

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Bc. Iva Drejslarová

Vliv vybraných parfémů na aktivitu aromatasy

Effect of selected perfumes on aromatase activity

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Školitel: prof. RNDr. Petr Hodek, CSc.

Praha 2023

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 jsou enzymy zapojené do mnoha fyziologických procesů v organismu, kromě metabolismu xenobiotik také do biosyntézy a katabolismu endogenních látek, jako jsou hormony a steroidy. Cytochromy P450 zodpovědné za přeměny endogenních sloučenin mohou být ovlivněny xenobiotiky, které různými mechanismy zasahují do sekrece, metabolismu, transportu či eliminace endogenních hormonů. Tyto látky se také označují jako endokrinní disruptory a řadí se mezi ně například pesticidy, insekticidy, některá léčiva, nebo sloučeniny obsažené v kosmetických prostředcích. Jedním z mechanismů jejich působení je zásah do biosyntézy steroidních hormonů prostřednictvím interakcí se steroidogenními enzymy. Takovým enzymem je cytochrom P450 19, aromatas, který v posledním kroku biosyntézy steroidních hormonů katalyzuje konverzi testosteronu na β -estradiol. Následkem narušení aktivity tohoto enzymu endokrinními disruptory je nerovnováha hladiny estrogenů v organismu, která může vést k poškození reprodukčních funkcí, vzniku osteoporózy, aterosklerózy, demence, či rozvoji některých typů karcinomů.

V této souvislosti byl zkoumán vliv komerčně dostupných parfémů na konverzi testosteronu na β -estradiol, jež je katalyzována aromatasou. Ovlivnění aktivity tohoto enzymu bylo stanoveno pomocí HPLC a HPLC ve spojení s hmotnostní spektrometrií.

Experimenty prokázaly, že všechny testované parfémy o celkovém ředění 300x, měly na tento enzym inhibiční vliv. Nejvyšší míra inhibice byla zaznamenána u parfému *Montale, Intense Roses Musk*, kde došlo ke snížení množství vzniklého β -estradiolu o 88% oproti kontrole. Na základě porovnání složení parfémů by sloučeninami zodpovědnými za inhibici aromatasy mohly být komponenty esenciálních olejů obsažených v parfémech, například citronellol, limonen, geraniol, citral či linalool. Lze však předpokládat, že pozorované efekty závisí rovněž na koncentraci jednotlivých komponent v parfémech a zároveň i na jejich synergickém působení.

Klíčová slova: cytochrom P450, aromatas, endokrinní disruptor, inhibice

Abstract

Cytochromes P450 are enzymes involved in many physiological processes in the body, besides the metabolism of xenobiotics also in the biosynthesis and catabolism of endogenous substances such as hormones and steroids. Cytochromes P450 that are responsible for the transformation of endogenous compounds can be affected by xenobiotics, which interfere with the secretion, metabolism, transport or elimination of endogenous hormones by various mechanisms. These substances are also referred to as endocrine disruptors and include, for example, pesticides, insecticides, certain pharmaceuticals, or compounds contained in cosmetic products. One of their mechanisms of action is to interfere with steroid hormone biosynthesis through interactions with steroidogenic enzymes. One such enzyme is cytochrome P450 19, aromatase, which catalyses the conversion of testosterone to β -estradiol in the final step of steroid hormone biosynthesis. Modulation of the activity of this enzyme by endocrine disruptors results in an imbalance of estrogen levels in the body, which can lead to impaired reproduction, osteoporosis, atherosclerosis, dementia, and the development of certain types of cancer.

In this context, the effect of commercially available perfumes on the conversion of testosterone to β -estradiol, which is catalyzed by aromatase, has been investigated. The effects on the activity of this enzyme were determined by HPLC and HPLC coupled with mass spectrometry.

The experiments showed that all perfumes tested, in a total 300-fold dilution, had an inhibitory effect on this enzyme. The highest inhibition was observed for *Montale, Intense Roses Musk* perfume, an 88% reduction in the amount of β -estradiol produced compared to the control. Based on a comparison of perfume formulations, the compounds responsible for aromatase inhibition could be components of the essential oils contained in the perfumes, such as citronellol, limonene, geraniol, citral or linalool. However, it should be considered that the observed effects also depend on the concentration of individual components in the perfume as well as their synergistic action.

Key words: cytochrome P450, aromatase, endocrine disruptor, inhibition

[IN CZECH]

Poděkování:

Tímto bych ráda poděkovala svému školiteli prof. RNDr. Petru Hodkovi, CSc. za odborné vedení při psaní této diplomové práce a také za trpělivost, ochotu, cenné rady a připomínky. Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Tomáši Ječmenovi, Ph.D. za provedení měření na hmotnostním spektrometru a v neposlední řadě také Doc. RNDr. Václavu Martínkovi, Ph.D. za pomoc při práci na HPLC.

Zvláštní poděkování patří také mé rodině a přátelům za podporu při psaní této práce a během celého studia.

