells. *Biochemical Pharmacology* 56, 599–612.
- Li, Y., Innocentin, S., Withers, D. R., Roberts, N. A., Gallagher, A. R., Grigorieva, E. F., Wilhelm, C., Veldhoen, M. (2011). Exogenous Stimuli Maintain Intraepithelial Lymphocytes via Aryl Hydrocarbon Receptor Activation. *Cell* 147, 629–640.
- Loizzo, M., Tundis, R., Menichini, F., Saab, A., Statti, G., Menichini, F. (2007). Cytotoxic activity of essential oils from Labiatae and Lauraceae families against in vitro human tumor models. *Anticancer Research* 27, 3293–3299.
- Loub, W. D., Wattenberg, L. W., Davis, D. W. (1975). Aryl Hydrocarbon Hydroxylase Induction in Rat Tissues by Naturally Occurring Indoles of Cruciferous Plants. *Jnci: Journal Of The National Cancer Institute* 54, 985–988.
- Luecke, S., Backlund, M., Jux, B., Esser, C., Krutmann, J., Rannug, A. (2010). The aryl hydrocarbon receptor (AHR), a novel regulator of human melanogenesis. *Pigment Cell & Melanoma Research* 23, 828–833.
- Lv, Q., Shi, C., Qiao, S., Cao, N., Guan, C., Dai, Y., Wei, Z. (2018). Alpinetin exerts anti-colitis efficacy by activating AhR, regulating miR-302/DNMT-1/CREB signals, and therefore promoting Treg differentiation. *Cell Death & Disease* 9, 1201–1207.
- MacPherson, L., Tamblyn, L., Rajendra, S., Bralha, F., McPherson, J. P., Matthews, J. (2013). 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin poly(ADP-ribose) polymerase (TiPARP, ARTD14) is a mono-ADP-ribosyltransferase and repressor of aryl hydrocarbon receptor transactivation. *Nucleic Acids Research* 41, 1604–1621.
- Magiatis, P., Pappas, P., Gaitanis, G., Mexia, N., Melliou, E., Galanou, M., Vlachos, C., Stathopoulou, K., Skaltsounis, A. L., Marselos, M., Velegraki, A., Denison, M. S., Bassukas, I. D. (2013). *Malassezia* Yeasts Produce a Collection of Exceptionally Potent Activators of the Ah (Dioxin) Receptor Detected in Diseased Human Skin. *Journal Of Investigative Dermatology* 133, 2023–2030.

- Ma, Q., Baldwin, K. T., Renzelli, A. J., McDaniel, A., Dong, L. (2001). TCDD-Inducible Poly(ADP-ribose) Polymerase: A Novel Response to 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Biochemical And Biophysical Research Communications* 289, 499–506.
- McGinty, D., Letizia, C. S., Api, A. M. (2010). Fragrance material review on isophytol. *Food And Chemical Toxicology* 48, S76–S81.
- McGinty, D., Vitale, D., Letizia, C. S., Api, A. M. (2012). Fragrance material review on benzyl acetate. *Food And Chemical Toxicology* 50, S363–S384.
- Meinking, T. L., Villar, M. E., Vicaria, M., Eyerdam, D. H., Paquet, D., Mertz-Rivera, K., Rivera, H. F., Hiriart, J., Reyna, S. (2010). The Clinical Trials Supporting Benzyl Alcohol Lotion 5% (Ulesfia TM): A Safe and Effective Topical Treatment for Head Lice (Pediculosis Humanus Capitis). *Pediatric Dermatology* 27, 19–24.
- Metidji, A., Omenetti, S., Crotta, S., Li, Y., Nye, E., Ross, E., Li, V., Maradana, M. R., Schiering, C., Stockinger, B. (2018). The Environmental Sensor AHR Protects from Inflammatory Damage by Maintaining Intestinal Stem Cell Homeostasis and Barrier Integrity. *Immunity* 49, 353–362.e5.
- Mimura, J., Ema, M., Sogawa, K., Fujii-Kuriyama, Y. (1999). Identification of a novel mechanism of regulation of Ah (dioxin) receptor function. *Genes & Development* 13, 20–25.
- Mohinta, S., Kannan, A. K., Gowda, K., Amin, S. G., Perdew, G. H., August, A. (2015). Differential Regulation of Th17 and T Regulatory Cell Differentiation by Aryl Hydrocarbon Receptor Dependent Xenobiotic Response Element Dependent and Independent Pathways. *Toxicological Sciences* 145, 233–243.
- Monostory, K., Pascussi, J.-M., Kóbori, L., Dvořák, Z. (2009). Hormonal regulation of CYP1A expression. *Drug Metabolism Reviews* 41, 547–572.
- Monteleone, I., Rizzo, A., Sarra, M., Sica, G., Sileri, P., Biancone, L., MacDonald, T. T., Pallone, F., Monteleone, G. (2011). Aryl Hydrocarbon Receptor-Induced Signals Up-regulate IL-22 Production and Inhibit Inflammation in the Gastrointestinal Tract. *Gastroenterology* 141, 237–248.e1.
- Murakami, K., Ide, T., Suzuki, M., Mochizuki, T., Kadowaki, T. (1999). Evidence for Direct Binding of Fatty Acids and Eicosanoids to Human Peroxisome Proliferators-Activated Receptor α . *Biochemical And Biophysical Research Communications* 260, 609–613.
- Nebert, D. W., Karp, C. L. (2008). Endogenous Functions of the Aryl Hydrocarbon Receptor (AHR): Intersection of Cytochrome P450 1 (CYP1)-metabolized Eicosanoids and AHR Biology. *Journal Of Biological Chemistry* 283, 36061–36065.
- Nebert, D. W., Roe, A. L., Dieter, M. Z., Solis, W. A., Yang, Y., Dalton, T. P. (2000). Role of the aromatic hydrocarbon receptor and [Ah] gene battery in the oxidative stress response, cell cycle control, and apoptosis. *Biochemical Pharmacology* 59, 65–85.

