

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI**

**Přírodovědecká fakulta**

**Laboratoř růstových regulátorů**

**Esenciální olej z vanilky jako zdroj aktivátorů  
arylhlovodíkového receptoru**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Autor:	<b>Iva Gřešková</b>
Studijní program:	B1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	doc. Ing. Radim Vrzal, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	2020

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Iva Gřešková
Název práce	Esenciální olej z vanilky jako zdroj aktivátorů aryluhlovodíkového receptoru
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra buněčné biologie a genetiky
Vedoucí práce	doc. Ing. Radim Vrzal, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2020

### Abstrakt

Esenciální oleje nebo jejich složky jsou přítomny v každodenním životě jako součást potravin, kosmetických přípravků nebo v aromaterapii. U mnohých z nich byly potvrzeny jejich antioxidační, antimikrobiální a cytotoxické účinky. V této práci byla zkoumána schopnost minoritních složek esenciálního oleje z vanilky a hřebíčku (kreosolu, methylcinnamátu, methyl kreosolu, kumaranu, mequinolu, kyseliny homovanilinové, 4-vinylguajakolu, 4-hydroxybenzaldehydu, beta-karyofylenu a methyleugenolu) v koncentracích 1, 10, 50, 100 µg/ml aktivovat aryluhlovodíkový receptor. Nejdříve byla provedena MTT esej na zjištění cytotoxicity testovaných látek. Následně byla pomocí Reporter Gene Assay měřena transkripční aktivita aryluhlovodíkového receptoru. Schopnost aktivovat aryluhlovodíkový receptor v agonistickém módu měli mequinol, methyl kreosol, 4-vinylguajakol a 4-hydroxybenzaldehyd. Testování bylo prováděno na stabilně transfekované buněčné linii AZ-AhR odvozené od lidského hepatocelulárního karcinomu.

Klíčová slova	Esenciální olej, aryluhlovodíkový receptor, MTT esej, Reporter Gene Assay
Počet stran	44
Počet příloh	2
Jazyk	Český (anglický)

## **Bibliographical identification**

Author's first name and surname	Iva Gřešková
Title of thesis	Vanilla essential oil as a source of arylhydrocarbon receptor activators
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of Cell Biology and Genetics
Supervisor	doc. Ing. Radim Vrzal, Ph.D.
The year of presentation	2020

### **Abstract**

Essential oils and their components are present in everyday life, they occur in food, cosmetics or are used in aromatherapy. Many of them have antioxidant, antimicrobial and cytotoxic properties. In this thesis, the minority components of vanilla and clove essential oil (creosol, methyl cinnamate, methyl creosol, coumaran, mequinol, homovanillic acid, 4-vinylguaiacol, 4-hydroxybenzaldehyde, beta-caryophyllen and methyleugenol) were tested for the ability to activate arylhydrocarbon receptor in different concentrations (1, 10, 50, 100 µg/ml). First the cytotoxicity of tested compounds was studied via MTT assay. Second the transcriptional activity of human aryl hydrocarbon receptor was examined. Mequinol, methyl creosol, 4-vinylguaiacol and 4-hydroxybenzaldehyde were identified as agonists that activates aryl hydrocarbon receptor. In all experiments stably transfected cell line AZ-AhR derived from human hepatocellular carcinoma was used.

Keywords	Essential oil, aryl hydrocarbon receptor, MTT assay, Reporter Gene Assay
Number of pages	44
Number of attachment	2
Language	Czech (English)

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury.

V Olomouci dne .....

.....

Iva Gřešková

## Poděkování

Ráda bych zde poděkovala svému školiteli doc. Ing. Radimu Vrzalovi, Ph.D. za jeho odborné vedení, cenné rady a připomínky, ale také za vstřícný a lidský přístup v průběhu práce na mé bakalářské práci. Dále bych také ráda poděkovala kolektivu Laboratoře molekulární toxikologie a molekulární farmakologie za ochotu a pomoc po čas práce v laboratoři.

## Obsah

Seznam zkratk .....	8
1. Úvod.....	10
2. Teoretická část .....	11
2.1. Esenciální oleje .....	11
2.1.1. Chemické složení EO.....	11
2.1.2. Extrakce EO.....	13
2.1.3. Biologické účinky EO.....	15
2.1.4. EO z vanilky .....	16
2.1.5. EO z hřebíčku .....	19
2.2. Arylhlovodíkový receptor .....	21
2.2.1. Struktura AhR .....	22
2.2.2. Ligandy AhR.....	23
2.2.3. Signalizační dráha AhR .....	24
3. Materiál a metody .....	26
3.1. Biologický materiál.....	26
3.2. Chemikálie a roztoky .....	26
3.3. Laboratorní pomůcky .....	27
3.4. Laboratorní přístroje.....	28
3.5. Metodika .....	28
3.5.1. Příprava a kultivace buněk.....	28
3.5.2. Pasážování buněk.....	28
3.5.3. Počítání buněk a vyšetí na 96 jamkovou destičku .....	29
3.5.4. Příprava a aplikace testovaných látek pro MTT assay .....	29
3.5.5. MTT assay .....	30
3.5.6. Příprava a aplikace testovaných látek pro Reporter Gene Assay .....	30
3.5.7. Reporter Gene Assay .....	31
4. Výsledky .....	32

4.1. Viabilita buněčné linie AZ-AhR .....	32
4.2. Transkripční aktivita AhR.....	33
5. Diskuse.....	36
6. Závěr .....	39
7. Použitá literatura .....	40

#### Přílohy

Příloha A (Analýza oleje z *Vanilla planifolia*)

Příloha B (Analýza oleje z *Eugenia caryophyllus*)

## Seznam zkratek

AhR	Aryluhlovodíkový receptor
AHRE	Responzivní element pro aromatické uhlovodíky
AhRR	Represor aryluhlovodíkové receptoru
AIP	Interagující protein s aryluhlovodíkovým receptorem
ARA9	Asociovaný protein s aryluhlovodíkovým receptorem
ARNT	Jaderný translokátor aryluhlovodíkového receptoru
ATP	Adenosintrifosfát
AZ-AhR	Buněčná linie odvozená od hepatocelulárního karcinomu
bHLH	Bazická šroubovice-smyčka-šroubovice
CD4 <sup>+</sup>	Pomocné T lymfocyty produkující CD4 protein na jejich povrchu
CB1	Kanabinoidní receptor 1
CB2	Kanabinoidní receptor 2
CC <sub>50</sub>	50% koncentrace cytotoxicity vůči makrofágům
CYP	Cytochromy P450
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DRE	Dioxinový responsivní element
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Kyselina ethylendiamintetraoctová
EO	Esenciální olej
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv
HBA	4-hydroxybenzaldehyd
HepG2	Hepatocelulární buněčná linie
HIF	Hypoxií indukovaný faktor
hsp90	Protein teplotního šoku o hmotnosti 90 kDa
HVK	Kyselina homovanilinová ((4-hydroxy-3-methoxyfenyl)ethanová kyselina)
IC <sub>50</sub>	Koncentrace způsobující 50% inhibici růstu promastigotů
KRE	Kreosol (2-methoxy-4-methylfenol)
KUM	Kumaran (2,3-dihydro-1-benzofuran)



MC	Methylcinnamát (methyl(E)-3-fenylprop-2-enoát)
ME	Methyleugenol (1,2-dimethoxy-4-(prop-2-en-1-yl)benzen)
MEQ	Mequinol (4-methoxyfenol)
MKRE	Methyl kreosol (2-ethoxy-4-methylfenol)
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid
NF- $\kappa$ B	Nukleární faktor kappa B
Nrf2	Jaderný erythroidní faktor 2-příbuzný s faktorem 2
PAH	Polycyklické aromatické uhlovodíky
PAS	Per-ARNT-SIM doména
PBS	Fosfátový pufr
PCB	Polychlorované bifenyly
TCDD	2,3,7,8-tetrachlordibenzo-p-dioxin
THC	Tetrahydrokanabinol
UDS	Nenaplánovaná syntéza DNA
UT	Negativní kontrola (untreated)
UVB	Ultrafialové záření B
VG	4-vinylguajakol (2-methoxy-4-vinylfenol)
XAP2	X-asociovaný protein
XME	Enzymy metabolismu xenobiotik
XRE	Xenobiotický responzivní element
$\beta$ -KF	Beta-karyofylen ((1R, 4E, 9S)-4,11,11-trimethyl-8-methylidenbicyklo[7.2.0]undek-4-en)

## 1. Úvod

Esenciální oleje mají široké využití, od součástí potravin, kde slouží k dochucování, ale i jejich konzervování, přes kosmetický průmysl, kde jsou součástí parfémů, krémů a dalších přípravků až k aromaterapiím, jakožto uznávaným zdravotním terapiím. Součástí esenciálních olejů jsou látky různé chemické povahy, převážně se však jedná o terpeny a terpenoidy, z rostlinných částí jsou získávány různými způsoby extrakce. U mnoha esenciálních olejů, nebo jejich složek byly prokázány jejich antioxidační, antimikrobiální, cytotoxické a další léčivé účinky.

Aryluhlovodíkový receptor je ligandem aktivovaný transkripční faktor zapojený do metabolismu xenobiotik, jakožto regulátor exprese cytochromu P450. Spektrum ligandů aktivujících receptor je široké, převážně se jedná o látky toxické povahy, kam se řadí i modelový agonista 2,3,7,8-tetrachlordibenzo-p-dioxin (TCDD). Avšak skupina rychle metabolizovaných ligandů by mohla mít terapeutické využití, protože indukují tvorbu regulačních T lymfocytů, jež hrají roli v imunitní odpovědi organismu, nehromadí se v buňce a nevykazují tak dioxinu podobnou toxicitu.

Cílem této práce bylo zjistit, zda minoritní složky z esenciálního oleje z vanilky a hřebíčku jsou schopny aktivovat aryluhlovodíkový receptor.

## 2. Teoretická část

### 2.1. Esenciální oleje

Esenciální oleje (EO) jsou aromatické, těkavé, olejovité kapaliny syntetizované živými organismy (Tongnuanchan a Benjakul 2014; Baser a Fatih 2007). V rostlinách se EO nachází v olejových buňkách, sekrečních kanálech a dutinách nebo ve žláznatých trichomech. V některých případech mohou být EO vázány na sacharidy ve formě glykosidů, tato vazba musí být před destilací enzymaticky hydrolyzována (Baser a Fatih 2007).

EO jsou komplexní směsi složené z přírodních polárních a nepolárních uhlovodíků a jejich kyslíkatých derivátů, přesněji se v EO vyskytují terpeny (monoterpeny, diterpeny, seskviterpeny), terpenoidy (isoprenoidy), aldehydy, alkoholy, ketony, fenoly, methoxy deriváty, aminy, sulfidy a další (Bakkali et al. 2008; Mohamed, El-Emary, a Ali 2010; Masango 2005).

Obzvláště díky vůni jsou EO často přidávány do parfémů, kosmetiky, čistících prostředků, ale také se používají pro ochucení jídla a pití. Další využití našly jak EO, tak jejich složky v oblasti medicíny, díky svým účinkům (viz 2.1.3 Účinky EO) (Adorjan a Buchbauer 2010).

#### 2.1.1. Chemické složení EO

Jak již bylo zmíněno výše EO jsou přírodní složité směsi, obsahující kolem 20 – 60 složek, každou v jiné koncentraci. Ve většině EO se vyskytují dvě nebo tři majoritní složky ve vysokých koncentracích (okolo 20 – 70 %) a mnoho minoritních složek ve stopovém množství. Právě majoritní složky udělují EO jejich charakteristické biologické vlastnosti (např. vůni). Jednotlivé složky jsou rozděleny do dvou hlavních skupin, v jedné jsou zahrnuty terpeny a terpenoidy (převážně kyslíkaté deriváty terpenů), v druhé pak ostatní aromatické a alifatické uhlovodíky s malou molekulovou hmotností (Bakkali et al. 2008).

Terpeny jsou organické sloučeniny sestávající ze dvou nebo více jednotek isoprenu (C<sub>5</sub>). Dle počtu izoprenových jednotek se terpeny dělí na monoterpeny – obsahují dvě jednotky isoprenu (C<sub>10</sub>), seskviterpeny – tři jednotky isoprenu (C<sub>15</sub>), diterpeny – čtyři jednotky isoprenu (C<sub>20</sub>). Diterpeny a vyšší terpeny se v EO vyskytují jen výjimečně. Monoterpeny mohou mít acyklické, cyklické, lineární nebo aromatické řetězce,

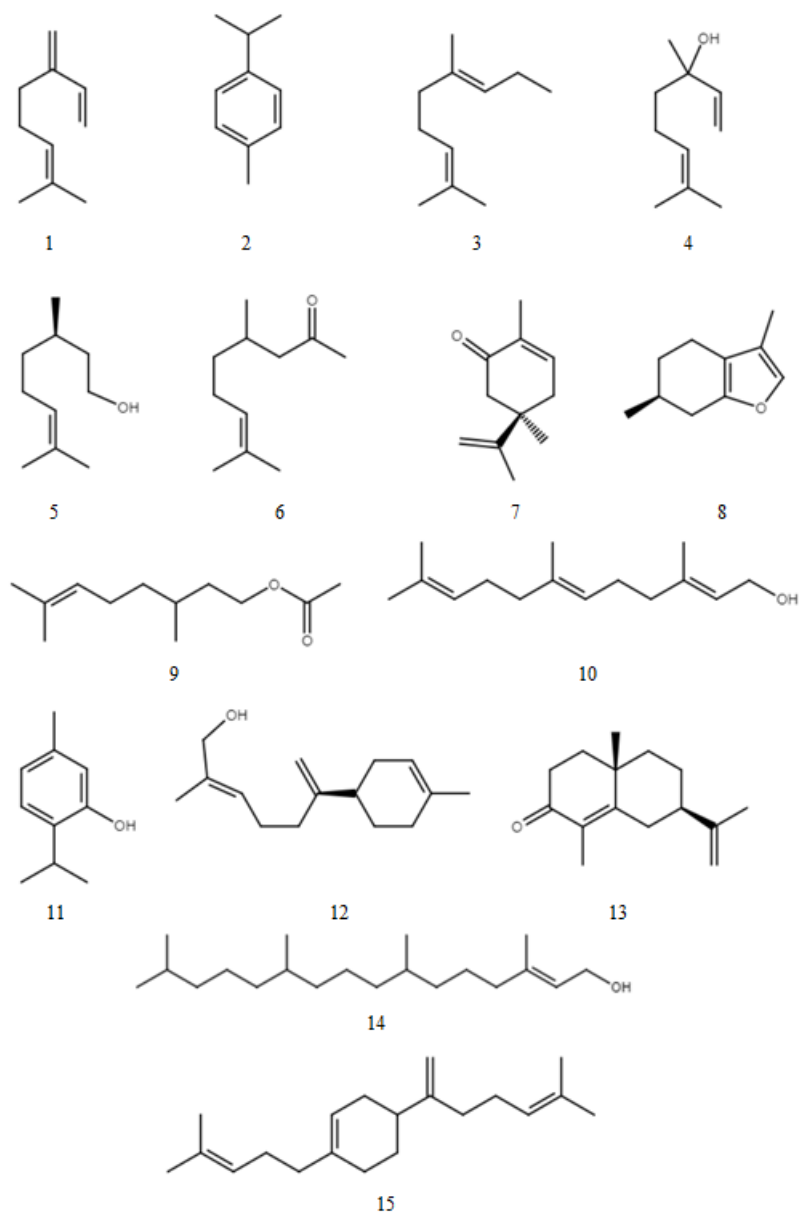
seskviterpeny lineární, rozvětvené nebo cyklické a diterpeny mohou mít acyklické nebo cyklické řetězce (Baser a Fatih 2007).

Monoterpeny a jejich deriváty tvoří okolo 90 % z EO, z acyklických monoterpenů se v EO vyskytují například myrcen (Obrázek 1, struktura 1), z cyklických *p*-cimen (2). Mezi kyslíkaté deriváty monoterpenů v EO se řadí geraniol (3), linalol (4), citronellol (5) (alkoholy), citronellal (6) (aldehyd), karvon (7) (keton), menthofuran (8) (ether), citronellyl acetát (9) (ester), thymol (11) (fenol) a mnoho dalších (Bakkali et al. 2008).

Seskviterpeny jsou nenasycené sloučeniny s největší diverzitou v rámci terpenů. Mezi lineární seskviterpeny EO patří například farnesol (10), cyklickým seskviterpenem je lanceol (12) nebo  $\alpha$ -kyperon (13) (Baser a Fatih 2007).

Mezi acyklické diterpeny vyskytující se v EO patří fytol (14) (trans i cis forma), kamforen (15) je zástupce cyklických diterpenů (Baser a Fatih 2007).

Z výše zmiňovaných sloučenin nepatřících do skupiny terpenů a terpenoidů lze v EO najít alkoholy a aldehydy s krátkým řetězcem, které vznikají při metabolické konverzi nebo degradaci fosfolipidů a mastných kyselin (Baser a Fatih 2007).