Obsah

Seznam zkratk a symbolů.....	9
Úvod	10
1. Literární přehled.....	11
1.1. Estrogeny	11
1.1.1. Syntéza estradiolu	11
1.1.2. Metabolismus estradiolu	13
1.1.3. Narušení buněčné signalizace estrogenů endokrinními disruptory	16
1.2. Cytochromy P450	18
1.2.1. Nomenklatura a rozdělení	19
1.2.2. Významné podrodiny a jejich role v karcinogenezi	20
1.2.3. Struktura cytochromů P450	22
1.2.4. Katalytický mechanismus	23
1.2.5. Funkce cytochromů P450	24
1.2.6. Cytochrom P450 19 – aromatasa	25
1.3. Vliv složek parfémů na cytochromy P450.....	29
1.3.1. Estrogenita a antiestrogenita parfémových komponent.....	32
2. Cíl práce.....	33
3. Materiál a metody	34
3.1. Použité chemikálie.....	34
3.2. Použité přístroje	37
3.3. Metabolismus testosteronu v přítomnosti parfémů.....	39
3.3.1. Použité roztoky a preparáty	39
3.3.2. Vliv parfémů na aktivitu aromatasy.....	40
3.3.3. Aktivita NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasy v přítomnosti parfému	42
4. Výsledky.....	43
4.1. Metabolismus testovaných parfémů	43
4.2. Vliv parfémů na aktivitu aromatasy.....	44
4.2.1. Stanovení β -estradiolu metodou hmotnostní spektrometrie	48

4.2.2. Aktivita NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasy v přítomnosti parfému.....	52
5. Diskuze	53
6. Shrnutí.....	58
Seznam použité literatury.....	59

Seznam zkratek a symbolů

<i>15q21</i>	chromozom kódující gen pro enzym aromatasu
17 β -HSD	17 β -hydroxysteroiddehydrogenasa
3 β -HSD	3 β -hydroxysteroiddehydrogenasa
BHT	butylhydroxytoluen
COMT	katechol- <i>O</i> -methyltransferasa
CYP	cytochrom P450
CYP19+OR	aromatasu + NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasa
CYPOR	NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasa
DMBA	7,12-dimethylbenz[α]anthracen
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EE2	17 α -ethinylestradiol
ER	estrogenní receptor
ER α a ER β	estrogenní receptor α a β
ERE	estrogen rezpozivní element
FAD	flavinadenindinukleotid
FMN	flavinmononukleotid
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HPLC-MS	HPLC ve spojení s hmotnostní spektrometrií
MCF-7	buněčná linie lidského prsního karcinomu
NADP ⁺	nikotinamidadenindinukleotidfosfát (oxidovaná forma)
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát (redukováná forma)
NNK	4-(methylnitrosoamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon
SGBH	globulin vázající sexuální hormony
SRS	oblasti cytochromů P450 rozpoznávající substrát

Úvod

Estrogeny představují skupinu strukturně podobných molekul, které jsou hormonálně aktivní. Hlavními zástupci estrogenů v lidském těle jsou estradiol, estron a estriol. Jsou odvozeny od cholesterolu a primárně sekretovány v ženských vaječnících. [1] [2] Zasahují do významných signálních drah organismu a ovlivňují například buněčnou proliferaci, diferenciaci a homeostázu, ale také fyziologické funkce ženských i mužských reprodukčních orgánů. [1] Nezbytné jsou i pro funkci imunitního a kardiovaskulárního systému, nebo kosterní a centrální nervové soustavy. [2]

Kromě fyziologických účinků estrogenů v těle je s jejich sníženou či zvýšenou hladinou spojena řada nepříznivých efektů, které se projevují zejména u žen. [3] Nízká hladina těchto hormonů zvyšuje riziko vzniku osteoporózy, obezity, aterosklerózy či demence. [2] S abnormálně zvýšenou hladinou v těle je spojeno vyšší riziko vzniku některých druhů karcinomů, zejména prsu a endometria. [3] Regulace estrogenů je závislá na enzymech zapojených do jejich metabolismu. Jsou to zejména enzymy, které se řadí mezi cytochromy P450 – aromatasa a 17 β -hydroxysteroiddehydrogenasa. [4]

Naše populace je na každodenní bázi vystavena působení hormonálně aktivních látek, které narušují regulaci a funkci endokrinního systému a způsobují tak zdravotní a reprodukční problémy. Tyto látky se také nazývají endokrinní disruptory. Řadí se mezi ně například pesticidy, kovy, potravinová aditiva či komponenty kosmetických prostředků. [5] Tyto látky mohou napodobovat endogenní estrogeny, ale také přímo zasahovat do jejich syntézy a metabolismu prostřednictvím modulace aktivity cytochromů P450. Vzhledem k jejich rozmanitým vlivům na organismus jsou endokrinní disruptory předmětem intenzivního výzkumu. [6]

1. Literární přehled

1.1. Estrogeny

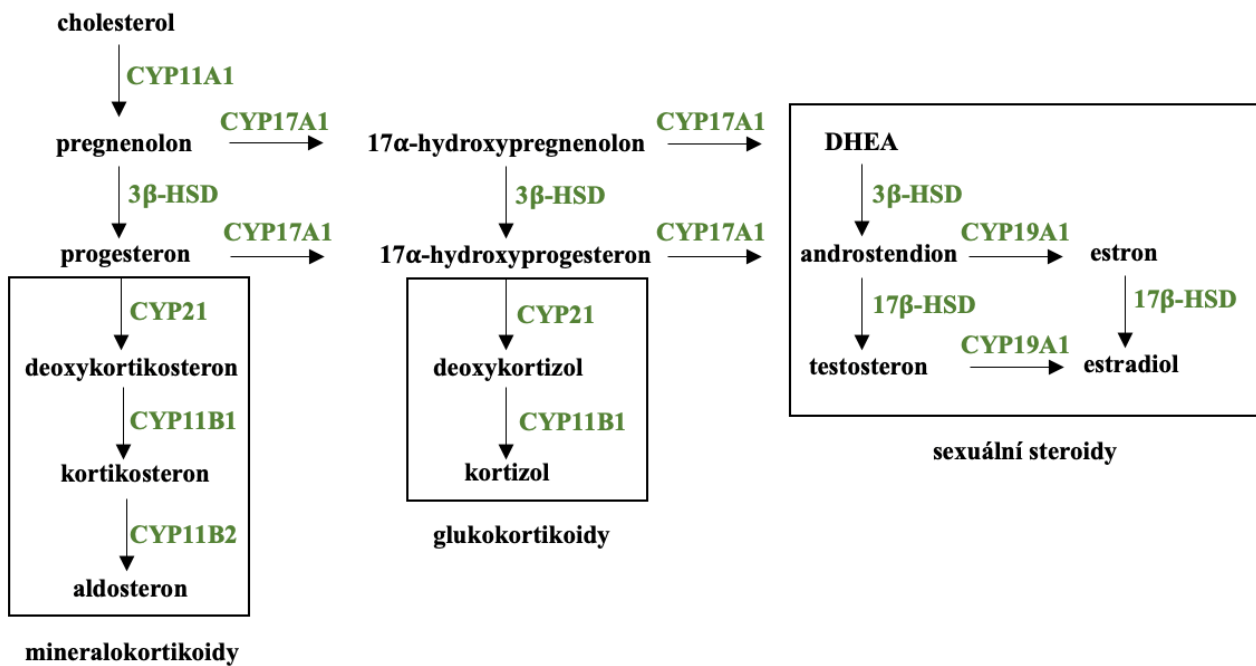
Estrogeny jsou steroidní hormony lipofilního charakteru, které jsou syntetizovány v posledním kroku biosyntézy steroidních hormonů. Tyto látky jsou krví distribuovány do tkání imunitní, kardiovaskulární a centrální nervové soustavy, kde díky své lipofilní povaze snadno pronikají buněčnými membránami i hematoencefalickou bariérou. [7]

