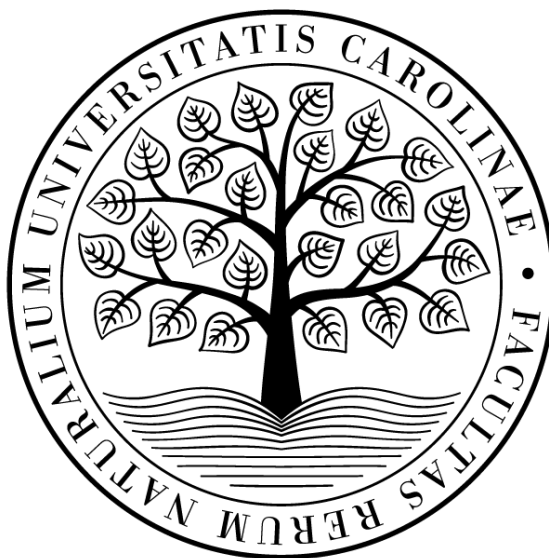


UNIVERZITA KARLOVA
Přírodovědecká fakulta
Katedra biochemie

Studijní program: Biochemie



Karel Špaček

Studium interakce placentární aromatasý s parfémý
Study of the interaction of placental aromatase with perfumes

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

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

Praha, 2025

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

V Praze dne

Jméno a příjmení

ABSTRAKT

Aromatasa (CYP19A1, AROM) je cytochrom P450 zprostředkovávající přeměnu androgenních pohlavních hormonů na estrogeny jejich aromatizací. Narušení aktivity tohoto enzymu látkami ze skupiny tzv. endokrinních disruptorů může mít pro lidský organismus mnoho nepříznivých důsledků. Inhibiční účinky parfémů vůči lidské aromatase byly zjištěny v rekombinantně exprimovaném systému – v tzv. bakulosomech.

V předkládané bakalářské práci byly ověřovány účinky parfémů na aktivitu lidské placentární aromatasu v přirozeném mikrosomálním systému. V připravených reakčních směsích byly sledovány změny v produkci estrogenu estradiolu, a to nejprve s vyhodnocením metodou TLC. Závěrečné vyhodnocení a kvantifikace probíhaly metodou HPLC/MS. Zároveň byla napříč několika expresními systémy (mikrosomálním, bakulosomálním a baktosomálním) v přítomnosti testovaných parfémů sledována aktivita důležitého redoxního partnera aromatasu, NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasy (CYPOR).

Provedené experimenty potvrdily inhibiční vlastnosti testovaných parfémů i v připravených placentárních mikrosomálních preparátech. Oba testované vzorky vykazovaly v mikrosomálním systému stejnou nebo větší míru inhibice lidské aromatasu než v systému bakulosomálním. Při stanovení aktivity CYPOR v reakčních směsích obsahujících parfém nebyla v bakulosomálních a baktosomálních systémech zjištěna významná změna aktivity oproti kontrolní reakci. Oba parfémy naopak v mikrosomálním preparátu působily jako stimulanty enzymatické aktivity CYPOR.

Klíčová slova: cytochrom P450, aromatasa, NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasa, modulace, expresní systémy

ABSTRACT

Aromatase (CYP19A1, AROM) is a cytochrome P450 enzyme that catalyses the metabolic transformation of androgens into oestrogens by introducing an aromatic A-ring into these precursors. Disruption of its enzymatic function by endocrine-disrupting chemicals (EDCs) can result in a variety of ailments. The inhibitory effect of certain perfumes on aromatase was confirmed in a recent study. However, the enzyme system used was produced recombinantly in baculosomes.

As part of this bachelor's thesis, the inhibitory effects of perfumes on aromatase in human placental microsomes were investigated. By comparing and then measuring oestradiol production in individual reactions using TLC and finally HPLC/MS, we were able to first identify and then quantify these effects. Interactions between perfumes and cytochrome P450 reductase (CPR) were also examined in multiple expression systems (microsomes, baculosomes, bacosomes).

By conducting these experiments, we were able to show that microsomal aromatase is also susceptible to inhibition by both of the tested perfumes. The inhibitory effects observed in microsomes were similar or even greater than those seen in baculosomes. We also found that the addition of either tested perfumes did not impact CPR activity in baculosomes or bacosomes. Conversely, cytochrome P450 reductase activity in human placental microsomes was increased by both of the tested perfumes.

Keywords: cytochrome P450, aromatase, cytochrome P450 reductase, modulation, expression systems

[IN CZECH]

Poděkování:

V rámci tohoto oddílu bych rád poděkoval především prof. RNDr. Petru Hodkovi, CSc. za nesmírnou trpělivost a ochotu při vedení mé bakalářské práce. Také bych mu chtěl poděkovat za mnoho opravdu užitečných a cenných rad, ať už v teoretické či praktické rovině. Dále bych chtěl mnohokrát poděkovat RNDr. Tomáši Ječmenovi, PhD. za provedení HPLC/MS analýzy reakčních směsí a RNDr. Věře Černé, PhD. za pomoc s BCA stanovením. Nakonec bych chtěl poděkovat své rodině a přátelům za podporu během psaní této práce.

Obsah

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	8
1. ÚVOD	9
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED	11
2.1. ZÁKLADNÍ TERMINOLOGIE	11
2.2. HISTORIE VÝROBY A POUŽÍVÁNÍ PARFÉMŮ	12
2.3. PARFÉMY 21. STOLETÍ	14
2.3.1. ROZPOUŠTĚDLA	15
2.3.2. VONNÉ LÁTKY	15
2.3.3. FIXATIVA	17
2.3.4. BARVIVA	18
2.3.5. KONZERVANTY	18
2.3.6. ZVLHČOVAČE	18
2.3.7. EMULGÁTORY	18
2.4. LEGISLATIVA A TOXIKOLOGIE	19
2.4.1. REGULAČNÍ RÁMEC	19
2.4.2. TOXIKOLOGICKÝ RÁMEC	19
2.4.3. POSOUZENÍ TOXICITY KOMPLEXNÍCH SMĚSÍ	22
2.5. CYTOCHROMY P450	22
2.5.1. HISTORICKÝ ÚVOD	22
2.5.2. ČLENĚNÍ A NOMENKLATURA	23
2.5.3. STRUKTURA	23
2.5.4. REAKČNÍ CYKLUS	25
2.5.5. EXPRESNÍ SYSTÉMY PRO VÝZKUM MEMBRÁNOVÝCH ENZYMŮ	27
2.5.6. STEROIDOGENEZE	28
2.6. CYP19A1 – AROMATASA	29
2.7. INHIBITORY AROMATASY	31
3. CÍLE PRÁCE	33
4. MATERIÁLY A METODY	34
4.1. POUŽITÉ CHEMIKÁLIE	34
4.2. POUŽITÉ PŘÍSTROJE	36
4.3. POUŽITÉ METODY	37
4.3.1. IZOLACE PLACENTÁRNÍ MIKROSOMÁLNÍ FRAKCE	37
4.3.2. STANOVENÍ CELKOVÉ KONCENTRACE BÍLKOVINY METODOU BCA	38
4.3.3. STANOVENÍ CELKOVÉ KONCENTRACE CYTOCHROMŮ P450	39
4.3.4. STANOVENÍ AKTIVITY NADPH:CYTOCHROM P450 OXIDOREDUKTASY	40
4.3.5. STANOVENÍ AKTIVITY AROMATASY S TLC NEBO HPLC/MS VYHODNOCENÍM	41
5. VÝSLEDKY	44
5.1. IZOLACE A CHARAKTERIZACE MIKROSOMÁLNÍCH PREPARÁTŮ	44
5.2. VLIV PARFÉMŮ NA AKTIVITU PLACENTÁRNÍ MIKROSOMÁLNÍ AROMATASY	46

5.3.	INHIBIČNÍ ÚČINKY PARFÉMŮ NA AKTIVITU AROMATASY V BAKULOSOMÁLNÍM A MIKROSOMÁLNÍM SYSTÉMU.....	47
5.4.	VLIV PARFÉMŮ NA AKTIVITU NADPH:CYTOCHROM P450 OXIDOREDUKTASY V ROZDÍLNÝCH EXPRESNÍCH SYSTÉMECH.....	48
6.	DISKUSE	49
7.	SOUHRN.....	52
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	53
	SEZNAM PŘÍLOH	62

Seznam použitých zkratk a symbolů

3 β -HSD	3 β -hydroxysteroiddehydrogenasa,
5 α -HSD	5 β -reduktasa
17 β -HSD	3 β -hydroxysteroiddehydrogenasa,
AcMNPV:	<i>Autographa californica</i> nukleopolyhedrovirus
AROM:	aromatasa (CYP19A1)
BSA:	hovězí sérový albumin
CYP:	cytochrom(y) P450
CYPOR:	NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasa
cyt c:	cytochrom c
DDT:	dichlordifenyltrichlorethan
E2:	estradiol (konkrétně 17 β -estradiol)
EDTA:	kyselina ethylendiamintetraoctová
EE2:	17 α -ethinylestradiol
FAD:	flavinadenindinukleotid
FMN:	flavinmononukleotid
GPMT:	maximalizační test na morčatech
HPLC:	vysoce účinná kapalinová chromatografie
HPRT:	hypoxanthinfosforibosyltransferasa
IA:	inhibitory aromatasy
IFRA:	mezinárodní asociace pro vonné látky
LLNA:	test lokálních mízních uzlin
MF:	mobilní fáze
MS:	hmotnostní spektrometrie
NADPH:	nikotinamidadenindinukleotidfosfát; redukovaný
NRU:	příjem neutrální červeně
OECD:	organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj
QSAR:	kvantitativní strukturně-aktivitní vztahy
RIFM:	výzkumný institut pro vonné látky
TLC:	chromatografie na tenké vrstvě
TST:	testosteron
TTC:	práh toxikologického rizika
UV:	ultrafialové [elektromagnetické záření]

1. Úvod

Již odnepaměti je pevnou součástí lidského života péče o svůj zevnějšek. Snahy o zvýšení svého půvabu (ať už úpravou vzhledu, přirozené čichové stopy či např. starostí o svůj chrup) pomocí chemických látek či jejich směsí jsou doloženy v literárních a uměleckých projevech lidí po tisíce let a takřka na všech světadílech. Dodnes význam takzvané kosmetiky roste – obchodní asociace výrobců kosmetiky Cosmetics Europe uvádí, že evropský trh s kosmetikou jen v roce 2023 navýšil svou hodnotu o 9,1 % na téměř 96 miliard euro, což z něj činí po USA druhý největší na světě [1]. Dotázaní Evropané uvádí ze 72 %, že kosmetické produkty jsou důležité nebo velmi důležité v jejich každodenním životě [2].

Z celého segmentu kosmetických produktů v Evropě vykazoval v roce 2023 největší růst trh s parfémami (11,5 %) [1]. Z výše zmíněné hodnoty evropského trhu s kosmetickými produkty pak na produkty tohoto typu připadá zhruba 15,4 miliardy euro, tedy 16,1 %, což z nich dělá hned po produktech péče o pleť a hygienických potřebách třetí ekonomicky nejvýznamnější kategorii [1].

Z výše uvedených údajů je zřejmé, že parfémami používá podstatná část evropské populace. Podle agentury Euromonitor dokonce kolem 75 % Evropanů používá tyto produkty jednou nebo vícekrát za týden (zhruba 50 % pak denně) [3].

I přes zjevný význam parfémů v každodenním životě ale chybí dostatečný výzkum, který by posoudil jejich vliv na lidské zdraví. Jednotlivé složky sice jsou většinou vyhodnoceny jako neškodné (resp. v realistických dávkách nemají škodlivé účinky), nicméně aplikovány jsou dohromady jako směs. Hodnocení celkové škodlivosti směsí v poslední době sice nabývá na významu, například v toxikologických metodikách EU se ale zatím objevuje především v souvislosti s pesticidy a potravinami.

Zvláště nebezpečným mechanismem účinku cizorodé látky na organismus je narušení produkce hormonů či endokrinní rovnováhy. Látky tohoto typu jsou totiž často schopny vyvolat nežádoucí účinky i v malém množství. Tyto tzv. endokrinní disruptory jsou pak spojeny s riziky rakoviny prsu a prostaty, poruchami metabolismu a obezitou, narušením běžné funkce rozmnožovacího ústrojí a s dalšími nepříznivými účinky [4].

Klíčovým enzymem, který zajišťuje přeměnu mužských pohlavních hormonů na ženské, a tedy se významně podílí na udržování endokrinní rovnováhy, je cytochrom P450 19A1 – aromatas. Jedná se o poměrně studovaný enzym, na který zároveň cílí řada léčiv, a to především kvůli jeho roli v rakovině prsu u žen po menopauze. U žen reprodukčního věku se aromatasová aktivita vyskytuje v mnoha tkáních a orgánech lidského těla, zdaleka nejvíce však ve vaječnicích. U postmenopausálních žen však k syntéze estrogenů ve vaječnicích již nedochází, její těžiště se přesouvá do tukové tkáně,

kostních osteoblastů a chondrocytů ad. [5]. Jak již bylo řečeno, narušení hormonální rovnováhy, např. estrogenů, endokrinními disruptory může mít závažné důsledky.

Nabízí se tedy otázka, zda mohou každodenně používané kosmetické směsi typu parfémů a voňavek či jejich jednotlivé složky mít vliv na aktivitu aromatasy, která se u postmenopauzálních žen vyskytuje často přímo v místě aplikace – tj. v podkožní tukové tkáni – či zda dokonce nemohou působit jako její potentní inhibitory?

Takový závěr byl navíc již částečně potvrzen v pilotní studii provedené Drejslarovou et al. [6]. Výsledky je nyní však třeba potvrdit v kontextu prostředí, ve kterém se aromatasu za fyziologických okolností nachází – totiž v komplexu endoplazmatického retikula, které lze experimentálně získat v podobě jeho fragmentů, mikrosomů.

2. Literární přehled

2.1. Základní terminologie

Navzdory významu, který parfémy mají v současné společnosti, jsou obklopeny řadou pojmů, které jsou v běžné řeči často zaměňovány či používány velmi volně. Tato kapitola cílí na definování alespoň základních pojmů pro potřeby této práce.

Nadřazeným pojmem vonným přípravkům (neboli parfémům) budiž pojem kosmetický přípravek. Ten je pro legislativní účely definován Nařízením Evropského parlamentu a Rady č. 1223/2009 [7], jako:

„jakákoli látka nebo směs určená pro styk s vnějšími částmi lidského těla (pokožkou, vlasovým systémem, nehty, rty, vnějšími pohlavními orgány) nebo se zuby a sliznicemi ústní dutiny, výhradně nebo převážně za účelem jejich čištění, parfemace, změny jejich vzhledu, jejich ochrany, jejich udržování v dobrém stavu nebo úpravy tělesných pachů;“

což je pro účely této práce více než postačující definice.

Nejdůležitějším pojmem, který je nutno definovat, je vonný přípravek, resp. parfém. Dobře platnou definici lze získat z původní definice kosmetického přípravku (viz výše), a to v následující podobě:

„jakákoli látka nebo směs určená pro styk s vnějšími částmi lidského těla (především však pokožkou), výhradně nebo převážně za účelem parfemace, popř. úpravy tělesných pachů;“

Obvyklým dělením parfémů je dělení na základě koncentrace vonných látek. Tyto produkty lze tak rozdělit do čtyř hlavních kategorií: *eau de cologne*, *eau de toilette*, *eau de parfum* a *parfum*, jejich obvyklé koncentrace viz Tab. 1 níže.

Tab. 1 – přehled nejčastěji používaných kategorií vonných prostředků dělených na základě koncentrací vonných látek.

Název kategorie (zkratka – český ekvivalent)	Obvyklá koncentrace vonných látek (w/w) [8]
<i>Eau de Cologne</i> (kolínská [voda])	3 % – 5 %
<i>Eau de Toilette</i> (toaletní voda)	4 % – 8 %
<i>Eau de Parfum</i> (parfumovaná voda)	15 % – 18 %
<i>Parfum</i> („parfém“)	15 % – 30 %

Nejvíce koncentrovanou formou parfémů je tedy stejnojmenný *perfum*, méně koncentrované formy se nazývají *eau* (francouzsky „voda“) [8]. Terminologicky problematické je použití slova parfém v češtině jak pro vonné přípravky obecně, tak pro jejich nejvíce koncentrovanou kategorii. V rámci této práce bude slovo parfém požíváno výhradně v prvním smyslu, tedy jako označení pro všechny vonné přípravky. V případě zmínky o nejkonzentrovanejší formě těchto přípravků bude použit francouzský název psaný kurzívou (*perfum*). V některých textech zabývajících se touto problematikou lze rovněž jako synonymum pro *perfum* nalézt slovo *extrait* (extrakt), popř. *extrait de parfum* (parfémový extrakt). Jako synonymum pro parfém, jako označení celé kategorie těchto produktů, lze také použít např. české slovo voňavka [9].

Kromě výše zmíněných čtyř hlavních kategorií parfémů (podle koncentrace vonných látek) lze nalézt v literatuře i další – jsou jimi např. *eau fraiche* („čerstvá voda“, 4 % – 5 % vonných látek) a *baby cologne* („dětská kolínská“, 1% – 2% vonných látek).

Navzdory zdání vytvořenému výše, že jsou tyto kategorie pevně stanoveny, lze v různých zdrojích najít poměrně rozdílné údaje [10]. Kategorie se tak mohou vzájemně překrývat a splývat dohromady. Navíc se často parfémy stejného jména ve svých různých ředěních (např. *eau de parfum* a *eau de cologne*) mohou poměrně lišit v i v kvalitativním obsahu jednotlivých látek. Napříč výrobci pak nelze obecně kvůli velkým rozpětím koncentrací u jednotlivých kategorií garantovat, že např. *eau de cologne* bude slabší a méně koncentrovaná než *eau de parfum*. Do hry navíc vstupuje i marketingový aspekt a lze se tak setkat i s nepřiliš definovanými *perfume de toilette* či *eaux de cologne* (*eaux* znamená francouzsky voda v množném čísle).

Obecně lze tedy říct, že dělení parfémů podle koncentrace vonných látek v nich obsažených má význam především pro spotřebitele. Je totiž (alespoň v rámci jednoho výrobce a stejné řady produktů) většinou přímo úměrná době trvání a intenzitě čichového vjemu. Po chemické stránce má ale malou vypovídající hodnotu.

Na závěr této kapitoly by bylo pro úplnost vhodné zmínit, že do definice vonných prostředků v rámci této práce spadají i produkty typu antiperspirantů a deodorantů. Vzhledem k tomu, že však v této práci nebyly v experimentální části testovány, nebudou ani dále teoreticky rozpracovávány.

2.2. Historie výroby a používání parfémů

Záznamy o přípravě parfémů lze nalézt již ve starověké Mezopotámii kolem roku 3000 př. n. l., tedy nedlouho po samotném vynálezu písma [8, 11, 12]. I přesto, že jejich výroba byla poměrně rozšířená, jednalo se o drahé zboží [13]. To bylo z velké části zapříčiněno náročností výrobního procesu, který začínal různými formami extrakce vonných látek z rostlinného materiálu.

Mezi tyto metody patřila macerace (louhování extrahované hmoty za studena ve vodě či rostlinném oleji) a absorpce za horka (extrakce do horkého oleje, jinak také „horká macerace“) [14]. Mezi jednotlivými extrakcemi byl vždy použitý rostlinný materiál odfiltrován přes látku a do vody nebo oleje byl přidán na extrakci materiál nový. Oba tyto způsoby přípravy parfemované hmoty však bylo nutno mnohokrát opakovat, pro velmi kvalitní přípravky např. i čtyřicetkrát [11].

Další používanou technologií byla tzv. hydrodestilace [8, 15]. V rámci této metody docházelo k zahřívání vody s vloženým rostlinným materiálem, přičemž s odpařovanou vodou ze směsi těkaly a odcházely také esenciální oleje a jejich složky. Ty byly po ukončení hydrodestilace jímány a představovaly tak samotný konečný produkt.

Zmíněná vysoká cena byla přímo způsobena, kromě ceny samotných surovin, časovou náročností macerace a absorpce za horka a technologickou nedokonalostí hydrodestilační aparatury [8, 13, 14]. Parfémy a vonné směsi byly tedy využívány především movitými vrstvami obyvatelstva a kněžími pro náboženské účely. Hlavními formami parfémů byly vonné oleje a méně také parfemované vody.

