

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Iva Drejslarová

Vliv vybraných kosmetických přípravků na produkci estrogenů

Effect of selected cosmetic products on estrogen formation

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Školitel: prof. RNDr. Petr Hodek, CSc.

Praha 2020

Prohlášení:

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

V Praze dne:

Podpis:

Abstrakt

Cytochromy P450 hrají klíčovou roli při metabolismu endogenních a exogenních sloučenin. Účastní se jak biotransformace, tak biosyntézy steroidních hormonů. Významným zástupcem těchto hemových enzymů je cytochrom P450 19, aromatasa, která katalyzuje finální krok biosyntézy estrogenních hormonů, aromatizaci androgenů na estrogeny. K fyziologickým funkcím estrogenů se řadí vývoj sekundárních pohlavních znaků, podpora tvorby kostní hmoty nebo regulace sekrece gonadotropinu. Narušení hormonální rovnováhy vlivem endokrinních disruptorů však může vést mimo jiné k rozvoji nádorových onemocnění nebo reprodukčním problémům. Mezi sloučeniny s těmito účinky patří kromě kontaminant životního prostředí také některá léčiva a kosmetická aditiva, kterým jsou lidé vystaveni každodenně.

V této bakalářské práci byl zkoumán vliv vybraných parfémů a antiperspirantů na metabolickou konverzi testosteronu na estradiol, katalyzovanou enzymem aromatasa. Aktivita tohoto enzymu byla orientačně detekována s využitím TLC chromatografie.

Experimentálně bylo zjištěno, že vybrané antiperspiranty nemají na aktivitu aromatasu vliv. U většiny testovaných parfémů byla zaznamenána jen velmi nízká míra inhibice aromatasu. Pouze jeden vzorek tento efekt vykazoval ve vyšší míře. Na základě porovnání složení parfémů by potenciálními inhibitory aromatasu mohly být například farnesol, kumarin nebo cinnamal.

Klíčová slova: cytochrom P450, aromatasa, inhibice, steroidogeneze

Abstract

Cytochrome P450 enzymes play a key role in the metabolism of endogenous and exogenous compounds. These enzymes are involved both in biotransformation and steroid hormone biosynthesis. An important member of this family is cytochrome P450 19, aromatase, which catalyzes the final step of estrogen hormone biosynthesis, conversion of androgens into estrogens. The physiologic functions of estrogens include development of secondary sexual characteristics, maintenance of bone mass or regulation of gonadotropin secretion. However, hormonal imbalance due to endocrine disruptors can result in development of certain cancers or impaired reproduction. Compounds with these effects include, in addition to environmental pollutants, some drugs and cosmetic additives which people are exposed to on a daily basis.

In the present study, the effect of selected perfumes and antiperspirants on the metabolic conversion of testosterone into estradiol, catalyzed by aromatase, was examined. The activity of this enzyme was detected using TLC chromatography.

The experiments showed that selected antiperspirants do not affect aromatase activity. For most of the perfumes tested, only a very low aromatase inhibition was observed. Only one sample showed this effect to a higher extent. Based on the comparison of perfume compositions, potential aromatase inhibitors could be, e.g. farnesol, coumarin or cinnamal.

Key words: cytochrome P450, aromatase, inhibition, steroidogenesis

[IN CZECH]

Poděkování:

Touto cestou bych ráda poděkovala prof. RNDr. Petru Hodkovi, CSc. za odborné vedení při psaní této bakalářské práce a také za trpělivost, ochotu, cenné rady a připomínky.

Obsah

SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ	7
1. LITERÁRNÍ PŘEHLED	9
1.1. Definice a klasifikace kosmetiky	9
1.2. Historie a vývoj.....	9
1.2.1. Kosmetika.....	9
1.2.2. Parfémy	9
1.2.3. Deodoranty a antiperspiranty.....	11
1.3. Vlastnosti a složení	12
1.3.1. Kosmetika.....	12
1.3.2. Parfémy	13
1.3.2.1. Klasifikace vůní.....	13
1.3.3. Deodoranty a antiperspiranty.....	14
1.4. Zdravotní aspekty deodorantů a antiperspirantů	16
1.5. Testování kosmetických přípravků	18
1.5.1. Rozdělení testů toxicity	19
1.5.2. Testy toxicity <i>in vitro</i>	21
1.5.3. Testy estrogenity a antiestrogenity	23
1.6. Steroidogeneze.....	25
1.6.1. Estradiol a testosteron.....	25
1.6.2. Interakce kosmetiky s cytochromy P450	26
1.6.3. Aromatasa.....	28
2. CÍL PRÁCE.....	30
3. MATERIÁL A METODY.....	31
3.1. Použité chemikálie	31
3.2. Použité přístroje	33
3.3. Metabolismus testosteronu v přítomnosti kosmetiky s detekcí na TLC.....	34
3.3.1. Vliv testovaných vzorků na aktivitu aromatasy.....	34
3.4. Aktivita NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasy v přítomnosti kosmetiky	35
4. VÝSLEDKY	36
4.1. Optimalizace složení reakční směsi	36
4.2. Vliv kosmetických přípravků na aktivitu aromatasy.....	38
4.3. Redukce cytochromu c v přítomnosti kosmetiky	40
5. DISKUZE	41
6. SOUHRN.....	44
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	45

Seznam zkratk a symbolů

3 β -HSD	3- β -hydroxsteroidní dehydrogenasa
17 β -HSD	17- β -hydroxsteroidní dehydrogenasy
<i>15q21.1</i>	chromozom kódující gen pro enzym aromatasu
AD	androstendion
AHA	α -hydroxykyseliny
AR	androgenní receptor
AHTN	tonalid, 6-acetyl-1,1,2,4,4,7-hexamethyltetralin
BHA	butylhydroxyanisol
BHT	butylhydroxytoluen
BP-3	benzofenon-3
CA	test chromozomových aberací
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CTA	test buněčné transformace
CYP	cytochrom P450
CYP19	aromatasa
CYP19+OR	aromatasa + NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasa
CYP11A1	enzym štěpení postranního řetězce cholesterolu
CYP17A1	17- α -hydroxylasa
CYP19A1	aromatasa
DES	diethylstilbesrol
DDE	dichlordifenyldichlorethylen
DDT	1,1,1-trichlor-2,2-bis(4-chlorfenyl)ethan
DHEA	dehydroepiandrosteron
DHT	5 α -dihydrotestosteron
DTB	dibutylcín
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
EHMC	ethylhexyl methoxycinamát
ER	estrogenní receptor
ER α	estrogenní receptor α
ER β	estrogenní receptor β
ERE	estrogen responzivní jednotky
ERR-gama	estrogenní receptor gama
FAD	flavinadenindinukleotid
FMN	flavinmononukleotid
H2AX	varianta histonu z rodiny H2A
HSL	hormon-senzitivní lipasa

LC ₅₀	koncentrace, která způsobí úmrtí 50% zvířat v testované skupině
LD ₅₀	dávka, která způsobí úmrtí 50% zvířat v testované skupině
LDH	laktátdehydrogenasa
LDL	nízkodenzitní lipoprotein
MBC	3-(4-methylbenzyliden)- <i>d-l</i> -kafr
MCF-7	buněčná linie lidského prsního karcinomu
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-difenyltetrazoliumbromid
NADH	nikotinamidadeninukleotid
NADPH	nikotinamidadeninukleotidfosfát
NOAEL	dávka, při které ještě nebyl pozorován škodlivý účinek
NRU	test s neutrální červení
OR	NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasa
PBSA	kyselina 2-fenylbenzimidazol-5-sulfonová
PCA	kyselina pyrrolidonkarboxylová
PG	propylenglykol
SCGE	kometový test
SHBG	sexuální hormony vázající globulin
SRB	sulforhodamin B
T47D	buněčná linie lidského prsního karcinomu
TBT	tributylcín
TCDD	tetrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin
TPT	trifenylcín
WST-1	2-(4-jodofenyl)-3-(4-nitrofenyl)-5-(2,4-disulfofenyl)-2H-tetrazolium
XTT	2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfofenyl)-2H-tetrazolium-5-karboxanilid

1. Literární přehled

1.1. Definice a klasifikace kosmetiky

Definice pojmu „kosmetika“ se v závislosti na různých zdrojích do určité míry liší, obecně se ale jedná o přípravek aplikovaný na tělo za účelem čištění, zkrášlení či úpravy jeho vzhledu, zvýšení atraktivity nebo udržování péče o pokožku a vlasy. [1]

Kosmetika může být klasifikována podle použití, místa aplikace a složení. Nejčastější je rozdělení podle použití, do této kategorie patří obličejová kosmetika určená k čištění, udržování rovnováhy pokožky a její ochraně. Dále make-up, používaný zejména na obličej, tělová kosmetika jako přípravky na opalování, deodoranty, antiperspiranty, depilační přípravky, mýdla, krémy na ruce, přípravky do koupele a také repelenty proti hmyzu. Mezi vlasové produkty se řadí šampony, výživy, barvy na vlasy, přípravky na styling vlasů nebo podporu jejich růstu. Pro ústní péči se používají zubní pasty či ústní vody a v neposlední řadě jsou tu různé vůně a parfémy. [1]

1.2. Historie a vývoj

1.2.1. Kosmetika

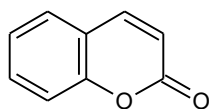
Slovo „kosmetika“ bylo poprvé použito na začátku 17. století Sirem Francisem Baconem. Ve svém spise *The Advancement of Learning* ([2]) z roku 1605 jej definoval jako „umění dekorace“ (z angl. „the art of decoration“). [3] V průběhu staletí se kosmetické přípravky nepoužívaly jen k dekoracím účelům, jak je tomu dnes, ale i k vyjádření náboženského vyznání, postavení ve společnosti, příslušenství k určitému rodu, bohatství a zdraví. Již v prehistorických dobách bylo malování na tělo zřejmě nezbytnou součástí náboženských rituálů, nebo sloužilo k zastrašení nepřítele v dobách válečného konfliktu. [3]

1.2.2. Parfémy

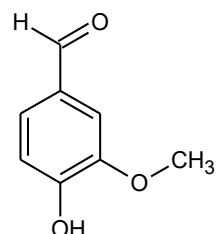
Počátky používání parfémů sahají až do období starověku. První nám známí výrobci byli egyptští kněží, kteří míchali extrakty získané z rostlin a ovocné dužiny s kořením, pryskyřicí, vínem, medem a nejrůznějšími oleji. Z těchto vonných směsí pak vyráběli masti a kadidlo. [4] Slovo „parfém“ (z lat. „*per fumum*“) znamená „skrz kouř“ a právě kadidlo bylo zřejmě jednou z prvních forem parfému. Vonné masti se používaly jak ke kosmetickým a léčebným účelům, tak k balzamování těl zesnulých. [5]

V Indii, Persii a Egyptě se vyráběly parfémů na olejové bázi procesem macerace. Aromatické rostlinné materiály byly rozdrčeny a louhovány v oleji, nebo pro léčebné účely ve vodě. [6] Významnou roli při vzniku parfémů tak, jak je známe dnes, sehrála alchymie – umění, které má své kořeny ve starověké Číně, Indii a Egyptě. Alchymisté jako první získali alkohol z vína díky vynálezu destilace, který nejen že významně přispěl k rozvoji chemie jako vědní disciplíny, ale i k vývoji v oblasti parfumerie. [4] Období počátku 12. století bylo v Evropě spjato nejen s rozvojem výroby parfémů, ale i se získáváním esenciálních (éterických) olejů procesem parní destilace. Využívaly se při ní aromatické rostliny obsahující určité množství „těkavého oleje“ s charakteristickou chutí či vůní. [7] Principem bylo zahřátí vody spolu s rostlinným materiálem k bodu varu. Vznikající kapky páry s sebou nesly i vonné oleje a byly kondenzovány pomocí chladiče. Separace vody a esenciálních olejů poté probíhala pomocí tzv. florentinské nádoby na základě rozdílné hustoty. [8]

Ve 2. polovině 19. století byla vynalezena metoda izolace aromatických látek z rostlin, ve kterých se vyskytují – jako první kumarinu (Obr. 1) z tonkových bobů (semena plodů silovoně obecného) v roce 1856 a vanilinu (Obr. 2) z vanilkových lusků v roce 1858. O 10 let později dokázali chemici Perkin a Graebe jako první připravit kumarin syntetickou cestou. Díky objevu přípravy syntetických vonných látek již výrobci parfémů nebyli závislí pouze na přírodních ingrediencích. [9] [10]



Obr. 1: Strukturální vzorec molekuly kumarinu.



Obr. 2: Strukturální vzorec molekuly vanilinu.

Období začátku 20. století bylo známo jako zlatý věk parfumerie. V roce 1921 uvedla francouzská módní návrhářka Coco Chanel parfém *Chanel no.5*, jehož charakteristickým znakem byly svrchní tóny tvořené mimo jiné alifatickými aldehydy. [9] Aldehydy jako takové byly objeveny na konci 19. století a posléze se začaly používat v parfémích, protože poskytovaly větší spektrum vůní, než přírodní látky. [11]

Postupem času se parfémů staly více komerční záležitostí – rozmohlo se jejich přidávání do kosmetických produktů, přípravků pro osobní hygienu a čistících prostředků pro domácnost za účelem zvýšení atraktivity pro zákazníka. [9] Na konci 20. století probíhaly debaty na téma bezpečnosti ingrediencí ve vůních a parfémích, a to především ve spojitosti s jejich vlivem na vznik kontaktní alergie. Vědecký výbor pro kosmetické prostředky a nepotravinářské výrobky určené spotřebitelům (SCCNFP, z angl. „Scientific

Committee on Cosmetic products and Non-Food Products“) vydal v roce 1999 na základě dermatologických dat a klinických pozorování stanovisko (SCCNFP/0017/98, [12]), ve kterém označil 24 přírodních i syntetických ingrediencí jako možné alergeny, mezi nimi například kumarin, benzylalkohol, hydroxycitronellal, *d*-limonen a citral. O rok později byly přidány další dvě přírodní látky, extrakty z lišejníků větvičnicku slívového a terčovky otrubičnaté. Tento seznam látek byl v roce 2003 zanesen do pozměňovacího návrhu evropské Směrnice o kosmetických prostředcích 76/768/EHS (2003/15/ES, [13]). [14]

1.2.3. Deodoranty a antiperspiranty

Název deodorant pochází z latinského *odor*, neboli pach, slovo antiperspirant má také svůj původ v latině – základem slova je *spiro*, neboli „dýchání“, *perspirace* pak znamená „dýchání kůží“. [15] Tyto látky jsou primárně určeny k aplikaci do podpaží. Deodoranty typicky obsahují vůni k překrytí tělesného zápachu a antibakteriální složku ke zničení bakterií, které se množí v potu a způsobují zápach. Jejich podkategorií jsou antiperspiranty, které kromě již zmíněných účinků navíc brání produkci potu. [16]

První písemné zmínky o používání podpažních deodorantů se datují do 9. století. Tehdy byly založeny zejména na vůních maskujících tělesný zápach. [17] V podobě, v jaké je známe dnes, se na trhu začaly poprvé objevovat teprve ke konci 19. století. První deodorant pod názvem *Mum deodorant* bylo možné zakoupit v roce 1888. Jednalo se o látku s voskovitou strukturou obsahující oxid zinečnatý. První antiperspiranty, jejichž hlavní účinnou složkou byly sloučeniny hliníku nebo zirkonia, vznikly na počátku 20. století. Od roku 1903 byl v prodeji antiperspirant *Everdry*. Tento roztok s chloridem hlinitým o nízkém pH (kolem pH = 2,5–3,0) byl však poměrně agresivní, způsoboval podráždění kůže, štípání, pálení a také poškozoval oblečení. [16]

Složení i podoba těchto produktů se postupem času vyvíjela. Záslouhou amerického chemika a vynálezce Julese Monteneira bylo v roce 1941 patentováno nové složení antiperspirantů s lepší snášenlivostí. Jejich účinnou látkou byly pufrované sloučeniny s chloridem hlinitým, které udržovaly pH blíže neutrálnímu (zhruba pH = 4). Byly součástí produktu *Stopette*, hojně využívaného v 50. letech. Roku 1952 díky vynálezu kuličkového pera vznikl první deodorant typu „roll-on“. [15] První antiperspiranty ve formě aerosolu se na trhu objevily na konci 50. let a brzy získaly na popularitě. V 70. letech byly však aerosolové antiperspiranty obsahující zirkonium a chlor-fluorované uhlovodíky zakázány kvůli obavám z jejich bezpečnosti pro zdraví a životní prostředí. V dnešní době je již k dispozici široké spektrum deodorantů a antiperspirantů v různých formách – jako roztoky („roll-ony“), aerosoly, gely, krémy nebo v pevné formě jako tyčinky. [17]

1.3. Vlastnosti a složení

1.3.1. Kosmetika

Vlastnosti a podoba kosmetických produktů se přizpůsobují dle části těla, na kterou jsou určeny, zda se poté smyjí, setřou, nebo ponechají na pokožce a obecně tak, aby byly pro spotřebitele snadno použitelné. Jsou dostupné v podobě tekutin, gelů, krémů, vosků, tuhých látek, pudrů či aerosolů. [18]