Významnou úlohu hrají zejména v ženském organismu – zde zajišťují například vývoj sekundárních pohlavních znaků, regulaci sekrece gonadotropinu při ovulaci, odpověď tkání na stimulaci progesteronem, udržování kostní hmoty a kognitivních funkcí, nebo regulaci citlivosti na inzulin. [8] Díky regulaci metabolismu cholesterolu a triglyceridů estrogeny snižují riziko vzniku kardiovaskulárních onemocnění, jako aterosklerózy. Také redukuje uvolňování kortizolu jako odpověď na stresový podnět, čímž snižují hladinu stresu. V neposlední řadě jsou také důležité pro zdraví kostí – právě z důvodu poklesu hladiny estrogenů u žen po menopauze se u nich zvyšuje riziko rozvoje osteoporózy. [9] Jak již bylo zmíněno, u žen vznikají zejména ve folikulárních buňkách vaječnicků, placentě, či kožní a tukové tkáni. V mužském těle jsou nezbytné v období růstu, a to pro udržování kostní hmoty a růst kostí v oblasti epifýz. Jejich hlavním zdrojem v mužském organismu jsou periferní tkáně (kůže a tuková tkáň), přibližně 15% celkového množství vzniká steroidogenezí v Sertoliho buňkách varlat. [8] Mezi hlavní endogenní estrogeny se řadí estron, estriol a 17β -estradiol, z nichž poslední jmenovaný se vyznačuje nejvyšší aktivitou a zastoupením v těle. [9] [10]

1.1.1. Syntéza estradiolu

Biosyntéza steroidních hormonů (Obr. 1, str. 12) se v lidském těle odehrává v kůře nadledvin, dále u mužů v Leydigových buňkách varlat a u žen ve folikulárních buňkách vaječnicků a syncytiotrofoblastu placenty. [11] Steroidní hormony hrají významnou roli v regulaci metabolismu, hladiny vody a solí v organismu, či v pohlavní diferenciaci a reprodukci. Jsou odvozeny od cholesterolu a vyznačují se podobnou strukturou s charakteristickými čtyřmi uhlíkovými kruhy (cyklopentano-perhydrofenantrenová struktura steranu). [12]

1. Literární přehled



Obr. 1: Syntéza steroidních hormonů – prekurzorem je cholesterol a syntéza vede ke vzniku mineralokortikoidů, glukokortikoidů a sexuálních steroidů. Převzato a upraveno z [13].

Aktivní steroidní hormony mohou být syntetizovány konverzí různých prekurzorů, ale nejčastěji je to *de novo* syntézou z cholesterolu. Prvním krokem je přenos cholesterolu k vnitřní membráně mitochondrie. Zde se nachází enzym CYP11A1 (také označován P450_{scc}), který katalyzuje odštěpení postranního řetězce cholesterolu za vzniku pregnenolonu. [13] Tato reakce je rychlost určujícím krokem celé syntézy a je to právě schopnost exprese genu *CYP11A1*, která buňku charakterizuje jako „steroidogenní“. V dalším kroku je pregnenolon za katalýzy enzymem 3β-hydroxysteroiddehydrogenasa (3β-HSD) přeměněn na progesteron, který je prekurzorem mineralokortikoidů. Druhou možností je přenos pregnenolonu z mitochondrie do endoplazmatického retikula, kde je pomocí enzymu CYP17A1 konvertován na 17α-hydroxypregnenolon – ten dává za katalýzy 3β-HSD vzniknout 17α-hydroxyprogesteronu, prekurzoru glukokortikoidů. [14] Aktivita enzymů CYP17A1 a 3β-HSD tedy určuje, zda biosyntéza bude směřovat k produkci glukokortikoidů a mineralokortikoidů, nebo sexuálních steroidů. [13]