Obrázek 1 **Chemické struktury zástupců mono-, seskvi- a diterpenů.** Vybrané chemické struktury látek ze skupin mono-, seskvi- a diterpenů vyskytující se v EO. Struktury 1-9, 11 představují monoterpeny, struktury 10, 12,13 jsou zástupci seskviterpenů a struktury 14,15 jsou diterpeny. 1 – myrcen, 2 – p-cimen, 3 – geraniol, 4 – linalol, 5 – citronellol, 6 – citronellal, 7 – R(-)-karvon, 8 – menthofuran, 9 – citronellyl acetát, 10 – farnesol, 11 – thymol, 12 – lanceol, 13 – α-kyperon, 14 – fytol, 15 – kamforen.

## 2.1.2. Extrakce EO

EO jsou extrahovány z různých částí rostlin, například z kořenů, listů, kůry, pupenů, květů, semen a dalších. V závislosti na materiálu jsou k extrakci používány různé metody (Tongnuanchan a Benjakul 2014). Mezi běžně používané metody patří parní destilace,

hydrodestilace, extrakce rozpouštědlem, extrakce nadkritickou tekutinou (pomocí oxidu uhličitého (CO<sub>2</sub>)) a další. EO z citrusů jsou získávány pomocí lisování (Baser a Fatih 2007).

Parní destilace je nejvíce používanou metodou pro extrakci EO v poměru 93 % ku 7 % s ostatními metodami (Masango 2001). Masagno (2005) ve své práci popsal nový způsob destilace, který na rozdíl od parní destilace zvýší výtěžek EO a sníží ztráty způsobené rozpuštěním polárních sloučenin v odpadní vodě (čím méně vody bude v destilátu, tím menší bude rozpustnost polárních sloučenin v kondenzátu). Rostlinný materiál je zabalen a umístěn nad zdroj páry (packed bed), do kontaktu s rostlinným materiálem přichází pouze pára a nikoli vroucí voda. Takto aplikované teplo (musí být dostatečně velké) způsobí rozbití buněčných struktur, v jehož důsledku dojde k uvolnění aromatických sloučenin nebo EO (Perineau, Ganou, a Vilarem 2007; Babu a Kaul 2005). Následně je pára s EO ochlazena a zkapalněna v kondenzátoru, z něhož jsou EO a voda převedeny do separátoru, kde dochází k oddělení olejové (EO) od vodné frakce.

Hydrodestilace se stala standardní metodou extrakce EO z rostlinných materiálů, jakými jsou dřevo nebo květy, jež obsahují ve vodě nerozpustné sloučeniny s vysokým bodem varu (Tongnuanchan a Benjakul 2014). Rostlinný materiál je vložen do baňky s vroucí vodou. Pomocí osmotických sil přechází oleje do vody, ta se při jejím bodu varu společně s přítomnými EO odpařuje. Následně dochází ke kondenzaci páry na stěnách chladiče. Kondenzát je převeden do separační aparatury, kde je oddělena olejová frakce od vodné (Baser a Buchbauer 2016).

Extrakce rozpouštědlem je používána v případě křehkých rostlinných materiálů, které nemohou být extrahovány pomocí parní destilace (Tongnuanchan a Benjakul 2014). Jako rozpouštědla mohou sloužit aceton, hexan, petroleum ether, methanol nebo ethanol (Areias et al. 2000; Pizzale et al. 2002; Koşar, Dorman, a Hiltunen 2005).

Při extrakci nadkritickou tekutinou je využívána její vlastnost, kdy při překročení její kritické teploty a při dostatečně vysokém tlaku má jak vlastnosti plynů (viskozita, dobře proniká vzorkem), tak vlastnosti kapalin (hustota). Nejčastěji používaným plynem je CO<sub>2</sub>, nepolární sloučenina vhodná pro extrakci nepolárních látek (Opekar 2010). Na rozdíl od jiných používaných metod extrakce nejsou ve výsledném produktu přítomny stopy rozpouštědla, jelikož se CO<sub>2</sub> po snížení teploty a tlaku vrátí do plynného stavu a z produktu se odpaří (Tongnuanchan a Benjakul 2014).

### 2.1.3. Biologické účinky EO

EO jsou baktericidní, virucidní, fungicidní, insekticidní, také působí proti býložravcům a díky těmto vlastnostem jsou v přírodě důležité pro ochranu rostlin, které je produkují. Baktericidní, virucidní a fungicidní (souhrnně antimikrobiální) vlastnosti spolu s antiseptickými, analgetickými, sedativními, protizánětlivými, spasmolytickými a lokálně anestetickými jsou využívány v lékařství, při uchovávání potravin, ale také v kosmetice (Bakkali et al. 2008).

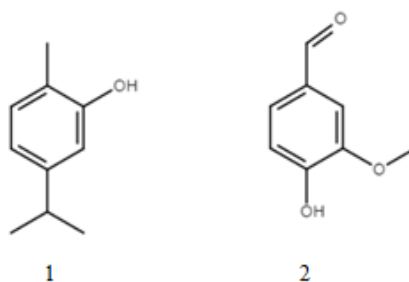
Mechanismus cytotoxických účinků EOs není zcela znám, ale vzhledem k heterogenitě složení např. Tea Tree oleje se předpokládá více než jeden mechanismus účinku a zapojení více komponent oleje (Carson, Mee, a Riley 2002). To samé lze predikovat u většiny EO.

EO jsou složeny z lipofilních látek, ty prochází přes buněčnou stěnu a cytoplazmatickou membránu, narušují různé vrstvy polysacharidů, mastných kyselin a fosfolipidů, čímž dochází k permeabilizaci buněčných stěn a membrán. U bakterií je narušení membrán spojováno se ztrátou iontů a snížením membránového potenciálu, čímž dochází k narušení funkce protonové pumpy a vyčerpání zásob ATP. U eukaryot mohou EO způsobit depolarizaci mitochondriální membrány snížením jejího membránového potenciálu, ovlivněním cyklu vápenatých iontů, poruchou funkce jiných iontových kanálů, snížením gradientu pH a stejně jako u bakterií ovlivněním protonové pumpy a zásob ATP. Díky těmto pochodům dochází k permeabilizaci vnější a vnitřní membrány mitochondrie, která se stává propustnou pro volné radikály, cytochrom C, vápenaté ionty a proteiny. V buňce roste oxidativní stres, dochází k selhání hospodaření s energií a buňka umírá apoptózou nebo nekrózou (Bakkali et al. 2008).

Antioxidanty jsou takové látky, které jsou schopny reagovat s radikály a snižovat tak oxidativní stres. Vysokou reaktivitou s peroxy radikály se vyznačují například fenolické látky obsažené v EO. Při reakci peroxy radikálu s fenolickou látkou dochází k přenosu vodíku z hydroxy skupiny fenolu na radikál, vzniká fenoxyl radikál a peroxid. Fenoxyl radikál následně reaguje s dalším peroxy radikálem za vzniku neradikálových sloučenin. Těmito radikálovými reakcemi ubývá volných radikálů a snižuje se oxidativní stres (Amorati, Foti, a Valgimigli 2013). Tyto antioxidační účinky jsou například využívány v potravinářském průmyslu. V potravinách dochází k oxidaci lipidů, jež vede ke vzniku nežádoucích chutí, ale také může docházet k utváření toxických látek. Aby bylo zabráněno

oxidaci lipidů, přidávají se do potravin syntetické antioxidanty. Ty však mohou být zdraví škodlivé včetně potenciálních karcinogenů, a tak se nahrazují přírodními antioxidanty (Lee a Shibamoto 2002). Kromě antioxidantních účinků mohou mít EO i prooxidační účinky, ovlivňují membrány uvnitř buňky a organely jako například výše zmíněné mitochondrie (Bakkali et al. 2008).

Široké spektrum EO je známo pro své antimikrobiální vlastnosti, jež zastávají především monoterpeny, seskviterpeny a odvozené alkoholy, ale také alkoholy přítomny v těchto olejích. Přesněji EO s fenolickými sloučeninami, jakými jsou thymol (viz Obrázek 1, str. 13) a carvacrol (Obrázek 2, struktura 1) mají vysokou aktivitu proti širokému spektru organismů. Důležitou roli v mikrobiální aktivitě fenolických sloučenin hraje přítomnost hydroxylové skupiny fenolu (Koroch, Juliani, a Zygadlo 2007). Carvacrol narušuje integritu vnější membrány gramnegativních bakterií, uvolňuje z nich lipopolysacharidy, a tím zvyšuje její permeabilitu vůči ATP. U grampozitivních bakterií je carvacrol schopen ovlivňovat propustnost pro vodíkové a draselné kationty (Tongnuanchan a Benjakul 2014). Vanilin (Obrázek 2, struktura 2) vykazuje antifungální aktivitu nejen proti různým druhům plísní a kvasinek způsobujícím kažení potravin, ale také proti kvasinkám *Candida albicans* a *Cryptococcus neoformans* (významným z lékařského hlediska). Hlavní roli v antifungální aktivitě a její míře hraje aldehydická skupina vanilinu, stejně jako postavení vedlejších skupin na benzenovém jádru (Sinha, Sharma, a Sharma 2008).



Obrázek 2 Chemické struktury carvacrolu (1) a vanilinu (2).

#### 2.1.4. EO z vanilky

Vanilka, v češtině je pod tímto označením myšleno jak koření, tak rostlina, je z rodu *Vanilla* patří do čeledi *Orchideaceae* (vstavačovitě). Tato čeleď čítá na 100 druhů bylinných lián, které mohou dosahovat výšky až 35 m (Burnie 2007). Rostliny vanilky se vyskytují

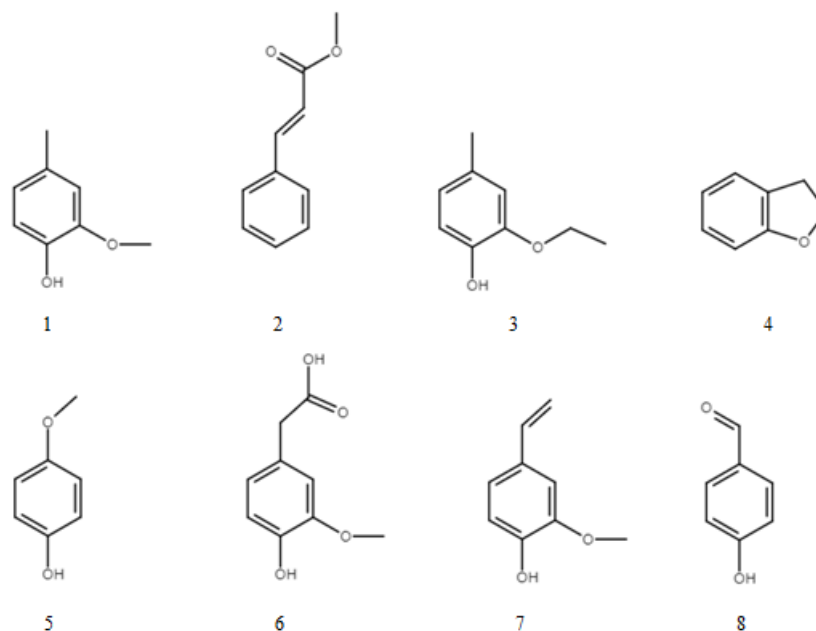


v subtropických a tropických oblastech po celém světě, nejčastěji však v amerických tropech (Valíček 2002). Vanilka má střídavě postavené dužnaté listy a šupiny, k opoře se přichytávají pomocí vzdušných kořenů, které jsou na lodyze postaveny proti listům. Květy vanilky tvoří květenství hroznu, plody jsou masité úzce válcovité tobolky (Burnie 2007).

Z rostliny vanilky se sklízí její do žluta zbarvené tobolky v době, kdy jsou téměř zralé a uvnitř naplněny černou kašovitou hmotou s velkým množstvím drobných většinou neklíčivých semen. V tobolkách vlivem fermentace dochází k hydrolyze glukovanilinu na glukosu a vanilin, jež je hlavní složkou esenciálního oleje a rostlině dává její charakteristickou vůni (Valíček 2002).

V extrahované směsi z tobolek vanilky je okolo 170 těkavých, aromatických komponent. Jednou z hlavních složek a nejvíce známou je vanilin (Rao a Ravishankar 2000). Přírodní vanilin je získáván z tobolek vanilky, ty jsou však drahou komoditou, a tak jsou vyvíjeny metody pro výrobu syntetického vanilinu (Korthou a Verpoorte 2007). V mnoha studiích jsou vanilinu přisuzovány antioxidační, antimikrobiální, antikarcinogenní a „antisickling“ (předcházení nebo potlačení vzniku srpkovitých erytrocytů) účinky (Sinha, Sharma, a Sharma 2008).

V práci Bartoňkové a Dvořáka (2018) byla zkoumána schopnost EO z vanilky a následně i vanilinu, jakožto hlavní komponenty, aktivovat aryluhlovodíkový receptor (více kapitola 2.2.). EO z vanilky byl shledán plným agonistou aryluhlovodíkové receptoru. Dále byl testován vanilin (11 %), ten byl však neaktivní (Bartoňková a Dvořák 2018). Z těchto výsledků je přisuzována aktivita jiným složkám oleje, nebo jejich kombinaci. Na základě těchto předpokladů bylo pro tuto práci vybráno 8 minoritních látek vyskytujících se v EO z vanilky (Obrázek 3) přesněji kreosol (2-methoxy-4-methylfenol; struktura 1), methylcinnamát (methyl(E)-3-fenylprop-2-enoát; 2), methyl kreosol (2-ethoxy-4-methylfenol; 3), kumaran (2,3-dihydro-1-benzofuran; 4), mequinol (4-methoxyfenol; 5), kyselina homovanilinová ((4-hydroxy-3-methoxyfenyl)ethanová kyselina; 6), 4-vinylguajakol (2-methoxy-4-vinylfenol; 7), 4-hydroxybenzaldehyd (8) (podrobná analýza oleje z rostliny *Vanilla planifolia*, ze které byly vybrány testované látky viz Příloha A).



Obrázek 3 **Chemické struktury minoritních látek v EO z vanilky.** Přehled chemických struktur látek, jež jsou v této práci podrobeny testování. 1 – kresol (2-methoxy-4-methylfenol), 2 – methylcinnamát (methyl(E)-3-fenylprop-2-enoát), 3 – methyl kreosol (2-ethoxy-4-methylfenol), 4 – kumaran (2,3-dihydro-1-benzofuran), 5 – mequinol (4-methoxyfenol), 6 – kyselina homovanilinová ((4-hydroxy-3-methoxyfenyl)ethanová kyselina), 7 – 4-vinylguajakol (2-methoxy-4-vinylfenol), 8 – 4-hydroxybenzaldehyd.

Methylcinnamát a methyl kreosol jsou používány jako součásti parfémů a kosmetických aromatických výrobků (Bhatia et al. 2007; Aida, Maruyama, a Matsuda 2017).

Kumaran byl izolován z brazilského hnědého propolisu v dichlormethanové frakci. Propolis vykazoval antileismaniázovou aktivitu a nízkou cytotoxicitu vůči makrofágům, zejména jeho dichlormethanová frakce, která měla nejvyšší podíl  $CC_{50}$  (50% cytotoxická koncentrace pro makrofágy) a  $IC_{50}$  (koncentrace způsobující 50% inhibici růstu promastigotů (jedna z fází životního cyklu leishmanie)) (Santana et al. 2014).

Přípravek se směsí 2% mequinolu a 0,01% tretinoinu byl v klinické studii sledán jako efektivní léčba lentig (malé pigmentové skvrny na kůži s jasně ohraničenými okraji) a příbuzných hyperpigmentálních lézí, zároveň byl organismem dobře tolerován. Výsledky jsou prezentovány ze dvou randomizovaných, kontrolovaných, dvojitě slepých klinických studií s celkovým počtem 1 175 subjektů (Fleischer et al. 2000).

Kyselina homovanilinová se nachází jako metabolit katecholaminů v mozkové tkáni (Duda a Kissinger 1993).

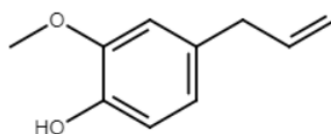
U buněčné kultury RAW264.7 obohacené lipopolysacharidem z *Escherichia coli* 4-vinylguajakol koncentračně závisle inhibuje produkci oxidu dusnatého a prostaglandinů, je schopen blokovat expresi indukibilního enzymu makrofágů (iNOS – odpovědný za tvorbu oxidu dusnatého) a cyklooxygenasy 2, navíc je schopen inhibovat translokaci nukleárního faktoru kappa B (NF-κB) (p65) do jádra. 4-vinylguajakol má na základě těchto poznatků protizánětlivé účinky (Jeong et al. 2011).

Sprague Dawleyho potkanům na dietě s vysokým obsahem tuků byl denně podáván 1 g vodného extraktu z květů rostliny *Gastrodia elata*, jehož hlavní složkou je vanilin a 4-hydroxybenzaldehyd. U potkanů byla prokázána redukce inzulínové rezistence na základě snížení akumulace tuků v adipocytech díky oxidaci tuků (Park, Kim, a Kang 2011).