Od Mezopotámců převzali znalosti a technologii tvorby parfémů starověcí Egypťané [8]. Zavedli používání tuků zvířecího původu v rámci absorpce za horka. To jim zřejmě umožnilo vyrábět tzv. vonné kužele – předměty kuželovitého tvaru s oblou špičkou z pevného parfemovaného tuku [16]. Tuto nezvyklou formu parfému si uživatel umístil na hlavu, kde pak došlo vlivem teploty k postupnému roztékání vonného kužele. To vedlo k parfemaci a pomazání daného jedince. Esenciální oleje některých plodů (citrusů) byly získávány lisováním [12].

Během starověku platily Egyptské parfémy za luxusní zboží [8, 17]. Byly hojně dováženy např. do starověkého Řecka a Říma. Za dob Římského císařství byly parfémy využívány ve velkých množstvích k náboženským a osobním účelům, ale také k parfemaci některých veřejných prostranství. Zároveň došlo k poklesu ceny, který zpřístupnil parfémy širším masám obyvatel. Římané používali parfémy v pevné a tekuté podobě. Docházelo i k barvení parfémů [12].

Po pádu Římské říše se v podstatě největším výrobcem parfémů stali Arabové [8]. Ti po zdokonalení destilace dovedli připravit velmi koncentrované roztoky alkoholu [15], které umožnily přípravu parfémů v dnešním slova smyslu, tedy smícháním vonných látek s koncentrovaným alkoholem [18] – ty se pak staly dominantní formou parfémů. Místo čistě rostlinných ingrediencí začaly být využívány i látky zvířecího původu, z části jako další vonné látky, nicméně především jako velmi účinná fixativa (látky prodlužující vonné účinky parfémů, do té doby byla používána fixativa pouze rostlinného původu).

V Evropě se výroba parfémů ve středověku udržela v kláštrech, kde byly připravovány především jako léčivé prostředky [12]. V období renesance došlo k rozvoji výroby parfémů a nastoupilo období hojného využívání těchto látek šlechtou a bohatými měšťany [17]. V návaznosti na klášterní tradici byly parfémy využívány i léčebně, často

dokonce i per orálně [19]. Tato tradice odezněla po legislativních omezeních v období napoleonských válek [19].

V novověku pak došlo k zdokonalení extrakčních procesů vonných látek [8]. V 18. století začala být ve Francii používána absorpce za studena [20]. Při tomto procesu je (především) rostlinný materiál zavřen mezi dvě skleněné desky potřené živočišným tukem [9]. Vonné látky tak zčásti přejdou do tuku, který je pak odebrán jako pomáda, popř. je dále zpracováván [9]. Jedná se o časově náročný proces. V 19. století pak přichází zřejmě nejpoužívanější metoda extrakce esenciálních olejů, totiž parní destilace [20]. Extrahovaný materiál není ponořen ve vodě jako v případě hydrodestilace, je místo toho umístěn v samostatné nádobě, do které je vodní pára přiváděna [20]. Do procházející páry jsou pak extrahovány esenciální oleje, po ochlazení jsou jímány jako nevodná fáze a dále využívány.

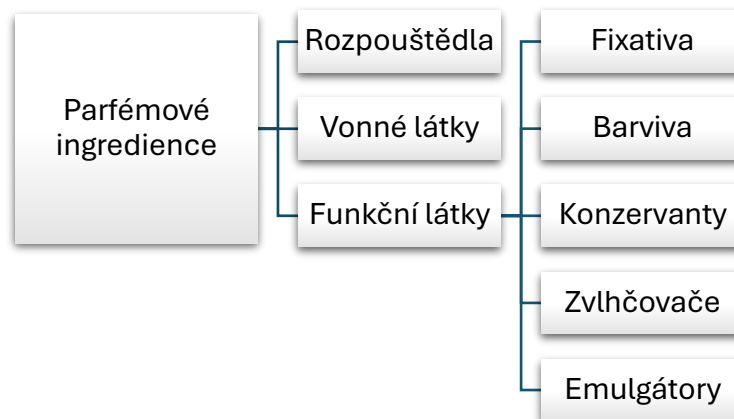
Rozvíjející se syntetická organická chemie v 19. a 20. století nahradila velké množství drahých surovin, používaných pro přípravu parfémů, jejich syntetickými ekvivalenty [17, 19]. Připravila také nová organická rozpouštědla pro přímou extrakci z živočišného a rostlinného materiálu. To vše vedlo, společně s výše popsány pokroky v extrakci přírodních materiálů, k bezprecedentnímu snížení ceny a parfémů se tak staly masově vyráběným zbožím pro všechny společenské vrstvy [8]. Zároveň byly pomocí syntetických látek připraveny zcela nové vůně, které nelze připravit pouze z rostlinných či živočišných extraktů [21].

2.3. Parfémy 21. století

Parfémy současnosti jsou rozšířeny mezi v podstatě všemi vrstvami obyvatelstva. Jak bylo řečeno v úvodu, používání na denní bázi deklaruje přes 50 % Evropanů [3]. Po prvotním ústupu přírodních ingrediencí v minulém století se ukázalo, že některé látky nelze plnohodnotně nahradit [22], popř. se jejich výroba neukázala jako ekonomicky výhodná (ve spojitosti s novými metodami získávání vonných látek, jako je např. extrakce superkritickým oxidem uhličitým) [8, 20]. Dnešní spotřebitelské tendence také tlačí trh zpět k nesyntetickým látkám [3].

Současný parfémový průmysl tedy využívá jak přírodní, tak syntetické chemikálie rozličných typů. Celkem lze tyto látky rozdělit na látky vonné a funkční. Funkční látky

lze pak rozdělit na fixativa, barviva, konzervanty, zvlhčovače a emulgátory (Obr. 1 níže).



Obr. 1 – schéma rozdělení parfémových ingrediencí do jednotlivých skupin

2.3.1. Rozpouštědla

Zdaleka nejčastějším rozpouštědlem v parfémech je dnes vysoce čistý ethanol [22]. Pro lepší vlastnosti a rozpustnost vonných látek je v podstatě vždy naředěn vodou [23]. Obecně platí, že pro koncentrovanější typy parfémů (*perfum*) se používá koncentrovanější (např. až 95 %) ethanol než pro např. *eau de toilette* (mezi 80 a 90 %) [23].

Vysoká teplota ethanolu je pro spotřebitele žádoucí, neboť oproti parfémům dřívějších dob v olejovém základu nevyvolává pocit mastnoty a nezůstává na kůži [24]. Zároveň používání vysoce koncentrovaného ethanolu znemožňuje růst mikroorganismů, v drtivé většině případů tedy není nutné do parfémů přidávat antimikrobiální látky. Používaný ethanol je nicméně denaturovaný. To značí, že obsahuje špatně oddělitelné látky prakticky znemožňující jeho konzumaci (často svou extrémní hořkostí, např. diethylftalát nebo denatoniumbenzoát) [25]. U ethanolu obecně se také v závislosti na jeho původu (syntetickém nebo z různých přírodních zdrojů) mohou vyskytnout příměsi, které ovlivňují např. i vůni finálního produktu [25].

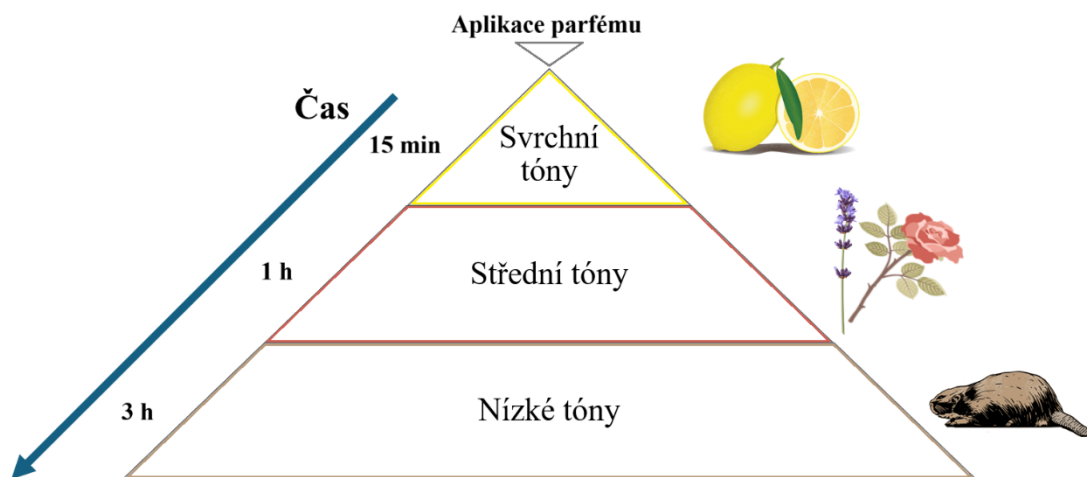
2.3.2. Vonné látky

Vonné látky jsou většinou těkavé organické molekuly schopné vyvolat čichový vjem, který je v průběhu času tradičně členěn do tří částí, často zobrazovaných v tzv. čichové pyramidě (Obr. 2 na další stránce) [22].

První a nejvyšší část pyramidy znázorňuje tzv. svrchní tóny, které jsou zprostředkovány nejtěkavějšími složkami parfému [12]. Jedná se o první registrovaný vjem z parfému, který relativně rychle odezní – vrcholí mezi 5 a 20 minutami po aplikaci. Do této kategorie patří především svěží ovocné vůně, např. citrusové aroma.

Druhou částí pyramidy jsou tzv. střední tóny. Jde o méně těkavé a zpravidla větší molekuly [12]. Jimi zprostředkovávaný čichový vjem dosahuje nejvyšší intenzity asi hodinu po aplikaci. Takto působí většina květinových vůní, např. levandulové aroma.

Poslední a nejdéle působící částí parfému jsou tzv. tóny nízké, vrcholící několik hodin po aplikaci [12]. Látky působící tímto účinkem jsou zpravidla nejméně těkavé složky směsi a patří mezi ně především vonné látky živočišného původu, např. pižmo, nebo látky mající dřevitou vůni.



Obr. 2 – schéma tzv. čichové pyramidy (viz text výše); použité obrázky jsou volně dostupné (pod licencí CC0).

Vonné látky lze dále podle jejich původu dělit na rostlinné, živočišné a ryze syntetické.

Rostlinné vonné látky jsou historicky nejpoužívanější vonnou součástí parfémů [8, 23]. Jedná se především o tzv. esenciální (neboli éterické) oleje. Jsou to tekutiny hydrofobní povahy obsahující těkavé vonné látky, které většinou pochází z určité části dané rostliny. Nejčastěji se jde o květy či listy [12]. Do parfémů se používají buď přímo esenciální oleje nebo jejich jednotlivé složky.

Nejvíce zastoupenými látkami v těchto olejích jsou terpenoidy a terpeny [12]. Mezi nejběžnější přísady do parfémů patří linalool, α - a β -pinen, limonen, 1,8-cineol a geraniol.

Mezi důležité synteticky produkováné přísady vyskytující se též v rostlinách patří především α - a β -jonony (hlavní komponenty fialkové vůně), kumarin (fixativum s vůní čerstvě posečené trávy) a vanilin [19].

Živočišné vonné látky jsou daleko méně početnou skupinou než ty rostlinné (které se počítají na tisíce) [8, 23]. Největšího uplatnění našlo těchto pět přírodních směsí: ambra, pižmo, bobřina, hyraceum a cibet [9]. Jako vonná látka bylo využíváno především pižmo, všechny pak mají roli silných fixativ (viz níže). Pro neudržitelnost a nevhodnost sběru a získávání těchto většinou žláznatých výměšků byly ovšem v podstatě plně nahrazeny syntetickými náhražkami, nebo jsou používány čím dál méně.

Syntetické náhražky většinou vychází z chemikálií obsažených v těchto látkách [8]. Ambru nejčastěji reprezentuje terpenoid ambroxid, pižmo pak jeho komponenta muskon [26].

Látky plně syntetického původu (bez přírodního výskytu) umožňují napodobovat rostlinné nebo hlavně živočišné vonné látky, často lze ale také vytvořit čichový vjem, jehož pomocí přírodních látek nelze dobře dosáhnout.

Rostlinné vůně napodobují např. 4-*terc*-butylcyklohexylacetát (vůně fialek), α -amylcinnamaldehyd (vůně jasmínu), 4-*terc*-butyl- α -methylhydrocinnamaldehyd (vůně bramboříku), javanol a polysantol (oba napodobují vůni santalového dřeva) [22].

Pižmový keton, tonalid, ethylenbrasylát a galaxolid pak patří mezi příklady sloučenin imitujících vůni pižma [19, 22].

Mezi látky s více abstraktním čichovým vjemem patří např. koavon (dřevitě květinová vůně s nádechem jantaru) či isocyklemon E (s podobnou vůní bez květinových tónů) [27].

2.3.3. Fixativa

Třetí nejvýznačnější skupinou látek v parfémeh jsou tzv. fixativa [22]. Jedná se o látky, které vyrovnávají tenzi par složek roztoku a zpomalují tak těkání především vonných látek. Díky tomu se prodlužuje doba účinku parfému po jeho aplikaci.

Fixativa, podobně jako vonné látky, můžeme rozdělit na přírodní (rostlinná a živočišná) a syntetická.

Rostlinná fixativa jsou z historického hlediska nejstarší [8]. Pro tento účel byly primárně využívány pryskyřice suchomilných stromů jako je myrha, kadidlo a mnohé další [22]. Fixativní účinky mají ovšem i některé esenciální oleje, kupříkladu z kořene kosatce (*Iris*) či tymiánový nebo cedrový.

Mnohem účinnější než ta rostlinná jsou však fixativa živočišného původu [8]. Jedná se o stejnou skupinu jako u vonných látek tohoto původu, jejich přehled viz výše [22].

Právě na **živočišná fixativa** často navazují ta syntetická [8, 22]. Působí tak např. již zmiňovaný pižmový keton či ambroxid. Živočišné pachy imitují také fixativa cyklopentadekanolid a 4-*terc*-butyl-2,6-dinitro-3-methoxytoluen, přezdívaný jantarové pižmo. Mezi vonná rostlinná fixativa připravovaná synteticky pak patří již zmiňovaný kumarin a vanilin, dále pak isougenol a benzylsalicylát.

Fixativa připravovaná synteticky jsou pak také často látkami bez zápachu [22]. Do této skupiny patří např. benzylbenzoát, diethylftalát a triethylcitrát.

2.3.4. Barviva

Některé parfémy obsahují látky, které způsobují jejich zbarvení. Mezi syntetickými barvivy jsou používána např. azo- [28] a trifenylmethanová barviva [29]. Parfémy obsahující esenciální oleje mohou být v některých případech zbarveny přímo těmito rostlinnými ingrediencemi [29].

2.3.5. Konzervanty

Pro zvýšení trvanlivosti parfému a jeho vůně se do těchto směsí přidávají také konzervanty. Jedná se především o chemikálie pohlcující UV (ultrafialové) záření, antioxidanty a chelatační činidla.

Antioxidanty v parfémeh pomáhají zpomalit oxidaci směsi, která může snížit kvalitu vůně a vzhledu [30]. Jedním z nejpoužívanějších antioxidantů v parfémeh je BHT (butylhydroxytoluen). Vzhledem k častým synergickým efektům se používá většinou ve směsích s dalšími látkami, jako např. kyselinou citronovou nebo šťavelovou [31].

Chemikálie pohlcující UV zabraňují nežádoucím chemickým přeměnám komponent parfému vlivem UV záření tím, že ho samy pohltní a následně tuto energii uvolní ve formě tepla [32]. Mezi tyto látky patří např. butylmethoxydibenzolmethan, ethylhexylmethoxycinnamát, ethylhexylsalicylát, benzofenony a oktokrylen [33, 34].

Poslední používanou kategorií konzervantů jsou **chelatační činidla** [35]. Smysl jejich využití spočívá ve vazbě kovů, které by mohly po čase reakcemi s okolními sloučeninami narušovat vzhled parfému. Typickým příkladem je Chelaton III (disodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové).

2.3.6. Zvlhčovače

Vysoušecí efekt odpařujícího se ethanolu na lidskou pokožku je v parfémeh často mírněn přidávkem látek se zvlhčujícími účinky [25, 35]. Mezi tyto látky patří především polyethylen- a polypropylenglykoly, často ve formě svých solí. V některých parfémeh je používán též glycerin [31].

2.3.7. Emulgátory

V parfémeh s nižší koncentrací ethanolu a vyšším obsahem vody (tedy např. *eau de cologne*) se mohou hydrofobní látky (např. esenciální oleje) po čase oddělit jako samostatná fáze [31]. Tomuto zabraňují v některých náchylných parfémeh právě emulgátory. V parfémeh se mj. využívá polysorbát 20 (neboli Tween 20) a polysorbáty 60 a 80 [33]. Přílišné využívání emulgátorů však není pro spotřebitele žádoucí, neboť na kůži, tj. v místě aplikace, působí nepříjemně.

2.4. Legislativa a toxikologie

V seznamu vytvářeném a provozovaném IFRA (*International Fragrance Association*), mezinárodní organizací úzce spolupracující s parfémovým průmyslem, se nachází přes 3500 jednotlivých ingrediencí [33]. U takového počtu používaných složek parfémů je logické položit si otázku, zda některé z nich nemohou být pro člověka toxické.

2.4.1. Regulační rámec

Parfémový průmysl v této oblasti podléhá dvěma typům regulací [35]. Oficiálním (například nařízení parlamentu a rady EU č. 1223/2009 [7]) a dobrovolně přijatým, připravovaným především mezinárodní výzkumnou organizací RIFM (*Research Institute for Fragrance Materials*). Ta spolupracuje jak s IFRA, tak s parfémovým průmyslem. Jedná se nicméně o nezávislou organizaci, pod jejíž záštitou probíhá výzkum chemických látek používaných v parfémech. Zároveň také RIFM obstarává shromažďování a publikaci informací týkajících se tohoto tématu.

Informace jsou kromě výrobců důležité i pro spotřebitele. Etikety parfémů však zdaleka neobsahují všechny chemikálie v těchto produktech obsažené. To by ostatně ani nebylo na tak malém prostoru možné – některé parfémy obsahují až několik stovek ingrediencí [35]. Hlavním důvodem je ale obchodní tajemství výrobců těchto produktů [35]. To ovšem neplatí absolutně. V EU jsou dle výše zmíněné legislativy (nařízení č. 1223/2009) výrobci povinni na etiketě uvést chemikálie s vonnou funkcí vyjmenované v tomto nařízení [7]. U většiny z nich je nutné je uvádět až od obsahu více než 0,001 % [7]. Funkční složky parfému společně s rozpouštědlem musí být uvedeny vždy [7].

2.4.2. Toxikologický rámec

Pro spotřebitele jsou sice údaje o kompletním složení parfému nedostupné, úřadům v EU a organizaci IFRA musí ovšem výrobce doložit řadu údajů [35]. Jedná se např. o přehledy bezpečnosti použitých chemikálií, jejich obsahu, výčet alergenů a mnoho dalších. Pro získání důležitého a prestižního certifikátu IFRA je nutno doložit soulad s regulacemi organizace IFRA.

Mezi příklady listin potřebných k uvedení parfému na trh však chybí toxikologické posouzení parfému jako celku, tedy směsi jednotlivých ingrediencí. Z historických a praktických důvodů probíhá posouzení bezpečnosti parfému pro spotřebitele většinou pouze na úrovni individuálních přísad [27].

Vývojem metodiky pro posouzení toxicity jednotlivých složek parfémů a samotným posouzením toxicity se zabývá již výše zmíněná organizace RIFM, která tak činí v souladu s vyvíjející se legislativou a vědeckým poznáním [27]. Je zřejmé, že existují mnohé další přístupy k testování těchto produktů, většinou se však jedná o metodiky podobného rázu a menšího významu. Jako příklad bude tedy rámcově

popsána metodika organizace RIFM, která bere specificky na zřetel aplikace parfémů a relevantní typy toxicity.

Zmíněná aplikace parfému probíhá především na pulzních místech – částech těla, kde lze díky blízkosti tepen jeho povrchu měřit puls (tělesné teplo zde pomáhá lepšímu odpařování složek parfému) [8]. Mezi tato místa se řadí např. spodní strana zápěstí, ohyb lokte a oblast na krku pod čelistí (u krkavice). Parfémy lze také mj. aplikovat na hrud', na zadní stranu kolen a za uši. Primární expozice parfému probíhá tedy kontaktem skrze kůži a jeho následným vdechováním [36].