Nejvíce zastoupenou složkou jsou látky propůjčující danému produktu formu. Patří mezi ně mastné kyseliny, které se vyznačují odolností vůči oxidaci a závislosti jejich konzistence na přítomnosti dvojných vazeb. Dále tuky a oleje, jejichž podstatnou součástí jsou tzv. nezmýdelnitelné látky (uhlovodíky, terpenické látky, steroly, některé vitaminy nebo jejich prekurzory). Mezi nejstarší kosmetické ingredience tohoto typu se řadí vosky, zejména včelí vosk, lanolin (vosk z ovčí vlny) a jojobový vosk. Jako emulgátory se používají glycerolfosfolipidy (fosfatidylcholin, neboli lecithin). [19] Mezi povrchově aktivní látky se řadí detergenty, pěnicí činidla, solubilizátory, změkčovadla, antimikrobiální či antistatická aditiva. [18] Konkrétně jsou to sulfáty, sulfonany, estery kyseliny sulfojantarové, isothionáty nebo N-acyltauráty. [19]

Značnou část kosmetických aditiv zaujímají látky, které udržují určitou úroveň hydratace pokožky. Nejúčinnějšími z nich jsou humektanty, konkrétně kyselina mléčná, mandlová a glykolová patřící do skupiny α -hydroxykyselin (AHA), dále kyselina pyrrolidonkarboxylová (PCA), močovina, polyoly (glycerol) a panthenol. Nižší hydratační účinek mají bílkoviny, nejčastěji odvozené od bílkovin kůže (kolagen, keratin, elastin), dále substituované polysacharidy, zejména kyselina hyaluronová a chitosan. [19]

Významnou roli při udržení kvality a stability přípravků hrají stabilizační látky, mezi něž patří látky ovlivňující pH, antimikrobiální přísady, antioxidanty a chelatační činidla. [18] Do kategorie antimikrobiotik se řadí kyseliny a jejich estery (kyselina benzoová a salicylová), alkoholy (ethanol, isopropanol), z esterů zejména parabeny, tedy estery kyseliny *p*-hydroxybenzoové. Antioxidanty zabraňují oxidačnímu působení kyslíku na složky kosmetických přípravků a používají se přírodní (flavonoidy, tokoferoly, kyselina askorbová) či syntetické – butylhydroxytoluen (BHT), butylhydroxyanisol (BHA). [19]

Účinky produktu jsou dány obsaženými aktivními látkami. Každý výrobce používá vlastní kombinaci přísad, mezi něž patří rostlinné extrakty, bylinné léčivé přípravky, aminokyseliny, proteiny, látky mikrobiálního původu, ceramidy a vitaminy. [18]

Látkami důležitými pro celkový dojem z produktu jsou barviva a odoranty. [18] Barviva mohou být přírodní, původem živočišná (karmín) či rostlinná (chlorofyly, betain, anthokyaniny), nebo syntetická – azobarviva, trifenylmethanová barviva, antrachinonová, ftalocyaniny. Patří sem také pigmenty, konkrétně oxidy železa, oxidy

trojmocného chromu, bílé oxidy (titanová a zinková běloba), modré pigmenty (ferrokyanid železitoamonný, ultramarín) a perleťové pigmenty. Mezi přírodní vonné látky patří rostlinné oleje (například levandulový, bergamotový) a tinktury živočišného původu – ambra (látko vznikající ve střevě vorvaně), cibet (látko produkováno cibetkou africkou) či pižmo (žlázočný výměšek samců kabara pižmoého). K syntetickým odorantům se řadí terpenické uhlovođíky (limonen, myrcen), terpenické alkoholy (citronellool, menthol, nerol), alifatické aldehydy, monoterpenické aldehydy (citral, citronelal), ketony s jedním či dvěma aromatickými jádry a estery. [19] [10]

1.3.2. Parfémy

Základem moderních parfémů je obvykle vonná složka odvozená od přírodních rostlinných či živočišných extraktů, nebo získaná syntetickou cestou. [20] Esenciální oleje mohou být z rostlin získány lisováním, jemnějšími metodami jsou různé druhy destilace (zejména destilace vodní párou) nebo extrakce těkavými rozpouštědly. [4] Syntetické vonné látky pochází často z petrochemického průmyslu – zejména terpentýn (těkavý olej získaný destilací z různých druhů borovic) a cedrový olej. Tato obsáhla skupina se nevyznačuje konkrétní funkční skupinou, mohou to být alkoholy, aldehydy, estery či terpeny. Příklady používaných syntetických látek jsou limonen, pinen, citronellool, benzylacetát, kumarín, ambroxan nebo anther. [21] [22]

Další komponentou jsou přírodní či syntetická fixativa, která snižují míru vypařování ostatních složek parfému a prodlužují tak dobu jeho retence na kůži. Jsou to většinou rostlinné látky jako pryskyřice, balzámy, pomalu se vypařující rostlinné oleje nebo živočišné substance – ambra, pižmo, cibet, kastoreum (výměšek z análních žláz bobra evropského a kanadského) a propolis (pryskyřičná látka produkována včelami). [11] [23] [24] Pro zvýšení stability vůči světlu se využívají absorbenty UV záření, například benzofenon-2. Dalšími stabilizátory jsou různá chelatační činidla (EDTA a její soli), antioxidanty jako BHT a dále kyselina citronová, vinná či šťavelová k zabránění žluknutí. [25] Poslední součástí je solvent, tedy kapalina, ve které je rozpouštěn vonný olej a ostatní komponenty. Obvykle je to roztok obsahující 98% ethanolu a 2% vody. [20]

1.3.2.1. Klasifikace vůní

Klasifikace vůní je hybridní systém, založený částečně na čichovém vnímání, botanickém či chemickém původu ingrediencí a historii. Základní členění je do tzv. rodin – květinové, chypre (cypřišové), fougèrové a ambrové (orientální) vůně. [26] Můžeme také rozlišovat vůně citrusové, kořeněné, bylinné, anýzové, mátové, květinové, růžové, dřevité, zemité, pryskyřicové či živočišné. [4]

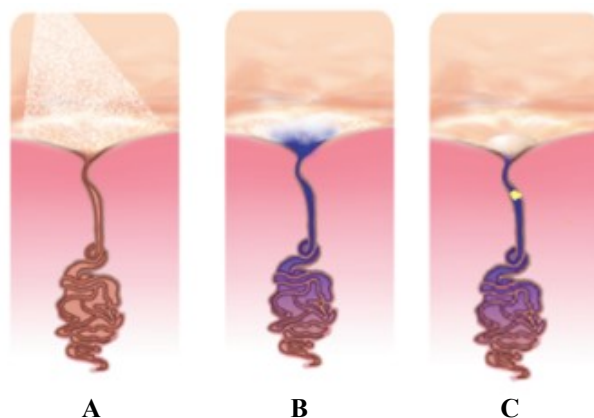
Obsah vonné složky udává intenzitu vůně a její výdrž na kůži – čím vyšší koncentrace, tím je parfém silnější a déle vydrží. Dle tohoto kritéria rozlišujeme čtyři hlavní třídy – nejvíce koncentrovaný je tzv. *parfum*, obsahující mezi 15 až 30% vonné složky. Dále *eau de parfum* s koncentrací 8 až 15%, *eau de toilette* o 4 až 8% a nakonec *eau de cologne* s pouze 2 až 5% vonné složky. [20]

Ve většině parfémů lze najít 3 tóny, které se objevují s postupným vypařováním jeho komponent. Svrchní tóny (hlava parfému) jsou tvořeny malými lehkými molekulami s vysokou těkavostí. Jsou to první tóny, které vnímáme a typicky jsou tvořeny aldehydy jako citrusy, levandule nebo anýz. Střední tóny (srdce parfému) se objevují od 2 minut do 1 hodiny po aplikaci. Jsou květinové a patří sem například růže, jasmín, šeřík, konvalinka, orchidej, neroli či tymián. Nízké tóny (základ parfému) se většinou rozvíjí současně se středními a bývají to fixativa podporující intenzitu svrchních a středních tónů. Tvoří je velké, těžké molekuly, které se pomalu vypařují a obvykle nejsou vnímány dříve než 30 minut po aplikaci. Patří k nim například pižmo či ambra. [20] [27]

1.3.3. Deodoranty a antiperspiranty

Pot je tekutina produkovaná asi 3 až 4 miliony potních žláz ve škáře a podkožním vazivu. Existují dva typy potních žláz, které se liší strukturou, umístěním a mechanismem sekrece – ekrinní a apokrinní. V kůži se nejvíce vyskytují žlázy ekrinní, zastoupené především v dlaních, chodidlech, obličejí a podpaží. Produkují mírně kyselý roztok obsahující vodu, anorganické ionty (zejména draselné, sodné a chloridové), kyselinu mléčnou a askorbovou, močovinu, kyselinu močovou, aminokyseliny, amoniak a glukosu. Tento sekret je obvykle bez zápachu, nicméně bakterie, které se v něm množí, mohou napomáhat k produkci zápachajících produktů (mastné kyseliny s krátkým řetězcem, aminy). Apokrinní žlázy se vyskytují v podpaží, v okolí pohlavních orgánů a prsních bradavek. Jejich produkty jsou sekretovány do chlupových folikulů a v jejich okolí opět rozkládány bakteriemi, čímž může vznikat zápach. [16]

Jak již bylo uvedeno, deodoranty působí dvojím mechanismem – antimikrobiální agens snižuje počet bakterií produkujících těkavé látky se zápachem a vonná složka tento zápach překrývá. [28] Funkce antiperspirantů je založena na působení aktivních ingrediencí, obvykle sloučenin hliníku. Ty tvoří spolu s elektrolyty v potu „gelovou zátku“, která ucpává vývod potní žlázy (Obr. 3, str. 15). Dalším důsledkem je denaturace keratinu v potní žláze a uzavření jejího vývodu. [15] Ačkoliv antiperspiranty redukuje produkci potu v podpaží, nemají vliv na tělesnou termoregulaci. [29]



Obr. 3: Princip funkce antiperspirantu – nanesení produktu (A), rozpuštění produktu v potu v místě potní žlázy (B), reakce aktivních látek (sloučenin hliníku) s elektrolyty v potu a tvorba gelové zátky, ucpání žlázy (C). [30]

Účinnou látkou antiperspirantů jsou hlinité soli, které mají zároveň antimikrobiální účinky. V produktech na bázi aerosolu či „roll-onech“ to bývá aluminium chlorohydrát, zatímco tyčinky, gely a ostatní pevné produkty obsahují soli alumina a zirkonu. Do deodorantů bez obsahu těchto solí se přidávají antimikrobiální přísady, které bakterie zabíjí nebo zpomalují jejich růst a množení. [29] Obvykle jsou to kvartérní amonné soli s dlouhým řetězcem, soli zinku, fenolické sloučeniny (triclosan), amoniové sloučeniny (benzethoniumchlorid) či širokospektrální antibiotika (neomycin). [16] Některé deodoranty a antiperspiranty obsahují alkohol, který je v tomto směru také účinný. [29]

Do většiny deodorantů a antiperspirantů se přidává parfém k maskování tělesného zápachu. Obsahují také různé oleje ke zklidnění a zjemnění pokožky, nebo k usnadnění aplikace u produktů ve formě „roll-onů“ a tyčinek. Hydratační účinek má glycerin či rostlinné oleje. Za účelem pohlcení přebytečného potu a mazu se přidává silikagel. [29]

K usnadnění aplikace musí být přísady zadrženy na nějakém typu nosiče (tekutina či pevná látka), kterým často bývá voda – produktům ve formě krémů a „roll-onů“ dodává na tekutosti a usnadňuje tak jejich rozetření na kůži. V aerosolech se používá tekutina (běžně dekamethylcyklopentasiloxan) v kombinaci s gelotvorným materiálem (dimethyldioctadecylammoniumhektorit). U pevných antiperspirantů je k tomuto účelu využívána například kombinace ricinového oleje, triacylglycerolu a stearyl alkoholu, která zároveň zabraňuje separaci jednotlivých ingrediencí. Některé antiperspiranty také obsahují PEG-8-distearát, usnadňující smytí produktu z kůže. [29]

Hnačí plyny v přípravcích na bázi aerosolu umožňují jemné rozptýlení vystřikované kapaliny, díky čemuž je produkt rovnoměrně nanesen. Nejčastěji jsou to směsi těžkých uhlovodíků jako butan, izobutan a propan. Písady deodorantů a antiperspirantů bývají často rozpuštěny v alkoholu, protože po aplikaci rychle usychá. V mnoha kosmetických přípravcích lze nalézt parabeny jako konzervanty. Nicméně u antiperspirantů to není pravděpodobné, jelikož mají konzervační účinky samy o sobě. [29]

1.4. Zdravotní aspekty deodorantů a antiperspirantů

Kromě pozitivního efektu těchto produktů, kterým je překrytí tělesného zápachu a omezení pocení, jsou tu i negativní účinky, a to zejména u antiperspirantů. Freony, jako součást chladících a hnacích médií, tedy i sprejů, způsobují snížení množství ozónu ve stratosféře a zvýšení množství propuštěného UV záření. Nepřímo tak ovlivňují i lidské zdraví, protože toto záření negativně ovlivňuje oči a kůži a je pravděpodobně i jednou z příčin vzniku maligních kožních nádorů. [15]

V souvislosti s přímými vlivy antiperspirantů na lidské zdraví se diskutuje o jejich hlavních složkách, sloučeninách hliníku a zirkonia. Ani jeden z těchto prvků není biogenní. [15] Vysoké dávky hliníku nepříznivě ovlivňují hematoencefalickou bariéru a epigenetické procesy, nebo mohou způsobit poškození DNA. [29] Při příjmu hliníku gastro-intestinálním traktem je jeho resorpce malá a kov je eliminován ledvinami. Tendenci ukládat se v různých orgánech (mozek, kosti, svaly, slezina, játra) má však při intravenózním či transdermálním podání. [15] Používání antiperspirantů obsahujících sloučeniny hliníku může představovat zvýšené riziko pro spotřebitele trpící onemocněním ledvin. V těchto případech proto americký Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (FDA, z angl. „Food and Drug Administration“) doporučuje před použitím produktů lékařskou konzultaci. [29] Objevily se také domněnky, že expozice sloučeninám hliníku vede ke zvýšenému riziku vzniku Alzheimerovy choroby. Potvrdila je recenze z roku 2008 posuzující 46 studií spojených s touto problematikou, všechny studie se však zabývaly pouze orální a environmentální expozicí [31]. Další studie zkoumající přímo antiperspirační produkty obsahující sloučeniny hliníku toto riziko také prokázala, přičemž v případě pravidelného používání produktů bylo riziko ještě vyšší. [32] Studie sice nebyla vzhledem k jistým metodologickým problémům zcela průkazná, toto téma ale stále zůstává předmětem diskuzí. [28]

Působení antiperspirantů na kůži může také vyvolat nežádoucí kožní reakce, zejména iritační dermatitidu, tvorbu granulomů či popáleniny aerosolem. [15] Nejčastější z nich je kontaktní alergická dermatitida, která může vzniknout reakcí na jakoukoliv ingredienci produktu. Nejvíce se vyskytujícími alergeny jsou parfémová složka, propylenglykol (PG) využívaný jako rozpouštědlo se zvlhčujícími, antiseptickými a konzervačními účinky. Dále některé esenciální oleje (obsahující citral, geraniol, eugenol) a biologická aditiva, vitamin E (antioxidant, zvlhčující a konzervační vlastnosti) a lanolin. [28]

Soli zirkonia v antiperspirantech jsou spojovány se vznikem kožních granulomů, z tohoto důvodu je jejich používání zakázáno. Povoleny jsou však sloučeniny obsahující komplex Al-Zr, jelikož komplex zabraňuje uvolnění volného zirkonia do kůže. [33] Sloučeniny zirkonia v aerosolech, včetně sloučenin s komplexem Al-Zr, byly kvůli obavám z jejich účinků při dlouhodobém vdechování zakázány FDA v roce 1977. [15]

Dalším rizikovým faktorem je iritace kůže, která vzhledem k narušení kožní bariéry zvyšuje možnost senzibilizace vůči ostatním přísadám. Tento potenciál má především propylenglykol a krystalický síran hlinito-draselný (kamenec) užívaný v „přírodních“ antiperspirantech. Pokud je aerosolový produkt aplikován na kůži z příliš malé vzdálenosti, mohou se také objevit aerosolové „popáleniny“ – omrzliny způsobené poklesem teploty až o 60°C. [15]

Nejzávažnější otázkou je ale vztah těchto produktů ke vzniku rakoviny prsu. [15] Diskutovaným tématem jsou složky antiperspirantů a deodorantů s potenciální estrogenní aktivitou. Takovou složkou jsou sloučeniny hliníku, které mohou být jakožto aktivní ingredience absorbovány kůží a způsobovat změny v estrogenních receptorech buněk prsní tkáně. Experiment provedený na buněčné kultuře potvrdil, že tento kov se může akumulovat ve žlázách savců, selektivně zde zasahovat do biologických vlastností epitelálních buněk a podporovat tak kaskádu změn připomínajících počáteční fázi maligní transformace. [34] Jiná studie zkoumala estrogenní aktivitu deodorantů ve formě sprejů, „roll-onů“ a tyčinek. Byla provedena s pomocí *in vitro* testu na buněčné linii lidských rakovinných buněk prsní tkáně. Měřitelná estrogenní aktivita byla prokázána u sedmi z deseti sprejových deodorantů, u „roll-onů“ a tyčinek to již bylo méně. [35]