### 2.1.5. EO z hřebíčku

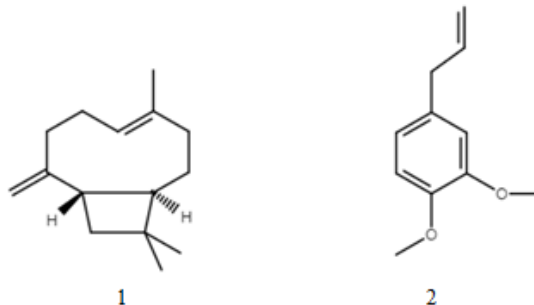
Hřebíček stejně jako u vanilky je označení jak pro koření, tak pro rostlinu *Syzygium aromaticum* (*Eugenia caryophyllus*) z čeledi *Myrtaceae* (myrtovité). Hřebíček je stálezelený strom dosahující výšky 8-15 m s krátkým kmenem vyskytující se v tropických oblastech zejména na ostrovech v Indickém oceánu, původem z Moluckých ostrovů. Listy jsou vstřícné, tmavozelené s prosvítajícími siličnými nádržkami. Květy jsou uspořádány do květenství zvaného vrcholík, ve kterém může být 3 - 40 oboupohlavných květů. Plodem je elipsoidní bobule obsahující převážně jedno semeno (Grulich 2011). EO je získáván z pupat hřebíčku, jež jsou sklízena v době zrání před vykvetením. Poupata mohou být sbírána manuálně nebo pomocí přírodních fytohormonů, ty uvolní ethylen ve vegetativních pletivech a navodí tím předčasné dozrání (Cortés-Rojas, de Souza, a Oliveira 2014).

Nejen extrakt z hřebíčku, ale i eugenol (Obrázek 4), jeho hlavní komponenta, mají antioxidační, antimikrobiální a cytotoxické účinky (Cortés-Rojas, de Souza, a Oliveira 2014). Eugenol je jednou z molekul, jež zasahuje do signální dráhy NF-κB, ten je aktivován například volnými radikály. Spuštěním signalizační dráhy dojde k translokaci do jádra, kde vyvolává expresi přibližně 200 genů zodpovědných za potlačení apoptózy, indukci buněčné transformace, proliferaci, vznik metastáz a mnoho dalších (Aggarwal a Shishodia 2006).



Obrázek 4 Chemická struktura eugenolu.

EO z hřebíčku byl jedním z testovaných olejů v práci Bartoňkové a Dvořáka (2018). EO jako celek byl sledován částečným (parciálním) agonistou aryluhlovodíkového receptoru. Dále byl testován eugenol a eugenyl acetát, jakožto hlavní složky oleje. Obě látky stejně jako celkový EO byly částečnými (parciálními) agonisty aryluhlovodíkového receptoru (Bartoňková a Dvořák 2018). Na základě těchto výsledků byly vybrány dvě látky (Obrázek 5) z EO beta-karyofylen ((1R, 4E, 9S)-4, 11, 11-trimethyl-8-methylidenbicyklo[7.2.0]undek-4-en; struktura 1) a methyleugenol (1,2-dimethoxy-4-(prop-2-en-1-yl)benzen; 2) (podrobná analýza oleje z rostliny *Eugenia caryophyllus* z níž byly vybrány tyto látky viz Příloha B), díky podobnosti s již testovanými látkami (methyleugenol) či díky zajímavé struktuře (beta-karyofylen).



Obrázek 5 Chemické struktury dvou minoritních složek EO z hřebíčku. Přehled chemických struktur látek, jež jsou v této práci testovány. 1 – beta-karyofylen ((1R, 4E, 9S)-4, 11, 11-trimethyl-8-methylidenbicyklo[7.2.0]undek-4-en), 2 – methyleugenol (1,2-dimethoxy-4-(prop-2-en-1-yl)benzen).

Beta-karyofylen je první známý „dietary“ kanabinoid vyskytující se v potravě, přitom je americkým Úřadem pro kontrolu potravin a drog (FDA) schválen jako bezpečný (Hartsel et al. 2016). Beta-karyofylen ačkoliv se strukturně liší od ostatních kanabinoidů, je schopen se vázat do kanabinoidního receptoru CB2, který je převážně v periferních tkáních a je terapeutickým cílem pro léčbu zánětů, bolesti, aterosklerózy a osteoporózy (Gertsch 2008; Gertsch et al. 2008), na rozdíl od CB1, jež je zodpovědný za psychoaktivní účinky kanabinoidů, jakým je například THC (tetrahydrokanabinol). Beta-karyofylen je v současné

době spojován s pozitivními účinky na osteoartritidu (Rufino et al. 2015), diabetes (Basha a Sankaranarayanan 2014), úzkosti a deprese (Bahi et al. 2014), jaterní fibrosu (Calleja et al. 2013; Mahmoud et al. 2014) a další onemocnění. Spolu s Paclitaxelem vykazuje beta-karyofylen synergické účinky v chemoterapeutické léčbě, samostatně je dokonce schopen stimulovat apoptózu a potlačit růst tumoru (Legault a Pichette 2007).

Methyleugenol působil na hepatocyty Fischer 344 potkanů a B3C3F<sub>1</sub> myši minimálně cytotoxicky, za to u něj byla pomocí UDS (unscheduled DNA synthesis) eseje zjištěna vysoká míra mutagenese, což může být zapříčiněno biotransformací methyleugenolu, který může podléhat hydroxylaci na C1 uhlíku vedlejšího řetězce díky cytochromu P450 a následně může být tato hydroxy skupina sulfatována. Následně může takto vzniklý sulfatovaný ester disociovat, ze zbytku molekuly se stanou vysoce reaktivní DNA elektrofilny (Burkey et al. 2000).

## 2.2. Aryluhlovodíkový receptor

Aryluhlovodíkový receptor (AhR) je ligandem aktivovaný transkripční faktor patřící do bHLH-PAS (basic helix-loop-helix Per-ARNT-Sim) rodiny transkripčních faktorů (Wu et al. 2013).

PAS domény, původně objeveny u *Drosophily melanogaster*, jsou obsaženy v proteinech účastnících se signálních drah regulace odpovědi organismu na změny vnějšího prostředí. Kromě AhR patří mezi PAS proteiny také jaderný translokátor AhR (ARNT z anglického aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator) a faktory indukované hypoxií (HIFs) (McIntosh, Hogenesch, a Bradfield 2010).

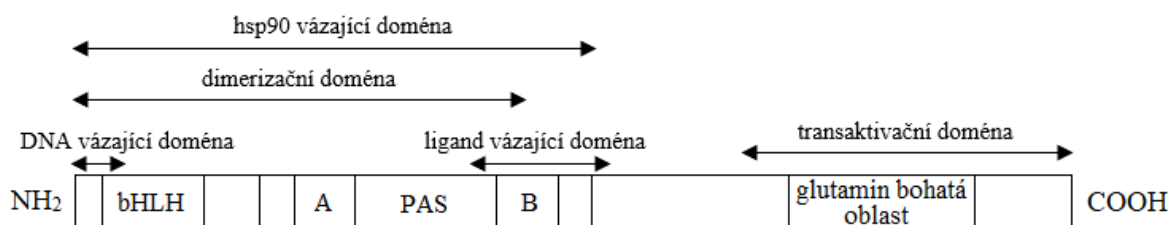
AhR je zapojen do regulace genů, které kódují enzymy metabolismu xenobiotik (XME), mezi něž patří například cytochrom P450 1A1/2 (CYP1A1/2) a 1B1 (CYP1B1) (Hahn 1998). Kromě úlohy v odpovědi na enviromentální znečištění a regulace exprese genů detoxifikace a metabolismu xenobiotik, je AhR také zapojen do kontroly buněčného cyklu, apoptózy a buněčné diferenciace (Wu et al. 2013; Vondracek a Machala 2011). Nedávné studie se zabývají aktivací AhR pomocí ligandů s potenciálními terapeutickými účinky, jež by mohly podporovat tvorbu regulačních T lymfocytů kontrolujících intenzitu a trvání imunitní odpovědi. Jedná se o rychle metabolizované AhR ligandy, které se neakumulují v buňce a nezpůsobují toxicitu podobnou dioxinu, ale indukují regulační T lymfocyty

a vykazují pozoruhodné výsledky v preklinických modelech autoimunitních (Ehrlich a Kerkvliet 2017).

Modelovým ligandem AhR s největší schopností jej aktivovat je 2,3,7,8-tetrachlordibenzo-p-dioxin (TCDD), způsobuje však řadu toxických efektů včetně imunosuprese a karcinogeneze (Vrzal, Ulrichová, a Dvořák 2004). Mezi nejlépe popsané ligandy AhR patří polycyklické aromatické uhlovodíky (PAH), polychlorované bifenyly (PCB) a halogenované dioxiny. Nutno podotknout, že většina ligandů AhR je částečnými agonisty (Stejskalova, Dvorak, a Pavek 2011).

### 2.2.1. Struktura AhR

Gen pro lidský AhR se nachází na krátkém raménku 7 chromosomu (7p15) a kóduje protein o velikosti přibližně 96 kDa. AhR obsahuje několik domén důležitých pro jeho správnou funkci (Obrázek 6). Na N-konci se nachází bazická šroubovice-smyčka-šroubovice (bHLH) doména sloužící ke správnému přichycení na DNA a pomáhající s tvorbou dimerů s ARNT. Za touto doménou se nachází centrální PAS doména rozdělená do dvou částí PAS-A a PAS-B každá o velikosti přibližně 50 aminokyselinových zbytků. PAS-B doména je zároveň součástí ligand vázající domény o velikosti 230-421 aminokyselin. PAS doména spolu s bHLH doménou zprostředkovává heterodimerizaci AhR spolu s ARNT. C-konec je oblast bohatá na glutaminová rezidua, zároveň se zde nachází transaktivační doména zodpovědná za transkripční aktivitu AhR. Tato oblast je velmi variabilní, což se odráží na rozdílech v molekulové hmotnosti AhR u různých organismů (Stejskalova, Dvorak, a Pavek 2011; Busbee et al. 2013).



Obrázek 6 **Struktura AhR.** Na N-konci se nachází bHLH doména umožňující vazbu AhR na DNA. Následuje centrální PAS doména rozdělena na PAS-A a PAS-B doménu, PAS-B doména zodpovídá za navázání ligandu na AhR. PAS doména spolu s bHLH doménou zprostředkovávají heterodimerizaci AhR s ARNT. Na C-konci se nachází oblast bohatá na glutamin a transaktivační doména zodpovědná za transkripční aktivitu AhR.

## 2.2.2. Ligandy AhR

Ligandy interagující s AhR tvoří velkou skupinu sloučenin s rozlišnou chemickou strukturou a vazebnou afinitou v rozmezí  $10^{-12}$ - $10^{-3}$  M (Busbee et al. 2013). Lze je rozdělit dle jejich původu na exogenní a endogenní, syntetického nebo přírodního původu.

Nejlépe charakterizovanými ligandy AhR s vysokou afinitou, jak již bylo zmíněno, jsou toxické, hydrofobní sloučeniny jako PCB, PAH, halogenované dioxiny a jim podobné sloučeniny (Stejskalova, Dvorak, a Pavek 2011), jedná se tedy o exogenní ligandy syntetického původu.

PAH mohou být syntetického ale i přírodního původu, vznikají při tepelném rozkladu organických sloučenin a jejich následné rekombinaci. V přírodě se tomu děje při lesních požárech, vulkanické činnosti a dalších, antropogenně vznikají při spalování fosilních paliv, dřeva, uhelného dehtu, odpadu a při kouření cigaret. PAH mají dvě nebo více kondenzovaných benzenových jader, mezi nejznámější patří naftalen (Obrázek 7, struktura 1), anthracen (2), fenantren (3) nebo benzo[a]pyren (4). Po aktivaci AhR jakožto jeho agonisté, jsou PAH metabolizovány CYP přidáním epoxidové skupiny k jejich struktuře a následné konverzi na dihydrodiol nebo až na diol epoxid, jež hraje hlavní roli v tumorigenezi (Stejskalova, Dvorak, a Pavek 2011).

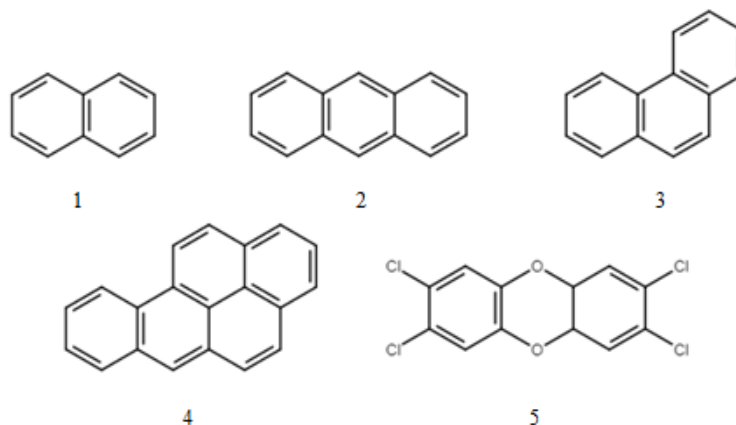
PCB jsou rozmanitou skupinou vzhledem k mnoha kombinacím v počtu a poloze atomů chloru v molekule. Používají se jako oleje v kondenzátorech a transformátorech, jako hydraulické tekutiny nebo jako změkčovadla (Stejskalova, Dvorak, a Pavek 2011). Díky jejich relativní stabilitě a lipofilní povaze jsou široce rozšířeny a transportovány životním prostředím, jejich rezidua byla detekována ve vzduchu, vodě, v lidské adipózní tkáni, séru a mléce (Safe 1993).

Jedním z nejvíce imunotoxických a imunosupresivních ligandů je TCDD (Obrázek 7, struktura 5) halogenovaný aromatický uhlovodík. Díky jeho vysoké vazebné afinitě se stal prototypem pro studium bioaktivity AhR, V dávkách TCDD ng/kg způsobuje up regulaci genů důležitých v metabolismu xenobiotik. V dávkách  $\mu\text{g}/\text{kg}$  up reguluje xenobiotickou odpověď, zároveň ale dochází k projevu jeho toxicity, a to například v podobě hepatotoxicity, vrozených vad, vzniku rakoviny a smrtnosti (Hayes et al. 2007).

Mezi přírodní ligandy AhR se řadí karotenoidy, flavonoidy, stilbeny, indoly a berberin, přijímané v potravě nebo bylinných léčivých přípravcích. Tyto ligandy jsou méně

toxické, ale zároveň vykazují malou schopnost aktivovat AhR (Gradelet et al. 1997; Ciolino, Wang, a Yeh 1998; 1998; Allen et al. 2001).

Endogenní ligandy AhR jsou chemické sloučeniny syntetizované vyššími organismy, lze sem zařadit metabolity aminokyseliny tryptofanu (chovají se jako imunomodulátory po navázání na AhR), bilirubin, biliverdin a hemin jako produkt degradace hemu, prostaglandin PGG2 nebo metabolity kyseliny arachidonové (Stejskalova, Dvorak, a Pavek 2011; Busbee et al. 2013).



Obrázek 7 **Chemické struktury zástupců PAH a TCDD.** Přehled chemických struktur nejznámějších zástupců PAH spolu s TCDD, jež je modelovým ligandem AhR. 1 – naftalen, 2 – anthracen, 3 – fenantren, 4 – benzo[a]pyrene, 5 – TCDD.