- Nelson, D. R., Koymans, L., Kamataki, T., Stegeman, J. J., Feyereisen, R., Waxman, D. J., Waterman, M. R., Gotoh, O., Coon, M. J., Estabrook, R. W., Gunsalus, I. C., Nebert, D. W. (1996). P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* 6, 1–42.
- Newmark, H. L. (1999). Squalene, Olive Oil, and Cancer Risk: Review and Hypothesis. *Annals Of The New York Academy Of Sciences* 889, 193–203.
- Nguyen, L. P., Bradfield, C. A. (2008). The Search for Endogenous Activators of the Aryl Hydrocarbon Receptor. *Chemical Research In Toxicology* 21, 102–116.
- Nieuwenhuizen, N. J., Green, S., Atkinson, R. G. (2014). Floral sesquiterpenes and their synthesis in dioecious kiwifruit. *Plant Signaling & Behavior* 5, 61–63.
- Novak, E., Stubbs, S. S., Sanborn, E. C., Eustice, R. M. (1972). The tolerance and safety of intravenously administered benzyl alcohol in methylprednisolone sodium succinate formulations in normal human subjects. *Toxicology And Applied Pharmacology* 23, 54–61.
- Novotny, M., Harvey, S., Jemiolo, B. (1990). Chemistry of male dominance in the house mouse, *Mus domesticus*. *Experientia* 46, 109–113.
- Öberg, M., Bergander, L., Håkansson, H., Rannug, U., Rannug, A. (2005). Identification of the Tryptophan Photoproduct 6-Formylindolo[3,2-b]carbazole, in Cell Culture Medium, as a Factor That Controls the Background Aryl Hydrocarbon Receptor Activity. *Toxicological Sciences* 85, 935–943.
- Ogawa, Y., Akamatsu, M., Hotta, Y., Hosoda, A., Tamura, H. (2010). Effect of essential oils, such as raspberry ketone and its derivatives, on antiandrogenic activity based on in vitro reporter gene assay. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 20, 2111–2114.
- Ohtake, F., Baba, A., Takada, I., Okada, M., Iwasaki, K., Miki, H., Takahashi, S., Kouzmenko, A., Nohara, K., Chiba, T., Fujii-Kuriyama, Y., Kato, S. (2007). Dioxin receptor is a ligand-dependent E3 ubiquitin ligase. *Nature* 446, 562–566.
- Ozawa, R., Shiojiri, K., Sabelis, M. W., Takabayashi, J. (2008). Maize plants sprayed with either jasmonic acid or its precursor, methyl linolenate, attract armyworm parasitoids, but the composition of attractants differs. *Entomologia Experimentalis Et Applicata* 129, 189–199.
- Park, J.-H., Lee, J.-M., Lee, E.-J., Hwang, W.-B., Kim, D.-J. (2018). Indole-3-Carbinol Promotes Goblet-Cell Differentiation Regulating Wnt and Notch Signaling Pathways AhR-Dependently. *Molecules And Cells* 41, 290–300.
- Peppers, J., Paller, A. S., Maeda-Chubachi, T., Wu, S., Robbins, K., Gallagher, K., Kraus, J. E. (2019). A phase 2, randomized dose-finding study of tapinarof (GSK2894512 cream) for the treatment of atopic dermatitis. *Journal Of The American Academy Of Dermatology* 80, 89–98.e3.

- 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. *Journal Of Biological Chemistry* 251, 4936–4946.
- Pongratz, I., Mason, G. G., Poellinger, L. (1992). Dual roles of the 90-kDa heat shock protein hsp90 in modulating functional activities of the dioxin receptor. Evidence that the dioxin receptor functionally belongs to a subclass of nuclear receptors which require hsp90 both for ligand binding activity and repression of intrinsic DNA binding activity. *Journal Of Biological Chemistry* 267, 13728–13734.
- Punj, S., Kopparapu, P., Jang, H. S., Phillips, J. L., Pennington, J., Rohlman, D., O'Donnell, E., Iversen, P. L., Kolluri, S. K., Kerkvliet, N. I., Forsthuber, T. (2014). Benzimidazoisoquinolines: A New Class of Rapidly Metabolized Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR) Ligands that Induce AhR-Dependent Tregs and Prevent Murine Graft-Versus-Host Disease. *Plos One* 9, 1–10.
- Quintana, F. J., Basso, A. S., Iglesias, A. H., Korn, T., Farez, M. F., Bettelli, E., Caccamo, M., Oukka, M., Weiner, H. L. (2008). Control of Treg and TH17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor. *Nature* 453, 65–71.
- Rabelo, V. W.-H., Romeiro, N. C., Abreu, P. A. (2017). Design strategies of oxidosqualene cyclase inhibitors: Targeting the sterol biosynthetic pathway. *The Journal Of Steroid Biochemistry And Molecular Biology* 171, 305–317.
- Racky, J., Schmitz, H.-J., Kauffmann, H.-M., Schrenk, D. (2004). Single nucleotide polymorphism analysis and functional characterization of the human Ah receptor (AhR) gene promoter. *Archives Of Biochemistry And Biophysics* 421, 91–98.
- Randhawa, P. K., Singh, K., Singh, N., Jaggi, A. S. (2014). A Review on Chemical-Induced Inflammatory Bowel Disease Models in Rodents. *The Korean Journal Of Physiology & Pharmacology* 18, 279–288.
- Rannug, A., Rannug, U. (2018). The tryptophan derivative 6-formylindolo[3,2-b]carbazole, FICZ, a dynamic mediator of endogenous aryl hydrocarbon receptor signaling, balances cell growth and differentiation. *Critical Reviews In Toxicology* 48, 555–574.
- Rannug, A., Rannug, U., Rosenkranz, H. S., Winqvist, L., Westerholm, R., Agurell, E., Grafström, A. K. (1987). Certain photooxidized derivatives of tryptophan bind with very high affinity to the Ah receptor and are likely to be endogenous signal substances. *Journal Of Biological Chemistry* 262, 15422–15427.
- Rannug, U., Rannug, A., Sjöberg, U., Li, H., Westerholm, R., Bergman, J. (1995). Structure elucidation of two tryptophan-derived, high affinity Ah receptor ligands. *Chemistry & Biology* 2, 841–845.