Profesorka P. D. Darbre z britské Univerzity v Readingu ve svých pracích poukázala na vliv parabenů, které simulují vliv estrogenů a mohou tak stimulovat proliferaci lidských rakovinných buněk v prsní tkáni. Mohou také inhibovat účinky 4-hydroxytamoxifenu, látky potlačující růst rakovinných buněk, a prostřednictvím vazby na estrogenní receptor ERR-gama zabránit jeho deaktivaci růstovými inhibitory (ERR-gama je aktivátor transkripce). [36] [37] [38] [39] [40] [41] [42]

Výsledky studií však byly mnohdy protichůdné. K opačnému závěru, než profesorka P. D. Darbre, došli vědci z institucí National Cancer Institute a American Cancer Society, kteří vydali prohlášení, že jejich studie neprokázaly přímou spojitost mezi parabeny a rozvojem karcinomu prsu. Tento negativní vliv antiperspirantů tedy zatím prokázán nebyl, nicméně k definitivnímu vyvrácení obav je třeba provést další studie. [15]

1.5. Testování kosmetických přípravků

Antiperspirační a deodorační produkty podléhají odlišným regulacím ve čtyřech hlavních oblastech světa – USA, Evropská Unie, Japonsko a Brazílie. Většina ostatních zemí se řídí pravidly jedné z těchto oblastí. [43]

Antiperspiranty jsou na evropském trhu považovány za kosmetické přípravky a řídí se evropskou Směrnicí o kosmetických prostředcích 76/768/EHS z roku 1976. [44] Podle Nařízení Evropského Parlamentu a Rady (ES) č. 1223/2009 je „kosmetický přípravek“ definován jako „jakákoli látka nebo směs, která je určena pro styk s vnějšími částmi lidského těla (pokožkou, vlasovým systémem, nehty, rty a 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.“ [45] [43]

Většina regulací kontroluje jednotlivé ingredience obsažené v kosmetických prostředcích (Tab. 1), tyto jsou poté předmětem testování. Lze je rozlišit na tři kategorie:

- **substance zakázané** – v produktu se nesmí objevit, povolena je však přítomnost jejich stop, a to v případech, kdy je nezbytná k provedení správného výrobního postupu a zároveň pokud nepředstavuje nebezpečí pro zdraví spotřebitele,
- **substance omezené** – nesmí být v produktech použity, až na výjimky dané odlišnou legislativou jednotlivých států. Těmi jsou například hodnoty maximálních koncentrací a pH limitů,
- **substance užívané ke specifickým účelům** – například kosmetická barviva, konzervanty či UV filtry pro ochranu pokožky. [46]

Tab. 1: Typy analytů – jednotlivé testované ingredience a konkrétní sloučeniny. [46]

Typ analytu	Specifikace	Testovaná sloučenina
UV filtry	produkty na opalování	<ul style="list-style-type: none"> • benzofenon-3 (BP-3) • ethylhexylmethoxycynamát (EHMC) • ethylhexyldimethyl-<i>p</i>-aminobenzoová kyselina • butylmethoxydibenzoylmethan • dihydroxyaceton • bergapten
	bělící přípravky	<ul style="list-style-type: none"> • hydrochinon a jeho estery • deriváty kyseliny askorbové a kyseliny kojové
barvicí látky	barvy na vlasy	<ul style="list-style-type: none"> • fenylendiamin • <i>p</i>-aminofenol • polyfenoly
		<ul style="list-style-type: none"> • monoazo-, disazo-, trifenylmethan-, fluoran-, xanthen-, chinolin- a antrachinonová barviva
konzervační látky	antimikrobiální i antioxidační konzervanty	<ul style="list-style-type: none"> • parabeny • formaldehyd • konzervanty uvolňující formaldehyd

Typ analytu	Specifikace	Testovaná sloučenina	
vonné látky	potenciální alergeny označené pozměňovacím návrhem evropské Směrnice o kosmetických prostředcích 76/768/EHS (2003/15/ES, [13])	<ul style="list-style-type: none"> amylcinnamal benzylalkohol cinnamylalkohol citral eugenol hydroxycitronellal isoeugenol 3-fenyl-2-pentylprop-2-en-1-ol benzylsalicylát cinnamal kumarin geraniol 4-(4-hydroxy-4-methylpentyl)-cyklohex-3-en-1-karbaldehyd 4-methoxybenzylalohol 	<ul style="list-style-type: none"> benzylcinnamát farnesol 2-(4-<i>terc</i>-butylbenzyl)propanal linalool benzylbenzoát citronellool 2-benzilidenoktanal <i>d</i>-limonen methyl-okt-2-yonát 3-methyl-4-(2,6,6-trimethylcyclohex-2-en-1-yl)but-3-en-2-on výtažek z větvičnicku slívového (<i>Evernia prunastri</i>) výtažek z terčovky otrubičnaté (<i>Evernia furfuracea</i>)
surfaktanty	látky kationtové, aniontové, či amfoterní	<ul style="list-style-type: none"> sulfáty, sulfonáty kationty alkylnpyridiniové, alkylbenzyltrimethylamoniové, trimethylamoniové kokamidopropylbetain kokamidopropylsultain lauroamfoglucinát 	
ostatní organické sloučeniny	účinné látky	<ul style="list-style-type: none"> heterocyklické sloučeniny, organické kyseliny, alkanolaminy, thiosloučeniny, aminy, aminokyseliny, amidy, alkoholy, peroxidy, ceramidy, polymery a peptidy 	
	přírodní extrakty	<ul style="list-style-type: none"> lanolin aloe vera enoxolon 	
	nečistoty, vedlejší produkty	<ul style="list-style-type: none"> nitrosaminy fenoly polychlorované bifenyly pesticidy 	
chemické prvky a anorganické ionty	nečistoty, vedlejší produkty	<ul style="list-style-type: none"> selen olovo rtuť zinek 	

1.5.1. Rozdělení testů toxicity

K ohodnocení zdravotních a environmentálních rizik látek je třeba pomocí testů prozkoumat jejich toxické vlastnosti. Pro studie se často využívají experimentální zvířata, takové metody se nazývají *in vivo* (z lat. „v živém“). [47] Neustále se však rozvíjí nové techniky, které se spoléhají na molekulární biologii, informační technologie a různé další alternativy k testování na živých zvířatech. Označují se jako *in vitro* (z lat. „ve skle“) metody. [48] Cílem toxikologických studií je získat informace spolehlivé, reprodukovatelné a závislé na dávce. [49]

Toxicitou rozumíme nepříznivý účinek dané látky či směsi látek na testovaný systém. Může být ovlivněna dobou působení látky, její koncentrací či faktory ovlivňujícími fyziologický stav testovaného organismu (teplota, přísun živin). Při testu toxicity je testovaný systém vystaven známé dávce dané látky za definovaných podmínek a změny vyvolané touto expozicí jsou vyhodnoceny porovnáním s kontrolním systémem. [50]

Tyto testy lze dělit podle různých kritérií – doba expozice, druh pokusného organismu a koncentrace toxické látky. Dle doby expozice se dělí na akutní (doba expozice 4 až 24 hodin), subchronické (několik týdnů až tři měsíce) a chronické (půl roku až několik let). Testování zpravidla začíná testy akutní toxicity, následují testy subchronické a chronické. [48] Z hlediska pokusných organismů je k dispozici široká škála druhů – prokaryota (*Escherichia coli*, *Pseudomonas sp.*, *Enterobacter cloacae*), jednobuněčná eukaryota (prvoci, sinice, kvasinky) a mnohobuněčná eukaryota (potkani, myši, králíci, ryby, ptáci, opice). [50]

Testy akutní toxicity posuzují negativní účinky krátkodobé expozice testovaným látkám při orální, dermální nebo inhalační expozici. [48] [50] Slouží zejména k vyhodnocení střední letální dávky LD₅₀ (dávka, která způsobí úmrtí 50% zvířat v testované skupině) a střední letální koncentrace LC₅₀ (koncentrace, která způsobí úmrtí 50% zvířat v testované skupině). [48] Do této kategorie patří jeden z nejkontroverznějších testů, tzv. LD₅₀ test, vyvinutý v roce 1927. Pokusným subjektům je podána studovaná látka, jejíž dávka je zvyšována, dokud nezemře polovina zvířat. [51] Dalším z nich je Draizův oční test, při kterém je do očí králíků (albínů) vpravena substance s testovanou látkou a následně jsou pozorovány nežádoucí reakce. [47]

Subchronické testy zkoumají účinky nepřetržité či opakované expozice. Poskytují informace o toxicitě pro cílové orgány, potenciálu bioakumulace a pomáhají stanovit dávky pro studie chronické toxicity. Získaným parametrem je hodnota NOAEL (dávka, při které ještě nebyl pozorován škodlivý účinek). [48]

Je-li třeba po ukončení těchto testů získat další data, následují doplňkové testy. Při testech reprodukční a vývojové toxicity se sleduje vliv toxických látek na pohlavní buňky, endokrinní funkce reprodukčních orgánů, anatomické abnormality potomstva, zpomalení růstu, teratogenitu a úmrtnost. Testy neurotoxicity se zabývají jak změnami anatomickými (axony a myelinové pochvy neuronů), tak fyziologickými (zpomalení synaptického přenosu) a behaviorálními (smyslové vnímání, reflexy, motorické a kognitivní funkce). Při imunotoxických testech jsou sledovány reakce imunitního systému vyvolané expozicí xenobiotiku – imunosuprese, antigenicita a autoimunita. [48] Indikátorem pro chemicky indukovanou imunosupresi je tzv. smíšená odpověď lymfocytů, kdy se v systému tkáňových kultur zjišťuje proliferativita T-lymfocytů izolovaných ze sleziny. [50] Testy genotoxicity jsou zaměřeny na detekci genových a bodových mutací nebo chromozomových aberací. [48]

1.5.2. Testy toxicity *in vitro*

V současné době je pro *in vitro* testování k dispozici celá řada systémů, například purifikované enzymy a subcelulární frakce, jednotlivé buňky, izolované tkáňové komponenty, tkáňové řezy či celé izolované orgány. [52] Zvláštní skupinou jsou modely *ex vivo* (z lat. „vně živého“), stojící na hranici mezi *in vitro* a *in vivo* modely. [53] Jsou při nich používány buněčné kultury, které byly připraveny z orgánů dárců nebo zvířat. Na těchto kulturách se poté provádí *in vitro* testy. [54] Dalším přístupem jsou počítačové simulace pro predikci chemické toxicity, označované jako metody *in silico* (z lat. „prováděný na počítači“). [52]

V buňkách a buněčných kulturách je možné sledovat mnoho parametrů, mezi něž se řadí mitochondriální funkce, integrita membrán (pomocí specifických markerů unikajících do média kultury), vliv na DNA a proteiny, proliferace buněk, buněčná spojení, životaschopnost a smrt buněk, metabolické a energetické pochody. [52]

Základem testování toxicity *in vitro* je studium cytotoxicity, neboli potenciálu určité látky způsobit buněčnou smrt. Předmětem těchto testů je obvykle toxický účinek látky na buňky z hlediska velikosti dávky a délky expozice, sledování buněčného cyklu, nebo mechanismů jako nekróza a apoptóza. [55] Nacházejí zde uplatnění kolorimetrické metody založené na optické aktivitě organických barviv. Jednou z nich je test s trypanovou modří, který posuzuje životaschopnost buněk. [53] Toto azobarvivo prochází pouze do nitra poškozených buněk a slouží k jejich vizualizaci. V LDH testu je sledován cytoplazmatický enzym laktátdehydrogenasa (LDH), který při poškození buňky uniká do jejího okolí. Je tedy důležitým markerem tohoto děje a nachází využití při měření buněčné enzymové aktivity. [56] Metabolická aktivita buněk se měří pomocí tetrazoliových testů, ve kterých jsou používány sloučeninami MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-difenyltetrazoliumbromid), XTT (2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfofenyl)-2H-tetrazolium-5-karboxanilid), nebo WST (např. WST-1, 2-(4-jodofenyl)-3-(4-nitrofenyl)-5-(2,4-disulfofenyl)-2H-tetrazolium). [53] [57] Principem je přeměna tetrazoliových solí na formazan katalyzovaná buněčnými dehydrogenasami. Reakce je doprovázena barevnou změnou, která se měří spektrofotometricky. [55] Při resazurinovém testu je nefluorescenční barvivo resazurin (neboli „Alamar Blue“) převedeno pomocí mitochondriálních reduktas na fluorescenční resorufin. [57] Intenzita fluorescence odpovídá metabolické aktivitě a počtu živých buněk. [53] Další metodou je sulforhodamin B test (SRB test). [58] Toto fluorescenční barvivo se v závislosti na pH elektrostaticky váže na základní aminokyseliny proteinů a umožňuje tak vyhodnocení množství proteinů vázaných v buňkách a tedy i množství buněk. [57] [58] Testem využívaným k odhadu počtu živých buněk v kultuře je metoda neutrální červeně (NRU, z angl. „Neutral Red Uptake“), založená na schopnosti živých buněk zachytit toto barvivo v lysozomech. Při fyziologickém pH má neutrální červeně

náboj blízký nule a přes buněčnou membránu prochází pasivním transportem. V lysozomech je oproti cytoplazmě nižší pH, barvivo zde získává kladný náboj a je zadrženo. [58]

Předmětem genotoxických studií jsou zejména somatické buňky, vzhledem k jejich zapojení do neoplastických transformací. Hlavními sledovanými parametry jsou mutace, poškození chromozomů, poškození či opravy DNA a změny v počtu chromozomů. [59] K detekci mutagenních vlastností látek slouží Amesův test. Využívá auxotrofní kmeny bakterií *Salmonella typhimurium* s mutacemi genu pro biosyntézu histidinu, které pro tvorbu kolonií vyžadují médium s histidinem. Mutagenní látky indukují zpětné mutace bakterií, čímž je obnovena schopnost syntézy histidinu a kolonie vznikají i v médiu s jeho nedostatkem. [54]

Technikou zabývající se měřením zlomů v řetězci DNA je například kometový test (SCGE, z angl. „Single-Cell Gel Electrophoresis“). Celé buňky jsou při něm podrobeny elektroforéze a DNA fragmenty vzniklé působením mutagenních faktorů putují ven z jádra. Po obarvení fluorescenčním barvivem jsou pozorovány útvary podobné kometám. [53] [60] H2AX test je důležitým ukazatelem zlomů dvouřetězcové DNA. Buněčnou odezvou na tyto zlomy je fosforylace jednoho z jaderných histonů (H2AX), který je zobrazen pomocí fluorescenčně značených protilátek. [53] Testem využívaným ke studiu cytogenetiky je test chromozomových aberací (CA, z angl. „Chromosome Aberration Assay“) a mikrojádrový test (angl. „Micronucleus Assay“), využívající fragmentace jaderného genomu po vystavení genotoxické látky. [53] [60] Test buněčné transformace (CTA, z angl. „Cell Transformation Assay“) posuzuje karcinogenitu látky na základě její schopnosti vyvolat transformaci buňky. [61]

Účinným nástrojem při hodnocení bezpečnosti a účinnosti kosmetických produktů jsou kromě biologických modelů (orgánové kultury) také 3D arteficiální tkáňové modely na bázi syntetických či přírodních biomateriálů. Tyto modely napodobují vysoce komplexní strukturu lidské kůže a nejčastěji jsou to epidermální modely využívající lidské kožní buňky. Příklady těchto tkání jsou EpiSkin[®] (L’Oreal, Francie), EpiDerm[®] (MatTek Corporation, USA), epiCS[®] (CellSystem, Německo), SkinEthic[®] (SkinEthics, Francie). Pokročilejší tkáňové modely sestávají z kolegenové matrix s lidskými fibroblasty, překryté vrstvou lidských keratinocytů. Jsou to například Phenion[®] (Henkel, Německo) a NeoDerm[®] (Tegoscience, Jižní Korea). [62]

Alternativní metody mají své výhody i omezení (Tab. 2, str. 23) a neustále se vyvíjí. Mají potenciál snížit počet laboratorních zvířat potřebných pro testování, nebo tyto experimenty zcela nahradit. V oblastech, kde jediná alternativní metoda selhává, by mohla být úspěšná kombinace strategií *in vitro*, *ex vivo* a *in silico*. U některých komplexnějších testů je však k vývoji alternativní metody nutné blíže prozkoumat mechanismus toxicity. [63]

Tab. 2: Výhody *in vitro* testů a jejich omezení. [54]