### 2.2.3. Signalizační dráha AhR

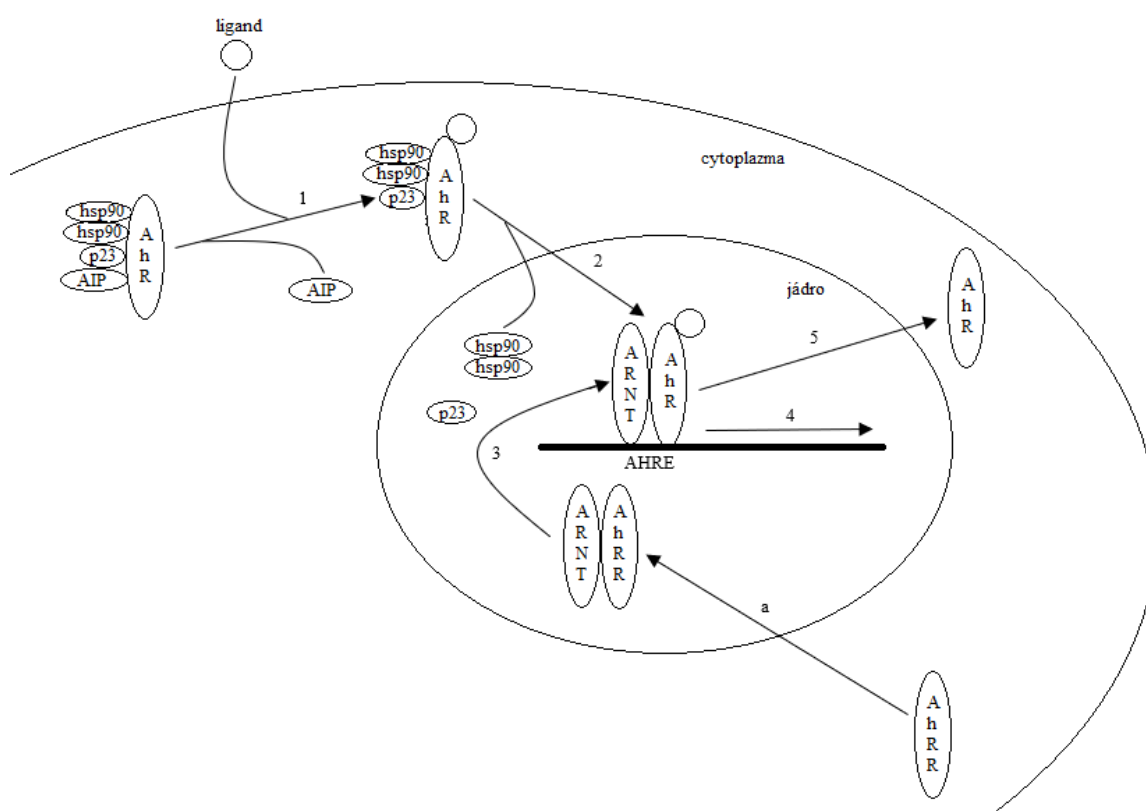
AhR se v klidovém stavu nachází v cytoplasmě jako multiproteinový komplex sestávající ze dvou molekul hsp90 (heat shock protein 90 kDa), XAP2 (X-associated protein 2, synonymem jsou ARA9 (aryl hydrocarbon receptor-associated protein), nebo AIP (aryl hydrocarbon receptor-interacting protein)) (Evans et al. 2008) a kochaperonu proteinu p23 (Obrázek 8). Tento chaperonový komplex udržuje receptor v inaktivním stavu, ale s vysokou afinitou pro navázání ligandu, taktéž chrání receptor před degradací proteazomem. Přesněji AIP udržuje receptor správně složený, stabilizuje jeho pozici v cytoplasmě díky inhibici interakce s importinem- $\beta$  (zprostředkovává přenos proteinu do jádra) a stabilizuje celý chaperonový komplex přímou interakcí s hsp90. Protein p23 chrání komplex před ubiquitinizací a následnou degradací proteazomem a taktéž stabilizuje lokalizaci AhR v cytoplasmě (Rothhammer a Quintana 2019; Tarnow, Tralau, a Luch 2019).

Po difúzi ligandu přes buněčnou membránu dochází k jeho navázání na komplex AhR. Navázáním ligandu dochází k disociaci AIP a tím k vystavení na povrch N-konce s jadernou



lokalizační sekvencí, díky níž je celý komplex translokován do jádra pomocí transportinu a importinu- $\beta$  (Rothhammer a Quintana 2019). V jádře dochází k heterodimerizaci s ARNT, což urychluje rozpad původního multiproteinového komplexu. Nově vzniklý ligand-AhR-ARNT komplex se následně váže do regulačních oblastí DNA označovaných jako AHRE (aromatic hydrocarbon response element) nebo XRE, DRE (xenobiotic/dioxin response element), jež jsou charakterizovány sekvencí 5'-GCGTG-3' (Nebert et al. 2000), čímž dochází k transkripci genů aktivovaných AhR (především genů pro XME – CYP1A1). Transkripce je ukončena disociací komplexu ligand-AhR-ARNT z DNA, translokací AhR zpět do cytoplazmy a následnou proteazomovou degradací pomocí ubiquitinu (Denison et al. 2011).

Jako represor transkripce je v buňce přítomen AhR represor (AhRR), který je neustále translokován do jádra, kde tvoří heterodimery s ARNT. Heterodimer AhRR/ARNT taktéž rozpoznává AHRE, váže se do nich, ale není aktivní, a tak zabraňuje navázání aktivního ligand-AhR-ARNT komplexu a následné transkripci. AhRR působí jako negativní regulátor AhR, soutěží s ARNT o tvorbu heterodimeru s AhR. AhR a AhRR tvoří zpětnovazebnou regulační smyčku (Mimura a Fujii-Kuriyama 2003; Denison et al. 2011).



Obrázek 8 **Signalizační dráha AhR.** 1 – Dochází k navázání ligandu na multiproteinový komplex AhR za současné disociace AIP; 2 – komplex je translokován do jádra; 3 – AhR tvoří heterodimer s ARNT za současné disociace proteinů z původního komplexu a nasedá na AHRE; 4 – transkripce genů; 5 – translokace AhR zpět do cytoplazmy a následná proteazomová degradace; a – AhRR je neustále translokován do jádra dle potřeby.

### 3. Materiál a metody

#### 3.1. Biologický materiál

K testování byla použita stabilně transfekovaná buněčná linie AZ-AhR odvozená od buněk lidského hepatocelulárního karcinomu (HepG2 buněčná linie). HepG2 buňky byly transfekovány plazmidem s několika vazebnými místy pro AhR a reportérovým genem pro luciferasu (Novotná et al., 2011).

#### 3.2. Chemikálie a roztoky

- 0,25% trypsin-EDTA (Biosera, LM-T1720)
- 2,3,7,8-tetrachlordibenzodioxin (TCDD) (LGC Standards)
- 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid (MTT) (Sigma-Aldrich, M2128)
- 4-hydroxybenzaldehyd (HBA) (Chem Cruz, SC-256775)
- 4-vinylguajakol (2-methoxy-4-vinylfenol; VG) (Chem Cruz, SC-265760)
- beta-karyofylen (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid;  $\beta$ -KF) (Sigma-Aldrich, 22075)
- Deionizovaná voda (dH<sub>2</sub>O)
- Dimethylsulfoxid (DMSO) (Lach-Ner, 20022-CT0)
- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Sigma-Aldrich, D6546) (s přidavkem 5 ml neesenciálních aminokyselin (Sigma-Aldrich, M7145), 5 ml L-glutaminu (SERANA, RGL-001) a 50 ml fetálního bovinního séra (Sigma-Aldrich, F7524))
- Ethanol (BC Chemservis, 28220210)
- Fosfátový pufr (PBS) (Biosera, LM-S2041)
- Hygromycin B (50 mg/ml) (Santa Cruz, SC-29067)
- Kreosol (2-methoxy-4-methylfenol; KRE) (Santa Cruz, SC-238110)
- Kumaran (2,3-dihydro-1-benzofuran; KUM) (Sigma-Aldrich, 183962)
- Kyselina homovanilinová ((4-hydroxy-3-methoxyfenyl)ethanová kyselina; HVK) (Santa Cruz, SC-204002)
- Lyzační pufr (Promega, E397A)

- Mequinol (4-methoxyfenol; MEQ) (Sigma-Aldrich, M18655)
- Methyl kreosol (2-ethoxy-4-methylfenol; MKRE) (Chem Cruz, SC-265671)
- Methylcinnamát (methyl(E)-3-fenylprop-2-enoát; MC) (Chem Cruz, M294790)
- Methyleugenol (1,2-dimethoxy-4-(prop-2-en-1-yl)benzen; ME) (Sigma-Aldrich, 04607)
- Substrát pro luciferázu (5 mg D-Luciferinu (Sigma-Aldrich, L9504), 10 mg adenosin-5' trifosfátu (ATP) (Sigma-Aldrich, A9062), 5 mg koenzymu A (Sigma-Aldrich, C4780), 168 mg dithiothreitol (DTT) (Sigma-Aldrich, 43819), 1,32 ml trisacetátu (Sigma-Aldrich, T8280), 1,23 mg/6,6  $\mu\text{l}$  0,5  $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  kyseliny ethylendiamintetraoctové (EDTA) (Sigma-Aldrich, E6511), 3,03 mg/1,23 ml 100  $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  heptahydrátu síranu hořečnatého ( $\text{MgSO}_4$ ) (Sigma-Aldrich, M5921), doplněno do 30 ml  $\text{dH}_2\text{O}$ )
- Triton X-100 (Serva, 37 240)
- Trypanová modř (0,4% Trypan blue v PBS) (Sigma-Aldrich, T6146)

### 3.3. Laboratorní pomůcky

- Automatické pipety o rozsahu 0,1-2,5  $\mu\text{l}$ , 2-20  $\mu\text{l}$ , 10-100  $\mu\text{l}$ , 100-1000  $\mu\text{l}$  (Eppendorf)
- Bílé 96 jamkové destičky (NUNC)
- Bürkerova komůrka (Assistent)
- Kultivační 96 jamkové destičky (TPP)
- Kultivační lahve 25 a 75  $\text{cm}^2$  (TPP)
- Mikrozkušavky o objemu 0,5 a 1,5 ml (TPP)
- Multikanálové pipety o rozsahu 0,5-10  $\mu\text{l}$ , 10-100  $\mu\text{l}$ , 30-300  $\mu\text{l}$  (Eppendorf)
- Petriho misky 60 a 100 mm (TPP)
- Plastové špičky o rozsahu 0,1-10  $\mu\text{l}$ , 10-100  $\mu\text{l}$ , 100-1000  $\mu\text{l}$  (Eppendorf)
- Plastové zkumavky o objemu 15 a 50 ml (TPP. SPL)
- Sérologické pipety o objemu 2, 5, 10, 25 ml (TPP)

### **3.4. Laboratorní přístroje**

- Analytické váhy ABS 80-4 (Kern)
- CO<sub>2</sub> inkubátor NB-203XL (N-BIOTEK)
- Laminární flowbox Class II Type A2 (ESCO)
- Mikroskop inverzní IMT-2 (Olympus)
- Odsávačka FTA-1 (Biosan)
- Spektrofotometr Infinite M200 (Tecan)
- Třepačka Mini-Rocker Shaker MR-1 (Biosan)
- Vodní lázeň LCB-11D (Labtech)
- Vortex Relax top D-91126 (Heidolph)

### **3.5. Metodika**

#### **3.5.1. Příprava a kultivace buněk**

Mikrozkumavka s alikvotem buněk byla vytažena z tekutého dusíku a opatrně otevřena v laminárním boxu. Po otevření byla opět uzavřena a na dvě minuty ponořena do vodní lázně o teplotě 37 °C tak, aby se do uzávěru nedostala voda.

V laminárním boxu bylo přeneseno 5 ml média do malé kultivační láhve. Z těchto 5 ml byl 1 ml přenesen do mikrozkumavky se suspenzí buněk. Objem byl v mikrozkumavce promíchán a následně celý přenesen zpět do kultivační láhve.

Buňky byly kultivovány v inkubátoru při 37 °C a 5% obsahu oxidu uhličitého do dalšího pasážování.

#### **3.5.2. Pasážování buněk**

Před samotným pasážováním bylo médium společně s PBS ohřáto ve vodní lázni nastavené na 37 °C, trypsin byl ponechán při laboratorní teplotě, dokud neroztál. Pod mikroskopem byl zkontrolován nárůst buněk, jejich adherence, případně bakteriální kontaminace.

Kultivační láhev byla přenesena z inkubátoru do laminárního boxu, staré médium bylo odsáto. Následně bylo do láhve pipetováno 5 ml PBS, buňky byly promyty, PBS odsáto. Na buňky byl aplikován 1 ml trypsinu, láhev byla vložena do inkubátoru na 4-5 minut.

Po vytažení lahve z inkubátoru byly buňky poklepem uvolněny z povrchu. Do láhve bylo napipetováno 8 ml média pro zastavení působení trypsinu. Suspenze byla propipetována, aby v ní nebyly přítomny žádné shluky buněk. Podle koncentrace buněk v jednom mililitru byl v lahvi ponechán 1,5 – 4 ml suspenze buněk, tento objem byl vždy doplněn médiem na konečný objem 16 ml. Láhev byla umístěna zpět do inkubátoru.

Pasážování probíhalo co dva, popřípadě co tři dny. Po třech pasážích byla vždy vyměněna kultivační lahev. Při pasážování na víkend bylo do lahve přidáno 60  $\mu$ l hygromycinu.

### **3.5.3. Počítání buněk a vyšetí na 96 jamkovou destičku**

Ze suspenze buněk při pasážování bylo odebráno a přeneseno 10  $\mu$ l do mikrozkušavky. Mimo laminární box bylo k suspenzi přidáno 90  $\mu$ l trypanové modře, dobře promícháno. Do každé jamky Bürkerovy počítací komůrky bylo napipetováno 10  $\mu$ l obarvené suspenze. Následně byly spočítány buňky v 10 čtvercích (čtverec o ploše 1 mm<sup>2</sup>), průměrný počet na jeden čtverec byl vynásoben faktorem 10<sup>5</sup>, čímž byl vypočítán počet buněk v 1 ml suspenze.

Dle vypočtené koncentrace buněk v 1 ml byla připravena suspenze (přidáním média podle potřeby) k aplikaci na 96 jamkovou destičku tak, aby v každé jamce bylo 100  $\mu$ l suspenze s 25 000 buněk. Vyšetá destička byla umístěna do inkubátoru na 24 hodin.

### **3.5.4. Příprava a aplikace testovaných látek pro MTT assay**

Testované látky byly vytemperovány na laboratorní teplotu a následně promíchány na vortexu. Médium bylo ohřáto ve vodní lázni o teplotě 37 °C.

V laminárním boxu byly testované látky ve všech použitých koncentracích ředěny 1000x na finální koncentrace 1, 10, 100  $\mu$ g/ml (350  $\mu$ l média a 0,35  $\mu$ l testované látky dané koncentrace), taktéž ethanol (negativní kontrola) byl ředěn 1000x, Triton X-100 (pozitivní kontrola) byl ředěn na finální 1% roztok. Obsahy všech mikrozkušavek byly důkladně promíchány na vortexu.

Destička byla vytažena z inkubátoru, bylo nutné zkontrolovat pod mikroskopem, zdali jsou buňky adherované. Staré médium bylo z jednotlivých jamek odsáto a nahrazeno připravenými roztoky látek. Každá koncentrace každé látky byla aplikována v tripletu, mezi

jednotlivými látkami byla vynechána řada, aby nedošlo ke kontaminaci v případě těkavosti testovaných látek.

Destička s aplikovanými testovanými látkami byla umístěna do inkubátoru na 24 hodin.

### **3.5.5. MTT assay**

Roztok MTT (3 mg/ml) byl rozmražen ponořením do vodní lázně o teplotě 37 °C. Následně byl 10x naředěn v PBS, dobře promíchán.

Destička byla vytažena z inkubátoru, staré médium s testovanými látkami bylo opatrně vyklepnuto, aby nedošlo ke kontaminaci. Do jamek, kde se nacházely testované látky bylo pipetováno 100 µl naředěného MTT. Destička byla umístěna zpět do inkubátoru na dobu nejméně 30 minut (dokud nevzniklo modro fialové zbarvení v jamkách – vznik krystalů formazanu). Poté byl roztok MTT vyklepnut a do jamek bylo pipetováno 100 µl DMSO. Destička byla opatrně protřepána v rukách, aby došlo k rozpuštění vzniklých krystalů.

Následně byla měřena absorbance při 570 nm, která byla přepočtena na životaschopnost buněk v porovnání s ethanolem – negativní kontrolou.

### **3.5.6. Příprava a aplikace testovaných látek pro Reporter Gene Assay**

Příprava látek byla obdobná jako pro MTT assay, objem média byl navýšen na 900 µl, testovaných látek bylo pipetováno 0,9 µl, ředění 1000x na finální koncentrace 1, 10, 50, 100 µg/ml bylo zachováno. Jako negativní kontrola sloužil ethanol, jako pozitivní kontrola TCDD (5 nM), obě dvě kontroly byly taktéž ředěny 1000x.

Připravené roztoky testovaných látek byly pipetovány ve čtyřech opakováních pro jednotlivé koncentrace taktéž s vynechanými řadami mezi jednotlivými látkami. Takto byly připraveny jednotlivé destičky pro 4 a 24 hodinovou inkubaci.

### **3.5.7. Reporter Gene Assay**

Po 4 hodinách inkubace bylo z destičky vyklepnuto médium s látkami, napipetováno 25  $\mu\text{l}$  lyzačního reportérového pufru (5x ředěn v  $\text{dH}_2\text{O}$ ) a destička byla umístěna do  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  na dobu nejméně 30 minut.