- Rastogi, S. C., Heydorn, S., Johansen, J. D., Basketter, D. A. (2001). Fragrance chemicals in domestic and occupational products. *Contact Dermatitis* 45, 221–225.
- Reddy, L. H., Couvreur, P. (2009). Squalene: A natural triterpene for use in disease management and therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews* 61, 1412–1426.
- Roager, H. M., Licht, T. R. (2018). Microbial tryptophan catabolites in health and disease. *Nature Communications* 9, 1–10.
- Robbins, K., Bissonnette, R., Maeda-Chubachi, T., Ye, L., Peppers, J., Gallagher, K., Kraus, J. E. (2019). Phase 2, randomized dose-finding study of tapinarof (GSK2894512 cream) for the treatment of plaque psoriasis. *Journal Of The American Academy Of Dermatology* 80, 714–721.
- Ross, J. A., Kasum, C. M. (2002). Dietary Flavonoids: Bioavailability, Metabolic Effects, and Safety. *Annual Review Of Nutrition* 22, 19–34.
- Rotem, R., Fingrut, O., Moskovitz, J., Flescher, E. (2003). The anticancer plant stress-protein methyl jasmonate induces activation of stress-regulated c-Jun N-terminal kinase and p38 protein kinase in human lymphoid cells. *Leukemia* 17, 2230–2234.
- Rotem, R., Heyfets, A., Fingrut, O., Blickstein, D., Shaklai, M., Flescher, E. (2005). Jasmonates: Novel Anticancer Agents Acting Directly and Selectively on Human Cancer Cell Mitochondria. *Cancer Research* 65, 1984–1993.
- Safe, S. (2008). Polychlorinated Biphenyls (PCBs), Dibenzo-p-Dioxins (PCDDs), Dibenzofurans (PCDFs), and Related Compounds: Environmental and Mechanistic Considerations Which Support the Development of Toxic Equivalency Factors (TEFs). *Critical Reviews In Toxicology* 21, 51–88.
- Sérée, E., Villard, P.-H., Pascussi, J.-M., Pineau, T., Maurel, P., Nguyen, Q. B., Fallone, F., Martin, P.-M., Champion, S., Lacarelle, B., Savouret, J. -F., Barra, Y. (2004). Evidence for a new human CYP1A1 regulation pathway involving PPAR- α and 2 PPRE sites. *Gastroenterology* 127, 1436–1445.
- Shaban, Z., El-Shazly, S., Ishizuka, M., Kimura, K., Kazusaka, A., Fujita, S. (2004). PPAR α -dependent modulation of hepatic CYP1A by clofibric acid in rats. *Archives Of Toxicology* 78, 496–507.
- Shimada, T. (2006). Xenobiotic-Metabolizing Enzymes Involved in Activation and Detoxification of Carcinogenic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Drug Metabolism And Pharmacokinetics* 21, 257–276.
- Shimizu, Y., Nakatsuru, Y., Ichinose, M., Takahashi, Y., Kume, H., Mimura, J., Fujii-Kuriyama, Y., Ishikawa, T. (2000). Benzo[a]pyrene carcinogenicity is lost in mice lacking the aryl hydrocarbon receptor. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences* 97, 779–782.