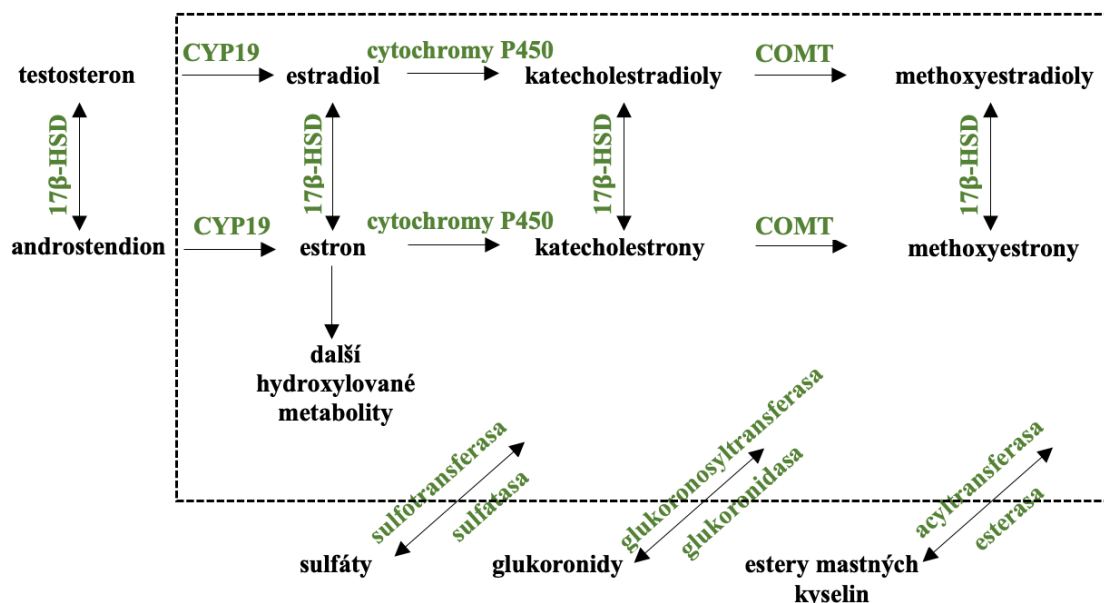
CYP17A1 má 17α-hydroxylasovou aktivitu, díky níž vznikají výše zmíněné produkty, pro vznik sexuálních steroidů je ale klíčová jeho 17,20-lyasová aktivita. Tato je využita při konverzi 17α-hydroxypregnenolonu na dehydroepiandrosteron (DHEA) a 17α-hydroxyprogesteronu na androstendion, který může být syntetizován také z DHEA pomocí 3β-HSD. Dalším krokem je přeměna androstendionu 17β-hydroxysteroid-

dehydrogenasou (17β -HSD) na testosteron. Poslední krok biosyntézy je katalyzován dalším z enzymů cytochromu P450, aromatasou (CYP19A1), která přeměňuje testosteron na estradiol ve folikulárních buňkách vaječníků a dále také androstendion na estron v tukové tkáni. Estron může být za katalýzy 17β -HSD syntetizován také z estradiolu. [15]

1.1.2. Metabolismus estradiolu

Jak již bylo řečeno, estradiol je v těle syntetizován několika cestami. První z nich je konverze androstendionu na estron enzymem aromatasou a jeho následná přeměna na estradiol pomocí enzymu 17β -HSD. Ve druhém případě jako výchozí látka vystupuje androstendion, který je opět enzymem 17β -HSD přeměněn na testosteron, z něhož následně za katalýzy aromatasou vzniká estradiol. [16]

Metabolismus estradiolu (Obr. 2) se odehrává zejména jeho konverzí na neestrogení a ve vodě rozpustné metabolity, které jsou z těla vylučovány močí či stolicí. [16]



Obr. 2: Metabolismus estrogenů – zapojení cytochromů P450. Přerušovaná čára na obrázku znázorňuje buněčnou membránu. Převzato a upraveno z [16].

Metabolismus estradiolu nejčastěji probíhá oxidační cestou, do které jsou zapojeny cytochromy P450. Ty jsou v hojné míře exprimovány v játrech, a právě játra a extrahepatální tkáně jsou hlavním dějištěm oxidačního metabolismu, při kterém

vznikají hydroxylované metabolity estradiolu, neboli katecholestradioly. [17] Na hydroxylaci estradiolu se podílí několik isoformů cytochromů P450 (rodiny CYP1, CYP2 a CYP3) a pro vznik každého metabolitu je důležitá poloha uhlíku, na kterém dochází k hydroxylaci. [16] U zhruba 80% jaterního estradiolu je to na uhlíku C2 za vzniku 2-hydroxyestradiolu. Tato reakce je katalyzována převážně isoformami CYP1A1, CYP1A2 a CYP3A4. Zbýlých 20% estradiolu v játrech je přeměněno na 4-hydroxyestradiol, a to díky katalytické aktivitě isoformů CYP1B1 a CYP3A5. V extrahepatálních tkáních, jako je prsní tkáň, placenta, děloha, mozek a hypofýza, vzniká 2-hydroxyestradiol především činností CYP1A1 a CYP3A4. Díky vysoké expresi CYP1B1 v děloze a prsní tkáni je zde převažujícím produktem 4-hydroxyestradiol. [17] Právě tyto dva metabolity jsou nejvíce biologicky aktivními katecholestradioly, které hrají významnou roli ve tkáních reprodukčních orgánů, jater, srdce, krevních cév, mozku a nervové soustavy. [16] Dále probíhají také minoritní metabolické reakce, do kterých jsou zapojeny cytochromy P450 1A1, 1A2, 1B1, 2A6, 2C8, 3A4, 3A5 a 3A7 a estradiol je při nich hydroxylován v pozicích 6 α , 6 β , 7 α , 12 β , 15 α , 15 β , 16 α a 16 β . [17]

Dalším krokem po hydroxylaci je *O*-methylace katecholestradiolů za katalýzy enzymem katechol-*O*-methyltransferasa (COMT, z angl. catechol-*O*-methyltransferase), při které vznikají methoxyestradioly. COMT je cytosolárním enzymem přítomným zejména v játrech, ledvinách, reprodukčních orgánech a krevních cévách. Metabolity 2- a 4-methoxyestradiol se ve srovnání s ostatními methoxyestradioly opět vyznačují nejvyšší biologickou aktivitou. [16]