Současný přístup k hodnocení toxicity spočívá v analýze sedmi relevantních koncových bodů toxicity – genotoxicity, toxicity opakovaných dávek, vývojové a reprodukční toxicity, senzibilizace kůže, forosenzibilizace a fotoalergenních vlastností, respirační toxicity, a nakonec vlivem na životní prostředí [36].

Prvním krokem je snaha o vyvození závěrů z již dostupných dat [36]. V případě jejich nedostatku jsou použita data a závěry získané u podobných látek. Pokud nejsou dostupné ani tyto informace, je vypočten tzv. TTC (*Threshold of Toxicological Concern*, česky „práh toxikologického rizika“). Pokud dochází k expozici v koncentracích menších, než je tento práh, je látka v podstatě prohlášena za bezpečnou. Pokud dochází k větší expozici, než je hodnota daného TTC, jsou provedeny potřebné *in vitro* a *in vivo* testy, ze kterých pak vychází toxikologické posouzení dané látky. Protokoly těchto testů jsou v drtivé většině případů standardy podle OECD, v této práci jsou pak uváděny především ty doporučené Evropskou unií.

Genotoxicita

V rámci této kategorie je zkoumán vliv látek na strukturu a funkci DNA [36]. Jsou posuzovány jak mutagenní tak klastogenní (delece nebo destrukce struktury DNA) vlastnosti. Mutagenita je posuzována např. Amesovým nebo HPRT (hypoxanthinfosforibosyltransferasa) testem. Klastogenní vlastnosti jsou podle doporučení posuzovány tzv. mikronukleárním testem.

Toxicita opakovaných dávek

Tyto testy hodnotí nepříznivé účinky způsobené expozicí chemické látky rozložené po delší dobu a zároveň na jiných místech organismu, než kde proběhla její aplikace [36]. Standardem jsou *in vitro* metabolické a dermatologické studie, v případě potřeby je pak na *in vivo* modelech studována toxikokinetika a subchronická toxicita. Stále většího významu nabývají výpočetní metody QSAR (*Quantitative Structure-Activity Relationship*).

Vývojová a reprodukční toxicita

Do této kategorie toxicity patří především zpomalení, zastavení a poruchy růstu nebo vývoje [36]. Analýza těchto případných účinků se provádí komparativně na potkaních, myších a lidských hepatocytech. Dříve bylo hojně využíváno *in vivo* testů na potkanech či jiných zvířatech.

Senzibilizace kůže

Některé chemické látky mají senzibilizační účinek na kůži a mohou tak způsobovat dermatitidy [36]. Mezi testy používané ke stanovení těchto vlastností patřily především LLNA (*Local Lymph Node Assay*), GPMT (*Guinea Pig Maximization Test*) a s ním související Buehlerův test. Jedná se především o testy *in vivo*. Dnes probíhá testování těchto vlastností pomocí kombinací alternativních *in vitro* testů. Ty monitorují především několik klíčových oblastí, které umožní data extrapolovat i na lidský organismus.

Fotosenzibilizace a fotoalergenní vlastnosti

Tento druh toxicity spočívá v podráždění pokožky, popř. vyvolání alergické reakce chemikáliemi, které jsou aktivovány světlem nebo UV zářením [36]. Pro analýzu náchylnosti k těmto účinkům se používají metody *in vitro*. Základním protokolem k analýze této problematiky je tzv. 3T3 NRU (*Neutral Red Uptake*).

Respirační toxicita

Jak již název napovídá, látky vykazující tento typ toxicity způsobují poruchy dýchací soustavy [36]. K řešení se opět používá kombinace *in vitro* modelů. Vzhledem k nízkým expozičním koncentracím se většinou nejedná o rizikový faktor.

Vliv na životní prostředí

Bioakumulace a výskyt v životním prostředí obecně jsou monitorovány pomocí screeningových programů a zároveň předpovídány *in silico* [36].

V Evropské unii není nicméně prodej kosmetiky, jejíž účinky a toxicita jsou testovány na zvířatech, od roku 2009 povolen [7]. Výše zmíněné *in vivo* testy jsou tudíž nahrazeny alternativními *in vitro* testy. Ty často nemohou postihnout plnou šíři toxického působení dané látky, používají se tedy v kombinacích několika testů dohromady. I přes množství moderních alternativních metod a jejich používání ve skupinách však mají jistá omezení vyplývající z jejich podstaty – nelze zkoumat mnohé složité interakce, které za fyziologických podmínek probíhají v organismu, často využívané nádorové buňky mají nepřírodně regulovaný metabolismus a další. Působení látek či jejich směsí se může také napříč podobně navrženými alternativními testy toxicity lišit.

2.4.3. Posouzení toxicity komplexních směsí

U směsí známého složení ale bez dat o jejich toxicitě lze toxicitu těchto směsí extrapolovat z toxicit jednotlivých obsažených složek [36]. V případě neznámého toxikologického profilů některých konstituentů lze pak tato data nahradit pomocí analogů těchto látek a stanovení TTC (a případných experimentálních stanovení).

Parfémy většinou nejsou podrobeny celkovému toxikologickému hodnocení, jak již bylo ostatně zmíněno výše [27]. Důraz pouze na jednotlivé chemikálie tak může opomenout synergické nebo aditivní efekty těchto směsí.

Tyto účinky mohou umocňovat některé nežádoucí efekty parfémových směsí a potenciálně by mohly z těchto směsí (povětšinou) neškodných látek vytvořit směs mající nežádoucí až toxické účinky [37]. Tyto potenciální účinky by se mohly projevit mnoha způsoby, např. zásahy do lidského metabolismu. Navíc se u drtivé většiny parfémových ingrediencí jedná o xenobiotika, neboli látky organismu cizí. Jako takové jsou také po vstupu do těla zpracovávány biotransformačními systémy, mezi něž patří monooxygenasové komplexy obsahující cytochromy P450.

2.5. Cytochromy P450

Cytochromy P450 jsou membránové hemoproteinové monooxygenasy, které zprostředkovávají velkou část metabolismu xenobiotik, mastných kyselin, eikosanoidů a steroidních sloučenin [38]. Účastní se zpracování až 70 % léčiv [39] a jako katalyzátory působí ve většině redoxních enzymatických reakcí v lidském těle [40].

Cytochromy P450 (CYP) jsou v lidských buňkách kódovány celkem 57 geny a 58 pseudogeny [41]. Těchto 57 exprimovaných CYP se v lidském organismu dělí do celkem 18 rodin [42] a přes čtyřiceti podrodin [43].

2.5.1. Historický úvod

V roce 1958 byl při studiích mikrosomálního cytochromu b_5 popsán neznámý „pigment“, který po redukci a následném sycení roztoku plynným oxidem uhelnatým vykazoval jediný absorpční pás při 450 nm [44]. Po rozpoznání hemoproteinové podstaty tohoto pigmentu díky rozporům v obsahu mikrosomálního hemu a výše zmíněné vazbě oxidu uhelnatého byl tento protein, původně považovaný za jeden z tamních cytochromů, nazván cytochrom P450 [45, 46, 47]. Písmeno P v tomto názvu značí pigment, podle původního provizorního názvu v jedné z pilotních studií.

Následujících dvacet let výzkumu těchto enzymů bylo věnováno především objasnění jejich funkce a struktury [48]. S využitím metod molekulární biologie bylo na přelomu tisíciletí popsáno mnoho cytochromů P450 živočichů, rostlin i bakterií. Dnes

počty známých CYP dosahují zhruba několik desítek tisíc, a je proto nutné je zařadit do dostatečně flexibilního nomenklaturního systému a současně je kategorizovat.

2.5.2. Členění a nomenklatura

Dnešní názvosloví a členění cytochromů P450 vychází z doporučení vypracovaného D. W. Nebertem et al. v článku z roku 1987 [49]. To bylo následně revidováno podobným kolektivem v letech 1989 [50], 1991 [51] a nakonec v roce 1993 [52], kdy byla nomenklatura uvedena do dnešní podoby (až na některé formální detaily týkající se ale především jiných organismů než člověka, např. aktualizace z roku 1996 od stejné komise [53]).

Současné názvosloví cytochromů P450 (jinak také obecně pouze CYP) tak spočívá v rozdělení nadrodiny CYP na rodiny a podrodiny [53, 54]. Název vždy tvoří základ „CYP“ a k němu se připojuje arabskou číslice značící rodinu. Za tento identifikátor se pak připojí velké tiskací písmeno určující podrodinu. Jednotlivé enzymy v rámci jedné rodiny se pak rozlišují opět arabskými číslicemi.

Pojmy rodina a podrodina jsou definovány pomocí shody sekvence aminokyselin v proteinových řetězcích CYP, vychází tedy z genetické příbuznosti jednotlivých proteinů [53, 54]. Původně uměle stanovené hranice obou kategorií se ukázaly jako výhodné a robustní – schopné pojmut velké množství nových CYP. Ve výsledku se tedy používají i v současnosti. Rodina je definována jako množina cytochromů P450 mající shodu ve více než 40 % svojí aminokyselinové sekvence. Podrodina je obdobně dána více než 55% shodou v primární struktuře. I když je sekvenční shoda nejdůležitějším faktorem při určování zařazení nového CYP, poslední slovo má vždy názvoslovná komise, přičemž kromě této podobnosti rozhodnutí zohledňuje i metabolické okolnosti a strukturu daného enzymu.

2.5.3. Struktura

Cytochromy P450 mají obecně poměrně konzervovanou terciární strukturu [38]. To se většinou týká α -helixů v okolí aktivního místa obsahujícího hem, s dílčími odchylkami umožňujícími substrátovou specifitu [55]. Před jedním z těchto α -helixů se vyskytuje β -smyčka obsahující vysoce konzervovanou sekvenci aminokyselin zahrnující mj. fenylalanin, glycin, bazický zbytek a především cystein. Ten působí jako axiální ligand hemového železa a ve formě hemthiolátového Fe^{II} -CO komplexu je zodpovědný za specifické spektrální vlastnosti všech CYP, totiž za typický absorpční pás při 450 nm. Mezi hemoproteiny nejsou tyto spektrální vlastnosti obvyklé.

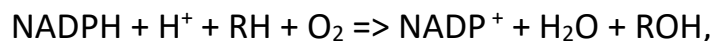
Aktivní místo lemované několika α -helixy a hemem se napříč cytochromy P450 poměrně liší [38]. Tuto skutečnost lze zdůvodnit různorodostí substrátů zpracovávaných jednotlivými členy této nadrodiny (viz Tab. 2 na další stránce).

Tab. 2 – Přehled dělení cytochromů P450 podle druhu jejich substrátu, převzato z [56]

Xenobiotika	Steroidy	Mastné kyseliny	Vitamíny	Eikosanoidy	Neznámé
1A1	1B1	2J2	2R1	2U1	2A7
1A2	7A1	2S1	24A1	4F2	4X1
2A6	7B1	2U1	26A1	4F3	20A1
2A13	8B1	4A11	26B1	4F8	
2B6	11A1	4A22	27A1	5A1	
2C8	11B1	4B1	27B1	8A1	
2C9	11B2	4F11	27C1		
2C18	17A1	4F12			
2C19	19A1	4F22			
2D6	21A2	4V2			
2E1	27A1	4Z1			
2F1	39A1				
2W1	46A1				
3A4	51A1				
3A5					
3A7					
3A43					

Velikost aktivního místa je také značně proměnlivá – jedním z nejmenších disponuje CYP2E1 (190 Å³), což koresponduje s jeho substrátovou specifitou [38, 57]. Ta je poměrně vyhraněná a vyznačuje se preferencí menších substrátů [57]. Naopak jedno z největších aktivních míst má CYP3A4, a to konkrétně 1386 Å³ [58]. Velikost aktivního místa opět určuje substrátovou specifitu – především velké molekuly, v případě menších substrátů pak byla zaznamenána přítomnost několika molekul v aktivním místě najednou [58]. Dalšími faktory určujícími substrátovou specifitu jsou především tvar aktivního místa a dostupné vazebné a nevazebné interakce s aminokyselinami okolního proteinového řetězce.

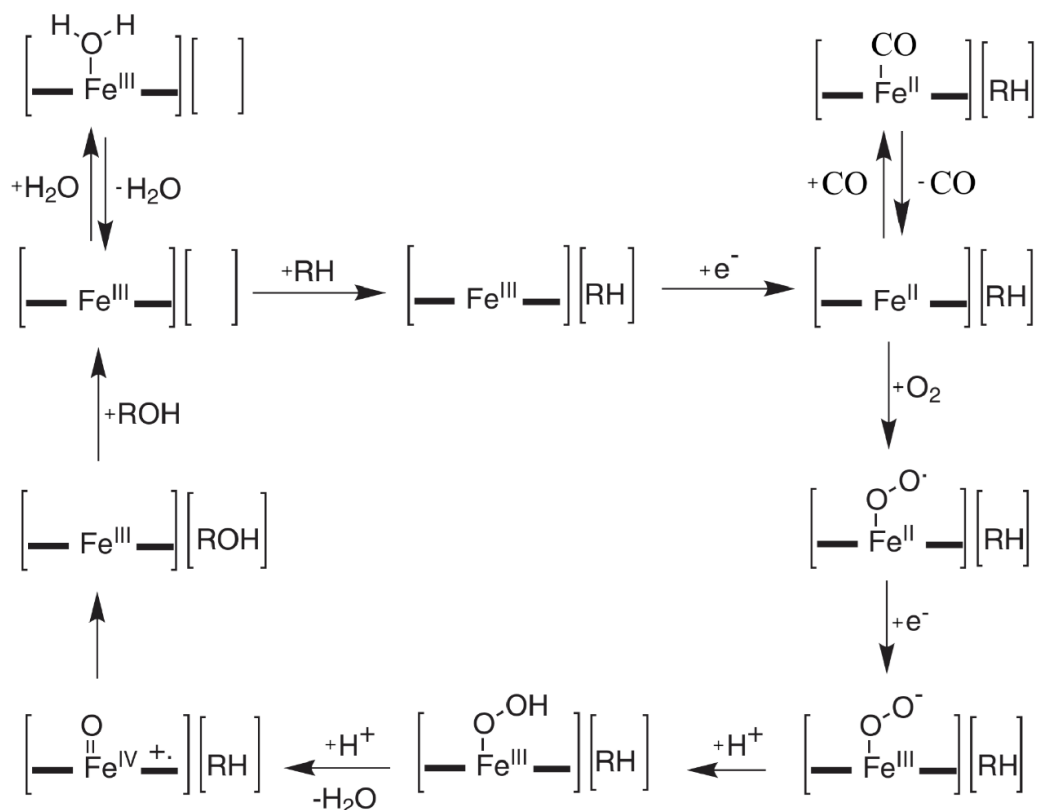
Substráty cytochromů P450 jsou obecně látkami hydrofobní povahy [59]. Nejčastějším substrátem napříč CYP (viz Tab. 2 výše) jsou již zmíněná xenobiotika. Cytochromy P450 zpracovávají tyto látky především v tzv. první fázi biotransformace, v rámci které jsou do nich obecně zaváděny (nebo jsou odkryvány) polární funkční skupiny. Polarizace substrátů dosahují CYP pomocí jejich hydroxylace, reakce jimi katalyzovaná má pak tvar:



kde R představuje hydroxylovaný substrát [38]. Stejný reakční mechanismus využívají v podstatě všechny cytochromy P450, ať už při metabolismu xenobiotik, steroidních hormonů nebo dalších endogenních látek. Často se tak však děje s různým konečným výsledkem, dochází tak např. k desaturaci, tvorbě dvojné vazby nebo aromatizaci původně nearomatického systému [38].

2.5.4. Reakční cyklus

Pro reakční cyklus cytochromů P450 je zdaleka nejdůležitějším atomem hemové železo přítomné v aktivním místě [60]. V nepřítomnosti substrátu je šestým ligandem jinak pentakoordinovaného Fe^{III} molekula vody. Substrát svojí přítomností tuto vodu vytěsňuje a iniciuje tak celý katalytický cyklus. V následujícím kroku dojde k redukci železa na Fe^{II} , což umožní vazbu molekulárního kyslíku (resp. molekuly oxidu uhelnatého, která tvoří výše zmiňovaný $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-CO}$ komplex). Vzniklý intermediát je opět redukován za vzniku komplexu Fe^{III} a peroxidového aniontu. Distální kyslík v dalších krocích přijme dva protony a heterolytickým štěpením vazby se oddělí jako molekula vody. Vzniklý $(\text{Fe}^{\text{IV}}\text{O})^{\cdot+}$ komplex následně provede samotnou hydroxylaci. Celý komplex se tak po uvolnění produktu dostane do počátečního stavu. Schéma popsaného cyklu je zobrazeno na Obr. 3 níže.



Obr. 3 – Zjednodušené schéma katalytického cyklu CYP. Fe symbolizuje hemové železo, R představuje substrát. Převzato, zjednodušeno a upraveno z [60].

Výše popsaný katalytický cyklus je velmi zjednodušený, může dojít k mnoha jevům, které tento proces komplikují – např. k disociaci substrátu v některém z kroků, k tvorbě peroxidu vodíku či jeho aniontu apod.

Z přechozího odstavce jasně plyne potřeba redoxního partnera pro cytochromy P450. Tímto partnerem je pro v podstatě pro všechny mikrosomální cytochromy P450 enzym nazvaný NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasa, zkráceně též CYPOR (EC 1.6.2.4).

Jedná se o membránový enzym, který v případě savčího systému lokalizovaného v endoplazmatickém retikulu obsahuje oba flavinové kofaktory, FMN (flavinmononukleotid) i FAD (flavinadenindinukleotid), náleží tak do rodiny tzv. diflavinových oxidoreduktas [61]. Molekula tohoto proteinu se skládá celkem ze tří domén. První doménou je doména vázající FMN, která zároveň svou částí zprostředkovává ukotvení v membráně endoplasmatického retikula. Na ní je napojena spojovací doména, která obsahuje mimořádně pohyblivý úsek umožňující vzájemný pohyb obou flavinových domén. Poslední částí tohoto enzymu je doména vázající FAD.

CYPOR existuje na membráně ve dvou konformacích, mezi kterými volně přechází – otevřenou a uzavřenou [61]. V otevřené konformaci jsou obě flavinové domény od sebe vzdáleny, v uzavřené jsou naopak v přímém kontaktu a je tak umožněn přímý přenos elektronů mezi oběma kofaktory.

Prvním částí tohoto enzymu nutnou k jeho redoxní aktivitě je doména vázající FAD [61]. Dochází zde totiž k přenosu hydridového aniontu z NADPH (nikotinamidadenindinukleotidfosfát v redukovaném stavu), na vázaný isoalloxazinový kofaktor [62]. K tomuto přenosu dochází ve zmíněné otevřené konformaci, kdy je FAD stericky přístupné pro látky z roztoku. Po přechodu do uzavřené konformace pak může dojít k přenosu elektronů na FMN. Návrat do otevřené konformace pak umožní interakci redukovaného mononukleotidového kofaktoru s redoxními partnery CYPOR.

Mezi tyto akceptory elektronů patří primárně všechny mikrosomální CYP, hemoxygenasa, skvalenepoxidasa a cytochrom b₅ [63]. V některých případech může také CYPOR fungovat jako enzym zprostředkující redoxní přeměny nízkomolekulárních látek. Mezi známé substráty patří např. derivát vitamínu K lapachol [64], mitomycin C [65] nebo tirapazamin [66].

Některé látky mají také schopnost modulovat aktivitu CYPOR. Mezi její inhibitory patří mj. kation difenyljodu [67], kyselina α -lipoová [68] a flavonoidy quercetin a morin [69]. Jako stimulant její aktivity působí např. α -naftoflavon [69].

Jak již bylo zmíněno výše, mezi redoxní partnery CYPOR se řadí i cytochrom b₅, který zřejmě patří mezi modulátory aktivit alespoň některých CYP a zároveň by také mohl působit jako jejich redoxní partner [70]. Jeho role není nicméně napříč cytochromy P450 jednotná a úloha donora elektronů je do jisté míry kontroverzní [71].

2.5.5. Expresní systémy pro výzkum membránových enzymů

Společně s CYP tvoří CYPOR (a cytochrom b₅) tzv. mikrosomální oxygenasový systém, který je zodpovědný za metabolismus širokého spektra chemických látek. Jedná se však o systém vázaný na membránu endoplazmatického retikula a je nutné ho zkoumat v tomto, nebo aspoň podobném prostředí, tj. na některé z buněčných membrán. V průběhu času bylo pro studium membránových proteinů vyvinuto několik expresních systémů, přičemž mezi nejpoužívanější se řadí baktosomy, bakulosomy a mikrosomy.