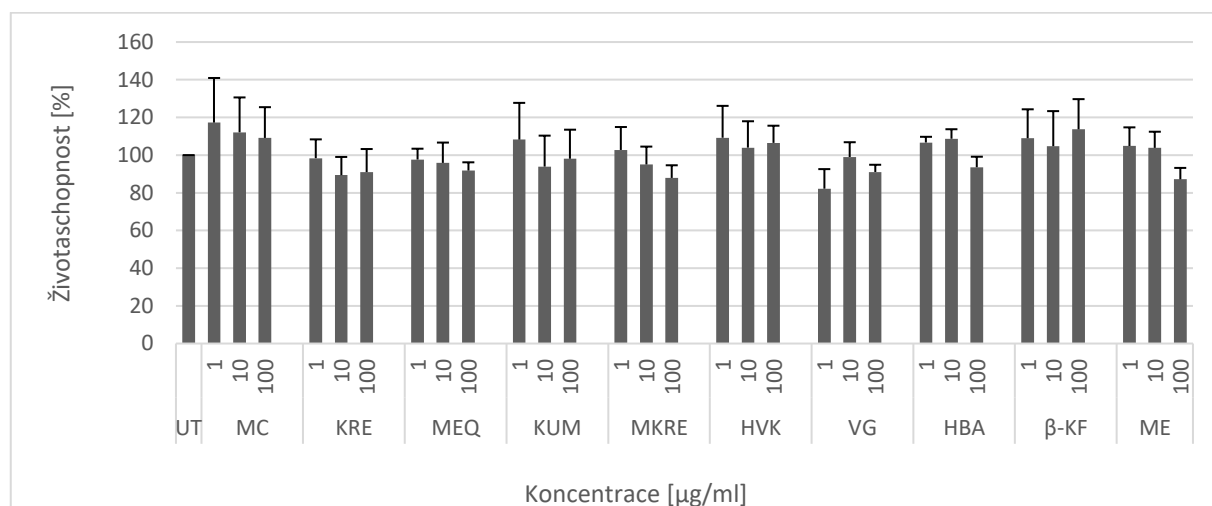
Po uplynutí inkubační doby byla destička ponechána při laboratorní teplotě, dokud neroztál lyzovaný obsah. Následně bylo přeneseno 5  $\mu\text{l}$  lyzátu do bílé 96 jamkové destičky, ke kterým bylo připipetováno 30  $\mu\text{l}$  substrátu pro měření luciferázové aktivity. Obsah destičky byl promíchán poklepem destičky o ruku a ihned byla měřena luminiscence.

## 4. Výsledky

### 4.1. Viabilita buněčné linie AZ-AhR

Ke stanovení viability AZ-AhR buněk, cytotoxicity testovaných látek, byla použita MTT esej. Buňky byly s testovanými látkami o koncentracích 1, 10, 100  $\mu\text{g/ml}$  inkubovány 24 hodin. Jako negativní kontrola byl použit ethanol, jako pozitivní kontrola Triton-X100.

U žádné z testovaných látek v rozsahu použitých koncentrací nebyl zaznamenán výraznější pokles viability (Graf 1). Největší pokles viability zhruba o 20 % vůči negativní kontrole byl pozorován u VG 1  $\mu\text{g/ml}$ . Tento pokles však nebyl vyhodnocen jako statisticky významný a vyšší koncentrace neměly žádný další vliv. Všechny testované látky v rozsahu použitých koncentrací byly následně testovány pomocí Reporter Gene Assay.



**Graf 1 Viabilita AZ-AhR buněčné linie po 24 hodinové inkubaci s testovanými látkami v koncentracích 1, 10, 100  $\mu\text{g/ml}$ .** Životaschopnost byla měřena pomocí MTT esej. Výsledné hodnoty  $\pm$  směrodatná odchylka, vztaženy k negativní kontrole (UT – ethanolu) jsou získány z pěti nezávislých experimentů po vyloučení nereprezentativních hodnot. MC – methylcinnamát, KRE – kreosol, MEQ – mequinol, KUM – kumaran, MKRE – methyl kreosol, HVK – kyselina homovanilinová, VG – 4-vinylguajakol, HBA – 4-hydroxybenzaldehyd,  $\beta$ -KF – beta-karyofylen, ME – methyleugenol.

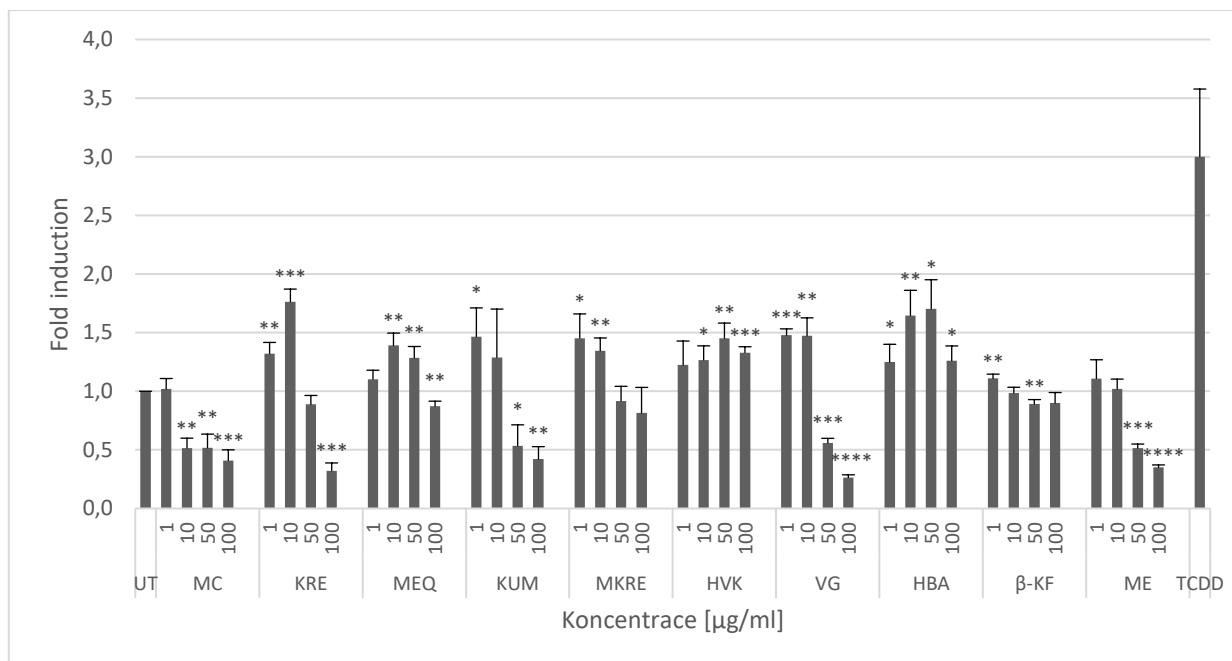


## 4.2. Transkripční aktivita AhR

Transkripční aktivita AhR byla měřena pomocí Reporter Gene Assay po 4 a 24 hodinové inkubaci buněk AZ-AhR s testovanými látkami. Jako negativní kontrola byl použit ethanol, jako pozitivní kontrola TCDD. Nárůst měřené luminiscence byl přepočítán na fold induction neboli násobek negativní kontroly.

AhR-závislá luciferázová aktivita po 4 hodinové inkubaci byla měřena pro lepší zachycení počátku transkripce, jelikož 24 hodin je poměrně dlouhá doba a aktivace receptoru nemusí být čistě jen díky testovaným látkám, ale v pozdější fázi také díky synergetickému efektu s nedefinovanými látkami přítomnými v médiu. Navíc mohou být testované látky rychle metabolizovány buňkou.

Po 4 hodinové inkubaci byl u KUM, MKRE, VG a ME pozorován koncentračně závislý pokles aktivace AhR (Graf 2). Nejvyšší hodnoty fold induction byly pozorovány u KRE (10  $\mu\text{g/ml}$ ), přesněji 1,8 násobek negativní kontroly. Obdobně vysoká fold induction byla pozorována také u HBA (10, 50  $\mu\text{g/ml}$ ) 1,7. Zhruba 1,5 násobek negativní kontroly byl zjištěn u KUM (1  $\mu\text{g/ml}$ ), MKRE (1  $\mu\text{g/ml}$ ), HVK (50  $\mu\text{g/ml}$ ) a VG (1,10  $\mu\text{g/ml}$ ). Přibližně o čtvrtinu vyšší AhR-závislou luciferázovou aktivitu oproti negativní kontrole vykazují KRE (1  $\mu\text{g/ml}$ ), MEQ (10, 50  $\mu\text{g/ml}$ ), KUM (10  $\mu\text{g/ml}$ ), MKRE (10  $\mu\text{g/ml}$ ), HVK (1, 10, 50  $\mu\text{g/ml}$ ) a HBA (1, 100  $\mu\text{g/ml}$ ). U zbývajících koncentrací nebyla hodnota fold induction vyšší než 1,2.

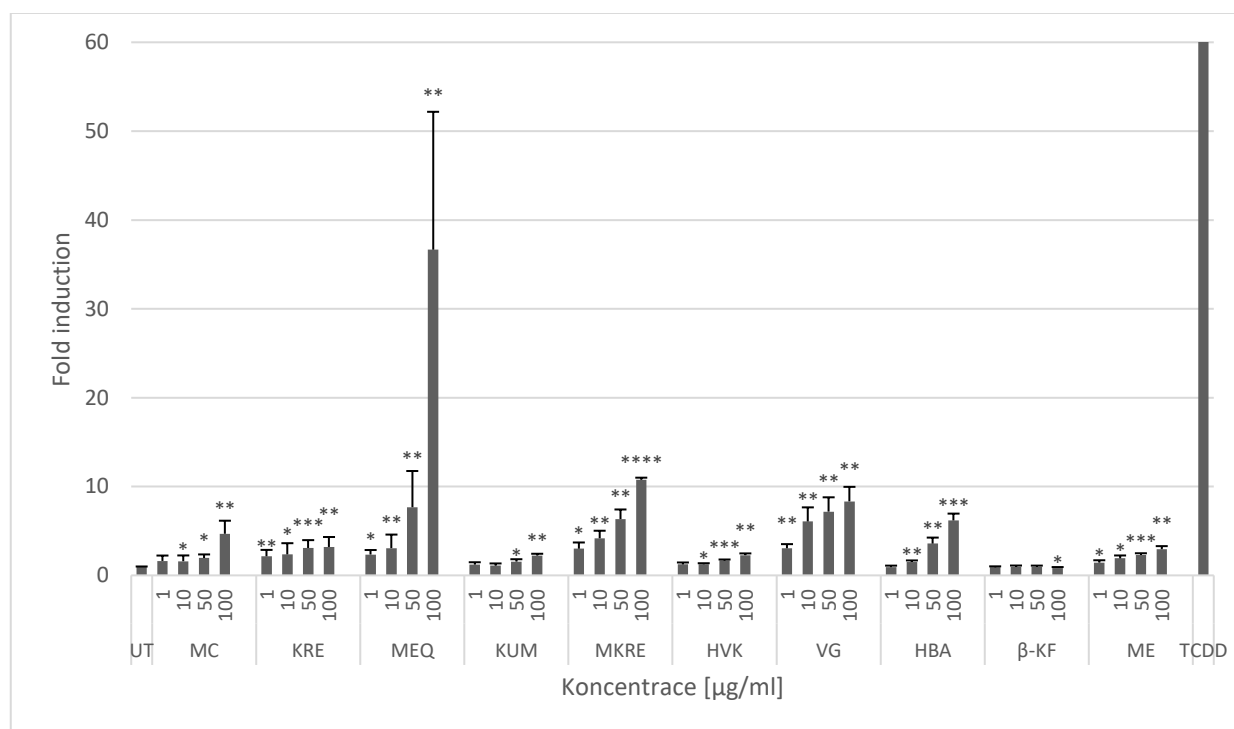


**Graf 2** Transkripční aktivita AhR po 4 hodinové inkubaci s testovanými látkami o koncentracích 1, 10, 50, 100 µg/ml. Buněčná linie AZ-AhR byla inkubována s testovanými látkami po dobu 4 hodin, následně byla měřena transkripční aktivita pomocí Reporter Gene Assay. Hodnoty jsou vyjádřeny pomocí fold induction, neboli násobky negativní kontroly (ethanol) ± směrodatná odchylka z pěti respektive sedmi (MC, KRE, MEQ) experimentů. Jako pozitivní kontrola byl použit TCDD (5nM). Statisticky významné hodnoty označeny \* ( $p < 0,05$  - \*,  $p < 0,01$  - \*\*,  $p < 0,001$  - \*\*\*,  $p < 0,0001$  - \*\*\*\*), vyhodnoceny pomocí párové t-testu. MC – methylcinnamát, KRE – kreosol, MEQ – mequinol, KUM – kumaran, MKRE – methyl kreosol, HVK – kyselina homovanilinová, VG – 4-vinylguajakol, HBA – 4-hydroxybenzaldehyd, β-KF – beta-karyofylen, ME – methyleugenol.

Při 24 hodinové inkubaci byl zaznamenán výrazný nárůst fold induction cca 40 krát u MEQ pro 100 µg/ml. Fold induction pro MC byl koncentračně zvýšen oproti negativní kontrole až na hodnotu 5 krát pro 100 µg/ml. V rozmezí testovaných koncentrací došlo u KRE k nárůstu fold induction na více než trojnásobek negativní hodnoty pro 100 µg/ml. Téměř identické hodnoty fold induction byly pozorovány u KUM a HVK, přičemž nejvyšší hodnoty byly přibližně 2 krát zvýšeny oproti negativní kontrole pro 100 µg/ml. U ME byly hodnoty fold induction podobné jako u předešlých dvou látek, pro 100 µg/ml dosahovaly necelého trojnásobku negativní kontroly. Obdobně navzájem podobné hodnoty fold induction byly pozorovány u MKRE a VG, pro 100 µg/ml u MKRE byl fold induction 10 krát, u VG 8 krát zvýšen oproti negativní kontrole. U HBA lze pozorovat nárůst fold induction od nejnižší koncentrace k více než šestinásobnému nárůstu hodnoty fold induction pro 100 µg/ml. β-KF ani v jedné z testovaných koncentrací (1, 10, 50, 100 µg/ml) nebyl schopen aktivovat AhR, všechny hodnoty fold induction byly přibližně o 5-15 % nižší než u negativní kontroly. Pro ověření funkčnosti systému byl použit TCDD (5 nM) jako pozitivní kontrola, jehož hodnoty fold induction byly 1000 krát vyšší než negativní kontrola.

Koncentračně závislá fold induction byla pozorována u čtyř z deseti testovaných látek, a to u MEQ, MKRE, VG a HBA (Graf 3). Na základě naměřených výsledků po 24 hodinové inkubaci lze předběžně těmto čtyřem látkám přisuzovat schopnost aktivovat AhR v agonistickém módu.

U vybraných látek a příslušných koncentracích byla pozorována vyšší hodnota fold induction po 4 hodinové inkubaci než po 24 hodinové. Přesněji u KUM, kdy byly hodnoty po 4 hodinové inkubaci pro 1 µg/ml 1,5 a pro 10 µg/ml 1,3, po 24 hodinové pak pro 1 µg/ml 1,2 a pro 10 µg/ml 1,1. Obdobně tomu bylo i u HBA (1, 10 µg/ml), po 4 hodinové inkubaci byly hodnoty fold induction 1,3 a 1,7, po 24 hodinové klesly na 0,9 a 1,5. U ostatních látek a koncentrací byly hodnoty fold induction vyšší po 24 hodinové inkubaci. Koncentračně závislý pokles hodnot fold induction při 4 hodinové inkubaci (Graf 2) a naopak koncentračně závislý nárůst hodnot při 24 hodinové inkubaci (Graf 3) byl pozorován pro KUM, MKRE, VG a ME. Z této skutečnosti lze tyto látky považovat za částečné (parciální) agonisty.



**Graf 3** Transkripční aktivita AhR po 24 hodinové inkubaci s testovanými látkami o koncentracích 1, 10, 50, 100 µg/ml. Buněčná linie AZ-AhR byla inkubována s testovanými látkami po dobu 24 hodin, následně byla měřena transkripční aktivita pomocí Reporter Gene Assay. Hodnoty jsou vyjádřeny pomocí fold induction, neboli násobky negativní kontroly (ethanol) ± směrodatná odchylka z pěti respektive sedmi (MC, KRE, MEQ) experimentů. Jako pozitivní kontrola byl použit TCDD (5 nM). Statisticky významné hodnoty označeny \* ( $p < 0,05$  - \*,  $p < 0,01$  - \*\*,  $p < 0,001$  - \*\*\*,  $p < 0,0001$  - \*\*\*\*), vyhodnoceny pomocí párové t-testu. MC – methylcinnamát, KRE – kreosol, MEQ – mequinol, KUM – kumaran, MKRE – methyl kreosol, HVK – kyselina homovanilinová, VG – 4-vinylguajakol, HBA – 4-hydroxybenzaldehyd, β-KF – beta-karyofylen, ME – methyleugenol.

## 5. Diskuse

V této práci byla zjišťována schopnost deseti minoritních látek z EO z vanilky a z hřebíčku aktivovat AhR. Z minoritních látek z EO z vanilky byly vybrány methyl-cinnamát (MC), kresol (CRE), mequinol (MEQ), kumaran (KUM), methyl kresol (MKRE), kyselina homovanilinová (HVK), 4-vinylguajakol (VG) a 4-hydroxybenzaldehyd (HBA), z hřebíčku pak beta-karyofylen ( $\beta$ -KF) a methyleugenol (ME). Nejdříve byla stanovována cytotoxicita testovaných látek (v koncentracích 1, 10, 100  $\mu\text{g/ml}$ ) pomocí MTT eseje, následně byla zjišťována samotná schopnost testovaných látek (v koncentracích 1, 10, 50, 100  $\mu\text{g/ml}$ ) aktivovat AhR pomocí Reporter Gene Assay na stabilně transfekované buněčné linii AZ-AhR odvozené od hepatocelulárního karcinomu.

Žádná z testovaných látek v rozsahu použitých koncentrací nepůsobila natolik toxicky, aby nemohla být testována dále. Nejvyšší pokles viability, cca o 20 %, byl pozorován u VG 1  $\mu\text{g/ml}$ , tento pokles však nebyl vyhodnocen jako statisticky významný.