Estradiol a jeho hydroxylované metabolity mohou být také konjugovány za účasti glukoronosyltransferas, sulforttransferas a acyltransferas – vznikají glukoronidy, keto-metabolity, sulfáty, estery mastných kyselin a dehydrogenované metabolity. Tyto látky, kromě svých biologických účinků, také slouží jako zdroj pro postupné uvolňování estradiolu a jeho hydroxylovaných metabolitů ve tkáních, jelikož výše jmenované enzymy jsou schopné i zpětné konverze. [16]

Další cestou oxidačního metabolismu estradiolu je jeho konverze na méně estrogení metabolit estron pomocí oxidace na uhlíku C17. [18] Tento reverzibilní děj probíhá za katalýzy enzymem 17 β -HSD a jeho rovnováha je obvykle posunuta k tvorbě estronu – konverze estradiolu na estron totiž probíhá vyšší rychlostí než opačný děj. [18] [19] Estron je následně přeměňován na další metabolity dvěma cestami, a to hydroxylací A-kruhu nebo D-kruhu jeho molekuly. Obě tyto hydroxylace jsou katalyzovány jinými

enzymovými systémy, přičemž vzniklé metabolity již nemohou být redukovány zpět na estron. [20] Tento fakt také znamená, že jejich biologické účinky již nemohou být připisovány parentální molekule estradiolu, jako je tomu v případě estronu. Významnými produkty metabolismu A-kruhu estronu jsou 2-hydroxyestron a 4-hydroxyestron, v případě D-kruhu je to 16 α -hydroxyestron a estriol. V dalších degradačních reakcích dochází ke konjugaci pomocí glukoronidace, methylace či sulfatace a dále vyloučení z těla. [19]

Známým faktem je, že zvýšená hladina estrogenů v těle zvyšuje riziko vzniku karcinomu prsu a endometria. [17] V posledních letech se pozornost začala upírat i na roli metabolitů estrogenů v patogenezi některých nádorových onemocnění, jelikož mohou způsobovat poškození DNA či produkovat kyslíkové radikály. [21]

Role metabolitů estrogenů v karcinogenezi

Prvními produkty metabolismu estradiolu a estronu jsou 4-hydroxyestrogeny – 4-hydroxyestradiol a 4-hydroxyestron. Jsou to estrogenní látky s karcinogenními účinky, u kterých byl prokázán vliv na buněčný růst u linie prsního karcinomu MCF-7. [18] [20] Tyto molekuly jsou relativně nestálé a mohou být přes semichinonové intermediáty přeměněny na vysoce reaktivní chinony. Během této reakce vznikají kyslíkové radikály, které jsou známé pro své toxické účinky na molekulu DNA, vzniklé chinony mohou také tvořit kovalentní vazby s tubuliny. [20] Jak již bylo zmíněno, 4-hydroxylace estrogenů je katalyzována převážně cytochromem P450 1B1, který je ve vysoké míře exprimován v nádorových tkáních – 4-hydroxyestradiol se tedy vyskytuje ve zvýšeném množství například v tkáni prsního karcinomu. Výše popsané skutečnosti naznačují, že přítomnost CYP1B1 a s ní spojená tvorba 4-hydroxyestrogenů hrají významnou úlohu v karcinogenezi prsu a endometria. [17]

Na rozdíl od 4-hydroxylace estrogenů, hydroxylace na uhlíku C2 je přímou reakcí, při které nevznikají reaktivní intermediáty. Produkty této přeměny, 2-hydroxyestradioly, působí jako slabě estrogenní až anti-estrogenní látky a jsou rychle eliminovány z krve přeměnou na 2-methoxyestradiol, přičemž nedochází ke vzniku kyslíkových radikálů. [18] U těchto metabolitů nebyla prokázána karcinogenita, vyznačují se spíše opačnými účinky – mají inhibiční efekt na buněčnou proliferaci. [17] Takovými antiestrogenními

účinky se vyznačuje jak 2-methoxyestradiol, tak 2-hydroxyestradiol, který potlačuje buněčný růst v linii MCF-7. [19]

Analogickým mechanismem jako 4-hydroxyestrogeny působí také 16 α -hydroxyestrogeny – poškozují DNA buď přímo prostřednictvím tvorby DNA aduktů s chinony a semichinony, nebo nepřímo díky redoxnímu zacyklení a s ním spojenou produkcí reaktivních forem kyslíku, které modifikují DNA. [22] 16 α -hydroxyestron má estrogenní účinky a díky tomu je spojen s rozvojem rakovinných procesů v těle, jelikož stimuluje proliferaci buněk. [19] [22] V tomto smyslu je tedy důležité, zda metabolismus směřuje více k hydroxylaci A kruhu nebo D kruhu estronu, jelikož 16 α -hydroxyestron podporuje vznik karcinomů a 2-hydroxyestron jej naopak inhibuje. [20]

1.1.3. Narušení buněčné signalizace estrogenů endokrinními disruptory

Buněčná signalizace estrogenů je ve většině tkání zprostředkována pomocí estrogenních receptorů (ER, z angl. estrogen receptor), které se řadí mezi jaderné ligandem aktivované transkripční faktory a obsahují pět funkčních domén. Identifikovány byly dvě formy těchto receptorů, estrogenní receptor α (ER α) a estrogenní receptor β (ER β), které sdílí 56% homologii své ligand vázající domény. Oba tyto typy jsou kódovány rozdílnými geny a exprimovány v různých buňkách a tkáních napříč organismem, přičemž míra jejich exprese se různí v závislosti na věku, vývoji a patologických stavech. [23]