- Shin, S., Wakabayashi, N., Misra, V., Biswal, S., Lee, G. H., Agoston, E. S., Yamamoto, M., Kensler, T. W. (2007). NRF2 Modulates Aryl Hydrocarbon Receptor Signaling: Influence on Adipogenesis. *Molecular And Cellular Biology* 27, 7188–7197.
- Schulte, K. W., Green, E., Wilz, A., Platten, M., Daumke, O. (2017). Structural Basis for Aryl Hydrocarbon Receptor-Mediated Gene Activation. *Structure* 25, 1025–1033.e3.
- Smirnova, A., Wincent, E., Vikström Bergander, L., Alsberg, T., Bergman, J., Rannug, A., Rannug, U. (2016). Evidence for New Light-Independent Pathways for Generation of the Endogenous Aryl Hydrocarbon Receptor Agonist FICZ. *Chemical Research In Toxicology* 29, 75–86.
- Song, J., Clagett-Dame, M., Peterson, R. E., Hahn, M. E., Westler, W. M., Sicinski, R. R., DeLuca, H. F. (2002). A ligand for the aryl hydrocarbon receptor isolated from lung. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences* 99, 14694–14699.
- Soshilov, A. A., Denison, M. S. (2014). Ligand Promiscuity of Aryl Hydrocarbon Receptor Agonists and Antagonists Revealed by Site-Directed Mutagenesis. *Molecular And Cellular Biology* 34, 1707–1719.
- Spink, B. C., Fasco, M. J., Gierthy, J. F., Spink, D. C. (1998). 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate upregulates the Ah receptor and differentially alters CYP1B1 and CYP1A1 expression in MCF-7 breast cancer cells. *Journal Of Cellular Biochemistry* 70, 289–296.
- Starling, A. P., Hughes, G., East, J. M., Lee, A. G. (1994). Mechanism of Stimulation of the Calcium Adenosinetriphosphatase by Jasmone. *Biochemistry* 33, 3023–3031.
- Strassel, C., Brouard, N., Mallo, L., Receveur, N., Mangin, P., Eckly, A., Bieche, I., Tarte, K., Gachet, C., Lanza, F. (2016). Aryl hydrocarbon receptor–dependent enrichment of a megakaryocytic precursor with a high potential to produce proplatelets. *Blood* 127, 2231–2240.
- Suskind, R. R. (1985). Chloracne, "the hallmark of dioxin intoxication." *Scandinavian Journal Of Work, Environment & Health* 11, 165–171.
- Sutter, T. R., Tang, Y. M., Hayes, C. L., Wo, Y. Y., Jabs, E. W., Li, X., Yin, H., Cody, C. W., Greenlee, W. F. (1994). Complete cDNA sequence of a human dioxin-inducible mRNA identifies a new gene subfamily of cytochrome P450 that maps to chromosome 2. *Journal Of Biological Chemistry* 269, 13092–13099.
- Swanson, H. I., Chan, W. K., Bradfield, C. A. (1995). DNA Binding Specificities and Pairing Rules of the Ah Receptor, ARNT, and SIM Proteins. *Journal Of Biological Chemistry* 270, 26292–26302.
- Štěpánková, M., Bartoňková, I., Jiskrová, E., Vrzal, R., Mani, S., Kortagere, S., Dvořák, Z. (2018). Methylindoles and Methoxyindoles are Agonists and Antagonists of Human Aryl Hydrocarbon Receptor. *Molecular Pharmacology* 93, 631–644.
- Takahashi, Y., Itoh, S., Shimojima, T., Kamataki, T. (1994). Characterization of Ah receptor promoter in human liver cell line, HepG2. *Pharmacogenetics* 4, 219–222.

- Takamura, T., Harama, D., Matsuoka, S., Shimokawa, N., Nakamura, Y., Okumura, K., Ogawa, H., Kitamura, M., Nakao, A. (2010). Activation of the aryl hydrocarbon receptor pathway may ameliorate dextran sodium sulfate-induced colitis in mice. *Immunology And Cell Biology* 88, 685–689.
- Tao, G., Irie, Y., Li, D.-J., Keung, W. M. (2005). Eugenol and its structural analogs inhibit monoamine oxidase A and exhibit antidepressant-like activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 13, 4777–4788.
- Thordardottir, S., Hangalapura, B. N., Hutten, T., Cossu, M., Spanholtz, J., Schaap, N., Radstake, T. R. D. J., van der Voort, R., Dolstra, H. (2014). The Aryl Hydrocarbon Receptor Antagonist StemRegenin 1 Promotes Human Plasmacytoid and Myeloid Dendritic Cell Development from CD34⁺ Hematopoietic Progenitor Cells. *Stem Cells And Development* 23, 955–967.
- Tisserand, R., Young, R. (2014). Essential oil composition. In *Essential Oil Safety*, (Londýn: Churchill Livingstone Elsevier), pp. 5–22.
- Tsuji, G., Hashimoto-Hachiya, A., Kiyomatsu-Oda, M., Takemura, M., Ohno, F., Ito, T., Morino-Koga, S., Mitoma, C., Nakahara, T., Uchi, H., Furue, M. (2017). Aryl hydrocarbon receptor activation restores filaggrin expression via OVOL1 in atopic dermatitis. *Cell Death & Disease* 8, e2931–e2931.
- van den Bogaard, E. H., Bergboer, J. G. M., Vonk-Bergers, M., van Vlijmen-Willems, I. M. J. J., Hato, S. V., van der Valk, P. G. M., Schröder, J. M., Joosten, I., Zeeuwen, P. L. J. M., Schalkwijk, J. (2013). Coal tar induces AHR-dependent skin barrier repair in atopic dermatitis. *Journal Of Clinical Investigation* 123, 917–927.
- van den Bogaard, E. H., Podolsky, M. A., Smits, J. P., Cui, X., John, C., Gowda, K., Desai, D., Amin, S. G., Schalkwijk, J., Perdew, G. H., Glick, A. B. (2015). Genetic and Pharmacological Analysis Identifies a Physiological Role for the AHR in Epidermal Differentiation. *Journal Of Investigative Dermatology* 135, 1320–1328.
- van den Brink, D. M., Wanders, R. J. A. (2006). Phytanic acid: production from phytol, its breakdown and role in human disease. *Cellular And Molecular Life Sciences* 63, 1752–1765.
- Veldhoen, M., Hirota, K., Westendorf, A.M., Buer, J., Dumoutier, L., Renauld, J.-C., Stockinger, B. (2008). The aryl hydrocarbon receptor links TH17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins. *Nature* 453, 106–109.
- Villard, P. H., Caverni, S., Baanannou, A., Khalil, A., Martin, P. G., Penel, C., Pineau, T., Seree, E., Barra, Y. (2007). PPAR α transcriptionally induces AhR expression in Caco-2, but represses AhR pro-inflammatory effects. *Biochemical And Biophysical Research Communications* 364, 896–901.