Nejvyšší nárůst fold induction (násobek negativní kontroly) cca 40 krát byl zaznamenán u MEQ (100  $\mu\text{g/ml}$ ) za 24 h. Desetinásobek negativní kontroly byl pozorován u MKRE (100  $\mu\text{g/ml}$ ), osminásobek u MEQ (50  $\mu\text{g/ml}$ ) a VG (100  $\mu\text{g/ml}$ ) a šestinásobek u MKRE (50  $\mu\text{g/ml}$ ), VG (10, 50  $\mu\text{g/ml}$ ) a HBA (100  $\mu\text{g/ml}$ ). U ostatních testovaných koncentrací se hodnoty fold induction pohybovaly v rozmezí od 0,9 do cca 4,5. Koncentračně závislý nárůst fold induction byl pozorován u MEQ, MKRE, VG a HBA. Těmto látkám lze momentálně přisuzovat schopnost aktivovat AhR v agonistickém módu.

Látky testované v mé práci se objevují ve studiích zaměřujících se na různé terapeutické využití. Například KUM vykazoval antileismaniózovou aktivitu vůči makrofágům (Santana et al. 2014). Směs 2% MEQ s 0,01% tretinoinem působila jako efektivní léčba na lentigy (Fleischer et al. 2000). VG jsou přisuzovány protizánětlivé účinky (Jeong et al. 2011). HBA spolu s vanilinem jsou potenciálně zodpovědní za redukci inzulinové rezistence (Park, Kim, a Kang 2011).  $\beta$ -KF je spojován s pozitivními účinky na osteoartritidu (Rufino et al. 2015), diabetes (Basha a Sankaranarayanan 2014) a další onemocnění. U ME byla naopak v hepatocytech Fischer 344 potkanů a B3C3F<sub>1</sub> myši zjištěna vysoká míra mutageneze (Burkey et al. 2000).

Studie zabývající se přímo schopností aktivovat AhR pomocí zde testovaných látek nebyly nalezeny. Nicméně EO jako celek a jejich majoritní složky byly podrobeny testování v práci Bartoňkové a Dvořáka (2018).

EO z vanilky byl v této studii shledán silným agonistou AhR, avšak vanilin (11 %) jako jeho hlavní komponenta tuto schopnost nevykazoval. Předpokladem je, že za schopnost aktivovat AhR jsou zodpovědné minoritní složky, nebo jejich směs (Bartoňková a Dvořák 2018). V mé práci, jak již bylo zmíněno výše, vykazoval nejvyšší hodnoty fold induction MEQ (100 µg/ml) cca 40, oproti pozorovanému 90 násobku EO (250 µg/ml) ve studii, je tento nárůst méně než poloviční, na schopnosti aktivovat AhR může mít MEQ velký podíl, ale nejspíše nebude jedinou složkou oleje podílející se na aktivaci AhR, i vzhledem k tomu, že v původním oleji činí jeho obsah 0,8% (v/v). U MKRE, VG a HBA byla stejně jako u MEQ pozorována, jak již bylo zmíněno, koncentračně závislá schopnost aktivovat AhR, přičemž nejvyšší hodnoty fold induction dosahovaly 10 násobku. Stejně jako zmíněný MEQ se mohou tyto látky podílet na aktivaci AhR. Je tedy možné, že vzájemná součinnost těchto dílčích komponent EO vyvolává onu silnou aktivaci popisovanou v publikaci (Bartoňková a Dvořák 2018).

EO z hřebíčku byl, taktéž ve studii Bartoňkové a Dvořáka (2018), shledán částečným (parciálním) agonistou AhR, stejně jako jeho hlavní komponenty eugenol a eugenyl acetát. V mé práci byl testován  $\beta$ -KF (pro jeho zajímavou strukturu), jež byl inaktivní při aktivaci AhR, a ME (pro podobnost s ostatními testovanými látkami), který se jeví jako částečný (parciální) agonista AhR, nejvyšší hodnota fold induction odpovídala 3 násobku negativní kontroly. ME může synergicky působit s hlavními komponentami na aktivaci AhR.

AhR je exprimován mimo jiné v kůži, kde hraje důležitou roli ve vývoji a udržování její bariéry, ale také v odpovědi na environmentální podněty včetně vystavení UVB (ultrafialové záření B), toxinům nebo mikrobiálním produktům (Furie et al. 2015). Atopická dermatitida je intenzivní svědivé, chronické, recidivující, zánětlivé onemocnění kůže, způsobené mnoha faktory od genetických a environmentálních faktorů, přes nedostatečnou funkci kožní bariéry až po nevhodnou imunologickou odpověď (Allam, Bieber, a Novak 2005). Tapinarof je přírodní lokální léčivý přípravek, který je účinný při léčbě psoriázy a atopické dermatitidy. Jeho protizánětlivé účinky jsou zprostředkovány aktivací AhR. Současně díky aktivaci AhR snižuje expresi prozánětlivých cytokinů ve stimulovaných CD4<sup>+</sup> T buňkách v periferní krvi a ex vivo lidské kůži a ovlivňuje expresi bariérových genů v primárních lidských keratocytech. AhR byl shledán primárním molekulárním cílem tapinarofu. Mimo schopnost aktivovat AhR, má tapinarof také antioxidační účinky (aktivuje signální dráhu Nrf2 (jaderný erythroidní faktor 2-příbuzný s faktorem 2)). Právě dvojí aktivace AhR/Nrf2 může být klíčem k protizánětlivé aktivitě AhR agonistů, jakými jsou tapinarof a např. extrakt z uhelného dehtu (Smith et al. 2017).

V této práci byli hledáni agonisté AhR právě za účelem potenciálního využití v léčbě kožních onemocnění. Jak bylo dokázáno v práci Smith et al. 2017, aktivace AhR je spojována s protizánětlivými účinky, současně však hledání agonisté nesmí vykazovat dioxinu podobnou toxicitu. K určení, zdali zde testované látky vykazující agonistickou aktivitu a mohly by být případně použity v léčbě kožních onemocnění, je potřeba dalšího testování.

Zde prezentované výsledky musí být brány s rezervou, jelikož byla testována schopnost aktivovat AhR pouze v agonistickém módu. K tvrzení, zda jsou testované látky úplnými, či částečnými (parciálními) agonisty, musí být provedeno ještě testování v antagonistickém módu (za přítomnosti např. TCDD spolu s testovanou látkou), které domněnky potvrdí, nebo naopak vyvrátí. Již nyní lze, díky srovnání 4 a 24 hodinové inkubaci, o KUM, MKRE, VG a ME říci, že jsou částečnými (parciálními) agonisty AhR.

## 6. Závěr

V teoretické části této práce jsou popsány EO obecně – jejich složení, způsoby extrakce z rostlinného materiálu a účinky EO, jakými jsou např. cytotoxické, antioxidační, antimikrobiální a další účinky. Dále byla věnována pozornost EO z vanilky a hřebíčku, jehož jsou testované látky součástí. Následující část je věnována AhR, jeho struktuře, nejvýznamnějším ligandům a také signalizační dráze, která je zapojena do metabolismu xenobiotik, díky expresi enzymů cytochromu P450.

V praktické části byla na stabilně transfekované buněčné linii odvozené od hepatocelulárního karcinomu (AZ-AhR) nejdříve studována cytotoxicita testovaných látek (methylcinnamátu (MC), kresolu (KRE), mequinolu (MEQ), kumaranu (KUM), methyl kresolu (MKRE), kyseliny homovanilinové (HVK), 4-vinylguajakolu (VG), 4-hydroxybenzaldehydu (HBA), beta-karyofylenu ( $\beta$ -KF) a methyleugenolu (ME)) pomocí MTT eseje v koncentracích 1, 10, 100  $\mu\text{g/ml}$ . Nejvyšší pokles viability byl zaznamenán u VG 1  $\mu\text{g/ml}$ , přibližně o 20 %. Tento pokles však nebyl vyhodnocen jako statisticky významný. Následně byla sledována schopnost testovaných látek aktivovat AhR pomocí Reporter Gene Assay v koncentracích 1, 10, 50, 100  $\mu\text{g/ml}$ . Transkripční aktivita byla vyjádřena pomocí fold induction neboli násobku negativní kontroly (ethanolu; jako pozitivní kontrola byl použit TCDD (5 nM)). Nárůst fold induction cca 40 krát byl pozorován u MEQ 100  $\mu\text{g/ml}$ , kdežto u TCDD byl pozorován nárůst 1000 krát. U dalších testovaných látek se hodnoty fold induction pohybovaly v intervalu od 1 do 10. Koncentračně závislý nárůst fold induction byl pozorován u MEQ, MKRE, VG a HBA, z čehož lze těmto čtyřem látkám přisuzovat schopnost aktivovat AhR v agonistickém módu.

K potvrzení, zda jsou tyto látky úplnými, či částečnými (parciálními) agonisty, je nutno dalšího testování.

## 7. Použitá literatura

- Adorjan, Barbara, a Gerhard Buchbauer. 2010. „Biological Properties of Essential Oils: An Updated Review". *Flavour and Fragrance Journal* 25 (6): 407–26. <https://doi.org/10.1002/ffj.2024>.
- Aggarwal, Bharat B., a Shishir Shishodia. 2006. „Molecular Targets of Dietary Agents for Prevention and Therapy of Cancer". *Biochemical Pharmacology* 71 (10): 1397–1421. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2006.02.009>.
- Aida, Takashi, Kenji Maruyama, a Hiroyuki Matsuda. 2017. Fragrance composition. United States US9834739B2, filed 15. leden 2015, a issued 5. prosinec 2017. <https://patents.google.com/patent/US9834739B2/en#patentCitations>.
- Allam, J.-P., T. Bieber, a N. Novak. 2005. „Recent Highlights in the Pathophysiology of Atopic Eczema". *International Archives of Allergy and Immunology* 136 (2): 191–97. <https://doi.org/10.1159/000083893>.
- Allen, Scott W., Lisa Mueller, Susanne N. Williams, Linda C. Quattrochi, a Judy Raucy. 2001. „The Use of a High-Volume Screening Procedure to Assess the Effects of Dietary Flavonoids on Human CYP1A1 Expression". *Drug Metabolism and Disposition* 29 (8): 1074–79.
- Amorati, Riccardo, Mario C. Foti, a Luca Valgimigli. 2013. „Antioxidant Activity of Essential Oils". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61 (46): 10835–47. <https://doi.org/10.1021/jf403496k>.
- Areias, Filipe, Patrícia Valentão, Paula B. Andrade, Federico Ferreres, a Rosa M. Seabra. 2000. „Flavonoids and Phenolic Acids of Sage: Influence of Some Agricultural Factors". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48 (12): 6081–84. <https://doi.org/10.1021/jf000440+>.
- Babu, Kiran G. D., a V. K. Kaul. 2005. „Variation in Essential Oil Composition of Rose-Scented Geranium (*Pelargonium* Sp.) Distilled by Different Distillation Techniques". *Flavour and Fragrance Journal* 20 (2): 222–31. <https://doi.org/10.1002/ffj.1414>.
- Bahi, Amine, Shamma Al Mansouri, Elyazia Al Memari, Mouza Al Ameri, Syed M Nurulain, a Shreesh Ojha. 2014. „ $\beta$ -Caryophyllene, a CB2 Receptor Agonist Produces Multiple Behavioral Changes Relevant to Anxiety and Depression in Mice". *Physiology & Behavior* 135 (srpen): 119–24. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2014.06.003>.
- Bakkali, F., S. Averbeck, D. Averbeck, a M. Idaomar. 2008. „Biological Effects of Essential Oils – A Review". *Food and Chemical Toxicology* 46 (2): 446–75. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>.
- Bartoňková, Iveta, a Zdeněk Dvořák. 2018. „Essential Oils of Culinary Herbs and Spices Display Agonist and Antagonist Activities at Human Aryl Hydrocarbon Receptor AhR". *Food and Chemical Toxicology* 111 (leden): 374–84. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.11.049>.
- Baser, K.H.C., a G. Buchbauer. 2016. *Handbook of essential oils: science, technology, and applications*. Second edition. Boca Raton: CRC Press.
- Baser, K.H.C., a Demirci Fatih. 2007. „Chemistry of Essential Oils". In *Flavours and Fragrances : Chemistry, Bioprocessing and Sustainability*. Berlin: Springer.
- Basha, Rafeek Hidayath, a Chandrasekaran Sankaranarayanan. 2014. „ $\beta$ -Caryophyllene, a Natural Sesquiterpene, Modulates Carbohydrate Metabolism in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats". *Acta Histochemica* 116 (8): 1469–79. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2014.10.001>.



- Bhatia, S. P., G. A. Wellington, J. Cocchiara, J. Lalko, C. S. Letizia, a A. M. Api. 2007. „Fragrance Material Review on Methyl Cinnamate". *Food and Chemical Toxicology*, Toxicologic and Dermatologic Assessments for Three Groups of Fragrance Ingredients: 1) Related Esters and Alcohols of Cinnamic Acid and Cinnamic Alcohol 2) Ionones 3) Salicylates, 45 (1, Supplement 1): S113–19. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.077>.
- Burkey, Jennifer Lewis, John-Michael Sauer, Charlene A McQueen, a I Glenn Sipes. 2000. „Cytotoxicity and Genotoxicity of Methyleugenol and Related Congeners — a Mechanism of Activation for Methyleugenol". *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 453 (1): 25–33. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(00\)00070-1](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(00)00070-1).
- Burnie, Geoff. 2007. *Botanika: ilustrovaný abecední atlas 10 000 zahradních rostlin s návodem, jak je pěstovat*. Praha: Slovart.
- Busbee, Philip B., Michael Rouse, Mitzi Nagarkatti, a Prakash S. Nagarkatti. 2013. „Use of Natural AhR Ligands as Potential Therapeutic Modalities against Inflammatory Disorders". *Nutrition Reviews* 71 (6): 353–69. <https://doi.org/10.1111/nure.12024>.
- Calleja, Miguel Angel, Jose María Vieites, Trinidad Montero-Meterdez, María Isabel Torres, María José Faus, Angel Gil, a Antonio Suárez. 2013. „The Antioxidant Effect of  $\beta$ -Caryophyllene Protects Rat Liver from Carbon Tetrachloride-Induced Fibrosis by Inhibiting Hepatic Stellate Cell Activation". *British Journal of Nutrition* 109 (3): 394–401. <https://doi.org/10.1017/S0007114512001298>.
- Carson, Christine F., Brian J. Mee, a Thomas V. Riley. 2002. „Mechanism of Action of Melaleuca Alternifolia (Tea Tree) Oil on Staphylococcus Aureus Determined by Time-Kill, Lysis, Leakage, and Salt Tolerance Assays and Electron Microscopy". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46 (6): 1914–20. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.6.1914-1920.2002>.
- Ciolino, Henry P., Thomas T. Y. Wang, a Grace Chao Yeh. 1998. „Diosmin and Diosmetin Are Agonists of the Aryl Hydrocarbon Receptor That Differentially Affect Cytochrome P450 1A1 Activity". *Cancer Research* 58 (13): 2754–60.
- Cortés-Rojas, Diego Francisco, Claudia Regina Fernandes de Souza, a Wanderley Pereira Oliveira. 2014. „Clove (*Syzygium Aromaticum*): A Precious Spice". *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 4 (2): 90–96. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(14\)60215-X](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(14)60215-X).
- Denison, Michael S., Anatoly A. Soshilov, Guochun He, Danica E. DeGroot, a Bin Zhao. 2011. „Exactly the Same but Different: Promiscuity and Diversity in the Molecular Mechanisms of Action of the Aryl Hydrocarbon (Dioxin) Receptor". *Toxicological Sciences* 124 (1): 1–22. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfr218>.
- Duda, Chester T., a Peter T. Kissinger. 1993. „Determination of Biogenic Amines, Their Metabolites, and Other Neurochemicals by Liquid Chromatography/Electrochemistry". In *Techniques in the Behavioral and Neural Sciences*, 11:41–82. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-81369-5.50007-9>.
- Ehrlich, Allison K., a Nancy I. Kerkvliet. 2017. „Is chronic AhR activation by rapidly metabolized ligands safe for the treatment of immune-mediated diseases?" *Current opinion in toxicology* 2 (únor): 72–78. <https://doi.org/10.1016/j.cotox.2017.01.007>.
- Evans, Brad R., Sibel I. Karchner, Lenka L. Allan, Richard S. Pollenz, Robert L. Tanguay, Matthew J. Jenny, David H. Sherr, a Mark E. Hahn. 2008. „Repression of Aryl Hydrocarbon Receptor (AHR) Signaling by AHR Repressor: Role of DNA Binding and Competition for AHR Nuclear Translocator". *Molecular Pharmacology* 73 (2): 387–98. <https://doi.org/10.1124/mol.107.040204>.