Baktosomy jsou membránovou frakcí izolovanou z bakteriálních buněk [72, 73]. Nejčastěji se pro rekombinantní expresi membránových proteinů využívá *E. coli* (především kmeny BL21(DE3) a jeho varianty, popř. C43(DE3) a C41(DE3)) [74]. Mezi nedostatky této expresní metody pro následné experimenty s takto připravenými proteiny patří především absence post-translačních modifikací – chybí nebo je omezena glykosylace, fosforylace, acylace a tvorba disulfidových můstků [75]. Problémem je také preferenční využívání některých kodonů (jiných než u eukaryot), což může způsobit chybné složení proteinu a další strukturní odlišnosti [74]. Tyto problémy je možné zmírnit využitím speciálních kmenů *E. coli*, i tak se však tento expresní systém nejlépe hodí pro přípravu malých, bezpodjednotkových proteinů (kolem 50 kDa).

Bakulosomy (obchodním názvem též *Supersomy*) jsou membránovou frakcí pocházející z endoplazmatického retikula hmyzí buňky transfekované virem z rodiny *Baculoviridae* (např. AcMNPV – *Autographa californica* multikapsidní nukleopolyhedrální virus) [72, 74]. Běžně využívanými buňkami pro tyto účely jsou buněčné linie Sf9 a Sf21 (motýl *Spodoptera frugiperda*, česky blýskavka kukuřičná), z motýla druhu *Trichoplusia ni* (česky kovolessklec cizokrajný) pocházejí pak buněčné linie Hi5 a Tnao38 [76]. Zdrojem buněk je u všech uvedených linií vaječník daného členovce. Mezi nedostatky tohoto způsobu přípravy rekombinantních proteinů patří především náročnost současné přípravy více proteinů (většinou je tedy připravován pouze jeden rekombinantní polypeptid), chyby při skládání složitějších proteinů a také problémy s komplexní N-glykosylací. Další skutečností mající vliv na aktivitu membránových enzymů je také odlišné složení buněčných membrán, a to kvůli jiné fyziologické teplotě původního organismu (buňky jsou kultivovány při 27 °C) [77].

Mikrosomy jsou nejstarším systémem pro studium mikrosomálního oxygenasového systému. Podobně jako u bakulosomů se jedná o útržky endoplazmatického retikula (přísně vzato jsou bakulosomy typem mikrosomů) [72]. Je zřejmé, že zde dochází ke kompletní sadě post-translačních modifikací proteinů v tomto systému přirozeně exprimovaných. Nevýhodou tohoto systému oproti dvěma předchozím může být menší obsah daného CYP, popř. CYPOR. Další nevýhodou může být interference metabolismu ostatních CYP se zkoumanou metabolickou dráhou.

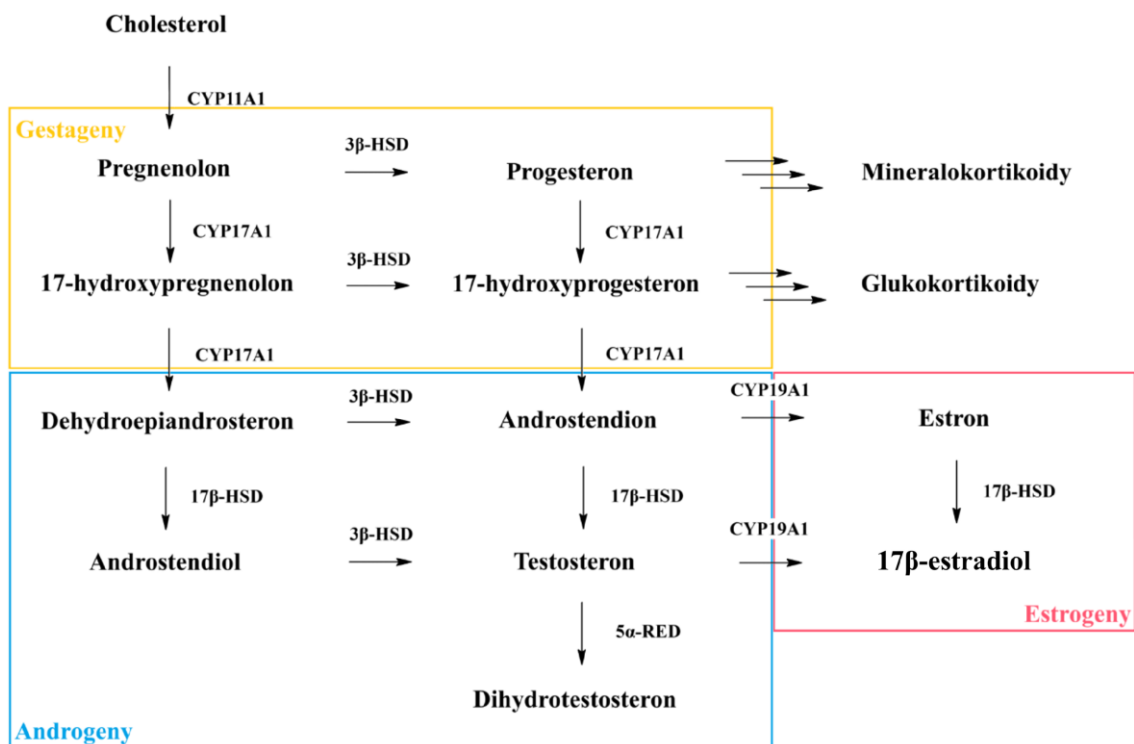
Typ tkáně pro izolace mikrosomální frakce závisí na požadovaném cytochromu P450 [42]. Expres CYP účastnících se metabolismu xenobiotik je centralizována

především v játrech a napříč jedinci se může kvantitativně (celková aktivita enzymů, vliv má také indukce jejich exprese některými látkami) a kvalitativně (díky genové výbavě jedince) poměrně lišit [78, 79]. Ze steroidogenních tkání (např. z placenty) lze pak získat druhou největší skupinu těchto enzymů, totiž cytochromy P450 účastníci se steroidogeneze. Obsah těchto CYP se mezi jedinci naopak liší jen málo, zřejmě kvůli velkému fyziologickému významu této metabolické dráhy.

2.5.6. Steroidogeneze

Steroidogeneze je metabolický proces, v rámci kterého je cholesterol přeměňován na steroidní hormony (mineralokortikoidy, glukokortikoidy a pohlavní hormony) [80]. Může probíhat několika způsoby v závislosti na cílové steroidní sloučenině, čehož je docíleno pomocí různé úrovně exprese a modulace jednotlivých enzymů v již zmíněných steroidogenních tkáních. S

První reakcí je obecně mitochondriální odštěpení bočního řetězce cholesterolu pomocí enzymu CYP11A1 [80]. Vzniklý pregnenolon je následně již vně mitochondrie přes několik meziproductů přeměněn na daný steroidní hormon. Zjednodušené schéma steroidogeneze s důrazem na syntézu pohlavních hormonů je na Obr. 4 níže.



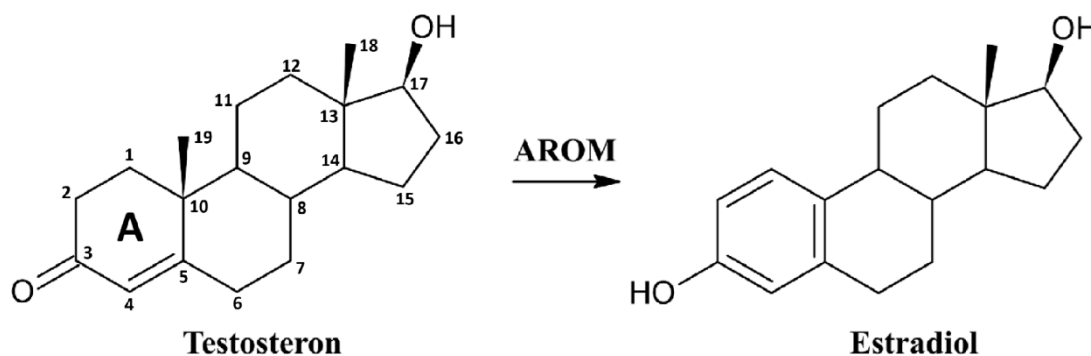
Obr. 4 – zjednodušené schéma steroidogeneze s důrazem na syntézu pohlavních hormonů. Skupiny těchto hormonů jsou ve schématu barevně vyznačeny i s legendou. Zkratky: 3β-HSD – 3β-hydroxysteroiddehydrogenasa, analogicky také 17β-HSD – 17β-hydroxysteroiddehydrogenasa, 5α-HSD – 5β-reduktasa; metabolické posloupnosti přejaty z [80] a [111].

Z Obr. 4 je zřejmé, že přeměny cholesterolu na steroidní pohlavní hormony se účastní celkem tři enzymy z nadrodiny cytochromů P450. Rychlost určující krok v této

biosyntéze zprostředkovává CYP19A1, zvaný též aromatasa (AROM): Tento enzym zprostředkovává přeměnu androgenů (mužských pohlavních hormonů, konkrétně testosteronu a androstendionu) na estrogeny (ženské pohlavní hormony, estron a 17 β -estradiol) [81].

2.6. CYP19A1 – aromatasa

Aromatasa (EC 1.14.14.14) je enzym náležící do nadrodiny cytochromů P450 [42]. Vztahuje se tedy k ní tedy většina obecných poznatků uvedených pro tuto kategorii proteinů v předchozích kapitolách. Z obou reakcí (viz Obr. 4 na předchozí straně), které aromatasa katalyzuje, bude dále diskutována především přeměna testosteronu (TST) na 17 β -estradiol (dále však bude používán především konvenční zkrácený název estradiol nebo zkratka E2). Tuto reakci lze znázornit následujícím schématem:



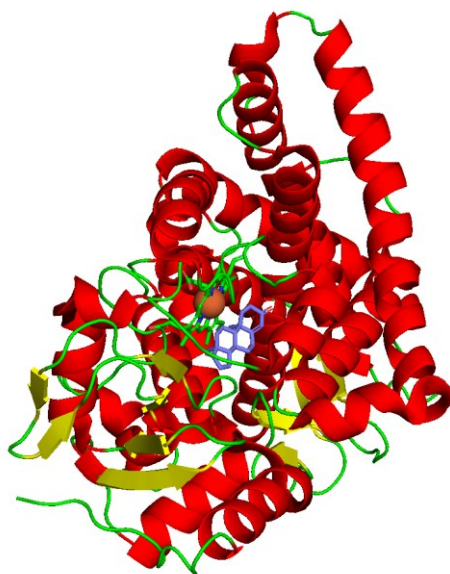
Katalyzovanou reakcí je aromatizace kruhu A v molekule androgenu, čímž dojde k přeměně na estrogen [42, 82, 83]. Při této reakci jsou spotřebovány tři moly molekulárního kyslíku a NADPH na jeden mol substrátu. Jedná se o tříkrokovou reakci, přičemž první dva kroky zahrnují hydroxylaci methylu v pozici 19 na geminální diol. Mechanismus posledního kroku není dosud jednoznačně vyřešen [84]. Dochází však k oxidačnímu odštěpení molekuly kyseliny mravenčí (původem methylu z pozice 19) a následnému přesmyku, jehož výsledkem je vznik aromatického kruhu.

Aktivní místo je schopno vázat a metabolizovat kromě obou zmíněných substrátů i další androgeny a steroidní sloučeniny, jmenovitě např. dihydrotestosteron [85], 16 α -hydroxytestosteron [42] a některé 3-deoxyandrogeny [86]. Poměrně úzká substrátová specifita je zprostředkována především iontovými vazbami, vodíkovými můstky a hydrofobní interakcí substrátu a okolních aminokyselin (např. vazba mezi 3-keto skupinou androgenů a aspartátem v poloze 309) [38].

Celková struktura aromatasy odpovídá obvyklé terciární struktuře cytochromů P450 (viz Obr. 5 na následující straně). Jedná se o první CYP, který byl vykrytalizován bez jakýchkoliv změn v aminokyselinové sekvenci [87]. V rámci post-translačních

modifikací dochází k fosforylaci na několika místech s možným regulačním významem [88] a k N-glykosylaci [89], přičemž dosud se jedná o málo prozkoumanou oblast.

Lokalizace a exprese aromatasy v lidském organismu se liší mezi pohlavími a v rámci různých období života. U mužů se AROM vyskytuje např. v Leydigových buňkách varlat, tukové tkáni, kůži některých částech mozku a v kostních buňkách [42, 90]. U premenopauzálních žen se aromatasová aktivita vyskytuje ve stejných místech. Místo v Leydigových buňkách se však těžiště aromatasové aktivity vyskytuje ve vaječnicích, které produkují drtivou většinu krevních estrogenů [5]. V období těhotenství je důležitým zdrojem estrogenů (především pro plod) fetoplacentální komplex [80]. Po menopauze však produkce estrogenů ve vaječnicích zaniká a na důležitosti nabývá aromatasu v periferních tkáních [5]. Obsah E2 (biologicky nejvíce aktivního estrogenu) v krvi však již není vysoký a primárně tak dochází k parakrinnímu a autokrinnímu působení tohoto hormonu [91].



Obr. 5 – Strukturní model aromatasy získaný krystalizací tohoto enzymu. V aktivním místě uprostřed je vázaný modře zbarvený substrát androstendion. Model je obarven podle sekundární struktury – α -helixy jsou zbarveny červeně, nestrukturované úseky a smyčky zeleně a jednotlivé β -hřebeny jsou vyznačeny žlutě. Orientace molekuly bílkoviny odpovídá její orientaci na mikrosomální membráně (ta by se nacházela zhruba ve třetině obrázku odspoda), hydrofobní částí směřuje dolů. Obrázek vytvořen v programu PyMOL (verze 3.0.4). PDB: 3EQM, struktura převzata z [87].

Narušení endokrinního metabolismu a rovnováhy estrogenů je spojeno s řadou nežádoucích stavů [4, 92]. Příčiny těchto odchylek od standardního stavu mohou být vnitřní (dědičné choroby, stáří organismu) nebo vnější (chemické agens) povahy. Látky, které obecně narušují endokrinní homeostázi se nazývají endokrinní disruptory. Mohou působit mnoha způsoby, např. inhibicí právě diskutované aromatasy.

Nedostatečná exprese či funkce aromatasy je spojena především s rizikem osteoporózy, předčasného porodu, schizofrenie a Alzheimerovy choroby [92]. Nadměrná exprese AROM je naopak typická pro některé typy rakoviny prsu, vaječníků a prostaty.

Dále jsou poruchy způsobující nadměrnou produkci estrogenů rizikovým faktorem pro obezitu, endometriózu, gynekomastii a mnohá další onemocnění.

Vzhledem k velkému počtu chorob způsobených chybnou (často zvýšenou) funkcí aromatasy jsou modulátory její aktivity (v naprosté většině inhibitory) předmětem velmi intenzivního výzkumu.

2.7. Inhibitory aromatasy

Inhibitory aromatasy (IA) se tradičně dělí na steroidní a nesteroidní. Tyto dvě skupiny se kromě struktury liší i inhibičním mechanismem.

Steroidní IA působí často jako tzv. sebevražedné substráty [82]. V aktivním místě jsou metabolizovány, následkem čehož dojde k tvorbě kovalentní vazby s enzymem. Tímto způsobem je pro další substráty znemožněn přístup do aktivního místa a enzym je tak deaktivován. Strukturně jsou tyto látky většinou podobné androstendionu. V současné době jsou klinicky využívány IA tzv. třetí generace, které vykazují méně vedlejších účinků než ty dříve používané. Typickým zástupcem této skupiny je inhibitor exemestan (viz Obr. 6 na další stránce). Dalšími steroidními IA jsou formestan nebo 4-hydroxyandrostendion.

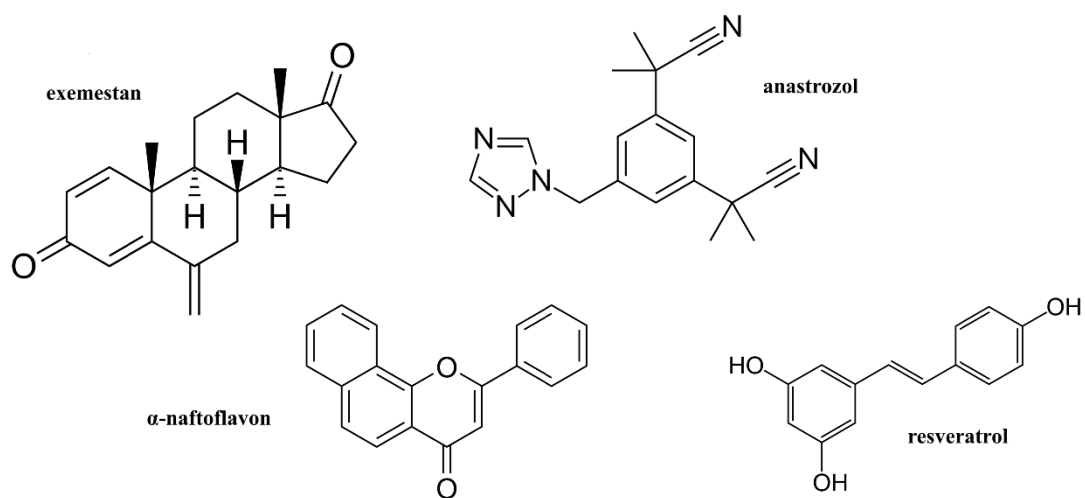
Nesteroidní IA fungují jako kompetitivní inhibitory AROM [82, 93]. Díky vazbě do aktivního místa tak soupeří o prostor v něm s androgeny. Do kategorie klinicky využívaných nesteroidních IA patří např. anastrozol (viz Obr. 6 na další stránce) a letrozol. Dalšími inhibitory jsou mj. fadrozol, vorozol a rogletimid.

Lidský organismus je vystaven i řadě environmentálních IA. Jedním z nejsilnějších nesteroidních IA je α -naftoflavon (viz Obr. 6 na další stránce) [94]. Flavonoidy často působí jako inhibitory aromatasy, především díky jisté strukturní podobnosti se substráty a produkty AROM (kruhy A a C u flavonoidů se podobají kruhům D a C u steroidních látek) [95, 96]. Mezi takové látky patří mj. chrysin, luteolin, apigenin, 8-prenylnaringenin, 7-hydroxyflavon, biochanin A a hesperetin [97].

Mezi další složky potravy inhibující AROM patří (-)-gossypol a resveratrol (viz Obr. 6 na další stránce) [95]. K biocidním látkám vykazujícím tyto účinky se řadí mořidlo kaptofol, fungicid ziram a prochloraz, dále také triklosan, lindan a tributylecín. Insekticid DDT ve vysokých dávkách vykazuje podobné účinky. Bisfenol-A je také modulátorem aktivity aromatasy, nicméně jeho přesný účinek závisí na intenzitě a délce expozice.

Některé látky obsažené v parfémeh a podobných přípravcích mohou také působit jako IA. Jedná se např. o parabeny (především methyl- a propylparaben) a kyselinu hydroxybenzoovou [98]. Mezi pravděpodobné inhibitory patří syntetické polycyklické pižmo tonalid [99]. Jiná skupina látek může regulovat aktivitu aromatasy na úrovni její transkripce. Patří sem mj. diethylftalát [100], a některé benzofenony [101].

Mnohé přírodní směsi (extrakty z plodů révy vinné, popř. červeného vína, některých rostlin a hub) byly také označeny jako IA [95, 102]. V nedávné pilotní studii s bakulosomálními preparáty byly jako IA prokázány také některé parfěmy [6].



Obr. 6 – Vybrané příklady inhibitorů aromatasy.

3. Cíle práce

Hlavním cílem předkládané bakalářské práce bylo porovnat účinky parfémů na aktivitu CYP19A1 v různých biologických systémech. Jako dílčí úkoly byly stanoveny tyto:

- Izolovat z lidské placenty mikrosomální frakci a provést její charakterizaci.
- Posoudit vliv vybraných parfémů na aktivitu lidské placentární mikrosomální aromatasy.
- Kvantifikovat tento vliv a porovnat s vlivem parfémů na aromatasu exprimovanou v bakulosomálním systému.
- Porovnat vliv parfémů na NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasu v mikrosomálním, bakulosomálním a baktosomálním expresním systému.

4. Materiály a metody

4.1. Použité chemikálie

Linde (Irsko): Oxid uhelnatý

Lach:ner (ČR): chlorid draselný (p.a.), Chelaton III (p.a.), glycerol bezvodý (p.a.), kyselina chlorovodíková (35 %, p.a.), dihydrát dihydrogenfosforečnanu sodného (p.a.), dihydrát dihydrogenfosforečnanu draselného (p.a.)