Výhody	Omezení
<ul style="list-style-type: none"> • snadné provedení testů, miniaturizace, automatizace • finančně výhodné, rychlé získání výsledků • postačuje menší množství testované látky • provedení studií na buněčné a molekulární úrovni • dostupnost buněčných modelů pro téměř všechny tkáně a druhy experimentálních zvířat • efekty toxických látek na funkce buněk vyžadující jejich organizaci mohou být provedeny s použitím jednovrstevných kultur • možnost uchování buněk v jednovrstevných kulturách po delší dobu • existence malého množství etických problémů, s výjimkou lidských embryonálních kmenových buněk a dárčovství lidských tkání • nové přístupy a technologie zvyšují kvalitu dat a zkracují dobu potřebnou k jejich získání 	<ul style="list-style-type: none"> • rozdíly mezi biokinetikou sloučenin v <i>in vitro</i> a <i>in vivo</i> systémech • neprobíhá biotransformace • disociace tkáně vede k narušení integrity buněk a poškození mezibuněčné komunikace • obtížné stanovení koncentrace, při které je látka toxikologicky aktivní a její účinek odpovídá dávkování <i>in vivo</i> • buňky jsou udržovány v umělých nefyziologických podmínkách, které neodráží tělesnou teplotu nebo hladinu krevních elektrolytů v organismu • podmínky v kultuře nejsou homeostatické a vzhledem k nedostatečnému přísunu kyslíku se může tvořit anaerobní prostředí • užívané imortalizované buněčné linie akumulují četné mutace, včetně ztrát celých chromozomů či jejich částí

1.5.3. Testy estrogenity a antiestrogenity

Endokrinní disruptory jsou látky, které zasahují do funkcí endokrinního systému a mohou tak narušit procesy spojené s udržováním homeostázy a regulací vývojových procesů. [64] Cizorodé látky napodobující svými účinky funkci steroidních hormonů estrogenů se nazývají xenoestrogeny. [65] Jejich estrogenní či antiestrogenní aktivita závisí na schopnosti interagovat s estrogenním receptorem (ER), který se řadí mezi jaderné receptorové proteiny. V různých tkáních se svou distribucí liší dva typy receptoru, α (ER α) a β (ER β). [66] [67] Neaktivní receptory tvoří komplex s proteiny tepelného šoku. Vazba estrogenní sloučeniny vede k jejich disociaci a následné aktivaci a dimerizaci receptorů. Homodimery vstupují do buněčného jádra, kde se váží na specifické sekvence DNA, tzv. estrogen responzivní jednotky (ERE, z angl. „Estrogen Response Elements“). Tím dochází k aktivaci a transkripci cílového genu, syntéze mRNA a její translaci na proteiny, které jsou konečnými efekty pozorované odpovědi. [68]

Estrogenní aktivitu sloučenin posuzují například testy vazby ligandu na receptor (ER Binding Assays). Tyto kompetitivní testy hodnotí schopnost testované látky soutěžit s endogenním ligandem 17 β -estradiolem o vazbu na ER. [69] Používají se preparáty z hormonálně aktivních tkání (například děložní tkáň z potkanů), které jsou inkubovány s nadbytkem radioaktivně značeného 17 β -estradiolu. Čím více testované látky je přidáno, tím více značeného přirozeného ligandu je z estrogenních receptorů vytěsněno. [70] [68] Tato metoda neposkytuje informace o schopnosti testované látky působit stejně jako přirozený ligand (agonismus), či funkci receptoru inhibovat (antagonismus). [69]

Testy s reportérovými geny jsou založeny na schopnosti testované látky stimulovat transkripční aktivitu. Technika využívá například geneticky modifikované kmeny kvasinek bez endogenních receptorů, do kterých jsou vloženy exogenní receptory spolu s reportérovým genem obvykle kódujícím β -galaktosidasu. Další možností jsou savčí buňky s endogenními receptory (buněčné linie lidského prsního karcinomu MCF-7 a T47D) a reportérovým genem kódujícím luciferasu. Do jaderné DNA buněk jsou vloženy sekvence DNA kódující receptor, estrogen-responzivní elementy a reportérový gen. Principem testů je exprese reportérového genu a následná produkce enzymu vyvolaná navázáním testované látky na ER. Vhodný substrát obsažený v reakční směsi je enzymem metabolizován na detekovaný produkt (v případě luciferasy je to vznikající světlo). V agonistických studiích se měří produkt reportérového genu, jehož vznik je indukován působením testované látky. Antagonistické testy zjišťují rozdíl ve vzniku produktu reportérového genu v přítomnosti a nepřítomnosti testované substance. [68] Omezením těchto metod je nedostatek citlivosti na určité estrogény a antiestrogény nebo rozdíly mezi savčími a kvasinkovými buňkami (rozdílné permeability buněčných stěn a membrán, rozdíly v hladinách receptorů). [69] [71]

Při testech buněčné proliferace (E-Screen) se využívají estrogen-responzivní buněčné linie MCF-7 nebo T47D. U buněk pěstovaných v kultivačním médiu s neestrogenním lidským či fetálním hovězím sérem proliferace neprobíhá a je indukována až přidávkem estrogenu. [71] Buněčné kultury jsou nejprve vystaveny různým koncentracím testované látky, následuje přidání neestrogenního séra a inkubace. Počet buněk v médiích je poté porovnán s kontrolním vzorkem bez obsahu testované látky. Při antagonistických studiích je nejprve testována schopnost domnělého antagonisty inhibovat estrogenní účinky. Poté se ověřuje, zda je inhibice zprostředkována receptorem. Nevýhodou metody E-Screen je nedostatek estrogenní specifity, jelikož proliferaci buněk mohou indukovat i další látky, například cytokiny, mitogeny, růstové faktory nebo ostatní hormony kromě estrogenu. [68]

Potenciální estrogenní aktivitu mají některá kosmetická aditiva, zejména parabeny, UV filtry a syntetické pižmové vůně. Parabeny mají antimikrobiální účinky, působí jako deodorační prostředky v mýdlech, nebo účinné látky v šamponech proti lupům. Konkrétně jsou to *p*-hydroxybenzoová kyselina, methylparaben, butylparaben, propylparaben nebo ethylparaben, jejichž estrogenní aktivita byla prokázána testy vazby ligandu na receptor a testy s reportérovými geny. UV filtry (BP-3, homosalát, ethylhexylmethoxycinamát, ethylhexyldimethyl-PABA) se vyskytují v produktech na opalování, ale i v dalších kosmetických prostředcích (krémy, make-up). Jejich estrogenní aktivita byla pozorována v *in vitro* testech (testy buněčné proliferace) a *in vivo* modelech. Mezi pižmové vůně s těmito účinky se řadí například galaxolid, celestolid a cashmeran, které lze najít v parfémtech, kosmetických produktech nebo pracích prostředcích. [72]

1.6. Steroidogeneze

Steroidogeneze je proces, kterým v buňkách specializovaných tkání vznikají steroidní hormony, molekuly lipofilní povahy na bázi terpenů. [73] [74] V kůře nadledvin vznikají glukokortikoidy (kortizol, kortikosteron), regulující zejména metabolismus sacharidů, a mineralokortikoidy (aldosteron), jejichž hlavní funkcí je udržování rovnováhy anorganických iontů a krevního tlaku. V centrální nervové soustavě vznikají neurosteroidy, které působí na procesy učení, paměti a stresové odpovědi. Dalšími skupinami steroidních hormonů jsou estrogeny (estradiol, estron, estriol), gestageny (progesteron) a androgeny (testosteron, androstendion, dihydrotestosteron). [73]

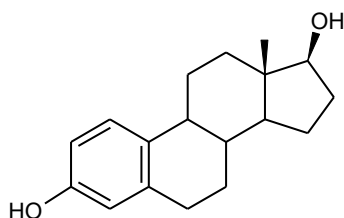
Ve steroidogenních orgánech a tkáních je počátečním krokem steroidogeneze přeměna cholesterolu na pregnenolon, hlavní prekurzor všech steroidních hormonů. [75] Lidské nadledviny jsou schopny syntetizovat cholesterol *de novo* z acetátu, z větší části pak z nízkodenzitních lipoproteinů (LDL). Esterifikovaný cholesterol je skladován v kůře nadledvin, pro potřebu syntézy steroidních hormonů je přeměněn na volný cholesterol enzymem hormon-senzitivní lipasa (HSL) a transportován na vnitřní membránu mitochondrie. [76] Zde přítomný cytochrom P450 11A1 (CYP11A1) katalyzuje odštěpení postranního řetězce cholesterolu za vzniku pregnenolonu. Po jeho přenesu do endoplazmatického retikula následuje buď konverze na progesteron enzymem 3- β -hydroxysteroiddehydrogenasa (3 β -HSD), nebo na 17- α -hydroxypregnenolon enzymem 17- α -hydroxylasa (CYP17A1). Ten také katalyzuje přeměnu progesteronu na 17- α -hydroxyprogesteron. [75] CYP17A1 má C17-20 lyasovou aktivitu a je vysoce exprimován v Leydigových buňkách varlat a ovariálních folikulech, kde hraje zásadní roli při nasměrování biosyntézy směrem k pohlavním hormonům. Přeměňuje 17- α -hydroxypregnenolon a 17- α -hydroxyprogesteron na androgeny dehydroepiandrosteron (DHEA) a androstendion (AD), ze kterého dále vzniká testosteron. Rovnováha mezi androstendionem a testosteronem je závislá na aktivitě 17- β -hydroxysteroiddehydrogenasy (17 β -HSD) – vysoká aktivita podporuje tvorbu testosteronu. Enzym aromatasa (CYP19A1) následně zajišťuje konverzi androstendionu a testosteronu na 17 β -estradiol a estron. [77]

1.6.1. Estradiol a testosteron

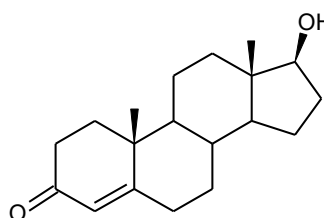
Mezi estrogení hormony se řadí estron a estriol, nejvíce se však vyskytuje 17 β -estradiol (Obr. 4, str. 26), vznikající aromatizací testosteronu ve folikulárních buňkách vaječníků, dále v placentárním syncytiotrofoblastu u těhotných žen a v tukové tkáni u postmenopauzálních žen. [78] [79] Tento hormon se v krvi transportuje navázaný na sexuální hormony vázající globulin (SHBG, z angl. „Sex Hormone Binding

Globuline“). Mezi jeho fyziologické funkce u žen se řadí vývoj sekundárních pohlavních znaků, regulace sekrece gonadotropinu v souvislosti s ovulací, podpora tvorby kostní hmoty, udržování kognitivních funkcí, regulace syntézy lipoproteinů a citlivosti na inzulin. [79] Využívá se v rámci postmenopauzální estrogenní substituční terapie a při léčbě Alzheimerovy choroby. [80] U mužů je syntetizován ve varlatech a hraje důležitou roli při údržbě kostní hmoty. [79] Mechanismus působení estradiolu, stejně jako dalších steroidních hormonů, je založen na difuzi plazmatickou membránou cílových buněk a signalizaci prostřednictvím estrogenních receptorů. Může také ovlivňovat genovou expresi nepřímo, a to interakcí ER s transkripčními faktory vázajícími DNA. [78]

Testosteron (Obr. 5) je steroidní hormon ze skupiny androgenů, který je u mužů z většiny produkován Leydigovými buňkami varlat a z menší části také v kůře nadledvin (*zona reticularis*). [81] Mezi jeho účinky patří zejména stimulace spermatogeneze, vývoj sekundárních pohlavních znaků, růst svalů, podpora tvorby kostní hmoty a zpětná vazba na ose hypothalamus-hypofýza. Je produkován i u žen, a to nejvíce v thekálních buňkách vaječníků, dále také v placentě, nadledvinách a periferních tkáních. Většina cirkulujícího testosteronu je v krvi vázána na SHBG nebo albumin. [82] Asi 7% testosteronu u mužů je redukováno na 5 α -dihydrotestosteron (DHT) enzymem 5 α -reduktasou. DHT je biologicky aktivnějším hormonem, jelikož se váže na androgenní receptor (AR) s patnáctkrát vyšší afinitou než testosteron. Testosteron ovlivňuje fyziologické funkce pomocí těchto receptorů podobným mechanismem jako estradiol. [81]



Obr. 4: Strukturální vzorec molekuly 17 β -estradiolu.

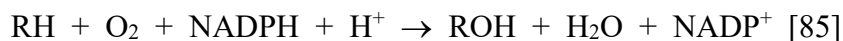


Obr. 5: Strukturální vzorec molekuly testosteronu.

1.6.2. Interakce kosmetiky s cytochromy P450

Cytochrom P450 (CYP) je souhrnné označení pro skupinu enzymů ze skupiny hem-thiolátových proteinů, které hrají klíčovou roli v metabolismu endogenních a exogenních molekul. [83] Téměř všechny katalyzují redukční štěpení molekulárního kyslíku, kdy jeden atom kyslíku je zaveden do substrátu a druhý redukován za vzniku molekuly vody. Jsou to terminální monooxygenasy, které využívají elektrony přenášené kofaktory NADH a NADPH. Aby byly katalycky aktivní, je nutné jejich spojení s redoxními proteiny (NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasa, NADH:cytochrom b₅ reduktasa, ferredoxin reduktasa), které přenášejí elektrony z těchto kofaktorů do

hemového centra. [83] Většinu reakcí lze sumárně vyjádřit rovnicí, kde RH představuje substrát a ROH hydroxylovaný produkt:



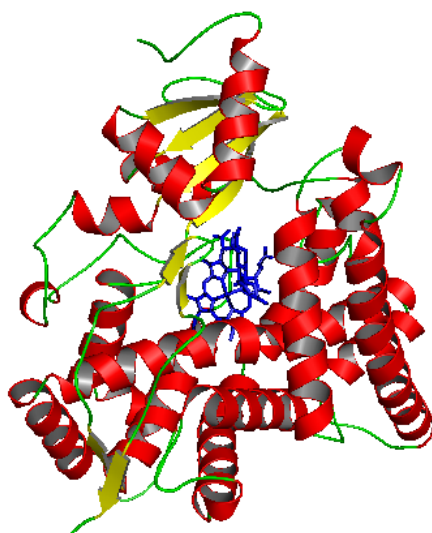
Cytochromy P450 hrají významnou roli při se biosyntéze hormonů, strukturních komponent buněk, detoxikaci cizorodých látek v I. fázi biotransformace, nebo při aktivaci léčiv a tvorbě jejich finálních metabolitů. [84] [85] Na druhou stranu jsou však zapojeny také do potenciálně nebezpečných reakcí aktivace protoxikantů a prokarcinogenů a účastní se tedy procesu karcinogeneze. Většina isoform cytochromů P450 je tzv. inducibilní – jejich koncentrace v tkáních může za určitých podmínek (například vliv induktorů) významně narůst. Příklady těchto induktorů jsou tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD), benzo[*a*]pyren, heterocyklické aminy, polychlorované bifenyly, omeprazol, barbituráty, ethanol, rifampicin, fenobarbital či dexamethason. [85]

Potenciál interagovat s cytochromy P450 a působit jako modulátory jejich aktivity mají také některá kosmetická aditiva. Jsou to například parabeny (antimikrobiální prostředky), ftaláty (fixativa syntetických vůní) a jejich metabolity, u kterých byl prokázán inhibiční účinek zejména na isoformy CYP1A a CYP2B. [86] Silnou inhibici aktivity CYP3C a CYP3D vykazují stříbrné nanočástice, které jsou jako antimikrobiální agens přidávány do opalovacích krémů, make-upu, hydratačních krémů či vlasových produktů. [87] [88] Dalším antimikrobiálním prostředkem je triclosan, zvyšující aktivitu CYP1A a CYP2B. [89] Diskutovaným kosmetickým aditivem jsou UV filtry přidávané za účelem ochrany pokožky před UV zářením. Například běžně používaná 2-fenylbenzimidazol-5-sulfonová kyselina (PBSA) výrazně zvyšuje aktivitu isoform CYP1A a CYP2B, organický filtr 3-(4-methylbenzyliden)-*d-l*-kafr (MBC) zase snižuje transkripční aktivitu některých genů pro cytochromy P450. [90] [91] Další studie poukazují na již zmíněná syntetická pižma, konkrétně nitro pižma (xylenové a ketonové pižmo) jako inhibitory CYP1A a dále polycyklická pižma (celestolid, galaxolid, tonalid) inhibující CYP3A. [92] Zajímavá je také interakce CYP s některými vonnými látkami, které samy o sobě nejsou senzibilizující, ale při metabolismu cytochromy P450 se mění na silné kontaktní alergeny. Příklady takových látek jsou geraniol a jeho metabolity geranial, neral a 6,7-epoxygeranial, nebo metabolit linaloolu, 6,7-epoxylinalool. [93] [94]

Důležitým enzymem z rodiny cytochromů P450 je aromatasa (CYP19, Obr. 6, str. 28), která má klíčovou úlohu při přeměně C19 steroidů (androgeny) na C18 steroidy (estrogeny). Tento enzym se však kromě fyziologických procesů podílí také na rozvoji nádorových onemocnění, je tedy třeba se zabývat i modulací jeho aktivity vlivem endokrinních disruptorů. [76] [95] [96]

1.6.3. Aromatasa

Aromatasa se řadí mezi glykoproteiny a vyskytuje se ve steroidogenních tkáních (folikulární buňky vaječníků, placenta), mozku, tukové tkáni a epifýzách rostoucích kostí. [76] Jak již bylo uvedeno, enzymový komplex je vázán v endoplazmatickém retikulu buněk a skládá se ze dvou hlavních proteinů – CYP19, který převádí androgeny na estrogeny, a enzymu NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasy (OR), přenášející redukční ekvivalenty na CYP19. [95] OR je diflavinový mikrosomální enzym, který přijímá elektrony z NADPH a transportuje je pomocí FAD (flavinadenindinukleotid) a FMN (flavinmononukleotid) na cytochromy P450, konečné akceptory elektronů. [97]



Obr. 6: 3D struktura lidské rekombinantní aromatasy (CYP19A1) s barevně odlišenými sekundárními strukturami – α -helixy jsou vyznačeny červeně, β -skládané listy žlutě. Prostetická skupina (hem b) je vyznačena modrou barvou. Vytvořeno v programu PyMol 1.7.4.5, PDB kód 4KQ8.