- Fleischer, Alan B., Edmund H. Schwartzel, Susan I. Colby, a David J. Altman. 2000. „The Combination of 2% 4-Hydroxyanisole (Mequinol) and 0.01% Tretinoin Is Effective in Improving the Appearance of Solar Lentigines and Related Hyperpigmented Lesions in Two Double-Blind Multicenter Clinical Studies". *Journal of the American Academy of Dermatology* 42 (3): 459–67. [https://doi.org/10.1016/S0190-9622\(00\)90219-6](https://doi.org/10.1016/S0190-9622(00)90219-6).
- Furue, Masutaka, Gaku Tsuji, Chikage Mitoma, Takeshi Nakahara, Takahito Chiba, Saori Morino-Koga, a Hiroshi Uchi. 2015. „Gene Regulation of Filaggrin and Other Skin Barrier Proteins via Aryl Hydrocarbon Receptor". *Journal of Dermatological Science* 80 (2): 83–88. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2015.07.011>.
- Gertsch, Jürg. 2008. „Antiinflammatory Cannabinoids in Diet – towards a Better Understanding of CB2 Receptor Action?: Towards a Better Understanding of CB<sub>2</sub> Receptor Action?" *Communicative & Integrative Biology* 1 (1): 26–28. <https://doi.org/10.4161/cib.1.1.6568>.
- Gertsch, Jürg, Marco Leonti, Stefan Raduner, Ildiko Racz, Jian-Zhong Chen, Xiang-Qun Xie, Karl-Heinz Altmann, Meliha Karsak, a Andreas Zimmer. 2008. „Beta-Caryophyllene Is a Dietary Cannabinoid". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (26): 9099–9104. <https://doi.org/10.1073/pnas.0803601105>.
- Gradelet, Sandra, Pierre Astorg, Thierry Pineau, Marie-Chantal Canivenc, Marie-Hélène Siess, Joël Leclerc, a Pierre Lesca. 1997. „Ah Receptor-Dependent CYP1A Induction by Two Carotenoids, Canthaxanthin and  $\beta$ -Apo-8"-Carotenal, with No Affinity for the TCDD Binding Site". *Biochemical Pharmacology* 54 (2): 307–15. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(97\)00176-7](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(97)00176-7).
- Grulich, Vít. 2011. „SYZYGIUM AROMATICUM (L.) Merr. et L. M. Perry – hřebíčkovec kořený | BOTANY.cz". *Botany.cz* (blog). 2011. <https://botany.cz/cs/syzygium-aromaticum/>.
- Hahn, Mark E. 1998. „The Aryl Hydrocarbon Receptor: A Comparative Perspective". *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* 121 (1–3): 23–53. [https://doi.org/10.1016/S0742-8413\(98\)10028-2](https://doi.org/10.1016/S0742-8413(98)10028-2).
- Hartsel, Joshua A., Joshua Eades, Brian Hickory, a Alexandros Makriyannis. 2016. „Chapter 53 - Cannabis Sativa and Hemp". In *Nutraceuticals*, editoval Ramesh C. Gupta, 735–54. Boston: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802147-7.00053-X>.
- Hayes, Kevin R., Gina M. Zastrow, Manabu Nukaya, Kalyan Pande, Ed Glover, John P. Maufort, Adam L. Liss, et al. 2007. „Hepatic Transcriptional Networks Induced by Exposure to 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo- *p* -Dioxin". *Chemical Research in Toxicology* 20 (11): 1573–81. <https://doi.org/10.1021/tx7003294>.
- Jeong, Jin Boo, Se Chul Hong, Hyung Jin Jeong, a Jin Suk Koo. 2011. „Anti-Inflammatory Effect of 2-Methoxy-4-Vinylphenol via the Suppression of NF-KB and MAPK Activation, and Acetylation of Histone H3". *Archives of Pharmacal Research* 34 (12): 2109–16. <https://doi.org/10.1007/s12272-011-1214-9>.
- Koroch, Adolfin R., Rodolfo Juliani, a Julio A. Zygadlo. 2007. „Bioactivity of Essential Oils and Their Components". In *Flavours and Fragrances: Chemistry, Bioprocessing and Sustainability*. Berlin: Springer.
- Korthou, H., a R. Verpoorte. 2007. „Vanilla". In *Flavours and Fragrances: Chemistry, Bioprocessing and Sustainability*. Berlin: Springer.
- Koşar, M., H. J. D. Dorman, a R. Hiltunen. 2005. „Effect of an Acid Treatment on the Phytochemical and Antioxidant Characteristics of Extracts from Selected Lamiaceae Species". *Food Chemistry* 91 (3): 525–33. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.06.029>.

- Lee, Kwang-Geun, a Takayuki Shibamoto. 2002. „Determination of Antioxidant Potential of Volatile Extracts Isolated from Various Herbs and Spices". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50 (17): 4947–52. <https://doi.org/10.1021/jf0255681>.
- Legault, Jean, a André Pichette. 2007. „Potentiating Effect of  $\beta$ -Caryophyllene on Anticancer Activity of  $\alpha$ -Humulene, Isocaryophyllene and Paclitaxel". *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 59 (12): 1643–47. <https://doi.org/10.1211/jpp.59.12.0005>.
- Mahmoud, Mona F., Sahar El Swefy, Rehab A. Hasan, a Amal Ibrahim. 2014. „Role of Cannabinoid Receptors in Hepatic Fibrosis and Apoptosis Associated with Bile Duct Ligation in Rats". *European Journal of Pharmacology* 742 (listopad): 118–24. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.08.021>.
- Masango, Phineas. 2001. „Towards understanding steam distillation of essential oils by differential quantification of principal components using capillary gas chromatography." PhD thesis, University of Surrey.
- Masango, Phineas. 2005. „Cleaner Production of Essential Oils by Steam Distillation". *Journal of Cleaner Production* 13 (8): 833–39. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2004.02.039>.
- McIntosh, Brian E., John B. Hogenesch, a Christopher A. Bradfield. 2010. „Mammalian Per-Arnt-Sim Proteins in Environmental Adaptation". *Annual Review of Physiology* 72 (1): 625–45. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021909-135922>.
- Mimura, Junsei, a Yoshiaki Fujii-Kuriyama. 2003. „Functional Role of AhR in the Expression of Toxic Effects by TCDD". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, Cellular Biology of Cytochrome P450 Regulation*, 1619 (3): 263–68. [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(02\)00485-3](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(02)00485-3).
- Mohamed, Amal A, Gehan A El-Emary, a Hanaa F Ali. 2010. „Influence of Some Citrus Essential Oils on Cell Viability, Glutathione-S-Transferase and Lipid Peroxidation in Ehrlich Ascites Carcinoma Cells", 8.
- Nebert, Daniel W, Amy L Roe, Matthew Z Dieter, Willy A Solis, Yi Yang, a Timothy P Dalton. 2000. „Role of the Aromatic Hydrocarbon Receptor and [Ah] Gene Battery in the Oxidative Stress Response, Cell Cycle Control, and Apoptosis". *Biochemical Pharmacology* 59 (1): 65–85. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(99\)00310-X](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(99)00310-X).
- Opekar, František. 2010. *Základní analytická chemie*. 2. vydání. Karolinum.
- Park, Sunmin, Da Sol Kim, a Suna Kang. 2011. „Gastrodia Elata Blume Water Extracts Improve Insulin Resistance by Decreasing Body Fat in Diet-Induced Obese Rats: Vanillin and 4-Hydroxybenzaldehyde Are the Bioactive Candidates". *European Journal of Nutrition* 50 (2): 107–18. <https://doi.org/10.1007/s00394-010-0120-0>.
- Perineau, Francis, Leguet Ganou, a Gérard Vilarem. 2007. „Studying Production of Lovage Essential Oils in a Hydrodistillation Pilot Unit Equipped with a Cohobation System". *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 53 (2): 165–71. <https://doi.org/10.1002/jctb.280530210>.
- Pizzale, Lorena, Renzo Bortolomeazzi, Stefania Vichi, Eva Überegger, a Lanfranco S. Conte. 2002. „Antioxidant Activity of Sage (*Salvia Officinalis* and *S Fruticosa*) and Oregano (*Origanum Onites* and *O Indercedens*) Extracts Related to Their Phenolic Compound Content". *Journal of the Science of Food and Agriculture* 82 (14): 1645–51. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1240>.
- Rao, S. Ramachandra, a G. A. Ravishankar. 2000. „Vanilla Flavour: Production by Conventional and Biotechnological Routes". *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80 (3): 289–304. [https://doi.org/10.1002/1097-0010\(200002\)80:3<289::AID-JSFA543>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/1097-0010(200002)80:3<289::AID-JSFA543>3.0.CO;2-2).

- Rothhammer, Veit, a Francisco J. Quintana. 2019. „The Aryl Hydrocarbon Receptor: An Environmental Sensor Integrating Immune Responses in Health and Disease". *Nature Reviews Immunology* 19 (3): 184–97. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0125-8>.
- Rufino, Ana Teresa, Madalena Ribeiro, Cátia Sousa, Fernando Judas, Lígia Salgueiro, Carlos Cavaleiro, a Alexandrina Ferreira Mendes. 2015. „Evaluation of the Anti-Inflammatory, Anti-Catabolic and pro-Anabolic Effects of E-Caryophyllene, Myrcene and Limonene in a Cell Model of Osteoarthritis". *European Journal of Pharmacology* 750 (březen): 141–50. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.01.018>.
- Safe, S. 1993. „Toxicology, Structure-Function Relationship, and Human and Environmental Health Impacts of Polychlorinated Biphenyls: Progress and Problems." *Environmental Health Perspectives* 100 (duben): 259–68. <https://doi.org/10.1289/ehp.93100259>.
- Santana, Lorena C.L.R., Sabrina Maria P. Carneiro, Laurentino B. Caland-Neto, Daniel D.R. Arcanjo, José M. Moita-Neto, Antônia M.G.L. Citó, a Fernando Aécio A. Carvalho. 2014. „Brazilian Brown Propolis Elicits Antileishmanial Effect against Promastigote and Amastigote Forms of *Leishmania Amazonensis*". *Natural Product Research* 28 (5): 340–43. <https://doi.org/10.1080/14786419.2013.856904>.
- Sinha, Arun K., Upendra K. Sharma, a Nandini Sharma. 2008. „A Comprehensive Review on Vanilla Flavor: Extraction, Isolation and Quantification of Vanillin and Others Constituents". *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 59 (4): 299–326. <https://doi.org/10.1080/09687630701539350>.
- Smith, Susan H., Channa Jayawickreme, David J. Rickard, Edwige Nicodeme, Thi Bui, Cathy Simmons, Christine M. Coquery, et al. 2017. „Tapinarof Is a Natural AhR Agonist That Resolves Skin Inflammation in Mice and Humans". *Journal of Investigative Dermatology* 137 (10): 2110–19. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2017.05.004>.
- Stejskalova, Lucie, Zdenek Dvorak, a Petr Pavek. 2011. „Endogenous and Exogenous Ligands of Aryl Hydrocarbon Receptor: Current State of Art". *Current Drug Metabolism* 12 (2): 198–212. <https://doi.org/10.2174/138920011795016818>.
- Tarnow, Patrick, Tewes Tralau, a Andreas Luch. 2019. „Chemical Activation of Estrogen and Aryl Hydrocarbon Receptor Signaling Pathways and Their Interaction in Toxicology and Metabolism". *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* 15 (3): 219–29. <https://doi.org/10.1080/17425255.2019.1569627>.
- Tongnuanchan, Phakawat, a Soottawat Benjakul. 2014. „Essential Oils: Extraction, Bioactivities, and Their Uses for Food Preservation". *Journal of Food Science* 79 (7): R1231–49. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12492>.
- Valíček, Pavel. 2002. *Užitkové rostliny tropů a subtropů*. Praha: Academia.
- Vondracek, Jan, a Lenka Umannova and Miroslav Machala. 2011. „Interactions of the Aryl Hydrocarbon Receptor with Inflammatory Mediators: Beyond CYP1A Regulation". *Current Drug Metabolism*. 31. leden 2011. <http://www.eurekaselect.com/73491/article>.
- Vrzal, Radim, Jitka Ulrichová, a Zdeněk Dvořák. 2004. „AROMATIC HYDROCARBON RECEPTOR STATUS IN THE METABOLISM OF XENOBIOTICS UNDER NORMAL AND PATHOPHYSIOLOGICAL CONDITIONS". *Biomedical Papers* 148 (1): 3–10. <https://doi.org/10.5507/bp.2004.001>.
- Wu, Dalei, Nalini Potluri, Youngchang Kim, a Fraydoon Rastinejad. 2013. „Structure and Dimerization Properties of the Aryl Hydrocarbon Receptor PAS-A Domain". *Molecular and Cellular Biology* 33 (21): 4346–56. <https://doi.org/10.1128/MCB.00698-13>.



## FICHE D'ANALYSE – ANALYSIS SHEET

Nom botanique – botanical name: *Vanilla planifolia* Absolue  
 Nom commun – french name: ABSOLUE DE VANILLE  
 Numéro du lot - lot number: ABV100  
 Origine - origin: ---- PRANARÔM - MADAGASCAR  
 Partie de la plante – part of the plant: OLEORESINE  
 Date de production – production date: 09/2015  
 Date de péremption – 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 mn à 50 °C –2 °C/mn→250 °C-100 mn à 250 °C  
 Gaz vecteur He: 23 psis

### Caractéristiques physiques – physical characteristics :

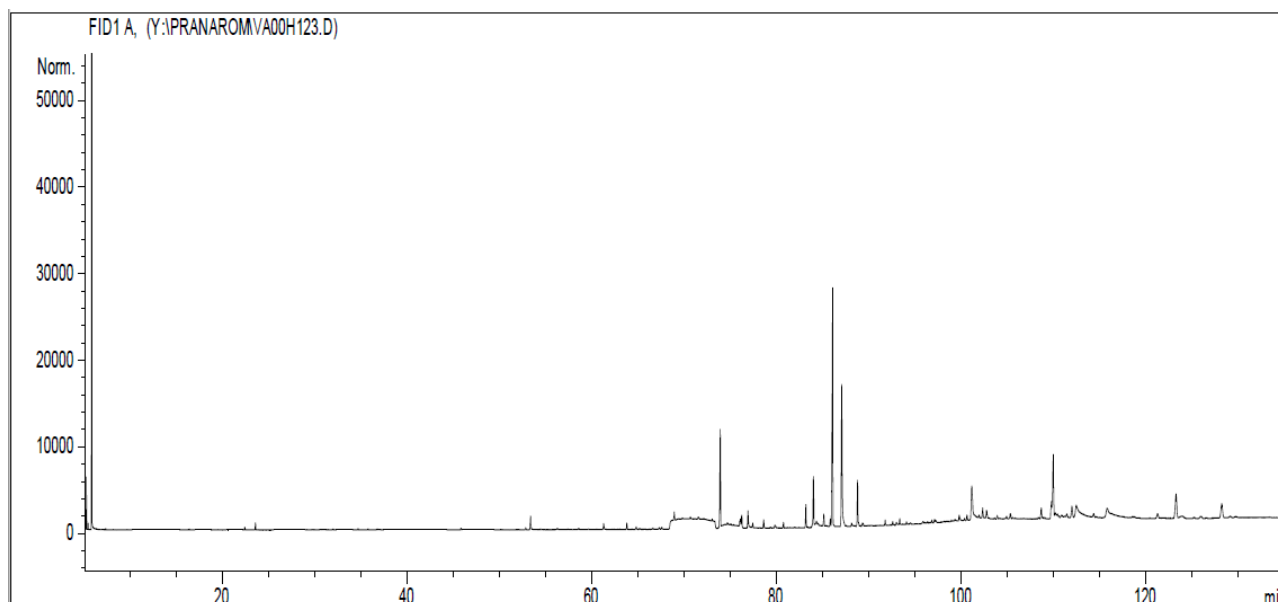
Aspect – physical state	Liquide épais
Couleur - colour	Marron orangé
Odeur - odour	Caractéristique de vanilline
Densité à 20°C - density	0,944
Densité à 15°C - density	0,947
Indice de réfraction à 20°C - refractive index	1,482 7
Pouvoir rotatoire à 20°C - optical rotation	Trop foncé pour la lecture
Miscibilité à l'éthanol à 95% - miscibility	10 volumes d'alcool 95 % / 1 volume d'HE (avec un dépôt)
Point d'éclair : SETAFLASH - flashpoint	109,7 °C

### Analyses pesticides – pesticide analysis :

<p><b>Pesticides Organochlorés : Dosage par GC MS détecteur XSD (méthode multirésidus interne validée selon la norme NF V03-110)</b>  <b>Liste des pesticides recherchés (Pharmacopée Européenne):</b> Alachlor, Aldrine, Bromophos Ethyl, Bromophos Methyl, Chlordane, Chlorfenvinphos, Chlorpyrifos, Chlorpyrifos Methyl, Chlorthal Dimethyl, Cyfluthrine, Cyhalothrine lambda, Cypermethrine, Dichlofluamide, Dichlorvos, Dicofol (Kelthane), Dieldrine, Endosulfan, Endosulfan sulfate, Endrine, Fenchlorphos (Ronnel), Fenchlorphos-oxon, Fenvalerate, Fluvalinate, Heptachlor, Heptachlor epoxide, Hexachlorobenzene, Hexachlorocyclohexane <math>\alpha</math>, Hexachlorocyclohexane <math>\beta</math>, Hexachlorocyclohexane <math>\delta</math>, Hexachlorocyclohexane <math>\epsilon</math>, Lindane, Methoxychlore, Mirex, Naled, o,p'-DDD , o,p'-DDE, o,p'-DDT, Oxychlordane, p,p'-DDD, p,p'-DDE, p,p'-DDT, Pentachloroaniline, Pentachloroanisole, Permethrine , Phosalone, Procymidone, Profenophos, Prothiofos, Quintozene, S421, Tecnazene, Tetradifon, Vinclozoline</p>	<p><b>Résultats</b></p> <p>&lt; LMR*</p> <p>* Limite Maximale de Résidus autorisée</p>
--	--