Mechanismem působení estrogenů je modulace transkripce cílových genů v buněčném jádře. Po vazbě estradiolu nebo syntetického ligandu na ligand vázající doménu je receptor oddělen od jeho chaperonových proteinů, podstoupí konformační změnu a dimerizaci. Tento aktivovaný komplex se může navázat na DNA přímo pomocí specifických estrogen-responzivních elementů (ERE, z angl. estrogen responsive element), nebo nepřímo díky transkripčním faktorům. Po vazbě k DNA dimer interaguje s dalšími regulačními proteiny důležitými pro modulaci genové exprese, jako například modulátory chromatinu. Povaha ligandu vázaného na receptor předurčuje, se kterými regulačními proteiny bude dimer interagovat, ale i vznik homodimeru, heterodimeru či jejich kombinace – všechny tyto faktory vedou k expresi rozdílných genů. [10]

Právě tato část signální kaskády estrogenů, tedy jejich interakce s ER, může být cílovým místem působení endokrinních disruptorů. Řadí se mezi ně sloučeniny strukturou podobné endogenním estrogenům, které různými mechanismy zasahují do syntézy, sekrece, metabolismu, transportu či eliminace endogenních hormonů. [24] Tyto látky se nazývají xenoestrogeny. Konkrétně jsou to například průmyslové chemikálie (insekticidy, pesticidy, průmyslové surfaktanty, polychlorované bifenyly), sloučeniny vyskytující se v plastech (ftaláty, alkylfenoly), kosmetických prostředcích (parabeny, benzofenony), produkty využívané v domácnosti (detergenty), léčiva (ethinylestradiol, diethylstilbestrol) či fytoestrogeny (isoflavonoidy, lignany). [25]

Vzhledem k tomu, že estrogenní receptory jsou relativně promiskuitní jaderné receptory, xenoestrogeny se na ně váží s poměrně vysokou afinitou a poté ovlivňují genomovou i negenomovou signalizaci ER. [26] Tyto sloučeniny působí v násobně vyšších koncentracích než estradiol a pokud jsou přítomny současně s estradiolem, mohou mít aditivní či synergické účinky. [25] Jednou z možností genomových účinků xenoestrogenů je změna terciární struktury ER, která vede k rozdílným interakcím s kofaktory. Výsledkem je změna regulace transkripce a následně i exprese cílových genů. Sloučeniny jako bisfenol A a diethylstilbestrol ovlivňují ER negenomovými účinky – mohou je aktivovat prostřednictvím aktivace MAP-kinas a fosfatidylinositol-3-kinas. [27] Interakcí s ER mohou xenoestrogeny dále ovlivňovat také rovnováhu buněčné proliferace a apoptozy, diferenciaci buněk či samotnou expresi ER. [24]

Hormonální nerovnováha estrogenů vyvolaná těmito vlivy může mít četné následky. Estrogeny jsou klíčovými regulátory kostního metabolismu u mužů i žen, ovlivňují buňky osteocyty, osteoblasty a osteoklasty. Jejich úkolem je potlačit resorpci kosti a zároveň zachovat tvorbu nové kostní hmoty. Snížené množství estrogenů v organismu tedy zvyšuje riziko vzniku osteoporózy a fraktur. [27] Pokles hladiny estrogenů byl také identifikován jako jeden z faktorů vzniku Alzheimerovy a Parkinsonovy choroby či schizofrenie. [28] Mezi další procesy v těle, do kterých tyto hormony zasahují, se řadí například regulace metabolismu lipidů v tukové tkáni, využití glukosy jako odpověď na sekreci inzulínu, regulace homoestázy glukosy a lipidů v játrech. Podílí se také na celkové glykémii prostřednictvím regulace pankreatických β -buněk, které zároveň chrání před apoptózou. V tomto ohledu může mít nedostatek estrogenů za následek rozvoj obezity, metabolického syndromu a *diabetes mellitus* 2. typu. [29] Abnormálně zvýšená hladina estrogenů v organismu je spojena se vznikem jistých typů karcinomů, a to zejména prsu,

endometria, vaječníků, plic, prostaty a tlustého střeva. Estrogeny totiž inhibují apoptózu v rakovinných buňkách, podporují buněčnou proliferaci a také sekreci růstových faktorů zapojených do procesu angiogeneze (proces tvorby cévního zásobení kolem nádoru, kterým jsou následně dodávány živiny potřebné pro masivní růst a dělení buněk). [3] S vysokou hladinou těchto hormonů je spojena řada dalších patologií, například syndrom polycystických ovarií, endometrióza a některá autoimunitní onemocnění jako systémový lupus erythematosus a roztroušená skleróza. [28]

Xenoestrogeny ovlivňují hormonální homeostázu mnoha dalšími mechanismy. Mohou například soutěžit s endogenními hormony o vazbu na globulin vázající sexuální hormony (SHBG, z angl. sex hormone binding globulin), což vede k poškození transportu estradiolu v plasmě. [25] Neméně významná je také jejich interakce s cytochromy P450, díky čemuž zasahují do syntézy a metabolismu steroidních hormonů. Některé z nich přímo ovlivňují produkci estrogenů díky modulaci aktivity aromatasy, enzymu katalyzujícímu konverzi androgenů na estrogenery, čímž narušují rovnováhu těchto hormonů v těle. Zasahují také do aktivity isoforem, které se účastní metabolismu a exkrece estrogenů (CYP1A1, CYP1B1, CYP3A4). [26]

1.2. Cytochromy P450

Cytochromy P450 je souhrnné označení pro superrodinu hem-thiolátových enzymů, které se vyskytují v celé řadě organismů od bakterií až po člověka. [30] První zmínky o cytochromech P450 se v literatuře objevily již v 70. letech 20. století – od té doby byly identifikovány tisíce enzymů patřících do této skupiny, která i nadále zůstává předmětem intenzivního výzkumu. Význam těchto enzymů nespočívá pouze na poli biochemie, ale i v oblasti lékařství, vývojové biologie, anorganické chemie či chemie životního prostředí. [31]