Oxidační demethylace C19 steroidů spotřebuje tři ekvivalenty NADPH a molekulárního kyslíku. Reakce vede k tvorbě C18 steroidů s aromatickým kruhem A (17 β -estradiol, estron) za současného vzniku kyseliny mravenčí. Tato aromatizace sestává ze třech po sobě následujících oxidačních kroků, jejichž detailní mechanismus však nebyl doposud zcela objasněn. Prvním krokem je zřejmě hydroxylace na C2 19-oxoandrostendionu, následovaná enzymatickým přesmykem a tautomerizací intermediátu na fenolový aromatický kruh A za současného zabudování atomu kyslíku do kyseliny mravenčí. [76] První dva kroky jsou společné pro všechny cytochromy P450, třetí je charakteristický pro aromatasa. [96]

Aromatasa hraje důležitou roli v pohlavní diferenciaci, vývoji, reprodukci a chování. Jak již bylo uvedeno, je také zapojena do procesu karcinogeneze. Vzhledem k její expresi v rakovinných buňkách jsou zde produkovány vyšší hladiny estrogenů, než je tomu u buněk normálních. [76] [96] Estrogeny podporují růst a proliferaci buněk, včetně

epitelových buněk prsu a buněk prsního karcinomu. Rovněž indukují tvorbu a sekreci růstových faktorů v buněčných liniích MCF-7 a T47D. [95]

Inhibice aromatasu je tedy důležitým přístupem ke snížení růstově-stimulačních účinků estrogenů na nádorové buňky. [95] Rozlišujeme dva typy inhibitorů, steroidní a nesteroidní. Hlavním mechanismem steroidních inhibitorů je kompetice se substrátem o vazbu na aktivní centrum enzymu, zatímco nesteroidní interagují s prostetickou skupinou aromatasu. [98] První steroidní inhibitor schválený k využití v protinádorové terapii byl 4-hydroxyandrostendion. Do novější generace inhibitorů se řadí steroidní exemestan a nesteroidní tamoxifen, anastrozol a letrozol. Hlavní využití nacházejí při léčbě metastázující rakoviny prsu, a to zejména u postmenopauzálních pacientek. [95] U žen v premenopauzálním období jsou podávány za účelem zvýšení sekrece gonadotropinu, či stimulace ovulace u neplodných žen. [99] Dlouhodobá léčba tamoxifemem je však spojena se zvýšeným výskytem potenciálně život ohrožujících nežádoucích účinků, konkrétně rakoviny endometria a tromboembolických příhod. Tato rizika jsou výrazně snížena při nahrazení tamoxifenu anastrozolem či letrozolem, ani tyto inhibitory však nejsou zcela bez vedlejších účinků. V jejich případě studie poukazují na určité zvýšení rizika demineralizace kostí a následných fraktur. [100]

Procesy exprese a aktivity aromatasu jsou ovlivněny různými endokrinními disruptory. Ty mohou působit ve smyslu aktivace či inhibice enzymu, nebo účinkem závislým na dávce (tedy v závislosti na míře expozice působí jako aktivátory či inhibitory). Substance odvozené z rostlin, které se svou strukturou podobají přirozeně se vyskytujícím estrogenům a působí obecně inhibičním účinkem, se nazývají fytoestrogeny. Patří mezi ně isoflavony (biochanin A, geinstein, daidzen), flavony (kvercetin, apigenin), lignany (enterodiol, enterolakton), mykotoxiny (zearalenon) a kumestany. Jako inhibitory působí také některé xenoestrogeny, tedy zemědělské a průmyslové chemikálie. Konkrétně to jsou některé pesticidy (DDT, methoxychlor), fungicidy (vinclozolin, prochloraz, klotrimazol), změkčovadla a surfaktanty (ftaláty) nebo polychlorované bifenyly. Aktivační účinek má pesticid DDE (dichlordifenyldichlorethylen) a herbicidy atrazin a propazin. Účinkem závislým na dávce působí pesticidy DTB (dibutylcín), TBT (tributylcín), TPT (trifenylicín) a také bisfenol A. [101]

Mezi kosmetická aditiva ovlivňující aktivitu CYP19 patří parabeny (methyl-, ethyl-, propyl-, isopropyl-, butyl-, isobutyl-, benzylparaben), které její aktivitu významně inhibují. [102] Stejným účinkem působí hojně využívané polycyklické pižmo AHTN (tonalid, 6-acetyl-1,1,2,4,4,7-hexamethyltetralin). [103] Některá aditiva ovlivňují aromatasu na úrovni transkripce jejího genu – například organický UV-filtr benzofenon-3 nebo monoisobutylftalát, které snižují transkripční aktivitu. Mezi ftaláty s opačným účinkem se řadí diethyl-, benzylbutyl- a diisobutylftalát. [104] [105]

2. Cíl práce

Cílem předkládané bakalářské práce bylo orientační studium vlivu kosmetiky, konkrétně parfémů a antiperspirantů, na aktivitu enzymu aromatasy. Pro dosažení tohoto cíle bylo třeba provést následující dílčí úkoly:

- Optimalizovat provedení reakce a složení reakční směsi obsahující enzymový komplex lidské mikrosomální aromatasy a NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasy (CYP19+OR).
- Orientačně porovnat vliv kosmetických produktů na aktivitu enzymového komplexu CYP19+OR.
- Stanovit aktivitu NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasy v přítomnosti vybraného vzorku kosmetiky.

3. Materiál a metody

3.1. Použité chemikálie

Corning® Gentest™, USA: lidská mikrosomální aromatasa + NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasa (CYP19+OR), koncentrace: 1 nmol/ml

Cypex, Velká Británie: lidská NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasa (OR) v baktosomech, koncentrace: 10,4 nmol/ml

Sigma-Aldrich, USA: β -estradiol, letrozol, TLC destičky (nosič: aluminium, stacionární fáze: silikagel)

Fluka® Analytical, Švýcarsko: testosteron

Merck KGaA, Německo: TLC destičky (nosič: aluminium, stacionární fáze: silikagel 60 F₂₅₄)

Roche Diagnostics GmbH, Německo: NADPH (tetrasodná sůl, 98%)

Lach-Ner, Česká republika: methanol, ethylacetát, dichlormethan, hexan, diethylether, kyselina sírová, NaH₂PO₄·2H₂O, hydroxid sodný, hydroxid draselný

Složení parfémů a antiperspirantů:

Parfém 1: LOEWE®, 7 Plata – alkohol, parfém (vůně), voda, ethylhexylmethoxycynamát, butylmethoxydibenzoylmethan, ethylhexylsalicylát, BHT, tokoferol, limonen, linalool, citral, benzylalkohol, citronellol, geraniol.

Parfém 2: Yves Saint Laurent®, Black Opium – alkohol, parfém (vůně), voda, benzylsalicylát, benzylalkohol, hydroxycitronellal, butylmethoxydibenzoylmethan, hexylcinnamal, limonen, linalool, geraniol, citronellol, cinnamylalkohol, methylanthranilát, amylcinnamal, citral, kumarin, benzylbenzoát, CI 15985 (žlutá 6), CI 17200 (červená 33).

Parfém 3: Chanel®, Coco – alkohol, parfém (vůně), voda, benzylsalicylát, limonen, benzylalkohol, benzylbenzoát, cinnamylalkohol, citral, citronellol, kumarin, eugenol, farnesol, geraniol, hexylcinnamal, hydroxyizohexyl-3-cyklohexenkarboxaldehyd, isoeugenol, linalool, alfa-isomethylionon, BHT, CI 14700 (červená 4), CI 19140 (žlutá 5), CI 42090 (modrá 1).

Parfém 4: Gucci®, *Giulty Absolute Pour Femme* – alkohol, parfém (vůně), voda, ethylhexylmethoxycinamát, diethylaminohydroxybenzoylhexylbenzoát, BHT, limonen, benzylsalicylát, linalool, hydroxycitronellal, alfa-isomethylionon, hexylcinnamal, citronellol, citral, kumarin, geraniol, eugenol, farnesol, CI 60730 (fialová 2), CI 17200 (červená 33), CI 15985 (žlutá 6), CI 14700 (červená 4).

Parfém 5: Chanel®, *Bleu de Chanel* – alkohol, parfém (vůně), voda, limonen, linalool, citronellol, alfa-isomethylionon, kumarin, citral, geraniol, extrakt z větvičnicku slívového (*Evernia prunastri*), farnesol, benzylbenzoát, ethylhexylmethoxycinamát, butylmethoxydibenzoylmethan, ethylhexylsalicylát, CI 60730 (fialová 2), CI 15985 (žlutá 6), CI 19140 (žlutá 5).

Parfém 6: Hermès®, *Voyage d' Hermès* – alkohol, parfém (vůně), voda, ethylhexylmethoxycinamát, limonen, citronellol, butylmethoxydibenzoylmethan, linalool, ethylhexylsalicylát, geraniol, BHT, farnesol, kumarin, citral, cinnamal, CI 19140 (žlutá 5).

Parfém 7: Gucci®, *Bloom Nettare di Fiori* – alkohol, parfém (vůně), voda, benzylsalicylát, ethylhexylmethoxycinamát, diethylaminohydroxybenzoylhexylbenzoát, BHT, linalool, benzylalkohol, cinnamal, hydroxycitronellal, citronellol, geraniol, eugenol, isoeugenol, farnesol, benzylbenzoát, hexylcinnamal, citral.

Parfém 8: Sisley®, *Soir d'Orient* – alkohol, parfém (vůně), voda, tetrasodná sůl EDTA, citronellol, hexylcinnamal, limonen, alfa-isomethylionon, benzylsalicylát, geraniol, linalool, eugenol, citral, benzyl benzoát, benzylalkohol.

Antiperspirant 1: Nivea® *Men Invisible Black & White* – voda, aluminium chlorohydrát, isoceteth-20, minerální olej (paraffinum liquidum), butylenglykol, glycerylizostearát, laureth-7-citrát, parfém, palmitamidopropyltrimoniumchlorid, propylenglykol, PEG-150-distearát, linalool, geraniol, kumarin.

Antiperspirant 2: Rexona® *Motionsense Active Protection Invisible* – voda, aluminiumzirkoniumpentachlorohydrát, glycerin, olej ze slunečnice roční (*Helianthus annuus*), steareth-2, parfém, steareth-20, disodná sůl EDTA, pentaerythryltetra-di-*t*-butylhydroxyhydrocinnamát, kaprylové/kaprinové triglyceridy, želatinový polymer, celulózová guma, benzoát sodný, silikagel, mléčnan draselný, alfa-isomethylionon, benzylalkohol, benzylbenzoát, benzylsalicylát, butylfenylmethylpropional, citronellol, geraniol, hexylcinnamal.

3.2. Použité přístroje

Centrifugační koncentrátor:

Acid-Resistant CentriVap Concentrator, BioTech, Česká republika

Stolní centrifugy:

Hettich Zentrifugen, EBA 270, Schoeller Instruments, Německo
Eppendorf[®], Centrifuge 5418, Německo

Třepací vodní lázeň:

Jeio Tech Co., LTD, BS-11, Schoeller Instruments, Jižní Korea

Vortex:

IKA[®], MS1, Schoeller Pharma Praha, Česká republika

Magnetická míchačka s ohřevem:

IKA[®], IKAMAG RH basic 2, Vitrum Praha, Česká republika

pH metr s teploměrem:

HI 2211, Hanna Instruments, USA

UV-VIS spektrofotometr:

HP 8453, Hewlett Packard, USA

Analytické váhy:

Ohaus[®], Discovery DV215CD, Schoeller Instruments, Švýcarsko

Magnetická míchačka s ohřevem:

DLAB, MS-H-S, DLAB Scientific Europe S.A.S, Francie

Automatické pipety:

Eppendorf[®], Německo

Mikrostříkačky:

Hamilton, USA

3.3. Metabolismus testosteronu v přítomnosti kosmetiky s detekcí na TLC

Reakční pufr 1:	0,1 M Na-fosfátový pufr, pH = 7,4 0,1 M NaH ₂ PO ₄ , pH upraveno 2 M NaOH
Reakční pufr 2:	0,3 M K-fosfátový pufr, pH = 7,5 0,3 M KH ₂ PO ₄ , pH upraveno 2 M KOH
Mobilní fáze (TLC):	hexan : diethylether v poměru 1 : 4
Vyvíjecí činidlo:	10% (v/v) kyselina sírová
Extrakční činidlo:	ethylacetát
Enzymy:	lidská OR v baktosomech, koncentrace: 10,4 nmol/ml lidská mikrosomální CYP19+OR, koncentrace: 1 nmol/ml
Testované vzorky:	parfémy extrahované v methanolu antiperspiranty extrahované v methanolu
Zásobní roztoky:	5 mM testosteron (TST) v methanolu 0,5 mM β-estradiol (ESD) v methanolu 5 mM a 10 mM NADPH v destilované vodě 50 μM a 200 μM letrozol v methanolu 0,5 mg/ml cytochrom c v reakčním pufru 2 1,04 nmol/ml OR v reakčním pufru 2

3.3.1. Vliv testovaných vzorků na aktivitu aromatasy

Do silnostěnných zkumavek byly připraveny reakční směsi o celkovém objemu 500 μl. Nejprve byly přidány všechny složky kromě NADPH – reakční pufr 1 (dále jen „pufr 1“), 50 μM testosteron, 15 nM nebo 30 nM aromatasa, testovaný vzorek (parfém či antiperspirant, ředění: 3x, 10x, 15x, 25x), případně methanol. Příklad parfému či methanolu byl 5 μl, s výjimkou stanovení koncentrační závislosti vybraného testovaného vzorku, kdy bylo přidáváno 25 μl. Při všech optimalizačních experimentech byl přidáván parfém 1.

Reakční směsi byly 5 minut preinkubovány v třepací vodní lázni (37 °C, 55 RPM). V časových intervalech 1 minuta byly reakce postupně iniciovány přidavkem NADPH (u reakčních směsí bez NADPH byl přidán pouze pufr 1), promíchány 10 sekund na přístroji vortex a následně 30 minut inkubovány v třepací vodní lázni (37 °C, 55 RPM).

Po inkubaci byly reakce opět v intervalech 1 minuta ukončovány přidavkem 2 ml ethylacetátu. Poté byla provedena tzv. vířivá extrakce na přístroji vortex a následovala centrifugace na stolní centrifuze EBA 270 (3000 RPM, 2 minuty). Do tenkostěnných zkumavek bylo injekční stříkačkou odebráno 1,5 ml horní organické fáze a odpařeno v centrifugačním koncentrátoru (37 °C, 30 minut). Odparky byly přidavkem 125 µl ethylacetátu smyty ze stěn zkumavek, odpařeny v centrifugačním koncentrátoru (37 °C, 5 minut) a následně rozpuštěny ve 20 µl ethylacetátu.

TLC destička (5x10 cm) byla nejprve aktivována proudem horkého vzduchu z fénu po dobu 5 minut a poté na ni byly naneseny vzorky. Vyvíjení probíhalo v chromatografické vaně s mobilní fází hexan : diethylether (1 : 4). Destička byla vysušena fénem a skvrny vizualizovány roztokem 10% kyseliny sírové nanášeným pomocí rozprašovače. Následovalo další vysušení fénem a zahřívání na ploténce, dokud nebyly barevné produkty na TLC destičce plně vizualizovány.

3.4. Aktivita NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasy v přítomnosti kosmetiky

Experiment byl proveden dle Teplá a kol. [106] Aktivita enzymu byla měřena spektrofotometricky v UV-VIS spektrofotometru (HP 8453) ve skleněné maskované semimikrokyvetě (délka optické dráhy: 10 mm), při vlnové délce 550 nm.

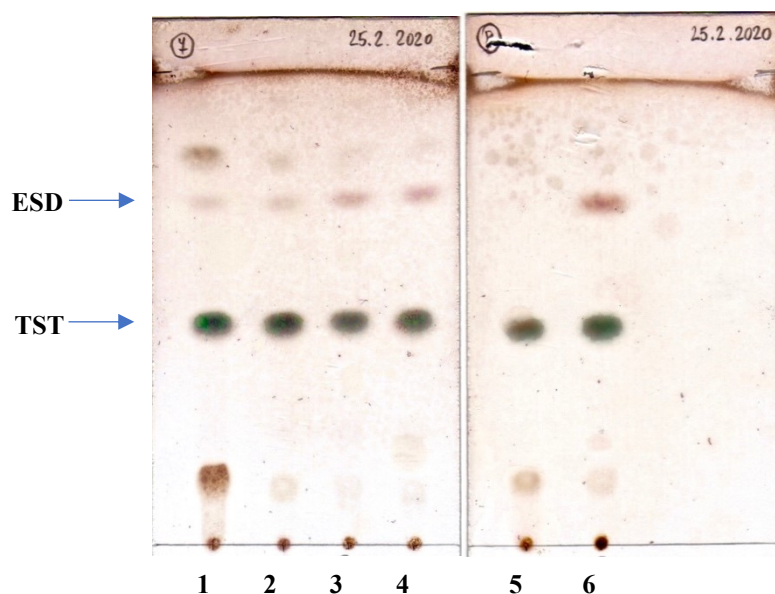
Do spektrofotometrické kyvety byly dávkovány komponenty reakční směsi o celkovém objemu 600 µl, obsahující 0,5 mg/ml cytochrom c v reakčním pufru 2, enzym OR o koncentraci 4,3 pmol/ml a 5 µl 3x ředěného testovaného vzorku či methanolu. Před iniciací reakce přidavkem NADPH byl přístroj na tento vzorek vynulován, následně bylo přidáno 10 µl 10 mM NADPH a ihned registrována absorbance při 550 nm po dobu 3 minut (v časových intervalech 10 sekund).