- Villard, P.-H., Barlesi, F., Armand, M., Dao, T.-M.-A., Pascussi, J.-M., Fouchier, F., Champion, S., Dufour, C., Giniès, C., Khalil, A., Amiot, M. -J., Barra, Y., Seree, E., Zanger, U. (2011). CYP1A1 Induction in the Colon by Serum: Involvement of the PPAR α Pathway and Evidence for a New Specific Human PPRE α Site. *Plos One* 6, 1–8.
- Vos, J .G., Moore, J. A. (1974). Suppression of Cellular Immunity in Rats and Mice by Maternal Treatment with 2, 3, 7, 8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin. *International Archives Of Allergy And Immunology* 47, 777–794.
- Waite, J. C., Skokos, D. (2012). Th17 Response and Inflammatory Autoimmune Diseases. *International Journal Of Inflammation* 2012, 1–10.
- Wang, H.-F., Yih, K.-H., Yang, C.-H., Huang, K.-F. (2017). Anti-oxidant activity and major chemical component analyses of twenty-six commercially available essential oils. *Journal Of Food And Drug Analysis* 25, 881–889.
- Wang, X., Li, K., Liu, L., Shi, Q., Song, P., Jian, Z., Guo, S., Wang, G., Li, C., Gao, T. (2015). AHR promoter variant modulates its transcription and downstream effectors by allele-specific AHR-SP1 interaction functioning as a genetic marker for vitiligo. *Scientific Reports* 5, 1–11.
- Wang, Z., Tan, K. (2019). Honey Bee Alarm Pheromone Mediates Communication in Plant–Pollinator–Predator Interactions. *Insects* 10, 1–11.
- Wei, A., Shibamoto, T. (2007). Antioxidant Activities and Volatile Constituents of Various Essential Oils. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry* 55, 1737–1742.
- Weiss, E.A. (1997a). Oleaceae. In *Essential Oil Crops*, (New York: CAB International), pp. 342–361.
- Weiss, E.A. (1997b). Distilling and Extracting Essential Oils. In *Essential Oil Crops*, (New York: CAB International), pp. 568–578.
- Wheeler, J. L. H., Martin, K. C., Resseguie, E., Lawrence, B. P. (2014). Differential Consequences of Two Distinct AhR Ligands on Innate and Adaptive Immune Responses to Influenza A Virus. *Toxicological Sciences* 137, 324–334.
- Whitlock, J. P. (1999). Induction of cytochrome P4501A1. *Annual Review Of Pharmacology And Toxicology* 39, 103–125.
- Wincent, E., Amini, N., Luecke, S., Glatt, H., Bergman, J., Crescenzi, C., Rannug, A., Rannug, U. (2009). The Suggested Physiologic Aryl Hydrocarbon Receptor Activator and Cytochrome P4501 Substrate 6-Formylindolo[3,2- b]carbazole Is Present in Humans. *Journal Of Biological Chemistry* 284, 2690–2696.
- Wlodarska, M., Luo, C., Kolde, R., d’Hennezel, E., Annand, J.W., Heim, C. E., Krastel, P., Schmitt, E. K., Omar, A. S., Creasey, E. A., Garner, A. L., Mohammadi, S., O’Connell, D. J., Abubucker, S., Arthur, T. D., Franzosa, E. A., Huttenhower, C., Murphy, L. O., Haiser, H. J., Vlamakis, H., Porter, J. A., Xavier, R. J. (2017). Indoleacrylic Acid Produced by Commensal *Peptostreptococcus* Species Suppresses Inflammation. *Cell Host & Microbe* 22, 25–37.e6.

- Wu, Q., Yu, L., Qiu, J., Shen, B., Wang, D., Soromou, L. W., Feng, H. (2014). Linalool attenuates lung inflammation induced by *Pasteurella multocida* via activating Nrf-2 signaling pathway. *International Immunopharmacology* 21, 456–463.
- Xue, Z., Li, D., Yu, W., Zhang, Q., Hou, X., He, Y., Kou, X. (2017). Mechanisms and therapeutic prospects of polyphenols as modulators of the aryl hydrocarbon receptor. *Food & Function* 8, 1414–1437.
- Yamamoto, J., Ihara, K., Nakayama, H., Hikino, S., Satoh, K., Kubo, N., Iida, T., Fujii, Y., Hara, T. (2004). Characteristic expression of aryl hydrocarbon receptor repressor gene in human tissues: Organ-specific distribution and variable induction patterns in mononuclear cells. *Life Sciences* 74, 1039–1049.
- Yang, E.-J., Stokes, J. V., Kummari, E., Eells, J., Kaplan, B. L. F. (2016). Immunomodulation By Subchronic Low Dose 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in the Absence of Pertussis Toxin. *Toxicological Sciences* 151, 35–43.
- Yeruva, L., Pierre, K. J., Bathina, M., Elegbede, A., Carper, S. W. (2009). Delayed Cytotoxic Effects of Methyl Jasmonate and cis-Jasmone Induced Apoptosis in Prostate Cancer Cells. *Cancer Investigation* 26, 890–899.
- Yeste, A., Mascanfroni, I. D., Nadeau, M., Burns, E. J., Tukpah, A.-M., Santiago, A., Wu, C., Patel, B., Kumar, D., Quintana, F. J. (2014). IL-21 induces IL-22 production in CD4⁺ T cells. *Nature Communications* 5, 1–13.
- Yin, J., Yang, K., Zhou, C., Xu, P., Xiao, W., Yang, H. (2019). Aryl hydrocarbon receptor activation alleviates dextran sodium sulfate-induced colitis through enhancing the differentiation of goblet cells. *Biochemical And Biophysical Research Communications* 514, 180–186.
- Yu, J., Luo, Y., Zhu, Z., Zhou, Y., Sun, L., Gao, J., Sun, J., Wang, G., Yao, X., Li, W. (2019). A tryptophan metabolite of the skin microbiota attenuates inflammation in patients with atopic dermatitis through the aryl hydrocarbon receptor. *Journal Of Allergy And Clinical Immunology* 143, 2108–2119.e12.
- Yu, M., Wang, Q., Ma, Y., Li, L., Yu, K., Zhang, Z., Chen, G., Li, X., Xiao, W., Xu, P., Yang, H. (2018). Aryl Hydrocarbon Receptor Activation Modulates Intestinal Epithelial Barrier Function by Maintaining Tight Junction Integrity. *International Journal Of Biological Sciences* 14, 69–77.
- Zelante, T., Iannitti, R. G., Cunha, C., De Luca, A., Giovannini, G., Pieraccini, G., Zecchi, R., D'Angelo, C., Massi-Benedetti, C., Fallarino, F., Carvalho, A., Puccetti, P., Romani, L. (2013). Tryptophan Catabolites from Microbiota Engage Aryl Hydrocarbon Receptor and Balance Mucosal Reactivity via Interleukin-22. *Immunity* 39, 372–385.
- Zhang, S., Qin, C., Safe, S. H. (2003). Flavonoids as aryl hydrocarbon receptor agonists/antagonists: effects of structure and cell context. *Environmental Health Perspectives* 111, 1877–1882.