V organismu jsou lokalizovány zejména v játrech, nachází se ale i v plicích, tenkém střevě, ledvinách, nadledvinkách, kůži a mozku. Z hlediska umístění v buňce se vyskytují převážně na membránách hladkého endoplazmatického retikula či na membránách mitochondrií. Jejich množství v jednotlivých tkáních je podmíněno mnoha faktory, mezi něž se řadí věk, výživa, genetický polymorfismus, vliv vnějších podmínek, kouření, podávaná léčiva nebo konzumace alkoholu. [32]

Tyto enzymy jsou hemoproteiny obsahující porfyrinový skelet (protoporfyrin IX), který je v aktivním centru vázán koordinační vazbou přes thiolát cysteinu. Šestým ligandem je atom kyslíku molekuly vody. [32] Spektrum reakcí katalyzovaných cytochromy P450 je široké, ale obecně působí jako oxidasy, které se podílí na aktivaci molekulárního kyslíku jeho heterolytickým štěpením – jeden z atomů kyslíku je zabudován do substrátu a druhý je následně redukován na molekulu vody. [33]

Cytochromy P450 jsou v lidském těle zapojeny do reakcí I. fáze biotransformace xenobiotik, vedoucí k detoxikaci chemických látek. V této fázi dochází k zavedení polární skupiny (nejčastěji -OH) nebo k jejímu odkrytí. Účastní se tedy eliminace těchto látek a jejich exkreci z těla při II. fázi biotransformace. [32]

1.2.1. Nomenklatura a rozdělení

Název cytochrom P450 („P“ = pigment) odkazuje na spektrální vlastnosti těchto enzymů – v redukované formě se do aktivního centra místo atomu kyslíku může vázat oxid uhelnatý, což vede k posunu absorpčního maxima hemu na 450 nm. Tato vlastnost je pro cytochromy P450 charakteristická. V literatuře se tyto enzymy také označují zkráceně jako „CYP“ (CYtochrom P450). [33]

Cytochromy P450 se vyskytují jako isoformy a podle stupně homologie primární struktury jsou řazeny do genetických rodin a podrodin. Nejvíce rozhodující oblastí sekvence je ta obklopující cystein v aktivním centru. Do stejné rodiny náleží cytochromy P450 se sekvenční homologií vyšší než 40% a jsou označeny prvním číslem za zkratkou P450. Enzymy s homologií vyšší než 60% se řadí do podrodiny a značí se velkým písmenem. Následuje číslo označující konkrétní enzym. Výsledným označením dané isoformy je tedy např. cytochrom P450 1A1, případně CYP1A1. [32]

Většina isoform cytochromů P450 má širokou substrátovou specifitu. Příkladem substrátů z řad xenobiotik mohou být léčiva, antioxidanty, anestetika, pesticidy, organická rozpouštědla, barviva, alkoholy nebo aromatické látky. Mezi fyziologicky významné substráty se řadí steroidy, mastné kyseliny, retinoidy, lipidové hydroperoxydy, eikosanoidy či aceton. [34] Neméně důležité je také zapojení cytochromů P450 do procesů chemické karcinogeneze a toxicity, jelikož se účastní metabolické aktivace mnoha karcinogenů a prokarcinogenů. [31]

1.2.2. Významné podrodiny a jejich role v karcinogenezi

CYP1A1 a 1A2

Cytochromy P450 podrodiny 1A mohou aktivovat až 90% známých karcinogenů. [32] CYP1A1 se vyskytuje zejména v extrahepatálních tkáních, v játrech se ve vyšším množství objevuje až následkem indukce, a to zejména kouřením. [30] Významná hladina tohoto enzymu byla zjištěna v plicní tkáni a v některých nádorových tkáních (buňky plicního či prsního karcinomu). Z tohoto důvodu se předpokládá, že míra inducibility CYP1A1 souvisí nejen s rozvojem rakoviny plic, ale i prsu a kůže. [32]

CYP1A2 je hlavním jaterním enzymem, jehož hladina v organismu je značně závislá na vnějších faktorech. Hlavními substráty jsou polycyklické aromatické uhlovodíky, aromatické aminy, nebo například kofein. Dále je zapojen i do aktivace nitroaromatických sloučenin a aflatoxinu B1. [30]

CYP2A6 a 2B6

Isoforma P450 2A6 tvoří u člověka asi 4% celkových cytochromů P450 a podílí se na metabolismu mnoha významných substrátů, například nikotinu, sloučenin používaných k léčbě AIDS, nitrosaminů, nebo kumarinu. Je zapojen do procesu chemické karcinogeneze, aktivuje například aflatoxin B1 či 4-(methylnitrosoamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon (NNK) přítomný v tabákovém kouři. Do tohoto procesu je i přes své nízké zastoupení v organismu (asi 0,2%) významně zapojen také CYP2B6, který má významnou úlohu v metabolismu protinádorových léčiv (cyklofosfamid, ifosfamid). [32]

CYP2C a CYP2D6

Nejvýznamnějšími enzymy podrodiny 2C jsou CYP2C8, 2C9, 2C10 a 2C19, které mají širokou substrátovou specifitu a v lidském těle jsou zastoupeny ve vysoké míře. Jejich charakteristickou vlastností je genetický polymorfismus, který může u některých skupin populace způsobit blokaci účinku chemoterapeutik metabolizovaných právě enzymy této podrodiny. [32]