4. Výsledky

4.1. Optimalizace složení reakční směsi

Koncentrace aromatasy a NADPH

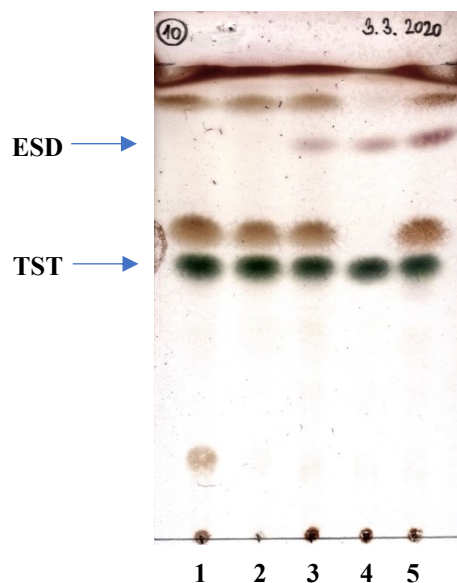
Prvním krokem bylo určení vhodné koncentrace CYP19+OR a NADPH v reakční směsi, aby byl produkt reakce (estradiol) na TLC dobře viditelný (Obr. 7). Reakční směsi obsahovaly 50 μM testosteron, CYP19+OR o koncentracích 15 nM a 30 nM a NADPH o koncentracích 1 mM a 0,5 mM v pufru 1. Další reakční směs byla bez přídavku NADPH, které bylo nahrazeno pufrům 1. Standardní roztok obsahoval 50 μM testosteron a 5 μM estradiol v pufru 1.



Obr. 7: Optimalizace koncentrace aromatasy a NADPH v reakční směsi – **dráha č. 1:** 15 nM CYP19+OR, 1 mM NADPH; **dráha č. 2:** 15 nM CYP19+OR, 0,5 mM NADPH; **dráha č. 3:** 30 nM CYP19+OR, 1 mM NADPH; **dráha č. 4:** 30 nM CYP19+OR, 0,5 mM NADPH; **dráha č. 5:** bez NADPH (nahrazeno pufrům 1), **dráha č. 6:** standard (50 μM TST, 5 μM ESD v pufru 1).

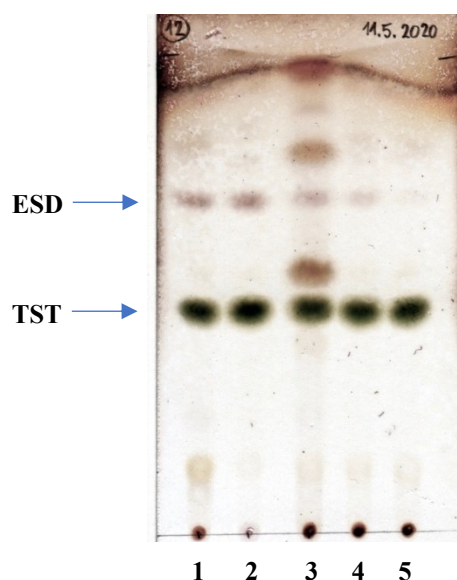
Reakční směs bez aromatasy a NADPH

Sledovaným parametrem byl vliv chybějících složek reakční směsi (CYP19+OR, NADPH) na vznik produktu (Obr. 8, str. 37). Reakční směs bez CYP19+OR obsahovala testosteron, parfém a NADPH v pufru 1, reakční směs bez NADPH obsahovala testosteron, parfém a CYP19+OR v pufru 1. Dále byl zkoumán průběh reakce v kompletní reakční směsi (s CYP19+OR i NADPH) s parfémem a bez něj. Vzniklý estradiol byl na TLC destičce porovnáván se standardem (reakční směs obsahující testosteron a estradiol v pufru 1).



Obr. 8: Vliv chybějících složek reakční směsi na produkt – **dráha č. 1:** bez NADPH (50 μ M TST, 30 nM CYP19+OR, 3x ředěný parfém v pufru 1); **dráha č. 2:** bez CYP19+OR (50 μ M TST, 0,5 mM NADPH, 3x ředěný parfém v pufru 1); **dráha č. 3:** 50 μ M TST, 30 nM CYP19+OR, 0,5 mM NADPH, 3x ředěný parfém v pufru 1; **dráha č. 4:** bez parfému (50 μ M TST, 30 nM CYP19+OR, 0,5 mM NADPH v pufru 1); **dráha č. 5:** 50 μ M TST, 5 μ M ESD, 3x ředěný parfém v pufru 1).

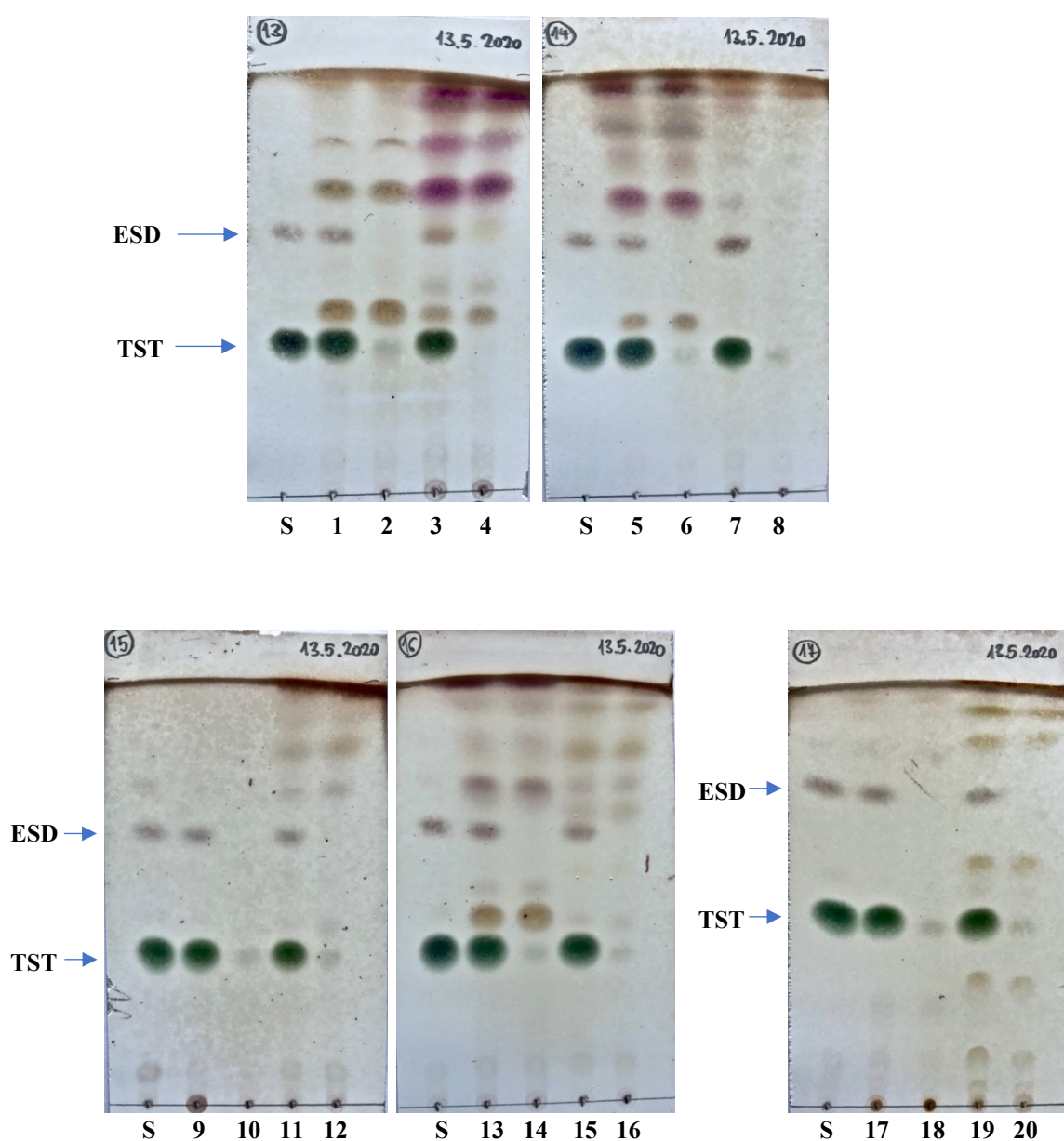
Cílem dalšího experimentu bylo porovnat vliv parfému na aktivitu CYP19+OR s nesteroidním inhibítoem tohoto enzymu, letrozolem (Obr. 9). Reakční směsi obsahovaly testosteron, aromatasu, NADPH, letrozol o koncentracích 0,5 μ M a 2 μ M a dále parfém či methanol v pufru 1.



Obr. 9: Porovnání inhibice aromatasy parfémem a letrozolem – **dráha č. 1:** 50 μ M TST, 30 nM aromatasu, 0,5 mM NADPH v pufru 1; **dráha č. 2:** standard (50 μ M TST, 5 μ M ESD v pufru 1); **dráha č. 3:** reakční směs s 3x ředěným parfémem; **dráha č. 4:** reakční směs s 0,5 μ M letrozolem; **dráha č. 5:** reakční směs s 2 μ M letrozolem.

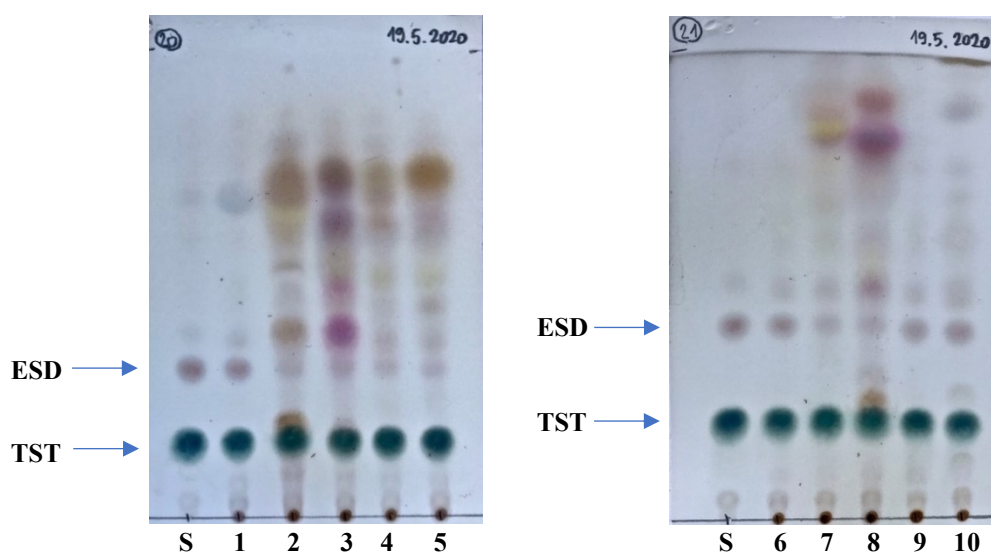
4.2. Vliv kosmetických přípravků na aktivitu aromatasy

Pro orientační „screening“ interakce kosmetiky s enzymem aromatasou technikou TLC je zásadní, aby žádná z jejích komponent nekomigrovala s estradiolem a nebránila tak detekci jeho zóny na TLC (Obr. 10). Každý vzorek parfému či antiperspirantu byl přidán jednak do reakční směsi s testosteronem a estradiolem v pufru 1 a dále pro porovnání do reakční směsi obsahující pouze pufr 1. Výsledky byly porovnány se standardem.



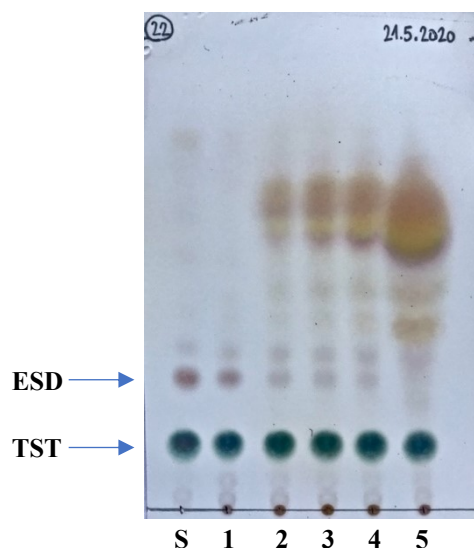
Obr. 10: TLC separace složek kosmetiky a hormonů – **dráhy S:** standard (50 μ M TST, 5 μ M ESD v pufru 1). Každý vzorek kosmetiky byl přidán do dvou reakčních směsí, první z nich obsahovala 50 μ M TST, 5 μ M ESD a 3x ředěný parfém / antiperspirant v pufru 1, následující 3x ředěný parfém / antiperspirant a methanol v pufru 1. **Dráha č. 1 a 2:** parfém 1; **dráha č. 3 a 4:** parfém 2; **dráha č. 5 a 6:** parfém 3; **dráha č. 7 a 8:** parfém 4; **dráha č. 9 a 10:** parfém 5; **dráha č. 11 a 12:** parfém 6; **dráha č. 13 a 14:** parfém 7; **dráha č. 15 a 16:** parfém 8; **dráha č. 17 a 18:** antiperspirant 1; **dráha č. 19 a 20:** antiperspirant 2.

Následně byla u vybraných parfémů a antiperspirantů testována jejich schopnost ovlivnit metabolickou konverzi testosteronu na estradiol. Reakční směsi obsahovaly testosteron, CYP19+OR, NADPH v pufru 1 a testovaný vzorek. Porovnáním s neovlivněnou reakcí bylo zjištěno, do jaké míry tyto vzorky ovlivňovaly aktivitu aromatasy (Obr. 11).



Obr. 11: Testování vlivu parfémů a antiperspirantů na aktivitu aromatasy – **dráhy S:** standard (50 μ M TST, 5 μ M ESD v pufru 1); **dráhy č. 1 a 6:** reakční směs bez testovaného vzorku kosmetiky (50 μ M TST, 30 nM aromatasa, 0,5 mM NADPH, methanol v pufru 1). Ostatní dráhy obsahovaly 50 μ M TST, 30 nM aromatasa, 0,5 mM NADPH a 3x ředěný parfém / antiperspirant v pufru 1. **Dráha č. 2:** parfém 1; **dráha č. 3:** parfém 3; **dráha č. 4:** parfém 4; **dráha č. 5:** parfém 5; **dráha č. 7:** parfém 6; **dráha č. 8:** parfém 7; **dráha č. 9:** antiperspirant 1; **dráha č. 10:** antiperspirant 2.

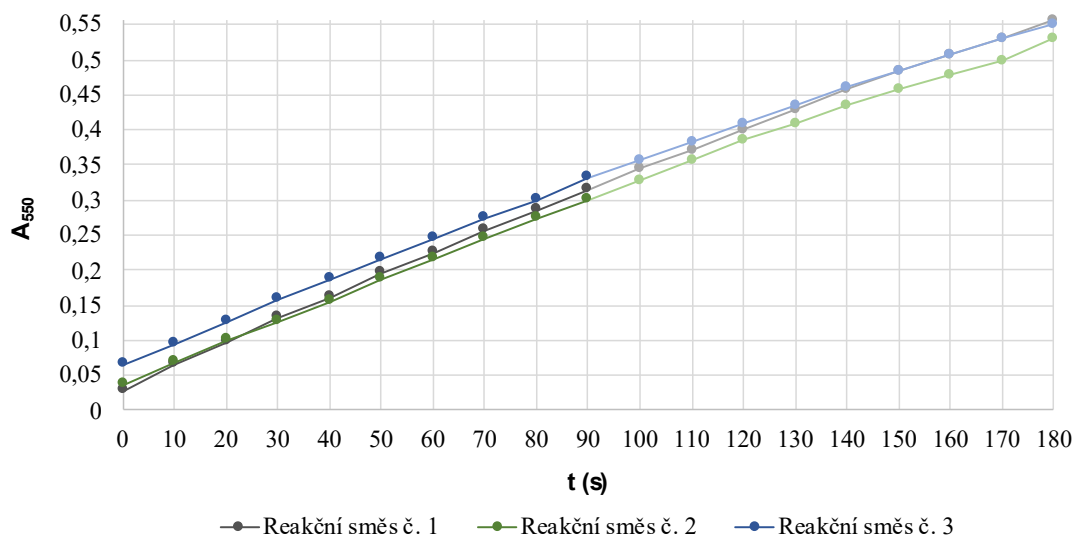
Na základě předchozího testu byl vybrán vzorek, který ovlivňoval aktivitu aromatasy nejvíce. Následně byl porovnáním se standardem a reakční směsí bez přidavky testovaného vzorku zkoumán vliv jeho koncentrace v reakční směsi na vznik estradiolu (Obr. 12, str. 38). Reakční směsi obsahovaly testosteron, aromatasu, NADPH a různé koncentrace testovaného vzorku (nebo methanol) v pufru 1.