<p><b>Pesticides Organophosphorés : Dosage par GC MS détecteur FPD</b>  (méthode multirésidus interne validée selon la norme NF V03-110)  <b>Liste des pesticides recherchés (Pharmacopée Européenne):</b> Acephate, Azinphos Ethyl, Azinphos Méthyl, Bromophos Ethyl, Bromophos Méthyl, Chlorfenvinphos, Chlorpyrifos, Chlorpyrifos Methyl, Diazinon, Dichlorvos, Dimethoate, Ethion, Etrimphos, Fenchlorphos (Ronnel), Fenchlorphos-oxon, Fenitrothion, Fensulfothion (Dasanit), Fensulfothion-oxon, Fensulfothion-oxon-sulfone, Fensulfothion-sulfone, Fenthion, Fenthion-oxon, Fenthion-oxon-sulfone, Fenthion-oxon-sulfoxyde, Fenthion-sulfone, Fenthion-sulfoxyde, Fonofos, Malaixon, Malathion, Mecarbam, Methacrifos, Methamidophos (Monitor), Methidathion, Monocrotophos, Naled, Omethoate, Paraoxon, Paraoxon Méthyl, Parathion Ethyl, Parathion Methyl, Phosalone, Phosmet, Pirimiphos Ethyl, Pirimiphos Méthyl, Profenophos, Prothiofos, Quinalphos.</p>	<p><b>Résultats</b></p> <p>&lt; LMR*</p> <p>* Limite Maximale de Résidus autorisée</p>
---	--

## Profil CHROMATOGRAPHIQUE



## Tableau de résultats 1 : ABSOLUE DE VANILLE

LOT OF22032

Pics	Temps de rétention	Constituants	%
1	5,3	ACETATE D'ETHYLE	1,00
2	5,8	<b>ETHANOL</b>	<b>21,04</b>
3	22,4	2-HYDROXYPROPIONATE D'ETHYLE	0,11
4	23,6	4-HYDROXY-4-METHYL-2-PENTANONE	0,30
5	30,6	ACIDE ACETIQUE	0,25
6	53,4	MEQUINOL	0,80
7	58,6	CREOSOL	0,09
8	61,3	PHENOL	0,36
9	63,8	MYRISTATE D'ETHYLE	0,32
10	64,8	CINNAMATE DE METHYLE	0,15
11	67,6	TRIMETHYL PENTADECANONE	0,11
12	69,0	PENTADECANOATE D'ETHYLE	0,49
13	70,7	VINYL QUAJACOL	0,11
14	71,5	ALCOOL ALIPHATIQUE	0,16
15	73,1	ALCOOL ALIPHATIQUE	0,03
16	73,9	<b>PALMITATE D'ETHYLE</b>	<b>5,14</b>
17	74,7	ALDEHYDE ALIPHATIQUE	0,16
18	76,3	TRICOSANE	1,13
19	76,9	TRICOSENE ISOMERE	1,14
20	77,5	ACIDE HOMOVANILLIQUE	0,21
21	78,6	HEPTADECANOATE D'ETHYLE	0,43
22	79,9	2,3-DIHYDRO BENZOFURANE	0,26
23	80,8	TETRACOSANE	0,29
24	83,2	STEARATE D'ETHYLE	1,29
25	84,0	<b>OLEATE D'ETHYLE</b>	<b>2,73</b>
26	84,3	LINOLEATE DE METHYLE	0,19
27	85,1	PENTACOSANE	0,64
28	85,9	ETHOXY METHYLPHENOL	0,31
29	86,1	<b>LINOLEATE D'ETHYLE</b>	<b>15,42</b>
30	87,1	<b>VANILLINE</b>	<b>10,75</b>
31	88,8	<b>LINOLENATE D'ETHYLE</b>	<b>2,56</b>
32	89,3	PHYTOL	0,34
33	91,8	ARACHIDOATE D'ETHYLE	0,29
34	92,6	EICOSENATE DE METHYLE	0,21
35	93,4	HEPTACOSANE	0,31
36	96,9	ESTER ALIPHATIQUE	0,14
37	99,8	ACIDE AROMATIQUE	0,46
38	100,7	DIMETHYL HENEICOSANOATE DE METHYLE	0,34
39	101,2	<b>ACIDE PALMITIQUE</b>	<b>4,46</b>
40	102,4	ERUCATE D'ETHYLE C22 : 1	0,62
41	102,8	NONACOSANE	0,64
42	104,9	4-HYDROXY BENZALDEHYDE	0,21
43	105,4	NONACOSENE	0,40
44	108,7	LIGNOCERATE D'ETHYLE C24 : 0	0,73
45	110,0	<b>NERVONATE D'ETHYLE C24 : 1</b>	<b>6,54</b>

## Tableau de résultats 2 : ABSOLUE DE VANILLE

LOT OF22032

Pics	Temps de rétention	Constituants	%
46	112,0	ALCOOL ALIPHATIQUE	1,05
47	112,5	<b>1-HEPTACOSANOL</b>	<b>4,21</b>
48	115,8	<b>ACIDE LINOLEIQUE</b>	<b>4,71</b>
49	123,3	<b>METHYL CEROTATE DE METHYLE C26 : 0</b>	<b>2,92</b>
50	126,0	ESTER ALIPHATIQUE	0,35
51	128,2	HEXACOSENOATE DE METHYLE C26 : 1	2,02
52	133,0	ESTER METHYLIQUE INSATURÉ	1,00
		<b>TOTAL</b>	<b>99,92</b>

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

Pranarôm Int.

C. Schulze

Contrôle qualité





## FICHE D'ANALYSE – ANALYSIS SHEET Huile essentielle – Essential oil

Nom botanique – botanical name: *Eugenia caryophyllus*  
Nom commun – french name: CLOUS DE GIROFLE  
Numéro du lot – lot number: OF23303  
Origine - origin: -- PRANARÔM - INDONESIE  
Partie de la plante – part of the plant: BOUTON FLORAL  
Date de distillation – distillation date: 11/2015  
Date de péremption – out of date: 08/2021

### Caractéristiques d'analyse – analysis characteristics:

CPG - SM HEWLETT PACKARD / CPG - FID  
Colonne: HP INNOWAX 60-0.5-0.25  
Programmation de température: 6 mn à 50°C -2°C/mn→250°C-20mn à 250°C  
Gaz vecteur He: 22 psis

### Caractéristiques physiques – physical characteristics:

Aspect – physical state	Liquide limpide
Couleur - colour	Jaune d'or clair
Odeur - odour	Caractéristique de l'eugénol
Densité à 20°C - density	1,063
Densité à 15°C - density	1,067
Indice de réfraction à 20°C - refractive index	1,534 9
Pouvoir rotatoire à 20°C - optical rotation	- 0,5 °
Miscibilité à l'éthanol à 70% - miscibility	1 volume d'alcool / 1 volume d'HE
Point d'éclair : SETAFLASH - flashpoint	118,6 °C

### Analyses pesticides – pesticide analysis:

<b>Pesticides Organochlorés : Dosage par GC MS détecteur XSD</b> (méthode multirésidus interne validée selon la norme NF V03-110) <b>Liste des pesticides recherchés (Pharmacopée Européenne):</b> Alachlor, Aldrine, Bromophos Ethyl, Bromophos Methyl, Chlordane, Chlorfenvinphos, Chlorpyrifos, Chlorpyrifos Methyl, Chlorthal Dimethyl, Cyfluthrine, Cyhalothrine lambda, Cypermethrine, Dichlofluanide, Dichlorvos, Dicofol (Kelthane), Dieldrine, Endosulfan, Endosulfan sulfate, Endrine, Fenchlorphos (Ronnel), Fenchlorphos-oxon, Fenvalerate, Fluralinate, Heptachlor, Heptachlor epoxide, Hexachlorobenzene, Hexachlorocyclohexane $\alpha$ , Hexachlorocyclohexane $\beta$ , Hexachlorocyclohexane $\delta$ , Hexachlorocyclohexane $\epsilon$ , Lindane, Methoxychlore, Mirex, Naled, o,p'-DDD, o,p'-DDE, o,p'-DDT, Oxychlordane, p,p'-DDD, p,p'-DDE, p,p'-DDT, Pentachloroaniline, Pentachloroanisole, Permethrine, Phosalone, Procymidone, Profenophos, Prothiofos, Quintozene, S421, Tecnazene, Tetradifon, Vinclozoline	<b>Résultats</b>  < LMR*  * Limite Maximale de Résidus autorisée
--	--

**Pesticides Organophosphorés : Dosage par GC MS détecteur FPD  
(méthode multirésidus interne validée selon la norme NF V03-110)**

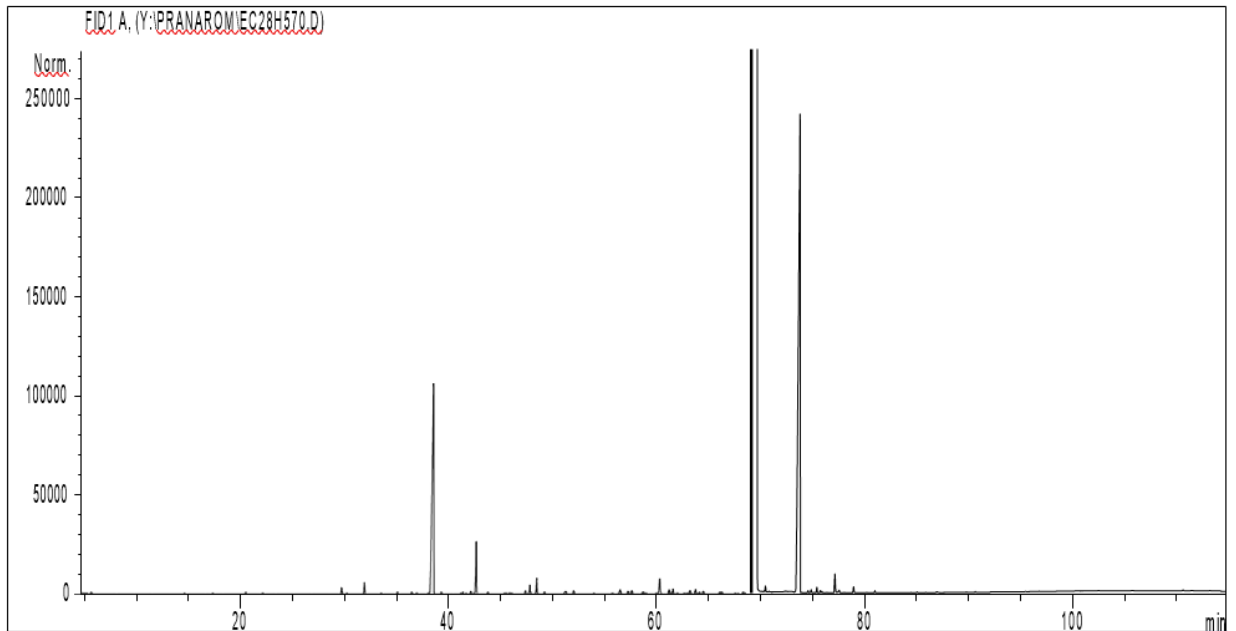
**Liste des pesticides recherchés (Pharmacopée Européenne):** Acephate, Azinphos Ethyl, Azinphos Méthyl, Bromophos Ethyl, Bromophos Méthyl, Chlorfenvinphos, Chlorpyriphos, Chlorpyriphos Methyl, Diazinon, Dichlorvos, Dimethoate, Ethion, Etrimphos, Fenchlorphos (Ronne), Fenchlorphos-oxon, Fenitrothion, Fensulfothion (Dasanit), Fensulfothion-oxon, Fensulfothion-oxon-sulfone, Fensulfothion-sulfone, Fenthion, Fenthion-oxon, Fenthion-oxon-sulfone, Fenthion-oxon-sulfoxyde, Fenthion-sulfone, Fenthion-sulfoxyde, Fonofos, Malaoxon, Malathion, Mecarbam, Methacrifos, Methamidophos (Monitor), Methidathion, Monocrotophos, Naled, Omethoate, Paraoxon, Paraoxon Méthyl, Parathion Ethyl, Parathion Methyl, Phosalone, Phosmet, Pirimiphos Ethyl, Pirimiphos Méthyl, Profenophos, Prothiofos, Quinalphos.

**Résultats**

< LMR\*

\* Limite Maximale de Résidus autorisée

## Profil CHROMATOGRAPHIQUE



## Tableau de résultats 1 : GIROFLE CLOUS

LOT N° OF23303

Pics	Temps de rétention	Constituants	%
1	5,7	ETHANOL	0,01
2	20,5	LIMONENE	0,01
3	22,2	6-METHYL-5-HEPTEN-2-ONE	0,01
4	29,7	FURFURAL	0,06
5	30,2	$\alpha$ -CUBEBENE	0,01
6	31,9	$\alpha$ -COPAENE	0,11
7	35,1	LINALOL	0,01
8	36,5	METHYL FURFURAL	0,01
9	37,0	ISOCARYOPHYLLENE ISOMERE	0,02
10	38,1	$\beta$ -ELEMENE	0,01
11	38,5	<b><math>\beta</math>-CARYOPHYLLENE</b>	<b>5,08</b>
12	39,3	SESQUITERPENE	0,01
13	41,4	SESQUITERPENE	0,01
14	42,2	ZONARENE	0,03
15	42,7	$\alpha$ -HUMULENE	0,62
16	43,8	$\gamma$ -MUUROLENE	0,01
17	45,5	FARNESENE ISOMERE	0,01
18	45,9	$\alpha$ -MUUROLENE	0,02
19	46,1	$\beta$ -SELINENE	0,01
20	47,4	$\alpha$ -FARNESENE	0,03
21	47,8	$\delta$ -CADINENE	0,09
22	48,0	$\gamma$ -CADINENE	0,01
23	48,5	SALICYLATE DE METHYLE	0,16
24	49,2	CADINA-1,4-DIENE	0,02
25	51,3	EPOXYDE SESQUITERPENIQUE	0,05
26	52,0	CALAMENENE	0,03
27	54,0	ALCOOL BENZYLIQUE	0,01
28	56,5	$\alpha$ -CALACORENE	0,06
29	57,3	CETONE AROMATIQUE Mw=164	0,03
30	57,6	CETONE AROMATIQUE Mw=164	0,04
31	58,7	EPOXYDE SESQUITERPENIQUE	0,03
32	58,9	EPOXYDE SESQUITERPENIQUE	0,01
33	60,0	OXYDE D'ISOCARYOPHYLLENE	0,01
34	60,3	OXYDE DE CARYOPHYLLENE	0,23
35	61,2	EPOXYDE SESQUITERPENIQUE	0,05
36	61,6	METHYLEUGENOL	0,06
37	62,0	EPOXYDE SESQUITERPENIQUE	0,01
38	63,2	EPOXY-6,7-HUMULENE	0,04
39	63,8	CARYOPHYLLENOL	0,06
40	64,2	GERMACRA-1,5-DIEN-4-OL	0,02
41	64,5	Épi-CUBENOL	0,03
42	66,1	METHOXY PROPYL PHENOL	0,02
43	66,3	COMPOSÉ AROMATIQUE	0,01
44	68,3	COMPOSÉ OXYGÉNÉ	0,03
45	69,6	<b>EUGENOL</b>	<b>79,37</b>

## Tableau de résultats 2 : GIROFLE CLOUS

LOT N° OF23303

Pics	Temps de rétention	Constituants	%
46	70,5	SESQUITERPENOL	0,06
47	72,4	COMPOSÉ PHENOLIQUE	0,02
48	73,8	<b>ACETATE D'EUGENYLE</b>	<b>12,75</b>
49	74,0	COMPOSE Mw=206	0,01
50	74,5	SESQUITERPENOL	0,03
51	74,9	EPOXYDE SESQUITERPENIQUE	0,04
52	75,4	CARYOPHYLLA-3,7-DIEN-6-OL	0,06
53	75,7	CARYOPHYLLADIENNE ISOMERE	0,02
54	77,0	CHAVICOL	0,13
55	77,1	EPOXYDE SESQUITERPENIQUE	0,10
56	77,4	ISOEUGENOL	0,02
57	77,5	EPOXYDE SESQUITERPENIQUE	0,03
58	78,9	SESQUITERPENOL	0,07
59	81,0	ACETATE D'ISOEUGENYLE	0,02
60	86,9	VANILLINE	0,01
		<b>TOTAL</b>	<b>99,94</b>

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

Pranarôm Int.  
C. Schulze  
Contrôle qualité