- Zhang, S., Rowlands, C., Safe, S. (2008). Ligand-dependent interactions of the Ah receptor with coactivators in a mammalian two-hybrid assay. *Toxicology And Applied Pharmacology* 227, 196–206.
- Zhao, A., Yu, J., Lew, J.-L., Huang, L., Wright, S. D., Cui, J. (2004). Polyunsaturated Fatty Acids Are FXR Ligands and Differentially Regulate Expression of FXR Targets. *DNA and Cell Biology* 23, 519–526.
- Zhao, B., DeGroot, D. E., Hayashi, A., He, G., Denison, M. S. (2010). CH223191 Is a Ligand-Selective Antagonist of the Ah (Dioxin) Receptor. *Toxicological Sciences* 117, 393–403.
- Zhao, L., Xiao, H.-tao, Mu, H.-xue, Huang, T., Lin, Z.-si, Zhong, L., Zeng, G.-zhi, Fan, B.-min, Lin, C.-yuan, Bian, Z.-xiang (2017). Magnolol, a Natural Polyphenol, Attenuates Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis in Mice. *Molecules* 22, 1–15.
- Zheng, L., Li, D., Xiang, X., Tong, L., Qi, M., Pu, J., Huang, K., Tong, Q. (2013). Methyl jasmonate abolishes the migration, invasion and angiogenesis of gastric cancer cells through down-regulation of matrix metalloproteinase 14. *BMC Cancer* 13, 1–13.
- Zhou, J., Gasiewicz, T. A. (2003). 3'-Methoxy-4'-nitroflavone, a reported aryl hydrocarbon receptor antagonist, enhances Cyp1a1 transcription by a dioxin responsive element-dependent mechanism. *Archives Of Biochemistry And Biophysics* 416, 68–80.
- Zhu, B. T., Lee, A. J. (2005). NADPH-dependent metabolism of 17 β -estradiol and estrone to polar and nonpolar metabolites by human tissues and cytochrome P450 isoforms. *Steroids* 70, 225–244.
- Zu, Y., Yu, H., Liang, L., Fu, Y., Efferth, T., Liu, X., Wu, N. (2010). Activities of Ten Essential Oils towards *Propionibacterium acnes* and PC-3, A-549 and MCF-7 Cancer Cells. *Molecules* 15, 3200–3210.
- (2013). *Aromatic natural raw materials — Vocabulary* (Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization).

9. Přílohy

Příloha 1: Katalogový list jasmínového esenciálního oleje

PRANARÔM

international

FICHE D'ANALYSE – ANALYSIS SHEET

Absolue

Nom botanique - botanical name : *Jasminum officinalis*
Nom commun – french name: JASMIN OFFICINAL (ABSOLUE)
Numéro du lot – lot number: OF22302
Origine - origin: PRANAROM - MAROC
Partie de la plante – part of the plant: FLEUR
Date de distillation – distillation date : 06/2015
Date de peremption – out of date : 04/2021

Caractéristiques d'analyse – analysis characteristics:

CPG - SM HEWLETT PACKARD / CPG-FID
Colonne : HP INNOWAX 60-0.5-0.25
Programmation de température : 6 mm à 50 °C –2 °C/mn→250 °C-100 mn à 250 °C
Gaz vecteur He : 22 psis

Caractéristiques physiques – physical characteristics:

Aspect – physical state	Liquide légèrement visqueux
Couleur - colour	Orangé
Odeur - odour	Jasminée, caractéristique
Densité à 20°C - density	0,950
Densité à 15°C - density	0,953
Indice de réfraction à 20°C - refractive index	1,492 8
Pouvoir rotatoire à 20°C - optical rotation	+ 2,5 ° (dilution au 1/15 ^{mm})
Miscibilité à l'éthanol à 90% - miscibility	Soluble jusqu'à 1,5 volumes à 90 % puis trouble
Point d'éclair : SETAFLASH - flashpoint	112,3 °C