Obr. 12: Vliv koncentrace vybraného vzorku kosmetiky na aktivitu aromatasy – **dráha S:** standard (50 μM TST, 5 μM ESD v pufru 1). **Dráha č. 1:** reakční směs bez testovaného vzorku (50 μM TST, 30 nM aromatasa, 0,5 mM NADPH, methanol v pufru 1). V ostatních dráhách byly místo methanolu přidávány různé koncentrace testovaného vzorku. **Dráha č. 2:** 25x ředěný parfém; **dráha č. 3:** 15x ředěný parfém; **dráha č. 4:** 10x ředěný parfém; **dráha č. 5:** 3x ředěný parfém.

4.3. Redukce cytochromu c v přítomnosti kosmetiky

Cílem testu bylo rozlišit, zda vybraný vzorek kosmetiky ovlivňuje aktivitu CYP19+OR, nebo inhibuje NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasu (OR), která slouží jako přenašeč elektronů v enzymovém komplexu CYP19+OR. Aktivita tohoto enzymu byla stanovena spektrofotometricky jako časový průběh redukce elektronového akceptoru, cytochromu c (Obr. 13).



Obr. 13: Vliv vzorku kosmetiky na aktivitu NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasy – **Reakční směs č. 1:** 0,5 mg/ml cytochrom c v reakčním pufru 2, OR o koncentraci 4,3 pmol/ml, 0,17 mM NADPH; **reakční směs č. 2:** s přidavkem 2,5 μl methanolu; **reakční směs č. 3:** s přidavkem 2,5 μl 3x ředěného parfému v methanolu. Měřeno při 550 nm po dobu 3 minuty. Lineární části závislosti jsou označeny tmavší barvou.

5. Diskuze

Endokrinní disruptory jsou exogenní sloučeniny s potenciálem narušovat hormonální regulaci a normální funkci endokrinního systému. Mohou poškozovat procesy produkce, uvolňování a metabolismu přirozených hormonů, nebo simulovat jejich funkce v organismu. [107] Tyto látky se vyskytují v životním prostředí, typickým příkladem jsou pesticidy, herbicidy či organické sloučeniny cínu. [77] Často jsou jim lidé vystaveni také vědomě, a to v podobě léčiv či kosmetických produktů, které denně používají.

V současné době jsou jako cíl endokrinních disruptorů stále více studovány enzymy zapojené do metabolismu steroidních hormonů. Narušení jejich homeostázy může mít za následek reprodukční problémy, změny v sexuální diferenciaci, růstu a vývoji, či zvýšené riziko vzniku nádorových onemocnění. [74] Jedním z těchto enzymů je aromatasa, enzym z rodiny cytochromů P450, který v posledním kroku syntézy steroidních hormonů převádí androgeny na estrogenery. Právě zvýšená hladina estrogenů je jedním z faktorů rozvoje nádorových onemocnění, jelikož účinkem těchto hormonů je mimo jiné podpora růstu a proliferace buněk. [95] Aromatasa je exprimována ve steroidogenních tkáních a mozku, obrovskou kapacitu má ale také v tukové tkáni. [76] Podkožní tuková tkáň tvoří nezanedbatelnou část lidského těla a je v podstatě v přímém kontaktu s kosmetickými produkty, které jsou na kůži aplikovány.

V rámci této bakalářské práce byl proto studován vliv vybraných parfémů a antiperspirantů na aktivitu aromatasy. Tento efekt byl orientačně detekován s využitím TLC chromatografie, sledovaným parametrem byla metabolická konverze testosteronu na estradiol katalyzovaná tímto enzymem.

Před samotným testováním vzorků kosmetiky bylo nutné optimalizovat složení experimentální reakční směsi. Nejprve byla zjišťována taková koncentrace CYP19+OR a NADPH, při které byla zóna vzniklého estradiolu na TLC dobře viditelná. Jako vhodná koncentrace CYP19+OR byla určena 30 pmol/ml, v případě NADPH o koncentracích 1 μmol/ml a 0,5 μmol/ml byly zóny estradiolu v podstatě shodné, v dalších experimentech byla proto používána koncentrace 0,5 μmol/ml.

Dále byl zkoumán průběh reakce v reakčních směsích, ve kterých chyběla určitá složka klíčová pro konverzi testosteronu na estradiol. V reakčních směsích bez CYP19+OR nebo NADPH žádný produkt nevznikl, čímž bylo ověřeno, že bez těchto komponent reakce neprobíhá. Po přidavku parfému do kompletní reakční směsi a porovnání s neovlivněnou reakční směsí a standardem byla detekována jistá inhibice vzniku estradiolu. Stejný výsledek byl získán i v dalším experimentu, kdy byl tento efekt porovnán s inhibicí zprostředkovanou nesteroidním inhibitorem aromatasy, letrozolem. [95] Po přidavku vyšší koncentrace tohoto inhibitoru byla pozorována vyšší míra inhibice aromatasy.

Při tomto orientačním testování vlivu parfémů a antiperspirantů na aktivitu aromatasy je zásadní, aby žádná z jejich ingrediencí nekomigrovala s estradiolem a nebránila tak detekci jeho zóny na TLC destičce. Dalším krokem tedy byla separace směsi hormonů v přítomnosti testovaných vzorků kosmetiky. U parfémů 2 a 8 bylo zjištěno určité splynutí zóny estradiolu s některou z jejich komponent, tyto vzorky proto nebylo možné v těchto testech dále zkoumat.

V dalším experimentu bylo zjišťováno, jakým účinkem působí vybrané vzorky kosmetiky na aktivitu aromatasy po jejich přidání do reakční směsi. V případě dvou testovaných antiperspirantů nebyla ani u jednoho z nich pozorována žádná změna v aktivitě aromatasy. Všechny testované parfémy působily určitým inhibičním účinkem. Z testovaného souboru byl vybrán parfém 6 (*Hermès®*, *Voyage d' Hermès*), vykazující nejvyšší inhibici metabolické konverze testosteronu na estradiol. U tohoto vzorku byla poté testována závislost jeho koncentrace na vzniku estradiolu. Zóna estradiolu byla prakticky stejná při přidavku 25x a 15x ředěného parfému, nicméně při porovnání 25x a 10x ředěného parfému již byla patrná vyšší inhibice v případě vyšší koncentrace v reakční směsi. U reakční směsi s přidavkem 3x ředěného parfému nebylo možné výsledek vyhodnotit, jelikož zóny v celé dráze byly nezřetelné.

Následně bylo nutné rozlišit, zda vybraný vzorek parfému skutečně ovlivňuje aromatasu, nebo pouze inhibuje NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasu (OR) v enzymovém komplexu CYP19+OR. OR je redoxní enzym, který přenáší elektrony z kofaktorů NADH a NADPH do reakčního centra enzymů cytochromu P450 a je tedy klíčový pro jejich funkci. [83] Aktivita tohoto enzymu byla stanovena spektrofotometicky jako časový průběh redukce jednoho z potenciálních elektronových akceptorů, cytochromu c. Z Obr. 13 (str. 40) je patrné, že směrnice závislosti pro neovlivněnou reakční směs je odlišná od zbývajících dvou reakčních směsí s přidavkem methanolu nebo roztoku parfému. Směrnice závislosti pro tyto reakční směsi však byly velmi podobné, z čehož lze usoudit, že parfém neměl na aktivitu OR vliv.

Při porovnání složení vybraného parfému 6, který aktivitu CYP19+OR inhiboval nejvíce, byla největší shoda s dalšími parfémy nalezena u parfému 1. Vzhledem k nezřetelné vizualizaci dráhy tohoto parfému na TLC sice není možné zónu estradiolu vyhodnotit zcela jednoznačně, i tak se však jeho vznik zdá být inhibován méně, než tomu v případě parfému 6 (Obr. 11, str. 39). Parfém 6 obsahuje navíc ingredience farnesol, kumarin, cinnamal a CI 19140 (žlutá 5), které v parfému 1 obsaženy nejsou. Sloučeniny farnesol a kumarin se vyskytují také v parfému 4 a 5, parfém 5 navíc ještě obsahuje CI 19140. U obou těchto parfémů byla zaznamenána srovnatelná míra inhibice vzniku estradiolu, jako u parfému 6. Cinnamal je dále obsažen v parfému 7, u kterého zóny opět nebyly zcela jednoznačné, nicméně jistá inhibice vzniku estradiolu byla zjištěna. Na druhou stranu, barvivo CI 19140 tento efekt pravděpodobně nevykazuje, jelikož parfém 3 s jeho obsahem vznik estradiolu inhiboval v menší míře.

Sloučeninami podezřelými z inhibičního vlivu na aktivitu aromatasu by tedy mohly být farnesol, kumarin nebo cinnamal, které jsou zároveň označeny jako potenciální alergeny v evropské Směrnici o kosmetických prostředcích (2003/15/ES, [13]). Tento účinek na aktivitu aromatasu byl prokázán u kumarinu a jeho derivátů například ve studiích Adams a kol. ([108]), nebo Yamaguchi a kol. ([109]). V případě farnesolu však studie poukazují spíše na opačný účinek, tedy indukci aktivity aromatasu (např. studie Horn a kol., [110]). Nicméně většina studií je zaměřena na testování jednotlivých složek kosmetiky, nikoliv kosmetických produktů jako celku – tedy směsi sloučenin. V konečném důsledku může tedy docházet k vzájemnému ovlivňování jednotlivých ingrediencí, a tudíž k odlišným účinkům, než při testování samotných ingrediencí (např. studie Backhaus a kol., [111]).

Většina testovaných parfémů vykazovala minimální inhibici aktivity aromatasu. Pouze parfém *Hermès®*, *Voyage d' Hermès* vykazoval vyšší inhibiční účinek. Potenciálním inhibítozem aktivity aromatasu může být některá z komponent parfému, například farnesol, kumarin či cinnamal. Testované antiperspiranty nevykazovaly významnou inhibici aktivity aromatasu a lze je tedy v tomto směru považovat za bezpečné. Nicméně metoda TLC chromatografie využívaná v předkládané bakalářské práci je pouze orientační a pro ověření těchto efektů bude třeba provést detailnější studie využívající HPLC chromatografii.

6. Souhrn

Tato bakalářská práce byla zaměřena na sledování vlivu parfémů a antiperspirantů na aktivitu enzymu cytochromu P450 19, aromatasy, která katalyzuje poslední krok biosyntézy steroidních hormonů, aromatizaci androgenů na estrogenery. Experimenty byly prováděny na enzymovém komplexu lidské mikrosomální CYP19+OR a sledovaly schopnost těchto kosmetických produktů ovlivnit metabolickou konverzi testosteronu na estradiol. Efekty byly orientačně detekovány metodou TLC chromatografie. Bylo dosaženo následujících výsledků:

- Při optimalizaci složení reakční směsi byla stanovena vhodná koncentrace CYP19+OR 30 pmol/ml a NADPH 0,5 μmol/ml.
- Pomocí TLC byla porovnána míra inhibice aktivity aromatasy v reakčních směsích s přidavkem vybraných parfémů a antiperspirantů.
- Nejvyšší míru inhibice vykazoval parfém 6 (*Hermès[®], Voyage d' Hermès*). Potenciálními inhibitory aromatasy by mohly být obsažené komponenty, například farnesol, kumarin nebo cinnamal.
- Spektrofotometrickým stanovením aktivity NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasy na základě měření redukce cytochromu c bylo ověřeno, že přidavek parfému do reakční směsi tento enzym neinhibuje.

Seznam použité literatury

- [1] Mitsui, T.: *New Cosmetic Science*. Amsterdam, Elsevier Science B.V., 1993.
- [2] Kitchin, G. W.: *Francis Bacon: The Advancement of Learning*. Philadelphia, Paul Dry Books, 2001.
- [3] Stewart, S.: *Painted Faces: A Colourful History of Cosmetics*. Stroud, Gloucestershire, Amberley Publishing, 2017.
- [4] Aftel, M.: *Essence and Alchemy: A Book of Perfume*. London: Bloomsbury Paperbacks, 2002.
- [5] *A Guide to the History of Perfume: A Selection of Vintage Articles on the Uses and Progress of Perfumery*. Read Books Limited, 2013.
- [6] Li, Y.; Fabiano-Tixier, A. S.; Chemat, F.: *Essential Oils as Reagents in Green Chemistry*. Avignon, Springer International Publishing, 2014.
- [7] Rhind, J. P.: *Essential Oils: A Handbook for Aromatherapy Practice*. 2nd ed. London, Jessica Kingsley Publishers, 2012.
- [8] Turin, L.; Sanchez, T.: *Perfumes: The A-Z Guide*. USA, Penguin Putnam, 2008.
- [9] Rhind, J. P.: *Fragrance and Wellbeing: Plant Aromatics and Their Influence on the Psyche*. London, Singing Dragon, 2014.
- [10] Piesse, G. W. S.: *The Art of Perfumery, and the Methods of Obtaining the Odours of Plants*. 3rd ed. London, Longman, Green, Longman and Roberts, 1862.
- [11] Groom, N.: *The New Perfume Handbook*. 2nd ed. London, Blackie Academic & Professional, 1992.
- [12] The Scientific Committee on Cosmetic Products and Non-Food Products Intended for Consumers: *Opinion Concerning Fragrance Allergy in Consumers*. Dostupné z URL: <https://ec.europa.eu/health/archive/ph_risk/committees/sccp/documents/out98_en.pdf> [cit. 15. 3. 2020]
- [13] Směrnice Evropského parlamentu a Rady 2003/15/ES ze dne 27. února 2003, kterou se mění směrnice Rady 76/768/EHS o sbližování právních předpisů členských států týkajících se kosmetických prostředků. *Úřední věstník Evropské unie*. Lucemburk. 13, 32003L0015 (2003).
- [14] Baser, K. H. C.; Buchbauer, G.: *Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications*. Boca Raton, CRC Press, 2009.
- [15] Kučerová, R.: Zdravotní aspekty antiperspirantů. *Dermato Praxi*. **9**, 70–72 (2015)
- [16] Toedt, J.; Koza, D.; Van Cleef-Toedt, K.: *Chemical Composition of Everyday Products*. Westport, Connecticut, Greenwood Press, 2005.

- [17] Baki, G.; Alexander, K. S.: *Introduction to Cosmetic Formulation and Technology*. Hoboken, New Jersey, John Wiley & Sons, 2015.
- [18] Shimada, K.; Iwata, H.: *Formulas, Ingredients and Production of Cosmetics: Technology of Skin- and Hair-Care Products in Japan*. Tokyo, Springer, 2013.
- [19] Krejčí, J.: *Kosmetické přípravky a prostředky*. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická. Učební text vyvinutý v rámci projektu OPVK "Zvyšování exkluzivity výuky technologie tuků, kosmetiky a detergentů", s. 32-88, registrační číslo CZ.1.07/2.2.00/28.0132.
- [20] Goldstein, B. E.: *Encyclopedia of Perception*. Los Angeles, SAGE Publications, 2010.
- [21] Kirk-Othmer, R. E.: *Kirk-Othmer Chemical Technology of Cosmetics*. Hoboken, New Jersey, John Wiley & Sons, 2013.
- [22] Veitch, F. P.; Grotlich, V. E.: *Turpentine Its Sources, Properties, Uses, Transportation, and Marketing, with Recommended Specifications*. Washington, D.C., U.S. Government Printing Office, 1921.
- [23] Arctander, S.: *Perfume and Flavor Materials of Natural Origin*. Lulu.com, 1960.
- [24] Rietschel, R. L.; Fowler, J. F., Jr.: *Fisher's Contact Dermatitis*. 6th ed. Hamilton, BC Decker, 2008.
- [25] Rowe, D.: *Chemistry and Technology of Flavours and Fragrances*. USA, Blackwell Publishing, 2005.
- [26] Van Toller, C. S.; Dodd, G. H.: *Fragrance: The Psychology and Biology of Perfume*. Essex, England, Elsevier Science Publishers, 1992.
- [27] Cotton, S.: *Every Molecule Tells a Story*. Boca Raton, CRC Press, 2008.
- [28] Del Rosso, J. Q.: *The Year Book of Dermatology and Dermatologic Surgery*. Philadelphia, Elsevier Mosby, 2012.
- [29] Dar, A. M.: *Cosmetic Chemistry: An Instant Approach*. New Delhi, Education Publishing, 2018.
- [30] Cosmetics Info: The Science & Safety Behind Your Favorite Products: *Antiperspirants & Deodorants*. Dostupné z URL: <<https://cosmeticsinfo.org/antiperspirants-deodorants>> [cit. 27. 3. 2020].
- [31] Ferreira, P. C.; Piai, K. A.; Takayanagui, A. M.; Segura-Muñoz, S. I.: Aluminum as a risk factor for Alzheimer's disease. *Rev Latino-Am Enfermagem*. **16**, 151–7 (2008).