NzyTech (Portugalsko): tris(hydroxymethyl)aminomethan (>99,9 %),

Penta (ČR): dithioničitan sodný (čistý)

VWR Chemicals (USA): Methanol (vhodný pro HPLC), diethylether bezvodý (>99,8 %), ethylacetát bezvodý (>99,8 %), n-hexan (Reag. Ph. Eur.),

Lachema (ČR): Kyselina sírová (96 %, p.a.), pyrofosforečnan sodný (p.a.), amoniak (25% vodný roztok, p.a.)

Reanal (Maďarsko): sodná sůl NADPH

Sigma Chemical Company (USA): 17 α -ethinylestradiol (>98 %)

Fluka Analyticals (Švýcarsko): Testosteron (čistý), (\pm)- α -tokoferol (>97 %)

Merck (Německo): 17 β -estradiol (>99%)

Montale Paris (Francie): *Parfém 1 – INTENSE Roses Musk*; *parfum* (parfém (vůně), denaturovaný alkohol, voda, citronellol, limonen, geraniol, citral, linalool);

Interparfums (Francie): *Parfém 2 – Karl Lagerfeld For Her*; *eau de parfum* (parfém (vůně), denaturovaný alkohol SD 39-C, voda, ethylhexylmethoxycinnamát, benzylsalicylát, limonen, hexylcinnamal, hydroxycitronellal, linalool, ethylhexylsalicylát, butylmethoxydibenzoylmethan, geraniol, α -isomethyljonon, BHT, citral, citronellol, benzylalkohol, isoeugenol, CI 14700 (červeň 4), CI 15985 (žlut' 6), CI 19140 (žlut' 5), CI 60730 (ext. fialová 2)

Vzorky placentární tkáně – ze Zemské porodnice u svatého Apolináře.

Corning Gentest (USA): lidská CYP19A1+CYPOR

(Supersomy, koncentrace CYP 1 μ M)

Cypex (Velká Británie): lidská CYPOR

(Baktosomy, koncentrace CYPOR 10,4 μ M)

Thermo Fischer Scientific (USA): Pierce BCA Protein Assay – Reducing Agent Compatible

4.2. Použité přístroje

Centrifugy:	EBA 270 (Hettich, Německo) Allegra X-30R Centrifuge (Beckman Coulter, USA)
Ultracentrifuga:	Optima XPN-90 Ultracentrifuge (Beckman Coulter, USA) rotory 45Ti a 70 Ti
Analytické váhy:	DV215CD (OHAUS, USA)
Předvážky:	440-35A (Kern, Německo)
pH metr:	HI 2211 pH/ORP Meter (Hanna Instruments, USA)
Magnetická míchačka:	RH basic 2 (IKA, Německo)
Spektrofotometr:	Specord 250 Plus (Analytik Jena, Německo) Sunrise (Tecan, Švýcarsko)
Homogenizační motor:	RW16 basic (IKA, Německo)
Inkubační zařízení:	IB-01E a BS-11 (JeioTech, Jižní Korea)
Centrifug. koncentrátor:	RC 10.22. (Jouan, Francie)
Vortex:	Maxi Mix II (Thermolyne, USA)
TLC destičky:	silikagel na hliníkové fólii, 60 F ₂₅₄ (Merck, Německo)
Automatické pipety:	Research Plus (Eppendorf, Německo)
Mikrostríkačky:	Hamilton, (USA)
HPLC/MS:	
HPLC:	Agilent 1290 Infinity II s binární pumpou (Agilent Technologies, Německo)
MS:	maXis Q-TOF s ESI (Bruker Daltonics, Německo)

4.3. Použité metody

4.3.1. Izolace placentární mikrosomální frakce

Použité roztoky a materiál:

Pufry

Homogenizační pufr (pufr 1): 0,15 M KCl; 50 mM Tris/HCl; 1 mM EDTA, 20 μ M vitamín E
Rozpuštěno v destilované vodě; pH = 7,4

Pufr 2: 0,1 M Na₄P₂O₇; 1 mM EDTA
Rozpuštěno v destilované vodě; pH = 7,2

Uchovávací pufr (pufr 3): 0,15 M KCl; 50 mM Tris/HCl; 1 mM EDTA, 20 % (v/v) glycerol
Rozpuštěno v destilované vodě, pH = 7,4

Placentární tkáň

Pro bližší informace viz Tab. 3 níže.

Tab. 3 – Charakteristika vzorků placent použitých pro přípravu mikrosomální frakce

Původ tkáně	První dárcce		Druhý dárcce		Třetí dárcce
Stav tkáně	Mražená*	Mražená	Čerstvá	Mražená	Čerstvá
Mikrosomální frakce	1	2	3	4	5

* mražená tkáň byla uchována při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$

Postup

Celá procedura probíhala při $5\text{ }^{\circ}\text{C}$. Všechny potřebný materiál byl předem vychlazen na tuto teplotu. Byla použita metodika podle van der Hoevena a Coona (1974) [103].

Tkáň určená k izolaci byla nejprve zvážena a nakrájena na co nejmenší kousky. Následně byla nastříhána a odkrvena v homogenizačním pufru (o zhruba trojnásobném objemu, než činila hmotnost tkáně, 1 ml odpovídá 1 g). Elektricky poháněným teflonovým pístem byla následně ve skleněném homogenizátoru podle Pottera-Elvehjema homogenizována ve zhruba čtyřnásobném objemu homogenizačního média. Vzniklý homogenát byl přefiltrován přes čtyři vrstvy gázy a centrifugován po 10 min při 600 g a $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Allegra X-30R, rotor SX4400). Supernatant byl odlit a znovu centrifugován (16 000 g, 20 min, $5\text{ }^{\circ}\text{C}$, Allegra X-30R, rotor F0630). Supernatant připravený touto centrifugací byl pak opatrně odlit a tím oddělen od tzv. jemně sedlé vrstvy.

Následně byl tento supernatant ultracentrifugován (235 000 g, 90 min, 5 °C, XPN-90, rotor 45Ti). Vzniklé pelety byly homogenizovány v pufru 2 (zhruba polovina množství homogenizačního média použitého při homogenizaci).

Vzniklý homogenizát byl opět ultracentrifugován (425 000 g, 65 min, 5 °C, XPN-90, rotor 70Ti). Získané pelety byly resuspendovány v pufru 3 (přibližně 1/50 množství pufru 2). Získaný mikrosomální preparát byl uložen v kapalném dusíku po malých dávkách až do jeho spotřeby.

4.3.2. Stanovení celkové koncentrace bílkoviny metodou BCA

Použité roztoky:

Komerčně dostupná sada „Pierce BCA Protein Assay – Reducing Agent Compatible“ od *Thermo Fischer Scientific* – roztoky A a B

Postup

Bylo využito metody podle Smith et al. (1985) [104], která je založena na měření absorbance komplexu kyseliny bicinchoninové s měďnými kationty, které vznikají redukcí měďnatých kationtů v roztoku s peptidovou vazbou.

Z rozmraženého mikrosomálního preparátu byly připraveny 10×, 20× a 50× ředěné roztoky v destilované vodě. Na mikrotitrační destičku byly aplikovány (vždy v množství 9 µl do jedné jamky) triplet blanku (destilovaná voda), duplikáty již připravených standardů obsahujících bílkovinu BSA (v koncentracích 2; 1,5; 1; 0,75; 0,5; 0,25 a 0,125 mg/ml) a všechna tři ředění mikrosomálního preparátu v triplicátech. Následně byl připraven „pracovní roztok“ smícháním jednoho dílu činidla B a padesáti dílů činidla A z výše uvedené komerční sady. Do každé použité jamky bylo přidáno 250 µl pracovního roztoku.

Mikrotitrační destička byla pak po 30 min inkubována při 37 °C. Po uplynutí této doby byla na přístroji Tecan Sunrise změřena absorbance v jednotlivých jamkách při 562 nm. Z absorbancí BSA standardu byla sestavena kalibrační křivka a z její směrnice a dat získaných pro triplety vzorků byla vypočtena jejich celková koncentrace bílkoviny.

4.3.3. Stanovení celkové koncentrace cytochromů P450

Použité roztoky:

Pufr: 0,1 M draselnofosfátový (KH_2PO_4)
Rozpuštěno v destilované vodě; pH = 7,4

Postup

Stanovení bylo prováděno podle Omury a Sata (1964) [47] na základě schopnosti CYP v redukovaném stavu vázat oxid uhelnatý a vykazovat pak absorpční pás při 450 nm.

Mikrosomální preparát byl v použitém pufru (0,1 M draselnofosfátový) naředěn na zhruba 1 mg/ml (výsledný objem 2,4 ml). Vzniklý roztok byl promíchán zpětným nasáváním do špičky pipety a následně rozdělen do dvou skleněných kyvet s maskováním o objemu přibližně 1 ml a optické dráze 1 cm. Obě kyvety byly jednu minutu syceny plynným oxidem uhelnatým. Následně byly obě kyvety promíchány a vloženy do spektrofotometru (Spekord 250 Plus). Bylo proměřeno referenční spektrum mezi 350 a 500 nm. Jedna z kyvet (vzorková) byla redukována několika mg pevného $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ a promíchána zpětným nasáváním do špičky pipety. Následně bylo proměřeno diferenční spektrum (o stejném rozsahu), z něhož byla určena absorbance při 450 a 490 nm.

Rozdíl těchto absorbancí byl vyjádřen jako $\Delta A_{450-490}$. Celková koncentrace CYP v preparátu byla určena ze vztahu:

$$c_{CYP} = \frac{\Delta A_{450-490}}{\varepsilon \cdot l} \cdot \text{ředění},$$

kde $\Delta A_{450-490}$ je rozdíl absorbancí při 450 a 490 nm,

c_{CYP} je koncentrace CYP v preparátu (v $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$),

ε je molární absorpční koeficient CYP ($0,126 \text{ dm}^3 \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \mu\text{mol}^{-1}$),

l je optická dráha kyvety v cm (u používané kyvety 1 cm).

Specifický obsah CYP byl poté vypočten následujícím způsobem:

$$s. o. CYP = \frac{c_{CYP}}{c_{\text{bílkovina}}},$$

kde c_{CYP} je výše vypočtená koncentrace CYP v preparátu,

s.o. CYP je specifický obsah CYP v preparátu,

$c_{\text{bílkovina}}$ je celková koncentrace bílkoviny určená metodou BCA.

4.3.4. Stanovení aktivity NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasy

Použitý materiál:

Reakční pufr:	0,3 M draselnofosfátový (KH ₂ PO ₄) Rozpuštěno v destilované vodě; pH = 7,4
Cytochrom c:	5 mg/ml roztok v destilované vodě
NADPH	10 mM roztok v destilované vodě
Parfémy 1 a 2	1,5× ředěný roztok v methanolu

Postup

Aktivita CYPOR byla stanovena podle Dignama a Strobela (1977) [105] na základě časové změny absorbance redukované formy cytochromu c při 550 nm.

Přímo do skleněné kyvety s maskováním (optická dráhy 1 cm, objem kyvety přibližně 1 ml) byla připravena reakční směs v objemu 1000 µl reakčního pufru. Finální koncentraci cytochromu c činila 0,5 mg/ml. Dále reakční směs obsahovala, v závislosti na experimentu, přibližně 4 nM mikrosomální CYP (stanovení aktivity mikrosomálních preparátů), nebo 4 nM baktosomální CYPOR (při stanovení její aktivity), nebo 4 nM rekombinantní bakulosomální AROM (při stanovení aktivity obsažené CYPOR).

Při stanovení aktivity CYPOR v přítomnosti parfémů byl také do vzorku přidán methanol, nebo testovaný parfém. U parfému byla testována celková ředění 300× a 150×. Methanol byl do roztoků přidáván do finálního ředění 100× (kontrolní methanolová reakce bez parfému), 200× (reakce s 300× ředěným parfémem; přídavek 1:1 parfém a methanol) anebo vůbec (kontrolní reakce bez methanolu, reakce se 150× ředěnými parfémy).

Po výše popsaném sestavení reakční směsi a promíchání zpětným nasáváním do pipety byla změřena absorbance reakční směsi při 550 nm jako blank (na spektrofotometru Spekord 250 Plus). Do kyvety bylo následně přidáno 10 µl 10 mM roztoku NADPH. Reakční směs byla pak rychle promíchána technikou zpětného nasávání do špičky pipety a po 4 min byl na výše zmíněném spektrofotometru měřen přírůstek absorbance při 550 nm. Absorbance byla měřena každých 10 s.

Z počátečního lineárního úseku získané křivky byla následně vypočtena aktivita CYPOR podle vztahu:

$$a_{\text{CYPOR}} = \frac{\Delta A}{\epsilon \cdot l \cdot t} \cdot \text{ředění} ,$$

kde a_{CYPOR} je aktivita CYPOR (v µmol cyt c · min⁻¹ · ml⁻¹)

ΔA je rozdíl absorbancí na počátku a konci lineárního úseku křivky,
 ϵ je molární absorpční koeficient CYPOR ($21 \text{ dm}^3 \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$),
 l je optická dráha kyvety v cm (u používané kyvety 1 cm)
 t je čas registrace absorbance na konci lineárního úseku (resp. doba, po kterou byla závislost lineární).

Specifická aktivita CYPOR byla následně vypočtena podle vztahu:

$$s. a. CYPOR = \frac{a_{CYPOR}}{c_{\text{bílkovina}}},$$

kde a_{CYPOR} je výše stanovená aktivita CYPOR,

$s. a. CYPOR$ je specifická aktivita CYPOR,

$c_{\text{bílkovina}}$ je celková koncentrace bílkoviny určená metodou BCA.

4.3.5. Stanovení aktivity aromatasy s TLC nebo HPLC/MS vyhodnocením

Použité roztoky:

Pufr:	0,1 M sodnofosfátový (NaH_2PO_4) Rozpuštěno v destilované vodě; pH = 7,4
Testosteron (TST):	5 mM roztok v methanolu
Estradiol (E2):	5 mM roztok v methanolu
Standard pro TLC:	přibližně 0,5 mM E2 a 1,25 mM TST v ethylacetátu
NADPH:	10 mM roztok v destilované vodě
Mobilní fáze (MF) pro TLC:	1 díl hexanu na 4 díly diethyletheru
Vyvolávací roztok:	10 % (v/v) kyselina sírová
Vnitřní standard pro MS:	0,5 mM roztok ethinylestradiolu v methanolu
Parfémy 1 a 2:	1,5× ředěný roztok a 3× ředěný roztok v methanolu

Postup

Do skleněných silnostěnných zkumavek byla v připravena reakční směs o složení: reakční pufr (0,1 M sodnofosfátový, pH = 7,4), 50 μ M TST a mikrosomální preparát (v konečné koncentraci bílkoviny přibližně 1 mg/ml). Koncentrace jsou vztaženy na celkových 500 μ l reakční směsi, tedy až po přidavku NADPH.

Při experimentech posuzujících aktivitu aromatasy v přítomnosti parfémů byly do směsi přidávány také parfémy, a to v celkovém ředění 150 \times a 300 \times (v závislosti na konkrétní reakční směsi). V případě porovnávání aromatasové aktivity byly proměnnou mezi jednotlivými reakčními směsmi mikrosomální preparáty, při studiu interakce s parfémů byl naopak ve všech směsích použit preparát stejný a proměnnou byl přidavek parfémů.

Při porovnání inhibičních účinků parfémů mezi expresními systémy (s HPLC/MS vyhodnocením) byly v roztoku přítomné parfémy ředěné 300 \times , v kontrolní reakci byl naopak 100 \times ředěný methanol. Mikrosomální preparát byl v odpovídajících reakčních směsích naředěn přibližně na koncentraci CYP 34 nM, rekombinantní aromatasu byla v daných reakčních směsích přítomna v koncentraci 30 nM.

Tyto reakční směsi byly po 5 min při 37 $^{\circ}$ C preinkubovány. Reakce byla iniciována přidavkem NADPH (jehož koncentrace ve výsledné reakční směsi byla 1 mM). Zkumavky s reakční směsí byly pak po 30 min při 37 $^{\circ}$ C inkubovány. Reakce byla ukončena přidavkem 1,5 ml ethylacetátu. Při experimentech s HPLC/MS vyhodnocením byl do směsi přidáván po ukončení reakce vnitřní standard 17 α -ethinylestradiol (přídavek činil celkem 10 μ l zásobního roztoku). Jeho celková koncentrace byla v celé směsi 2,5 μ M (tj. v reakční směsi i s 1,5 ml ethylacetátu).

Reakční směsi byly pak podrobeny vířivé extrakci na vortexu (75 s) a následně centrifugaci (2 min, 1700 g, EBA 270 s výkyvným rotorem). Dále byl odebrán 1 ml organické fáze do malých skleněných zkumavek. Ty byly následně umístěny do centrifugačního koncentrátoru a po 45 minut byla organická fáze odpařována za laboratorní teploty. Odparek byl smyt 125 μ l ethylacetátu a organická fáze byla znovu ponechána se odpařit za stejných podmínek. Výsledný odparek byl pak smyt 20 μ l ethylacetátu.

Experimenty s TLC vyhodnocením

Mezitím byla TLC destička (silikagel na hliníkové fólii) po 30 min aktivována při 120 °C. Po této době byly poznačeny startovní pozice a startovní linie. Připravená mobilní fáze byla probublána 50 cm³ plynného amoniaku.

Na aktivovanou destičku byly nanесeny jednotlivé vzorky a standardy a následně bylo provedeno samotné TLC (mobilní fáze: 1 díl hexanu na 4 díly diethyletheru). Po jeho ukončení a označení polohy chromatografického čela byla destička vyvolána 10 % kyselinou sírovou a následně byla zahřívána pomocí fénu až do úplné vizualizace.

Vyhodnocení probíhalo subjektivně posouzením velikosti žluté skvrny estradiolu v jednotlivých drahách.

Experimenty s HPLC/MS vyhodnocením

Místo aplikace na TLC destičku bylo 20 µl ethylacetátu s rozpuštěným odparkem znovu odpařeno. Takto připravené vzorky byly předány na HPLC/MS analýzu, kterou prováděl RNDr. Tomáš Ječmen, PhD podle Drejslarové et al. [6].

Analýza HPLC probíhala gradientovou elucí na reverzní fázi. Hmotnostní spektrometrie probíhala na přístroji složeném z kvadrupólového filtru a *time-of-flight* analyzérem. Přístroj byl opatřeným zdrojem s elektrosprejovou ionizací. Ze získaných chromatogramů byly pomocí MS identifikace připraveny tzv. extrahované iontové chromatogramy, zobrazující pouze relevantní ionty. Na těchto získaných datech byla pak provedena integrace jednotlivých píků pro E2 a EE2. Plocha estradiolového píku pak byla vztažena na plochu píku ethinylestradiolového. Ze získaného poměru a známé koncentrace EE2 v jednotlivých reakčních směsích byla dopočtena koncentrace E2.

5. Výsledky

5.1. Izolace a charakterizace mikrosomálních preparátů

Metodou frakční centrifugace podle Hoevena a Coona (1974) [103] bylo připraveno celkem pět mikrosomálních placentárních frakcí. Výsledky jejich charakterizace pomocí metod uvedených v kapitole 4.3 jsou shrnuty v Tab. 4 níže. Příklad subjektivního vyhodnocení aromatasových aktivit získaných preparátů je na Obr. 7 na následující stránce. Na Obr. 8 (také na následující stránce) je pak reprezentativní spektrum naměřené při stanovení celkové koncentrace CYP a na Obr. 9 (str. 46) je reprezentativní průběh redukce cytochromu c při stanovení aktivity CYPOR.

Tab. 4 – Charakterizace jednotlivých mikrosomálních preparátů.