Analyses pesticides – pesticide analysis :

Pesticides Organochlorés : Dosage par GC MS détecteur XSD (méthode multirésidus interne validée selon la norme NF V03-110) Liste des pesticides recherchés (Pharmacopée Européenne): Alachlor, Aldrine, Bromophos Ethyl, Bromophos Méthyl, Chlordane, Chlorfenvinphos, Chlorpyrifos, Chlorpyrifos Méthyl, Chlorthal Diméthyl, Cyfluthrine, Cyhalothrine lambda, Cyperméthrine, Dichlofuanilide, Dichlorvos, Dicofof (Kelthane), Dieldrine, Endosulfan, Endosulfan sulfate, Etridine, Fenchlorphos (Ronnel), Fenchlorphos-oxon, Fenvalerate, Fluvainate, Heptachlor, Heptachlor epoxide, Hexachlorobenzene, Hexachlorocyclohexane α , Hexachlorocyclohexane β , Hexachlorocyclohexane δ , Hexachlorocyclohexane ϵ , Lindane, Methoxychlor, Mirex, Naled, o,p'-DDD, o,p'-DDE, o,p'-DDT, Oxychlorane, p,p'-DDD, p,p'-DDE, p,p'-DDT, Pentachloroaniline, Pentachloroanisole, Permethrine, Phosalone, Procymidone, Profenophos, Prothiofos, Quintozene, S421, Tecnazene, Tetradifon, Vinclozoline	Résultats < LMR* * Limite Maximale de Résidus autorisée
Pesticides Organophosphorés : Dosage par GC MS détecteur FPD (méthode multirésidus interne validée selon la norme NF V03-110) Liste des pesticides recherchés (Pharmacopée Européenne): Acephate, Azinphos Ethyl, Azinphos Méthyl, Bromophos Ethyl, Bromophos Méthyl, Chlorfenvinphos, Chlorpyrifos, Chlorpyrifos Méthyl, Diazinon, Dichlorvos, Diméthoate, Ethion, Etrimphos, Fenchlorphos (Ronnel), Fenchlorphos-oxon, Fentrotion, Fensulfotion (Dasanit), Fensulfotion-oxon, Fensulfotion-oxon-sulfone, Fensulfotion-sulfone, Fenthion, Fenthion-oxon, Fenthion-oxon-sulfone, Fenthion-oxon-sulfoxyde, Fenthion-sulfone, Fenthion-sulfoxyde, Fonofos, Malaoxon, Malathion, Mecarbam, Methacrifos, Methamidophos (Monitor), Methidathion, Monocrotophos, Naled, Ométhoate, Paraaxon, Paraaxon Méthyl, Parathion Ethyl, Parathion Méthyl, Phosalone, Phosmet, Pirimiphos Ethyl, Pirimiphos Méthyl, Profenophos, Prothiofos, Quinalphos.	Résultats < LMR* * Limite Maximale de Résidus autorisée