- [32] Graves, A. B.; White, E.; Koepsell, T. D.; Reifler, B. V.; van Belle, G.; Larson, E. B.: The association between aluminum-containing products and Alzheimer's disease. *J Clin Epidemiol.* **43**, 35–44 (1990).
- [33] Montemarano, A. D.; Sau, P.; Johnson, F. B.; James, W. D.: Cutaneous granulomas caused by an aluminum-zirconium complex: An ingredient of antiperspirants. *J Am Acad Dermatol.* **37**, 496–498 (1997).
- [34] Pineau, A.; Fauconneau, B.; Sappino, A.-P.; Deloncle, R.; Guillard, O.: If exposure to aluminium in antiperspirants presents health risks, its content should be reduced. *J Trace Elem Med Biol.* **28**, 147–150 (2014).
- [35] Lange, C.; Kuch, B.; Metzger, J. W.: Estrogenic activity of constituents of underarm deodorants determined by E-Screen assay. *Chemosphere.* **108**, 101–106 (2014).
- [36] Darbre, P. D.; Harvey, P. W.: Parabens can enable hallmarks and characteristics of cancer in human breast epithelial cells: a review of the literature with reference to new exposure data and regulatory status. *J Appl Toxicol.* **34**, 925–938 (2014).
- [37] Darbre, P. D.: Underarm cosmetics are a cause of breast cancer. *Eur J Cancer Prev.* **10**, 389–394 (2001).
- [38] Darbre, P. D.; Aljarrah; Miller, W.; Coldham, N. G.: Concentrations of parabens in human breast tumours. *J Appl Toxicol.* **24**, 5–13 (2004).
- [39] Darbre, P.D.: Aluminium, antiperspirants and breast cancer. *J Inorg Biochem.* **99**, 1912–1919 (2005).
- [40] Darbre, P. D.: Metalloestrogens: an emerging class of inorganic xenoestrogens with potential to add to the oestrogenic burden of the human breast. *J Appl Toxicol.* **26**, 191–197 (2006).
- [41] Darbre, P. D.; Harvey, P. W.: Paraben esters: review of recent studies of endocrine toxicity, absorption, esterase and human exposure, and discussion of potential human health risks. *J Appl Toxicol.* **28**, 561–578 (2008).
- [42] Darbre, P. D.: Underarm antiperspirants/deodorants and breast cancer. *Breast Cancer Res.* **11** (2009).
- [43] Draelos, Z. D.; Thaman, L. A.: *Cosmetic Formulation of Skin Care Products*. New York, Taylor & Francis, 2006.
- [44] Směrnice Rady ze dne 27. července 1976 o sblížení právních předpisů členských států týkajících se kosmetických prostředků. *Úřední věstník Evropské unie*. Lucemburk. **13** (1976).

- [45] Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1223/2009 ze dne 30. listopadu 2009 o kosmetických přípravcích. *Úřední věstník Evropské unie*. Lucemburk. 1223/2009 (2009).
- [46] Salvador, A.; Chisvert, A.: *Analysis of Cosmetic Products*. Amsterdam, Elsevier Science B.V., 2007.
- [47] Balls, M.; Combes, R.; Worth, A.: *The History of Alternative Test Methods in Toxicology*. London, Academic Press, 2019.
- [48] *Toxicity Testing for Assessment of Environmental Agents: Interim Report*. Washington, D.C., The National Academies Press, 2006.
- [49] Loprieno, N.: *Alternative Methodologies for the Safety Evaluation of Chemicals in the Cosmetic Industry*. Boca Raton, CRC Press, 1995.
- [50] Knejzlík, Z.; Ruml, T.: Nepříznivý vliv xenobiotik na lidský organismus a metody jeho testování. *Chem Listy*. **93**, 607–610 (1999).
- [51] Sherrow, V.: *For Appearance' Sake: The Historical Encyclopedia of Good Looks, Beauty, and Grooming*. Westport, Connecticut, Oryx Press, 2001.
- [52] Woolley, A.: *A Guide to Practical Toxicology: Evaluation, Prediction, and Risk*. 2nd ed. Boca Raton, CRC Press, 2008.
- [53] Fadeel, B.; Pietroiusti, A.; Shvedova, A. A.: *Adverse Effects of Engineered Nanomaterials: Toxicity Tests: In Vitro and In Vivo*. 2nd ed. Academic Press, 2017.
- [54] Dhawan, A.; Kwon, S.: *In Vitro Toxicology*. London, Academic Press, 2018.
- [55] Eisenbrand, G.; Pool-Zober, B.; Baker, V.; Balls, M.; Blaauboer, B. J.; Boobis, A.; Carere, A.; Kevekordes, S.; Lhuguenot, J.-C.; Pieters, R.; Kleiner, J.: Methods of in vitro toxicology. *Food Chem Toxicol.* **40**, 193–236 (2002).
- [56] Celis, J. E.: *Cell Biology: A Laboratory Handbook*. 3rd ed. Amsterdam, Academic Press, 2006.
- [57] Blumenthaù, R. D.: *Chemosensitivity*. New Jersey, Humana Press, 2005.
- [58] Kuete, V.: *Medicinal Spices and Vegetables from Africa: Therapeutic Potential against Metabolic, Inflammatory, Infectious and Systemic Diseases*. London, Elsevier Science, 2017.
- [59] Kumar, A.; Dobrovolsky, V. N.; Dhawan, A.; Shanker, R.: *Mutagenicity: Assays and Applications*. London, Elsevier Science, 2017.
- [60] Keohawong, P.; Grant, S. G.: *Molecular Toxicology Protocols*. New Jersey, Humana Press, 2005.

- [61] Singleton, P.: *Dictionary of DNA and Genome Technology*. 3rd ed. Chichester, West Sussex, John Wiley & Sons, 2012.
- [62] Yun, Y. E.; Jung, Y. J.; Choi, Y. J.; Choi, J. S.: Artificial skin models for animal-free testing. *J Pharm Investig.* **48**, 215–223 (2018).
- [63] Kandárová, H.; Letašiová, S.: Alternative methods in toxicology: pre-validated and validated methods. *Interdiscip Toxicol.* **4**, 107–113 (2011).
- [64] Jung, J.; Ishida, K.; Nishihara, T.: Anti-estrogenic activity of fifty chemicals evaluated by in vitro assays. *Life Sci.* **74**, 3065–3074 (2004).
- [65] Edlin, G.; Golanty, E.: *Health and Wellness*. 10th ed. Sudbury, Jones & Bartlett Learning, 2009.
- [66] Mueller, S. O.: Overview of in vitro tools to assess the estrogenic and antiestrogenic activity of phytoestrogens. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* **777**, 155–165 (2002).
- [67] Ohno, K.; Fukushima, T.; Santa, T.; Waizumi, N.; Tokuyama, H.; Maeda, M.; Imai, K.: Estrogen Receptor Binding Assay Method for Endocrine Disruptors Using Fluorescence Polarization. *Anal Chem.* **74**, 4391–4396 (2002).
- [68] Kinnberg, K.: *Evaluation of in vitro assays for determination of estrogenic activity in the environment*. Danish Environmental Protection Agency, Working Report no. 43 (2003).
- [69] Wilson, V. S.; Bobseine, K., Gray, L. E., Jr.: Development and Characterization of a Cell Line That Stably Expresses an Estrogen-Responsive Luciferase Reporter for the Detection of Estrogen Receptor Agonist and Antagonists. *Toxicol Sci.* **81**, 69–77 (2004).
- [70] Charles, G. D.: In Vitro Models in Endocrine Disruptor Screening. *ILAR J.* **45**, 494–501 (2004).
- [71] Zacharewski, T.: In Vitro Bioassays for Assessing Estrogenic Substances. *Environ. Sci Technol.* **31**, 613–623 (1997).
- [72] Gomez, E.; Pillon, A.; Fenet, H.; Rosain, D.; Duchesne, M. J.; Nicolas, J. C.; Balauger, P.; Casellas, C.: Estrogenic Activity of Cosmetic Components in Reporter Cell Lines: Parabens, UV Screens, and Musks. *J Toxicol Environ Health A.* **68**, 239–51 (2005).
- [73] Stocco, D. M.: StAR Protein and the Regulation of Steroid Hormone Biosynthesis. *Annu Rev Physiol.* **63**, 193–213 (2001).
- [74] Sanderson, J. T.: The Steroid Hormone Biosynthesis Pathway as a Target for Endocrine-Disrupting Chemicals. *Toxicol Sci.* **94**, 3–21 (2006).

- [75] Gilep, A. A.; Sushko, T. A.; Usanov, S. A.: At the crossroads of steroid hormone biosynthesis: The role, substrate specificity and evolutionary development of CYP17. *Biochim Biophys Acta*. **1814**, 200–209 (2011).
- [76] Miller, W. L.; Auchus, R. J.: The Molecular Biology, Biochemistry, and Physiology of Human Steroidogenesis and Its Disorders. *Endocr Rev*. **32**, 81–151 (2011).
- [77] Sanderson, J. T.; Van den Berg, M.: Interactions of xenobiotics with the steroid hormone biosynthesis pathway. *Pure Appl Chem*. **75**, 11–12 (2003).
- [78] Marino, M.; Galluzzo, P.; Ascenzi, P.: Estrogen signaling multiple pathways to impact gene transcription. *Curr genomics*. **7**, 497–508 (2006).
- [79] Nelson, L. R.; Bulun, S. E.: Estrogen production and action. *J Am Acad Dermatol*. **45**, 116–124 (2001).
- [80] Hilder, T. A.; Hodgkiss, J. M.: Molecular Mechanism of Binding between 17 β -Estradiol and DNA. *Comput Struct Biotechnol J*. **15**, 91–97 (2017).
- [81] Lopes, R. A. M.; Neves, K. B.; Carneiro, F. S.; Tostes, R. C.: Testosterone and Vascular Function in Aging. *Front Physiol*. **3**, 89 (2012).
- [82] Andersen, M. L.; Alvarenga, T. F.; Mazaro-Costa, R.; Hachul, H. C.; Tufik, S.: The association of testosterone, sleep, and sexual function in men and women. *Brain Res*. **1416**, 80–104 (2011).
- [83] Urlacher, V. B.; Girhard, M.: Cytochrome P450 monooxygenases: an update on perspectives for synthetic application. *Trends Biotechnol*. **30**, 26–36 (2012).
- [84] Hannemann, F.; Bichet, A.; Ewen, K. M.; Bernhardt, R.: Cytochrome P450 systems - biological variations of electron transport chains. *Biochim Biophys Acta*. **1770**, 330–344 (2007).
- [85] Stiborová, M.; Hudeček, J.; Hodek, P.; Frei, E.: Význam cytochromů P450 pro lidské zdraví. *Chem Listy*. **93**, 229–237 (1999).
- [86] Ozaki, H.; Sugihara, K.; Watanabe, Y.; Ohta, S.; Kitamura, S.: Cytochrome P450-inhibitory activity of parabens and phthalates used in consumer products. *J Toxicol Sci*. **41**, 551–560 (2016).
- [87] Kulthong, K.; Maniratanachote, R.; Kobayashi, Y.; Fukami, T.; Yokoi, T.: Effects of silver nanoparticles on rat hepatic cytochrome P450 enzyme activity. *Xenobiotica*. **42**, 854–862 (2012).
- [88] Ganbhiye, S.; Sakharwade, S.: Silver Nanoparticles in Cosmetics. *J Cosmet Dermatol Sci Appl*. **06**, 48–53 (2016).

- [89] Crofton, K. M.; Paul, K. B.; Devito, M. J.; Hedge, J. M.: Short-term in vivo exposure to the water contaminant triclosan: Evidence for disruption of thyroxine. *Environ Toxicol Pharmacol.* **24**, 194–197 (2007).
- [90] Grabicová, K., Fedorová, G. A.; Burkina, V.; Steinbach, Ch.; Schmidt-Posthaus, H.; Žlábek, V.; Kocour Kroupová, H.; Grabic, R.; Randák, T.: Presence of UV filters in surface water and the effects of phenylbenzimidazole sulfonic acid on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following a chronic toxicity test. *Ecotoxicol Environ Saf.* **96**, 41–47 (2013).
- [91] Martínez-Guitarte, J. L.: Transcriptional activity of detoxification genes is altered by ultraviolet filters in *Chironomus riparius*. *Ecotoxicol Environ Saf.* **149**, 64–71 (2018).
- [92] Schnell, S.; Martin-Skilton, R.; Fernandes, D.; Porte, C.: The interference of nitro- and polycyclic musks with endogenous and xenobiotic metabolizing enzymes in carp: an *in vitro* study. *Environ Sci Technol.* **43**, 9458–9464 (2009).
- [93] Hagvall, L.; Baron, J. M.; Börje, A.; Weidolf, L.; Merk, H.; Karlberg, A.-T.: Cytochrome P450-mediated activation of the fragrance compound geraniol forms potent contact allergens. *Toxicol Appl Pharmacol.* **233**, 308–313 (2008).
- [94] Meesters, R. J.; Duisken, M.; Hollender, J.: Study on the cytochrome P450-mediated oxidative metabolism of the terpene alcohol linalool: indication of biological epoxidation. *Xenobiotica.* **37**, 604–617 (2007).
- [95] Brueggmeier, R. W.; Hackett, J. C.; Diaz-Cruz, E. S.: Aromatase Inhibitors in the Treatment of Breast Cancer. *Endocr Rev.* **26**, 331–345 (2005).
- [96] Chumsri, S.; Howes, T.; Bao, T.; Sabnis, G.; Brodie, G.: Aromatase, aromatase inhibitors, and breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol.* **125**, 13–22 (2011).
- [97] Iyanagi, T., Xia, C.; Kim, J.-J.: NADPH–cytochrome P450 oxidoreductase: Prototypic member of the diflavin reductase family. *Arch Biochem Biophys.* **528**, 72–89 (2012).
- [98] Cheshenko, K.; Pakdel, F.; Segner, H.; Kah, O.; Eggen, R. I. L.: Interference of endocrine disrupting chemicals with aromatase CYP19 expression or activity, and consequences for reproduction of teleost fish. *Gen Comp Endocrinol.* **155**, 31–62 (2008).
- [99] Smith, I. E.; Dowsett, M.: Aromatase Inhibitors in Breast Cancer. *N Engl J Med.* **348**, 2431–2442 (2003).
- [100] Mouridsen, H. T.: Incidence and management of side effects associated with aromatase inhibitors in the adjuvant treatment of breast cancer in postmenopausal women. *Curr Med Res Opin.* **22**, 1609–1621 (2006).

- [101] Whitehead, S. A.; Rice, S.: Endocrine-disrupting chemicals as modulators of sex steroid synthesis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* **20**, 45–61 (2006).
- [102] van Meeuwen, J. A.; van Son, O.; Piersma, A. H.; de Jong, P. C.; van den Berg, M.: Aromatase inhibiting and combined estrogenic effects of parabens and estrogenic effects of other additives in cosmetics. *Toxicol Appl Pharmacol.* **230**, 372–382 (2008).
- [103] Li, Z.; Yin, N.; Liu, Q.; Wang, C.; Wang, T.; Wang, Y.; Qu, G.; Liu, J.; Cai, Y.; Zhou, Q.; Jiang, G.: Effects of polycyclic musks HHCb and AHTN on steroidogenesis in H295R cells. *Chemosphere.* **90**, 1227–1235 (2013).
- [104] Sohn, J.; Kim, S.; Koschorreck, J.; Kho, Y.; Choi, K.: 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).
- [105] Blüthgen, N.; Zucchi, S.; Fent, K.: Effects of the UV filter benzophenone-3 (oxybenzone) at low concentrations in zebrafish (*Danio rerio*). *Toxicol Appl Pharmacol.* **263**, 184–194 (2012).
- [106] Hodek, P.; Teplá, M.; Křížková, J.; Šulc, M.; Stiborová, M.: Modulation of cytochrome P450 enzyme system by selected flavonoids. *Neuro Endocrinol Lett.* **30**, 67–71 (2009).
- [107] Casals-Casas, C.; Desvergne, B.: Endocrine Disruptors: From Endocrine to Metabolic Disruption. *Annu Rev Physiol.* **73**, 135–152 (2011).
- [108] Adams, L. S.; Chen, S.: Phytochemicals for breast cancer prevention by targeting aromatase. *Front Biosci (Landmark Ed).* **14**, 3846–3863 (2009).
- [109] Yamaguchi, Y.; Nishizono, N.; Kobayashi, D.; Yoshimura, T.; Wada, K.; Oda, K.: Evaluation of synthesized coumarin derivatives on aromatase inhibitory activity. *Bioorg Med Chem Lett.* **27**, 2645–2649 (2017).
- [110] Horn, T. L.; Long, L.; Cwik, M. J.; Morrissey, R. L.; Kapetanovic, I. M.; McCormick, D. L.: Modulation of hepatic and renal drug metabolizing enzyme activities in rats by subchronic administration of farnesol. *Chem Biol Interact.* **152**, 79–99 (2005).
- [111] Backhaus, T.; Scholze, M.; Grimme, L. H.: The single substance and mixture toxicity of quinolones to the bioluminescent bacterium *Vibrio fischeri*. *Aquat Toxicol.* **49**, 49–61 (2000).