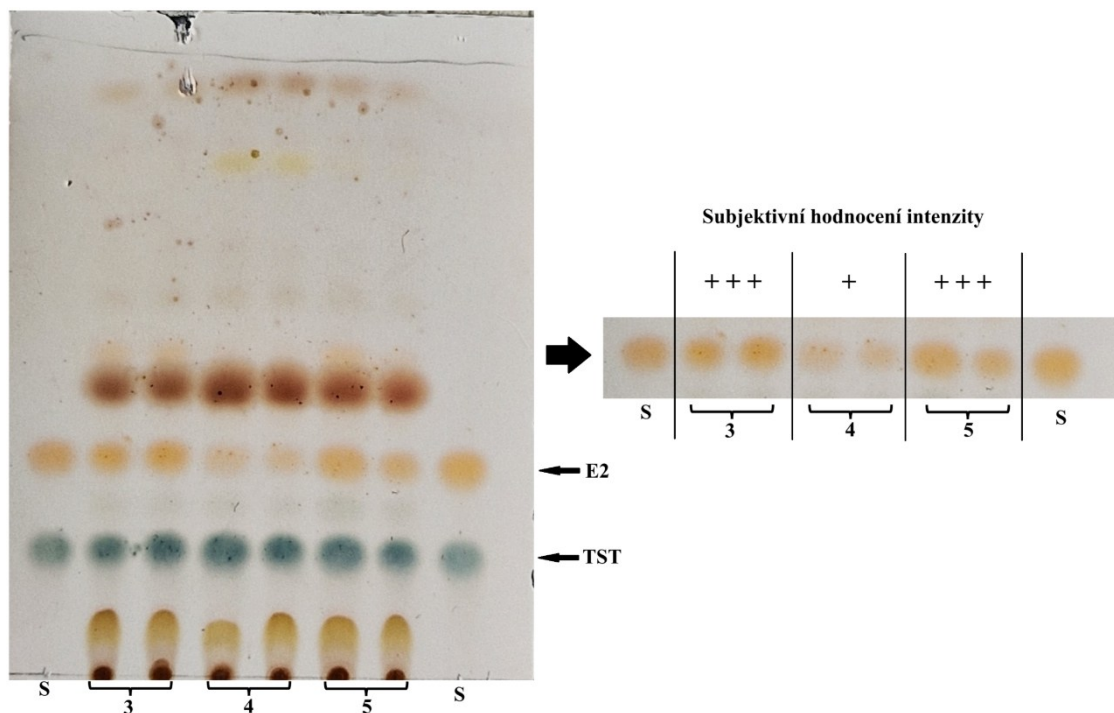
bílkovina	Preparát	m (homogenizovaná tkáň) [g]	V (získaný preparát) [ml]	$C_{\text{bílkovina}}$ [mg/ml]	Celkový zisk mikrosomální bílkoviny [mg]	Výtěžek ms. bílkoviny z původní tkáně
	1	180	5	21 ± 2	105	0,06 %
	2	81	2	18 ± 1	36	0,04 %
	3	90	2	22 ± 2	44	0,05 %
	4	90	2	8 ± 1	16	0,02 %
	5	100	3	25 ± 4	75	0,08 %

CYP	Preparát	c_{CYP} [μmol/ml]	s.o. CYP [μmol/mg]	n (celkem získaného CYP) [μmol]	Aktivita CYP19A1
	1	pod limitem detekce	pod limitem detekce	pod lim. detekce	++
	2	0,36	0,02	0,72	+
	3	1,32	0,06	2,64	+++
	4	0,07	0,01	0,16	+
	5	0,75	0,03	2,25	+++

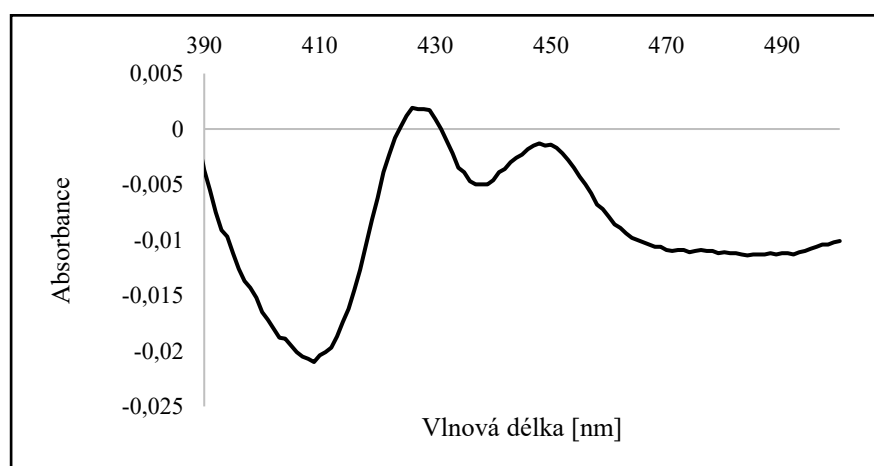
CYPOR	Preparát	a_{CYPOR} [μmol cyt c / min · ml]	s.a. CYPOR [μmol cyt c / min · mg]
	1	1,05	0,05
	2	0,54	0,03
	3	1,14	0,06
	4	1,10	0,16
	5	0,91	0,04

Stanovení celkové koncentrace bílkoviny probíhalo metodou BCA vždy ve třech ředěních, přičemž jednotlivá ředění se stávala z triplikátů. Data v tabulce jsou průměry koncentrací stanovených pro jednotlivá ředění a jsou uvedena s příslušnou směrodatnou odchylkou. Vzhledem k nátuře izolace z biologického materiálu není u celkového zisku mikrosomální bílkoviny provedeno statistické ošetření. Obsah CYP byl stanoven z jednoho měření provedeného podle Omury a Sata (1964) [47]. Aktivita CYPOR byla určena podle Dignama a Strobela (1977) [105]. Pro preparáty 1 až 4 byla stanovena z jednoho měření, u preparátu 5 je uveden průměr z triplikátu. Aktivita AROM byla posuzována subjektivně na základě provedených reakcí s TLC vyhodnocením. Jednotlivé reakce byly prováděny v duplikátech. Stupnice vyjadřuje míru aktivity CYP19A1, „+“ značí nejmenší aktivitu, „+++“ aktivitu nejvyšší. Pro příklad vyhodnocení viz Obr. 7 na následující stránce.

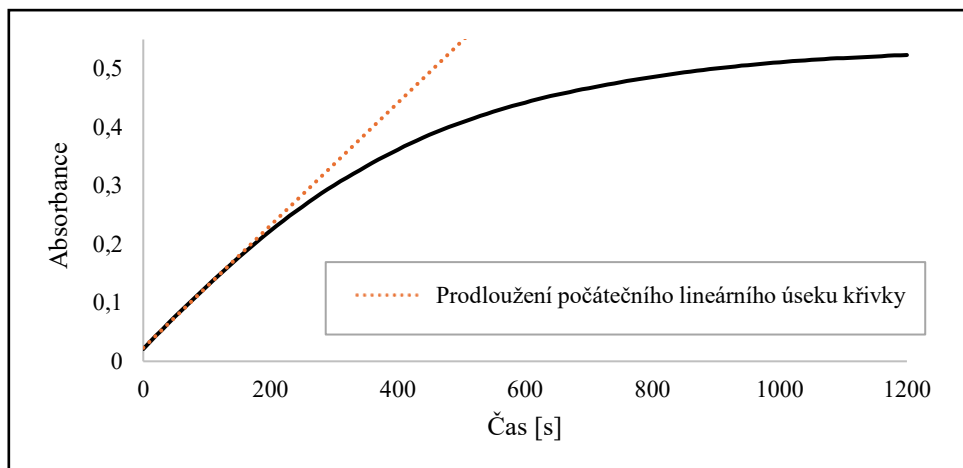
Preparáty č. 4 a 5 byly následně využívány k dalším pokusům (preparáty 1 a 2 vykazovaly příliš nízkou míru aromatasové aktivity a byly spotřebovány při optimalizaci složení roztoků a reakčních směsí, preparát 3 byl také spotřebován při optimalizačních experimentech).



Obr. 7 – Porovnávání aktivity aromatasy mezi preparáty placentárních mikrosomů. Na levém panelu je reprezentativní TLC destička, výřez (vpravo) zachycuje subjektivní hodnocení intenzit skvrn E2 při porovnání jednotlivých mikrosomálních preparátů. **Dráha S:** standard (0,5 mM E2 a 1,25 mM TST v ethylacetátu). Reakční směsi obsahovaly vždy 50 mM TST, 1 mM NADPH a odpovídající preparát (při celkové koncentraci bílkoviny v roztoku zhruba 1 mg/ml) v 0,1 M sodnofosfátovém pufru o pH 7,4. Reakce byly prováděny v duplikátech. **Dvojice dráh 3; 4 a 5:** číslo odpovídá preparátu použitému k přípravě dané reakční směsi. Zkratkou E2 je označen 17β-estradiol, TST pak značí testosteron.



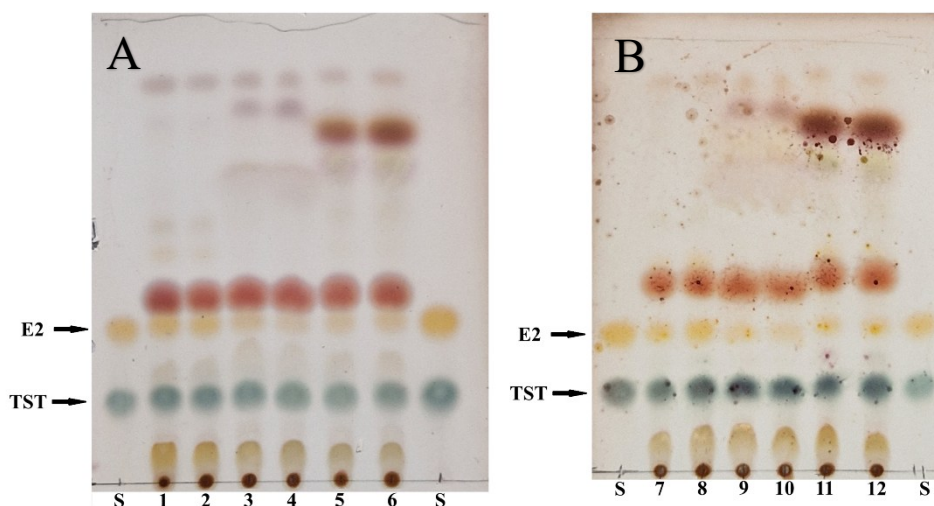
Obr. 8 – Reprezentativní spektrum redukováného mikrosomálního preparátu syčeného oxidem uhelnatým. Předkládané spektrum pochází ze stanovení celkového obsahu CYP u mikrosomálního preparátu číslo 3. Jako reference byl použit roztok nasycený oxidem uhelnatým a neredukovaný dithionit sodným. Vlastní měření diferenčního spektra bylo provedeno ve vzorkové kyvetě proti této referenci. Vzorková kyveta byla nasycena oxidem uhelnatým a následně redukována zmíněným činidlem (několik mg krystalické látky). Celková koncentrace mikrosomální bílkoviny v obou kyvetách činila přibližně 1,5 mg/ml (v 0,1 M draselnofosfátovém pufru o pH 7,4).



Obr. 9 – Reprezentativní záznam změny absorbance cytochromu c při stanovení aktivity CYPOR. Prezentovaný graf byl získán při stanovení aktivity CYPOR v preparátu č. 4. Reakční směs obsahovala 0,5 mg/ml cytochromu c a 4 nM mikrosomální CYP v 0,3 M draselnofosfátovém pufru.

5.2. Vliv parfémů na aktivitu placentární mikrosomální aromatasy

Orientační ověření vlivu parfémů na aktivitu mikrosomální aromatasy bylo provedeno reakcí (přeměna TST na E2) s TLC vyhodnocením (podobně jako na Obr. 7, viz přechozí stránka), přičemž experiment probíhal v duplikátech jednotlivých reakčních směsí. Nejprve byl pokus proveden s mikrosomálním preparátem č. 4 a 300× ředěnými parfémy (ve finální reakční směsi). Vzhledem k malé míře inhibice byl pokus zopakován ještě s preparátem č. 5 (pro nedostatek preparátu č. 4) a s parfémy ředěnými 150×. Obě vyvolané TLC destičky jsou na Obr. 10 níže.



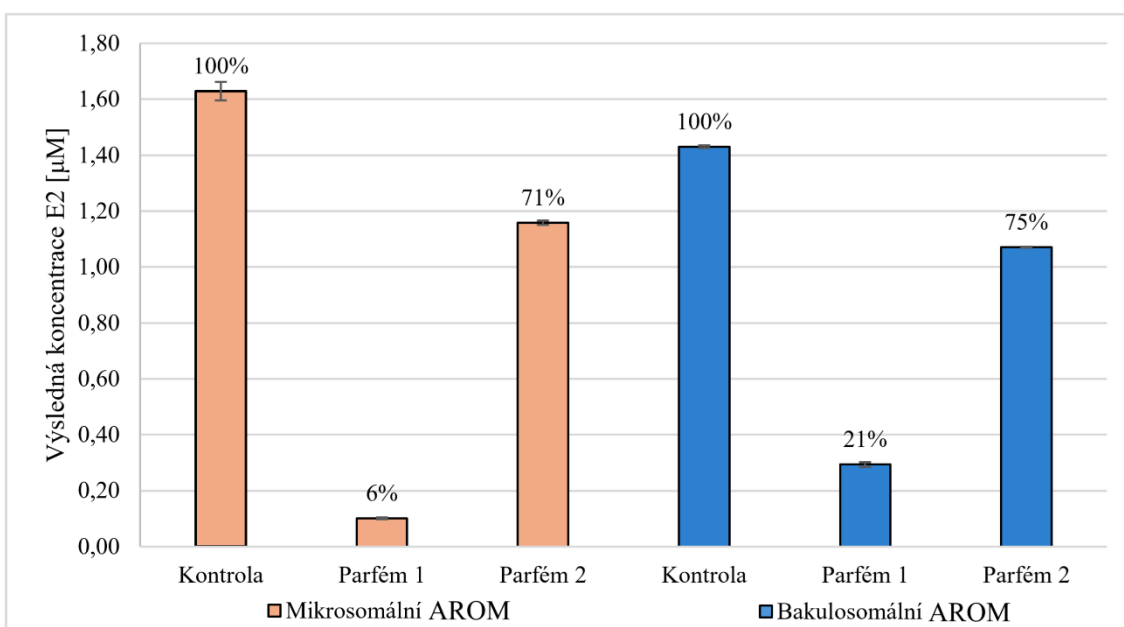
Obr. 10 – Vliv parfémů na aktivitu placentární mikrosomální aromatasy. Destičky jsou výsledkem separátne prováděných experimentů. **Dráhy 1 až 6** (pokus s 300× ředěnými parfémy) obsahují v reakční směsi preparát č. 4, **dráhy 7 až 12** (pokus s 150× ředěnými parfémy) pak preparát č. 5. **Dráha S**: standard (0,5 mM E2 a 1,25 mM TST v ethylacetátu; **Dráhy 1; 2; 7 a 8**: kontrolní reakční směs bez parfémů (reakční pufr; 50 mM TST, 1 mM NADPH a preparát v celkové koncentraci bílkoviny zhruba 1 mg/ml), ostatní dráhy jsou stejného složení až na přidávek parfému; **Dráhy 3 a 4**: 300× ředěný parfém 1; **Dráhy 5 a 6**: 300× ředěný parfém 2; **Dráhy 9 a 10**: 150× ředěný parfém 1; **Dráhy 11 a 12**: 150× ředěný parfém 2. **Pozn.** na destičce B (150× ředěné parfémy) jsou zřetelné skvrny po nečistotách z nánosu aerosolu zředěné kyseliny sírové. Zkratka E2 značí 17β-estradiol, TST pak testosteron.

5.3. Inhibiční účinky parfémů na aktivitu aromatasy v bakulosomálním a mikrosomálním systému

Po orientačním prokázání inhibičních účinků parfémů na aromatasu v mikrosomálním prostředí bylo nutné je kvantifikovat pomocí HPLC/MS. HPLC bylo prováděno gradientovou elucí na reverzní fázi. Hmotnostní spektra byla proměřena po elektrosprejové ionizaci a selekci iontů na základě kvadrupólového filtru a následného *time-of-flight* analyzáru. Celé HPLC/MS vyhodnocení prováděl RNDr. Tomáš Ječmen, PhD.

Celkem bylo připraveno šest reakčních směsí – tři s rekombinantní bakulosomální aromatasou a tři s mikrosomální aromatasou. Jedna z těchto tří reakčních směsí vždy představovala kontrolní reakci, kde byl místo parfému přidán methanol ve stejném objemu. Další dvě reakční směsi obsahovaly každá přídavek jednoho z testovaných parfémů (ve výsledku 300× ředěných). Jako vnitřní standard byl použit 17 α -ethinylestradiol, který má velmi podobný MS ionizační profil jako E2 (fragmentační spektra viz Příloha 1). Plochy píků E2 a EE2 získané jejich integrací pro jednotlivá měření v triplikátech jsou obsaženy v Příloze 2. Výsledné extrahované iontové chromatogramy, na nichž byly píky integrovány, jsou součástí Přílohy 3.

Plochy píků E2 byly vztaženy na plochu píků vnitřního standardu EE2 a pomocí toho byla vypočtena výsledná koncentrace E2 v jednotlivých vzorcích. Výsledný graf shrnující inhibiční účinky parfémů v obou systémech je na Obr. 11 níže.



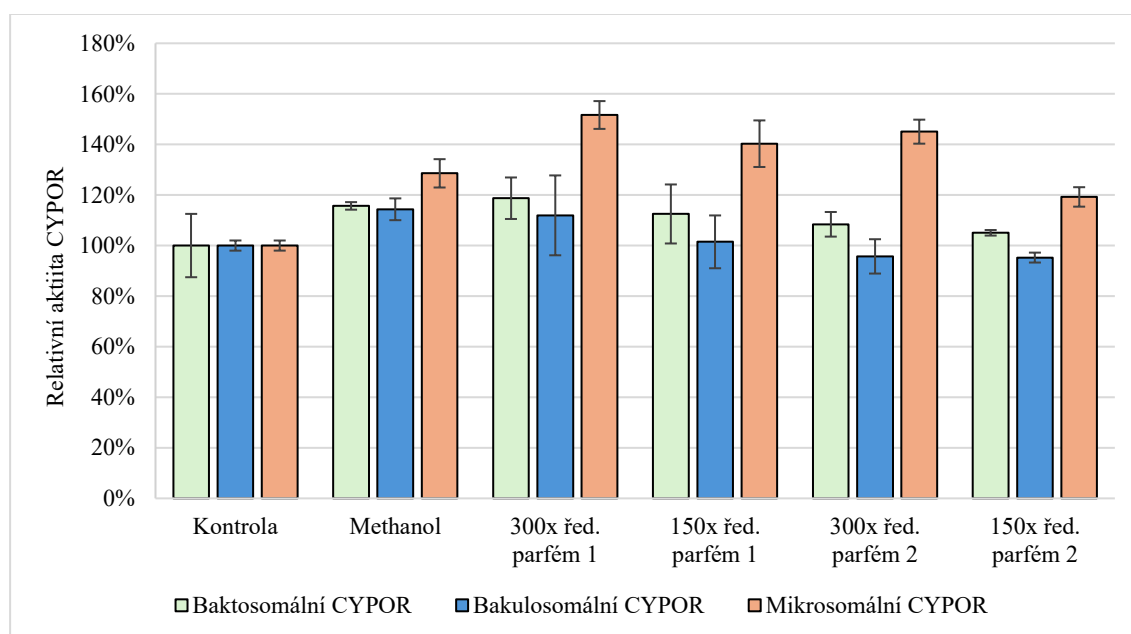
Obr. 11 – Vliv parfémů na aktivitu aromatasy v mikrosomálním a bakulosomálním systému. **Všechny reakční směsi obsahovaly 50 mM TST a 1 mM NADPH v reakčním pufru (0,1 M sodnofosfátový, pH = 7,4).**

Použitý **mikrosomální preparát** byl naředěn na celkovou koncentraci bílkoviny v reakční směsi přibližně 1 mg/ml. **Bakulosomální aromatasu** byla v daných reakčních směsích přítomna v koncentraci 30 nM. Oba parfémy byly v reakční směsi přítomny v 300× ředění. Kontrolní reakce probíhala s přídatkem methanolu (ve výsledném ředění 100×). Procenta nad jednotlivými sloupci představují vztažení výsledné koncentrace E2 v dané reakční směsi na tuto koncentraci v kontrolní reakci v totožném expresním systému. Měření bylo prováděno v technických triplikátech (vynesen je průměr a směrodatná odchylka těchto měření). Zkratka E2 značí 17 β -estradiol.

5.4. Vliv parfémů na aktivitu NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasy v rozdílných expresních systémech

Cílem této série experimentů bylo nejprve ověřit, zda mají testované parfémy vliv na aktivitu mikrosomální placentární aromatasy. Následně byl pro porovnání proveden totožný pokus také s bakulosomální a baktosomální CYPOR.