Profil CHROMATOGRAPHIQUE

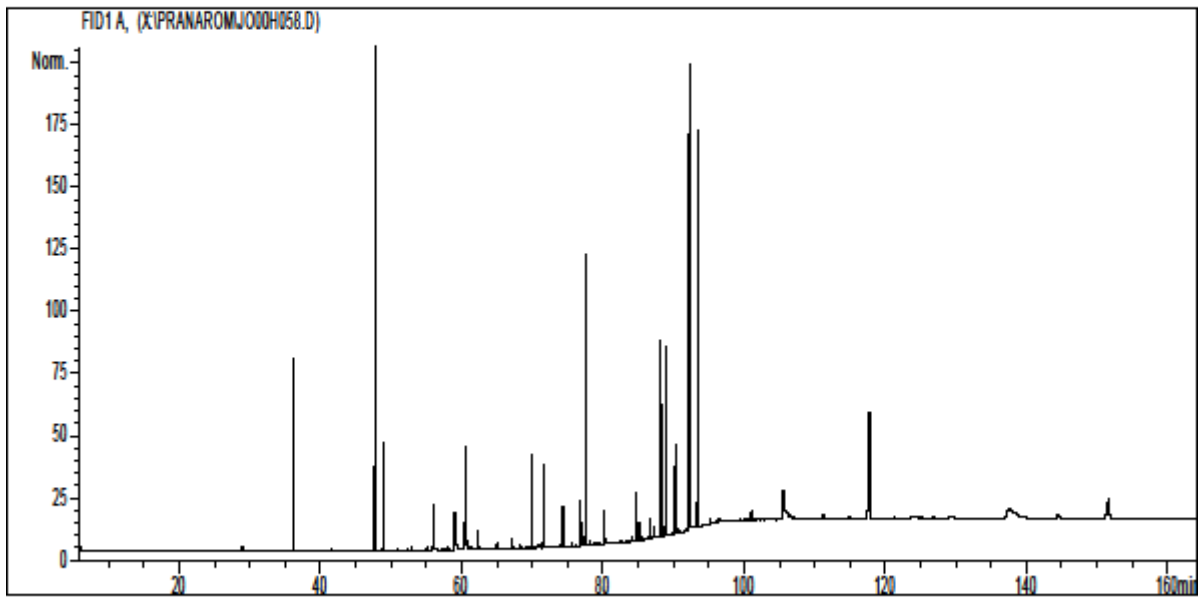


Tableau de résultats 1 : ABSOLUE DE JASMIN

LOT N° OF22302

Pics	Temps de rétention	Constituants	%
1	5,5	ACETATE D'ETHYLE	0,05
2	6,0	ETHANOL	0,04
3	15,3	LIMONENE	0,02
4	23,2	6-METHYL-5-HEPTEN-2-ONE	0,02
5	25,7	3-HEXEN-1-OL	0,01
6	28,9	PENTADECANE	0,09
7	31,7	Trans-OXYDE DE LINALOL	0,02
8	36,2	LINALOL	3,75
9	41,5	BENZOATE DE METHYLE	0,05
10	47,5	Z,E- α -FARNESENE	0,05
11	47,7	ACETATE DE BENZYLE	13,45
12	48,9	E,E- α -FARNESENE	2,43
13	50,9	SALICYLATE DE METHYLE	0,02
14	52,4	ACETATE DE 2-PHENYLETHYLE	0,03
15	52,9	ALCOOL ALIPHATIQUE	0,08
16	54,9	TETRAMETHYL HEXADECENOL ISOMERE	0,07
17	55,2	E-GERANYL ACETONE	0,11
18	56,0	ALCOOL BENZYLIQUE	1,27
19	57,6	NONADECANE	0,03
20	58,1	PHENYLACETONITRILE + ALCOOL PHENYLETHYLIQUE	0,07
21	59,0	Cis-JASMONE	1,74
22	60,6	Trans-JASMONE	2,35
23	60,7	2,6-DIMETHYL-3,7-OCTADIENE-2,6-DIOL	0,42
24	62,3	TETRAMETHYL HEXADECENOL ISOMERE	0,65
25	65,0	NEROLIDOL	0,18
26	67,1	p-CRESOL	0,24
27	67,4	BENZOATE D'HEXYLE	0,04
28	68,3	HENEICOSANE	0,08
29	69,1	TIGLATE DE BENZYLE	0,03
30	69,7	TRIMETHYLPENTADECANONE	1,20
31	69,9	BENZOATE DE cis-3-HEXENYLE	1,12
32	70,5	HENEICOSANE	0,03
33	70,9	ESTER BENZYLIQUE	0,08
34	71,6	EUGENOL	1,91
35	74,0	2,6-DIMETHYL-2,7-OCTADIENE-1,6-DIOL	0,04
36	74,4	PALMITATE DE METHYLE	0,95
37	75,7	PALMITATE D'ETHYLE	0,07
38	76,9	Z-JASMOLACTONE	1,32
39	77,6	ISOPHYTOL	7,09
40	78,2	CHAVICOL	0,12
41	78,9	2,6-DIMETHYL-2,7-OCTADIENE-2,6-DIOL	0,06
42	79,3	TETRAMETHYL PALMITATE DE METHYLE	0,04
43	79,6	HEPTADECANOATE DE METHYLE	0,06
44	80,2	JASMONATE DE METHYLE	0,78
45	80,4	HEPTADECANOATE DE METHYLE	0,14

Tableau de résultats 2 : ABSOLUE DE JASMIN

LOT N° OF22302

Pics	Temps de rétention	Constituants	%
46	82,4	JASMONATE DE METHYLE	0,05
47	82,6	ESTER ALIPHATIQUE	0,08
48	84,1	STEARATE DE METHYLE	0,18
49	84,7	INDOLE	1,33
50	85,1	OLEATE DE 9-METHYLE	0,43
51	85,5	OLEATE DE 10-METHYLE	0,10
52	86,7	N-METHYLACETYL ANTHRANILATE	0,62
53	87,2	COMPOSÉ METHYLESTER ALIPHATIQUE	0,15
54	87,3	LINOLEATE DE METHYLE	0,35
55	88,2	ACETATE DE PHYTYLE	5,37
56	88,9	GERANYL LINALOL	4,37
57	89,9	LINOLEATE D'ETHYLE	0,04
58	90,2	LINOLENATE DE METHYLE	2,10
59	90,4	GERANYLLINALOL ISOMERE	0,10
60	90,7	METHYLHEXACOSANE	0,09
61	91,7	COSANOATE DE METHYLE	0,05
62	92,2	PHYTOL	14,48
63	93,4	BENZOATE DE BENZYLE	10,72
64	95,2	EICOSENOATE DE METHYLE	0,11
65	96,4	COMPOSÉ AROMATIQUE	0,12
66	99,4	EICOSATRIENOATE DE METHYLE	0,05
67	99,9	SALICYLATE DE BENZYLE	0,13
68	100,6	HEPTACOSANE	0,07
69	101,0	SQUALENE ISOMERE	0,30
70	105,5	ACIDE PALMITIQUE	2,52
71	111,2	TETRAMETHYL HEPTADECANOLIDE Mw=324	0,20
72	117,7	SQUALENE	6,08
73	124,4	HENTRIACONTANE	0,45
74	125,0	ESTER PHENYLETHYLIQUE	0,21
75	126,8	Bis(2-ETHYLHEXYL)PHTHALATE	0,10
76	129,2	ACIDE LINOLEIQUE	0,44
77	137,5	ACIDE LINOLENIQUE	3,37
78	144,5	COMPOSÉ AROMATIQUE	0,20
79	151,6	COMPOSÉ C30H50O Mw=426 : EPOXYSQUALENE	1,80
80	166,2	COMPOSÉ C30H50O Mw=426 : EPOXYSQUALENE ISOM,	0,34
81	179,1	LINOLEATE DE PHENYLMETHYLE	0,34
		TOTAL	99,84

Date de l'analyse – date of the analysis : Avril 2016,

Pranarôm Int.
C. Schulze
Contrôle qualité