Aktivita CYPOR byla stanovena na základě časové změny absorbance redukované formy cytochromu c. Reakční směs obsahovala (mimo neovlivněný systém) buď 100× ředěný methanol, nebo ředěný testovaný parfém v celkovém ředění 300× a 150×. Výsledné vypočtené aktivity z jednotlivých měření jsou obsaženy v Příloze 4. Získané aktivity CYPOR byly následně statisticky vyhodnoceny a výsledný graf je na Obr. 12 níže.



Obr. 12 – Vliv parfémů na aktivitu CYPOR v různých expresních systémech. Výsledná aktivita jednotlivých systémů je vždy procentuálně srovnána s neovlivněnou reakcí (kontrola) prováděnou ve stejném expresním systému. Reakční směs obsahovala 0,5 mg/ml cytochrom c a 4 nM mikrosomální CYP, nebo 4 nM bakulosomální AROM, nebo 4 nM baktosomální CYPOR (v závislosti na experimentu, koncentrace CYPOR každého preparátu nebyla totiž známa) v 0,3M draselnofosfátovém pufru o pH 7,4. Reakce byla iniciována přidávkem 10 μ l 10 mM roztoku NADPH. Měření s přidávkem parfému, methanolu, nebo je pufru byla prováděna v triplicátech, vynesným údajem je průměr a mírou variability je směrodatná odchylka. Výjimkou jsou měření pro mikrosomální preparát pro 300× ředěný parfém 1 a 150× ředěný parfém 2, kde je vynesný průměr pouze z duplikátu a mírou variability je variační rozpětí souboru.

6. Diskuse

Aromatasa (CYP19A1, AROM) je cytochrom P450 zprostředkovávající aromatizaci androgenních steroidních hormonů na estrogény [42]. Její značný fyziologický význam dokumentuje množství patologických stavů při její deficienci nebo naopak nadměrné aktivitě [92]. Inhibitory aromatasy mají velký klinický význam jako léčiva, lze s nimi však přijít do kontaktu také nezáměrně v životním prostředí. Aromatasa se navíc v lidském organismu jakožto extrahepatální CYP vyskytuje mj. v tukové tkáni a kůži, do kterých mohou hydrofobní látky cizího původu v některých případech poměrně snadno procházet [106].

Předkládaná bakalářská práce navazuje na studii provedenou Drejslarovou et al. [6], která poukázala na inhibiční účinky parfémů vůči lidské aromatase. Enzym byl ovšem rekombinantního původu, přičemž používaným expresním systémem byly bakulosomy, tzn. mikrosomální frakce získaná z hmyzích buněk transfekovaných některým z bakulovirů. Napříč různými expresními systémy není možné vždy předpokládat totožný toxikokinetický a především toxikodynamický profil zkoumaných látek [72]. Zjištění výše uvedené studie bylo tedy nutné potvrdit v lidském mikrosomálním systému, tj. membránovém prostředí, kde se aromatasa fyziologicky vyskytuje.

Často využívaným zdrojem aromatasy je placentární tkáň, především kvůli vysokému obsahu AROM a relativně snadné dostupnosti biologického materiálu [42]. Nejprve bylo tedy připraveno metodou frakční centrifugace několik mikrosomálních preparátů, které byly charakterizovány a navzájem orientačně porovnány v rámci jejich aromatasové aktivity.

Dalším krokem bylo posoudit případné inhibiční účinky parfémů na aktivitu tohoto enzymu. Testované parfémy byly vybrány v návaznosti na výše zmíněnou studii. Vybrané vzorky v ní vykazovaly celkem největší (parfém 1) a nejmenší (parfém 2) inhibiční účinky na aromatasu v bakulosomálním systému. Samotné posouzení působení parfémů na tento enzym proběhlo nejprve orientačně formou reakce (fyziologická přeměna testosteronu na estradiol) s TLC vyhodnocením. Inhibice aromatasy parfémy byla sice zřetelná, mezi účinky obou parfémů však nebyl vidět výraznější rozdíl. Pokus tak byl zopakován s dvojnásobnou koncentrací parfémů. Výsledky byly, zřejmě vzhledem k malé citlivosti použité metody, téměř totožné. Inhibiční vlastnosti parfémů tak byly ovšem dostatečně potvrzeny.

Následovala kvantifikace a přímé porovnání tohoto inhibičního vlivu mezi oběma membránovými systémy. Znovu byly provedeny stejné pokusy, vyhodnocení však proběhlo metodou HPLC/MS. Opět byla potvrzena inhibice aromatasy v mikrosomálním i bakulosomálním systému, mikrosomální systém se v tomto ohledu dokonce ukázal jako mírně citlivější na přítomnost parfémů.

Na závěr bylo nutno ověřit účinky parfémů na redoxního partnera aromatasu, totiž CYPOR. Měření byla provedena s CYPOR obsaženou v bakulosomech, baktosomech a připravených mikrosomálních preparátech. Na aktivitu CYPOR v obou rekombinantních systémech neměly parfémy významnější vliv. CYPOR v mikrosomálním systému z placenty byla však přítomností parfému (i samotného methanolu) stimulována, přičemž nejvyšší stimulace nastávala při vyšších ředěních parfémů, při nižších aktivitě CYPOR opět klesala.

Rozdíly ve výsledcích v obou porovnávaných experimentálních systémech využívaných pro výzkum CYP dokazují, že jejich rovnost není samozřejmá a nelze ji obecně předpokládat. To platí zvláště v rámci metabolických a toxikologických studií prováděných v těchto systémech. Hmyzí buňky kultivované při 27 °C vykazují v membráně vyšší obsah nenasycených mastných kyselin a nižší obsah cholesterolu než kultivované savčí buňky (kvůli udržení dostatečné fluidity membrány) [77]. Nenasycené mastné kyseliny mohou navíc *in vitro* působit jako inhibitory aromatasu [107]. Zvýšená fluidita vede mj. ke zvýšení laterální difuze [108] a tedy k ovlivnění aktivity membránových enzymů [109], neboť lze předpokládat zvýšený počet jejich kontaktů se substráty, ale i inhibitory. Konkrétní výsledek těchto často protichůdných jevů a interakcí zřejmě závisí na specifické situaci a kombinaci dvojice substrátu a inhibitoru.

Dalším možným vysvětlením lišících se modulačních vlastností parfémů napříč expresními systémy je rozdílný metabolismus některých složek parfému zprostředkovaný buď CYPOR, nebo jinými enzymy obsaženými v těchto systémech. Výsledné metabolity by také mohly působit jako inhibitory či stimulatory enzymatické aktivity, případně se zapojovat do aditivních nebo synergických působení samotné parfémové směsi. Roli při stanovení aktivity aromatasu jistě hrají i zjištěné stimulační účinky parfémů na mikrosomální CYPOR.

I přesto ale vykazovala AROM v tomto systému větší míru inhibice parfémy než v bakulosomech. V rekombinantních systémech obecně dochází k nadměrné expresi určitého CYP společně s fyziologickou bazální expresí ostatních membránových proteinů (např. ostatních CYP a CYPOR) [72]. Lze pak předpokládat, že oproti mikrosomálnímu systému bude plocha membrány vztažená na jeden daný CYP v rekombinantních systémech menší. To by mohlo vést ke snížení kapacity pro absorpci, uchování a zpracování hydrofobních látek oproti mikrosomálnímu systému, kde by tak inhibitory mohly mít lepší podmínky k působení.

Celkový inhibiční profil testovaných parfémů se nápadně kvalitativně podobá účinkům α -naftoflavonu na CYP i CYPOR v mikrosomálním systému. Tato sloučenina totiž podobně jako testované parfémy působí jako inhibitor aromatasu [94], zároveň ale jako stimulator aktivity CYPOR [69]. Flavonoidy, látky mezi které se řadí i α -naftoflavon, se vyskytují i v rostlinných esenciálních olejích, kde působí i jako vonné látky [12]. Jejich přítomnost lze tedy očekávat i v testovaných parfémech. Některé z nich

ovšem působí naopak jako inhibitory CYPOR (např. quercetin a morin) [69], profil flavonoidů v tomto ohledu tedy není jednoznačný.

Lišící se stimulační působení obou parfémů na CYPOR lze vysvětlit např. jejich rozdílnými koncentracemi vonných složek – více stimulační parfém (parfém 1) byl zároveň více koncentrovaný a působil i jako silnější inhibitor AROM. Méně stimulační parfém (parfém 2) byl naopak méně koncentrovaný a méně potentní inhibitor aromatasy. Obdobné vysvětlení zaměřené na jejich koncentraci lze podat i u jejich inhibičních účinků vůči aromatase. Ovšem jak bylo uvedeno v kapitole pojednávající o terminologii těchto přípravků, zařazení parfému do kategorie s udávanou vyšší koncentrací vonných látek nemusí být vždy spolehlivým údajem a měřítkem jeho koncentrace.

Jako poměrně nezvyklý se jevil stimulační vliv methanolu na mikrosomální CYPOR. Při přidavku methanolu a parfému v poměru 1:1 (třistanásobné ředění parfémů) byl pozorován největší stimulační vliv na tento enzym. Menší stimulační vliv při vyšších koncentracích parfému (stopadesátinásobné ředění) je možné vysvětlit buď menším množstvím methanolu v reakční směsi (parfémy byly naředěny v methanolu), nebo inhibičními účinky samotného parfému. Tento jev je však třeba ověřit a prozkoumat v dalších experimentech.

Experiment sledující kvantitativní inhibici AROM parfémů je v budoucnu taktéž nutné zopakovat s odlišným placentárním mikrosomálním preparátem, aby bylo možné vyloučit vliv variability těchto preparátů na získané výsledky. Tato metabolická studie by také měla v budoucnu být provedena ve skutečných, nikoliv technických triplikátech v rámci ověření získaných výsledků.

7. Souhrn

V rámci předkládané bakalářské práce byly zkoumány inhibiční účinky vybraných parfémů na lidskou placentární mikrosomální aromatasu v porovnání s lidskou aromatasou exprimovanou v tzv. bakulosomech.

- Bylo izolováno a charakterizováno celkem pět placentárních mikrosomálních frakcí.
- Pilotní studií s vyhodnocením pomocí metody TLC bylo zjištěno, že oba testované parfémy působí jako inhibitory lidské placentární mikrosomální aromatasu, a to při svém 300× a 150× ředění.
- Inhibiční vliv obou parfémů byl kvantifikován pomocí HPLC/MS. V placentárním mikrosomálním systému se inhibiční účinky parfému 2 lišily od bakulosomálního jen nevýznamně, parfém 1 naopak inhiboval placentární aromatasu o 15 % efektivněji.
- Porovnáním účinků obou parfémů na NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasu (CYPOR) obsaženou ve třech biologických expresních systémech (mikrosomálním, bakulosomálním a baktosomálním) bylo zjištěno, že v obou rekombinantních systémech (baktosomálním a bakulosomálním) nemá přídavek parfému na aktivitu CYPOR vliv. V mikrosomálním systému vykazovaly naopak oba testované parfémy vůči aktivitě CYPOR stimulační účinky, přičemž parfém 1 zvyšoval aktivitu tohoto enzymu významněji než parfém 2 ve všech použitých ředěních.

Seznam použité literatury

- [1] Cosmetics Europe: *Market Performance Report 2023*. [on-line] Dostupné z URL: <https://psvak.gr/wp-content/uploads/2024/06/CE_Market_Performance_2023.pdf> [cit 3. 3. 2025]
- [2] Cosmetics Europe: *Consumer Perception Study 2022*. [on-line] Dostupné z URL: <<https://cosmeticseurope.eu/cosmetic-products/european-consumer-perception-study-2022/>> [cit 3. 3. 2025]
- [3] Euromonitor: *Voice of the Consumer: Beauty Survey June - July 2023*. [on-line] Dostupné z URL: <<https://www.euromonitor.com/article/unlocking-fragrance-consumer-trends-in-western-europe>> [cit 3. 3. 2025]
- [4] E. Diamanti-Kandarakis, J.-P. Bourignon, L. C. Giudice, R. Hauser, G. S. Prins, A. M. Soto, R. T. Zoeller a A. C. Gore: Endocrine-Disrupting Chemicals: An Endocrine Society Scientific Statement. *Endocr. Rev.* **30**:4, 293–342 (2009).
- [5] E. R. Simpson, Y. Zhao, V. R. Agarwal, M. D. Michael, S. E. Bulun, M. M. Hinshelwood, S. Graham-Lorence, T. Sun, C. R. Fisher, K. Qin a C. R. Mendelson: Aromatase expression in health and disease. *Recent Prog. Horm. Res.* **52**, 185–213 (1997).
- [6] I. Drejslarová, P. Hodek a T. Ječmen: Interaction of Perfumes with Cytochrome P-450 19. *Cosmetics.* **11**:2 33–47 (2024).
- [7] Rada a Parlament EU: *NARÍZENÍ EVROPSKÉHO PARLAMENTU A RADY (ES) č. 1223/2009 ze dne 30. listopadu 2009 o kosmetických přípravcích (přepřacované znění) (Text s významem pro EHP)*. Dostupné z URL: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/LSU/?uri=oj:JOL_2009_342_R_0059_01> [cit 17. 3. 2025]
- [8] N. Groom: *The Perfume Handbook*. Suffolk, Springer-Science+Business Media, 1992. ISBN 978-94-011-2296-2.
- [9] J. Otto: *Ottův slovník naučný: Dvacátýšestý díl*. Praha, J. Otto, 1907.
- [10] L. Turin a T. Sanchez: *Perfumes: the A-Z Guide*. New York, Penguin Group, 2008. ISBN 978-0143115014.
- [11] E. A. Escobar: Tapputi belet-ekalle (fl. 1200 BCE): A cuneiform tablet on Middle Assyrian perfumery (c. 1200 BCE). In: *Women in the History of Science*. H. Wills, S. Harrison, E. Jones, R. Martin, F. Lawrence-Mackey (eds.). London: UCL Press, 2023, p. 15–22. ISBN 978-1-80008-415-5.
- [12] F. J. González-Minero, L. Bravo-Díaz a E. Moreno-Toral: Pharmacy and Fragrances: Traditional and Current Use of Plants and Their Extracts. *Cosmetics.* **10**:6 157–175 (2023).
- [13] C. Laura: The Scents of Babylonian Sanctuaries. In: *Material Culture of Mesopotamia and Beyond 1: People and Their Environment in First Millennium BCE Babylonia*. L. Cousin,

- L. Quillien, M. Ramez (eds.). Lovaň, Peeters Publishers, 2023, p. 153–176. ISBN 978-9-04294-899-0.
- [14] R. Middeke-Conlin: The Scents of Larsa: A Study of the Aromatics Industry in an Old Babylonian Kingdom. *Cuneiform Digital Library Journal*. **24** 1–53 (2014).
- [15] N. Kockmann: History of Distillation. In: *Distillation*. A. Górak, E. Sorensen (Ed.). London, Elsevier, 2014, p. 1–43. ISBN 978-0-12-386547-2.
- [16] R. Price: Sniffing Out the Gods: Archaeology with the Senses. *Journal of Ancient Egyptian Interconnections*. **17** 137–155 (2018).
- [17] G. Ștefania, A. Vâtcă a S. Vâtcă: The History and Use of Perfume in Human Civilisation. *Agriculture - Science and Practice*. **103** 161–166 (2017).
- [18] K. Mohit, D. Arpna, S. Maninder, K. Palakdeep a K. Uttam: Review on perfume and present status of its associated allergens. *J. of Cosmet. Dermatol.* **20:2** 391–399 (2020).
- [19] M. Gautschi, J. A. Bajgrowicz a P. Kraft: Fragrance Chemistry - Milestones and Perspectives. *Chimia*. **55** 379–387 (2001).
- [20] P. Burger, H. Plainfossé, X. Brochet, F. Chemat a X. Fernandez: Extraction of Natural Fragrance Ingredients: History Overview and Future Trends. *Chemistry and Biodiversity*. **16:10** 1–30 (2019).
- [21] P. Nicolai: A Smelling Trip into the Past: The Influence of Synthetic Materials on the History of Perfumery. *Chem. Biodiversity*. **5:6** 1137–1146 (2008).
- [22] W. Sturm a K. Peters: Perfumes. In: *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. Weinheim, Wiley-VCH, 2011. ISBN 978-3527329434.
- [23] S. Sengupta, S. Singh, S. M. Sonkar, A. Sonkar, N. Kapoor, G. Tomar, S. Gaur a A. Bajaj: The Chemistry of Essential Oil and Its Role as Natural Fragrances in Perfumes. *International Education & Research Journal*. **7:11** (2021).
- [24] S. Arctander: *Perfume and Flavor Chemicals*. Carol Stream, Allured Publishing Corporation, 1994. ISBN 0-931710-37-5.
- [25] J. Beerling: The Application of Fragrance. In: *The Chemistry of Fragrances: From Perfumer to Consumer*. 2nd ed. C. Sells (ed.). Cambridge, Royal Society of Chemistry, 2006, p. 168–183. ISBN 978-0-85404-824-3.
- [26] K. G. Fahlbusch, F. J. Hammerschmidt, J. Panten, W. Pickenhagen a D. Schatkowski: Flavours and Fragrances. In: *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Weinheim, Wiley-VCH, 2011. ISBN 978-3527329434.
- [27] W. L. Schreiber: Perfumes. In: *Kirk-Othmer Chemical Technology of Cosmetics*. E. Saidra (ed.). Hoboken, John Wiley & Sons, 2013, p. 123–160. ISBN 978-1-118-40692-2.
- [28] A. Weisz, S. R. Milstein, A. L. Scher a N. M. Hepp: Colouring Agents in Cosmetics: Regulatory Aspects and Analytical Methods. In: *Analysis of Cosmetic Products*. A.

- Salvador, A. Chisvert (eds.). Amsterdam, Elsevier, 2018, p. 123–157. ISBN 978-0-444-63508-2.
- [29] C. S. Sell: *Fundamentals of Fragrance Chemistry*. Weinheim, Wiley-VCH, 2019. ISBN 978-3-527-81976-8.
- [30] G. Alvarez-Rivera, M. Llompart, M. Lores a C. Garcia-Jares: Preservatives in Cosmetics: Regulatory Aspects and Analytical Methods. In: *Analysis of Cosmetic Products*. A. Salvador, A. Chisvert (eds.). Amsterdam, Elsevier, 2018, p. 175–224. ISBN 978-0-444-63508-2.
- [31] S. J. Herman: Applications II: Fragrance. In: *Chemistry and Technology of Flavors and Fragrances*. D. J. Rowe (ed.). Oxford, Blackwell Publishing, 2005, p. 305–329. ISBN 978-1-405-11450-9.
- [32] A. Chisvert a A. Salvador: Ultraviolet Filters in Cosmetics: Regulatory Aspects and Analytical Methods. In: *Analysis of Cosmetic Products*. A. Salvador, A. Chisvert (eds.). Amsterdam, Elsevier, 2018, p. 85–106. ISBN 978-0-444-63508-2.
- [33] International Fragrance Association (IFRA): *The IFRA Transparency List 2022*. [on-line] Dostupné z URL: <<https://ifrafragrance.org/priorities/ingredients/ifra-transparency-list>> [cit 17. 4. 2025]
- [34] European Chemicals Agency: *Cosmetic Products Regulation, Annex VI - Allowed UV Filters (EU. Allowed UV Filters: Annex VI, Regulation 1223/2009/EC on Cosmetic Products, as amended by Regulation (EU) 2024/996, OJ L of 4 April 2024)*. [on-line] Dostupné z URL: <<https://echa.europa.eu/cs/cosmetics-uv-filters>> [cit 17. 4. 2025]
- [35] S. Herman: Fragrance. In: *Cosmetic Science and Technology: Theoretical Principles and Applications*. K. Sakamoto, R. Y. Lockhead, H. I. Maibach, Y. Yamashita (eds.). Amsterdam, Elsevier, 2017, p. 267–283. ISBN 978-0-128-02005-0.
- [36] A. M. Api, D. Belsito, M. Bruze, P. Cadby, P. Calow, M. L. Dagi, W. Dekant, G. Ellis, A. D. Fryer, M. Fukayama, P. Griem, C. Hickey, L. Kromidas, J. F. Lalko, D. C. Liebler, Y. Miyachi, V. T. Politano, K. Renskers, G. Ritacco, D. Salvito, T. W. Schultz, I. G. Sipes, B. Smith, D. Vitale a D. K. Wilcox: Criteria for the Research Institute for Fragrance Materials, Inc. (RIFM) safety evaluation process for fragrance ingredients. *Food Chem. Toxicol.* **82** 1–19 (2015).
- [37] A. B. Djordjevic, A. Tinkov a B. Antonijevic: Mixture, toxicology and risk assessment. In: *Encyclopedia of Toxicology, vol. 6*. 4th ed. P. Wexler (ed.). Amsterdam, Elsevier, 2023, p. 445–457. ISBN 978-0-323-85434-4.
- [38] F. P. Guengerich, M. R. Waterman a M. Egli: Recent Structural Insights Into Cytochrome P450 Function. *Trends Pharmacol. Sci.* **37**:8 625–640 (2016).
- [39] J. A. Williams, R. Hyland, B. C. Jones, D. A. Smith, S. Hurst, T. C. Goosen, V. Peterkin, J. R. Koup a S. E. Ball: Drug-drug interactions for UDP-glucuronosyltransferase substrates:

- a pharmacokinetic explanation for typically observed low exposure (AUC_i/AUC) ratios. *Drug Metab. & Dispos.* **32**:11 1201–1208 (2004).
- [40] S. Rendic a F. P. Guengerich: Survey of Human Oxidoreductases and Cytochrome P450 Enzymes Involved in the Metabolism of Xenobiotic and Natural Chemicals. *Chem. Res. Toxicol.* **20**:28 38–42 (2015).
- [41] R. D. Nelson, D. C. Zeldin, S. M. G. Hoffman, L. J. Maltais, H. M. Wain a D. W. Nebert: Comparison of cytochrome P450 (CYP) genes from the mouse and human genomes, including nomenclature recommendations for genes, pseudogenes and alternative-splice variants. *Pharmacogenetics.* **14**:1 1–18 (2004).
- [42] F. P. Guengerich: Human Cytochrome P450 Enzymes. In: *Cytochrome P450: Structure, Mechanism and Biochemistry*. 4th ed. P. R. O. de Montellano (ed.). Heidelberg, Springer, 2015, p. 523–785. ISBN 978-3-319-12108-6.
- [43] D. W. Nebert, K. Wikvall a W. L. Miller: Human Cytochromes P450 in Health and Disease. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **368** 1–21 (2012).
- [44] M. Klingenberg: Pigments of Rat Liver Microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.* **75**:2 376–386 (1958).
- [45] T. Omura a R. Sato: A New Cytochrome in Liver Microsomes. *J. Biol. Chem.* **237** 1375–1376 (1962).
- [46] T. Omura a R. Sato: The Carbon Monoxide-binding Pigment of Liver Microsomes: I. The Evidence for Its Hemoprotein Nature. *J. Biol. Chem.* **239** 2370–2378 (1964).
- [47] T. Omura a R. Sato: The Carbon Monoxide-binding Pigment of Liver Microsomes: II. Solubilization, Purification and Properties. *J. Biol. Chem.* **239** 2379–2385 (1964).
- [48] T. Omura: Recollection of the early years of the research on cytochrome P450. *Proc. Jpn. Acad., Ser. B.* **87**:10 617–640 (2011).
- [49] D. W. Nebert, M. Adesnik, M. J. Coon, W. R. Estabrook, F. J. Gonzalez, F. P. Guengerich, I. C. Gunsalus, E. F. Johnson, B. Kemper a W. Levin: The P450 Gene Superfamily: Recommended Nomenclature. *DNA*, **6**:1 1–11 (1987).
- [50] D. Nebert, D. R. Nelson, M. Adesnik, M. J. Coon, R. W. Estabrook, F. J. Gonzalez, F. P. Guengerich, I. C. Gunsalus, E. F. Johnson a B. Kemper: The P450 superfamily: updated listing of all genes and recommended nomenclature for the chromosomal loci. *DNA*. **8**:1 1–13 (1989).
- [51] D. W. Nebert, D. R. Nelson, M. J. Coon, R. W. Estabrook, R. Feyereisen, Y. Fujii-Kuriyama, F. J. Gonzalez, F. P. Guengerich, I. C. Gunsalus a E. F. Johnson: The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, and recommended nomenclature. *DNA Cell Biol.* **12** 1–14 (1991).
- [52] D. R. Nelson, T. Kamataki, D. J. Waxman, F. Guengerich, R. W. Estabrook, R. Feyereisen, F. J. Gonzalez, M. J. Coon, I. C. Gunsalus a O. Gotoh: The P450 superfamily: update on

- new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature. *DNA Cell Biol.* **3** 1–51 (1993).
- [53] D. R. Nelson, L. Koymans, T. Kamataki, J. J. Stegeman, R. Feyereisen, D. J. Waxman, M. R. Waterman, O. Gotoh, M. J. Coon, R. W. Estabrook, I. C. Gunsalus a D. W. Nebert: P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics.* **6**:1 1–42 (1996).
- [54] R. Trivedi, S. Kardani, S. Baile, H. S. Rajput, R. Maheshwari, R. Hadia, V. Singh, N. Solanki, S. Sharma, V. Saggi a C. Sajan: Unlocking the Clinical Significance of Cytochrome P450 Enzymes. *Int. J. Pharm. Invest.* **14**:1 30–38 (2024).
- [55] T. L. Poulos a E. F. Johnson: Structures of Cytochrome P450 Enzymes. In: *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry.* 4th ed. P. R. O. de Montellano (ed.). Heidelberg, Springer, 2015, p. 523–785. ISBN 978-3-319-12108-6.
- [56] F. P. Guengerich: Roles of cytochrome P450 enzymes in pharmacology and toxicology: Past, present and future. *Adv. Pharmacol.* **95** 3–47 (2022).
- [57] P. R. Porubsky, K. M. Meneely a E. E. Scott: Structures of Human Cytochrome P-450 2E1: INSIGHTS INTO THE BINDING OF INHIBITORS AND BOTH SMALL MOLECULAR WEIGHT AND FATTY ACID SUBSTRATES. *J. Biol. Chem.* **283**:48 33698–33707 (2008).
- [58] J. K. Yano, M. R. Wester, G. A. Schoch, K. J. Griffin, C. D. Stout a E. F. Johnson: The Structure of Human Microsomal Cytochrome P450 3A4 Determined by X-ray Crystallography to 2.05-Å Resolution. *J. Biol. Chem.* **279**:37 38091–38094 (2004).
- [59] K. S. Bhatia, A. N. Mahesh a S. Bhatt: Cytochrome P450. In: *Encyclopedia of Toxicology,* vol. 3. 4th ed. P. Wexler (ed.). Amsterdam, Elsevier, 2023, p. 445–457. ISBN 978-0-323-85434-4.
- [60] P. R. O. de Montellano: Substrate Oxidation by Cytochrome P450 Enzymes. In: *Cytochrome P450: Structure, Mechanism and Biochemistry,* 4th ed. P. R. O. de Montellano (ed.). Heidelberg, Springer, 2015, p. 111–176. ISBN 978-3-319-12108-6.
- [61] T. Iyanagi, C. Xia a J. Kim: NADPH–cytochrome P450 oxidoreductase: Prototypic member of the diflavin reductase family. *Arch. Biochem. Biophys.*, **528**:1 72–89 (2012).
- [62] J. L. Vermilion a M. J. Coon: Identification of the High and Low Potential Flavins of Liver Microsomal NADPH-Cytochrome P-450 Reductase. *J. Biol. Chem.* **253**:24 8812–8819 (1978).
- [63] D.-H. Kim, S.-K. Yim, K.-H. Kim, T. Ahn a C.-H. Yun: Continuous spectrofluorometric and spectrophotometric assays for NADPH-cytochrome P450 reductase activity using 5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride. *Biotechnol. Lett.* **31** 271–275 (2009).
- [64] Y. Kumagai, Y. Tsurutani, M. Shinyashiki, S. HommaTakeda, Y. Nakai, T. Yoshikawa a N. Shimojo: Bioactivation of lapachol responsible for DNA scission by NADPH-cytochrome P450 reductase. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **3**:4 245–250 (1997).

- [65] Y. Wang, J. P. Gray, V. Mishin, D. E. Heck, D. L. Laskin a J. D. Laskin: Distinct Roles of Cytochrome P450 Reductase in Mitomycin c Redox Cycling and Cytotoxicity. *Mol. Cancer Ther.* **9**:6 1852–1863 (2010).
- [66] A. V. Patterson, H. M. Barham, E. C. Chinje, G. E. Adams, A. L. Harris a I. J. Stratford,: IMPORTANCE OF P450 REDUCTASE-ACTIVITY IN DETERMINING SENSITIVITY OF BREAST-TUMOR CELLS TO THE BIOREDUCTIVE DRUG, TIRAPAZAMINE (SR-4233). *Br. J. Cancer.* **72**:5 1144–1150 (1995).
- [67] D. G. Tew: INHIBITION OF CYTOCHROME-P(450) REDUCTASE BY THE DIPHENYLIODONIUM CATION - KINETIC-ANALYSIS AND COVALENT MODIFICATIONS. *Biochemistry.* **32**:38 10209–10215 (1993).
- [68] I. A. Slepneva, S. V. Sergeeva a V. V. Khramtsov: Reversible Inhibition of NADPH-Cytochrome P450 Reductase by Alpha-lipoic Acid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **214**:3 1246–1253 (1995).
- [69] P. Hodek, M. Teplá, J. Křížková, M. Šulc a M. Stiborová: Modulation of cytochrome P450 enzyme system by selected flavonoids. *Neuroendocrinol. Lett.* **1**:1 67-71 (2009).
- [70] M. R. Bhatt, Y. Khatri, R. J. Rodgers a L. L. Martin: Role of cytochrome b5 in the modulation of the enzymatic activities of cytochrome P450 17 α -hydroxylase/17,20-lyase (P450 17A1). *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **170** 2–18 (2017).
- [71] L. Waskell a J.-J. P. Kim: Electron Transfer Partners of Cytochrome P450. In: *Cytochrome P450: Structure, Mechanism and Biochemistry*. 4th ed. P. R. O. de Montellano (ed.). Heidelberg, Springer, 2015, p. 33–68. ISBN 978-3-319-12108-6.
- [72] M. Stiborová, R. Indra, M. Moserová, L. Bořek-Dohalská, P. Hodek, E. Frei, K. Kopka, H. H. Schmeiser a V. M. Arlt: Comparison of human cytochrome P450 1A1-catalysed oxidation of benzo[a]pyrene in prokaryotic and eukaryotic expression systems. *Monatshfte für Chemie - Chemical Monthly.* **148**:11 1959–1969 (2017).
- [73] R. Arya, A. Bhattacharya a K. S. Saini: Dictyostelium discoideum - a promising expression system for the production of eucaryotic proteins. *FASEB J.* **22**:12 4055-4066 (2008).
- [74] A. Kesidis, P. Depping, A. Lodé, A. Vaitsooulou, R. M. Bill, A. D. Goddard a A. J. Rothnie: Expression of eukaryotic membrane proteins in eukaryotic and prokaryotic hosts. *Methods.* **180** 3–18 (2020).
- [75] D. Massotte: G protein-coupled receptor overexpression with the baculovirus–insect cell system: a tool for structural and functional studies. *Biochim. Biophys. Acta.* **1610**:1 77–89 (2003).
- [76] A. Schütz, F. Bernhard, N. Berrow, J. F. Buyel, F. Ferreira-da-Silva, J. Haustraete, J. van den Heuvel, J.-E. Hoffmann, A. de Marco, Y. Peleg, S. Suppmann, T. Unger, M. Vanhoucke, S. Witt a K. Remans: A concise guide to choosing suitable gene expression systems for recombinant protein production. *STAR Protocols*, **4**:4 1–16 (2023).

- [77] K. Marheineke, S. Grünewald, W. Christie a H. Reiländer: Lipid composition of *Spodoptera frugiperda* (Sf9) and *Trichoplusia ni* (Tn) insect cells used for baculovirus infection. *FEBS Lett.* **441**:1 49–52 (1998).
- [78] N. M. Woolhouse, B. Andoh, A. Mahgoub, T. P. Sloan, J. R. Idle a R. L. Smith: Debrisoquin hydroxylation polymorphism among Ghanaians and Caucasians. *Clinical Pharmacological Therapy*, **26**:5 584–591 (1979).
- [79] T. Tateishi, Y. Krivoruk, Y. F. Ueng, A. J. Wood, F. P. Guengerich a M. Wood: Identification of human liver cytochrome P-450 3A4 as the enzyme responsible for fentanyl and sufentanil N-dealkylation. *Anesth. Analg.* **82**:1 167–172 (1996).
- [80] R. J. Auchus a W. L. Miller: P450 Enzymes in Steroid Processing. In: *Cytochrome P450: Structure*, 4th ed. P. R. O. de Montellano (ed.). Heidelberg, Springer, 2015, p. 851–879. ISBN 978-3-319-12108-6.
- [81] E. Simpson a R. J. Santen: Celebrating 75 years of oestradiol. *J. Mol. Endocrinol.*, **55**:3 1–20 (2015).
- [82] S. Chumsri, T. Howes, T. Bao, G. Sabnis a A. Brodie: Aromatase, aromatase inhibitors and breast cancer. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **125**:1–2 13–22 (2011).
- [83] F. K. Yoshimoto a F. P. Guengerich: Mechanism of the third oxidative step in the conversion of androgens to estrogens by cytochrome P450 19A1 steroid aromatase. *J. Am. Chem. Soc.*, **130**:42 15016–15025 (2014).
- [84] M. Akhtar a J. N. Wright: A review of 18O labelling Studies to probe the mechanism of aromatase (CYP19A). *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **216** 1–9 (2022).
- [85] Q. Cheng, C. D. Sohl, F. K. Yoshimoto a F. P. Guengerich: Oxidation of dihydrotestosterone by human cytochromes P450 19A1 and 3A4. *J. Biol. Chem.* **287**:35 29554–29567 (2012).
- [86] M. Numazawa, M. Nagaoka a N. Sohtome: Aromatase reaction of 3-deoxyandrogens: steric mode of the C-19 oxygenation and cleavage of the C10-C19 bond by human placental aromatase. *Biochemistry*. **44**:32 10839–10845 (2005).
- [87] D. Ghosh, J. Griswold, M. Erman a W. Pangborn: Structural basis for androgen specificity and oestrogen synthesis in human aromatase. *Nature*. **457**:7226 219–223 (2009).
- [88] D. Ghosh, C. Egbuta, J. E. Kanyo a T. T. Lam: Phosphorylation of human placental aromatase CYP19A1. *Biochem. J.* **476**:21 3313–3331 (2019).
- [89] O. Shimosawa, M. Sakaguchi, H. Ogawa, N. Harada, K. Mihara a T. Omura: Core Glycosylation of Cytochrome P-450(arom): Evidence for Localization of N Terminus of Microsomal Cytochrome P-450 In The Lumen. *J. Biol. Chem.* **268**:28 21399–21402, (1993).
- [90] A. Slominski, B. Zbytek, G. Nikolakis, P. R. Manna, C. Skobowiat, M. Zmijewski, W. Li, Z. Janjetovic, A. Postlethwaithe, C. C. Zoubolis a R. C. Tuckey: Steroidogenesis in the

- skin: implications for local immune functions. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **137** 107–123 (2013).
- [91] H. Zhao, L. Zhou, A. J. Shangguan a S. E. Bulun: Aromatase expression and regulation in breast and endometrial cancer. *J. Mol. Endocrinol.*, **57**:1 19–33 (2016).
- [92] S. Patel: Disruption of aromatase homeostasis as the cause of a multiplicity of ailments: A comprehensive overview. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **168** 19–25 (2017).
- [93] R. J. Santen, H. Brodie, E. R. Simpson, P. K. Siiteri a A. Brodie: History of Aromatase: Saga of an Important Biological Mediator and Therapeutic Target. *Endocr. Rev.* **30**:4 343–375 (2009).
- [94] J. T. Kellis a L. E. Vickery: Inhibition of Human Estrogen Synthase (Aromatase) by Flavones. *Science.* **225**:4666 1032–1034 (1984).
- [95] K. Cheshenko, F. Pakdel, H. Segner, O. Kah a R. I. L. Eggen: Interference of endocrine disrupting chemicals with aromatase CYP19 expression or activity, and consequences for reproduction of teleost fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* **155**:1 31–62 (2008).
- [96] Y.-C. Kao, C. Zhou, M. Sherman, C. A. Laughton a S. Chen: Document details - Molecular basis of the inhibition of human aromatase (estrogen synthetase) by flavone and isoflavone phytoestrogens: A site-directed mutagenesis study. *Environ. Health Perspect.*, **106**:2 85–92 (1998).
- [97] Y. Wang, P. Pan, X. Li, Q. Zhu, T. Huang a R.-S. Ge: Food components and environmental chemicals of inhibiting human placental aromatase. *Food Chem. Toxicol.* p**128** 46–53 (2019).
- [98] J. A. van Meeuwen, O. van Son, P. C. de Jong a M. van den Berg: Aromatase inhibiting and combined estrogenic effects of parabens and estrogenic effects of other additives in cosmetics. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **230**:3 372–382 (2008).
- [99] Z. Li, N. Yin, Q. Liu, C. Wang, T. Wang, Y. Wang, G. Qu, J. Liu, Y. Cai, Q. Zhou a G. Jiang: Effects of polycyclic musks HHCb and AHTN on steroidogenesis in H295R cells. *Chemosphere.* **90**:3 1227–1235 (2013).
- [100] J. Sohn, S. Kim, J. Koschorreck, Y. Kho a K. Choi: Alteration of sex hormone levels and steroidogenic pathway by several low molecular weight phthalates and their metabolites in male zebrafish (*Danio rerio*) and/or human adrenal cell (H295R) line. *J. Hazard. Mater.* **320** 45–54 (2016).
- [101] N. Blüthingen, S. Zucchi a K. Fent: Effects of the UV filter benzophenone-3 (oxybenzone) at low concentrations in zebrafish (*Danio rerio*). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **263**:2 184–194 (2012).
- [102] M. J. Balunas, B. Su, R. W. Brueggemeier a A. D. Kinghorn: Natural Products as Aromatase Inhibitors. *Adv. Anticancer Agents Med. Chem.* **8**:6 646–682 (2008).

- [103] T. A. van der Hoeven a M. J. Coon: Preparation and properties of partially purified cytochrome P-450 and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-cytochrome P-450 reductase from rabbit liver microsomes. *J. Biol. Chem.* **249**:19 6302–6310 (1974).
- [104] P. K. Smith, R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson a D. C. Klenk: Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**:1 76–85 (1985).
- [105] J. D. Dignam a H. W. Strobel: NADPH-cytochrome P-450 reductase from rat liver: purification by affinity chromatography and characterization. *Biochemistry.* **16**:6 1116–1123 (1977).
- [106] A. Herman a A. P. Herman: Essential oils and their constituents as skin penetration enhancer for transdermal drug delivery: a review. *J. Pharm. Pharmacol.* **67**:4 473–485 (2015).
- [107] M. J. Balunas, B. Su, S. Landini, R. W. Brueggemeier a A. D. Kinghorn: Interference by Naturally Occurring Fatty Acids in a Noncellular Enzyme-Based Aromatase Bioassay. *J. Nat. Prod.* **69**:4 700–703 (2006).
- [108] V. K. Sharma, H. Srinivasan, J. Gupta a S. Mitra: Lipid lateral diffusion: mechanisms and modulators. *Soft Matter* **39** 7763–7796 (2024).
- [109] Y. Takakuwa, H. Nishino, Y. Ishibe a T. Ishibashi: Properties and Kinetics of Membrane-bound Enzymes when Both the Enzyme and Substrate are Components of the Same Microsomal Membrane. *J. Biol. Chem.* **269**:45 27889–27893 (1994).
- [110] K. Chabi a L. Sleno: Estradiol, Estrone and Ethinyl Estradiol Metabolism Studied by High Resolution LC-MS/MS Using Stable Isotope Labeling and Trapping of Reactive Metabolites. *Metabolites.* **12**:10 1–15 (2022).
- [111] I. Merchenthaler: Estrogens. In: *Encyclopedia of Reproduction, vol. 2*, 2th ed. M. K. Skinner (ed.). Oxford, Academic Press, 2018, p. 176–189. ISBN 978-0128118993.

Seznam příloh

Příloha 1: Fragmentační hmotnostní spektra 17β -estradiolu a 17α -ethinylestradiolu.

Příloha 2: Přehled ploch píků 17β -estradiolu a 17α -ethinylestradiolu získaných jejich integrací.

Příloha 3: Reprezentativní extrahované iontové chromatogramy

Příloha 4: Shrnutí vypočtených hodnot aktivity NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasy v jednotlivých měřeních triplikátu