CYP2E1

Tento enzym je jediným zástupcem podrodiny 2E. Je zapojen do chemické aktivace mnoha prokarcinogenů, karcinogenů a toxikantů a je znám pro svou úlohu v metabolismu ethanolu. Mezi substráty CYP2E1 se řadí zejména nízkomolekulární látky, kromě již zmíněného ethanolu je to například aceton, halogenované uhlovodíky (chloroform, chlormethan, vinylchlorid), benzen, styren, acetaldehyd či nitrosaminy. Dále se podílí na metabolismu acetaminofenu (paracetamol) či halothanu. [30] Vyskytuje se ve velké míře v jaterní tkáni a může být indukován látkami, které jsou zároveň jeho substráty (ethanol, aceton, toluen, isoniazid, pyrazol). [30] [32] Významná je také jeho indukovatelnost patologickými stavy, jako je *diabetes* či hladovění. [30]

CYP3A4

Cytochrom P450 3A4 je nejvýznamnější isoformou metabolismu léčiv u člověka, a to jak z hlediska míry zastoupení v jednotlivých tkáních, tak množství přeměňovaných substrátů. [30] [32] S širokým spektrem metabolizovaných léčiv však jdou ruku v ruce i nežádoucí lékové interakce, které mohou vést k extrémnímu zvýšení či snížení hladiny některého z léčiv v organismu. [30]

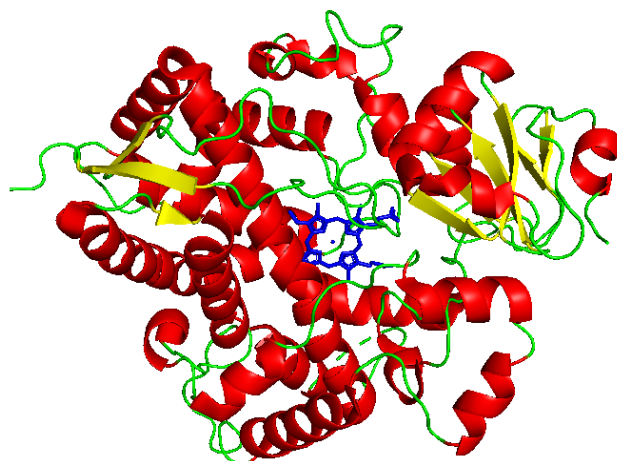
Kromě již zmíněných léčiv katalyzuje CYP3A4 oxidaci dalších exogenních látek, konkrétně karcinogenních xenobiotik (polycyklické aromatické uhlovodíky, aromatické aminy, nebo aflatoxiny). Z řad endogenních látek mezi jeho substráty patří steroidní sloučeniny – 17 β -estradiol, testosteron, kortisol a progesteron. [32]

CYP11, 17, 19 a 21

Cytochromy P450 těchto podrodin mají nejužší substrátovou specifitu a jejich hlavní úlohou je metabolismus endogenních látek steroidního charakteru. Katalyzují reakce biosyntézy steroidních hormonů probíhající ve steroidogenních tkáních, jako jsou pohlavní žlázy, kůra nadledvin a placenta. Právě s touto funkcí souvisí zapojení výše zmíněných enzymů do procesu karcinogeneze, jelikož zvýšená či snížená hladina některých steroidních hormonů v těle může vést k rozvoji karcinomu. Modulátory těchto enzymů jsou proto používány v protinádorové terapii - nejčastěji jsou to inhibitory CYP19 (aromatasy) využívané k terapii karcinomu prsu, nebo inhibitory CYP17 v případě rakoviny prostaty. [30]

1.2.3. Struktura cytochromů P450

Klíčovým vodítkem k porozumění mechanismu působení cytochromů P450 je znalost jejich struktury (Obr. 3). Jak již bylo řečeno, cytochromy P450 obsahují porfyrinový skelet s cysteinem v aktivním centru. Porfyrinový skelet je vázán jak prostřednictvím atomu síry sulfhydrylové skupiny cysteinu (pátý ligand železa protoporfyrinu IX), tak hydrofobními interakcemi. [32] Ve struktuře cytochromů P450 lze i přes vysokou variabilitu identifikovat některé více či méně podobné strukturní motivy. [35] Nejvíce konzervovaná struktura se nachází v okolí hemu a předurčuje podobný mechanismus funkce cytochromů P450 z hlediska přenosu protonů, elektronů a aktivace molekulárního kyslíku. Je tvořena svazkem čtyř helixů značených D, E, I a L, dále helixy J a K, strukturou zvanou „meandr“ a dvěma sadami β -listů. [36]

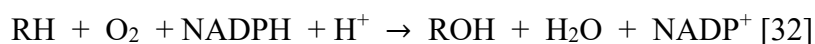


Obr. 3: Strukturní model lidského mikrosomálního cytochromu P450 3A4 s vyznačenými elementy sekundární struktury – α -helixy vyznačeny červeně, β -struktury žlutě a smyčky zeleně. Hem je znázorněn modrou barvou. Vytvořeno v programu PyMol 2.5.4 [37], PDB kód 1TQN.

Naopak nejvíce variabilní oblasti ve struktuře cytochromů P450 mají úlohu při jejich ukotvení v membránách či při rozpoznávání a vazbě substrátu. [35] Na rozpoznání a vazbě substrátu se podílí šest tzv. substrát rozpoznávajících oblastí (SRS, z angl. substrate recognition site). Jejich strukturní variabilita umožňuje vazbu různě velkých substrátů s rozdílnou mírou specifity. Některé z cytochromů P450 provádějí oxidaci substrátu s vysokou stereospecifitou a regiospecifitou, jiné jsou ve vazbě substrátů naopak více promiskuitní – například lidský jaterní CYP3A4 metabolizuje více než 50% léčiv. [38]

1.2.4. Katalytický mechanismus

Cytochromy P450 obecně působí jako monooxygenasy, které katalyzují oxidační, peroxidační a redukční reakce. Většinu reakcí lze sumárně vyjádřit následovně (RH = substrát, RH = hydroxylovaný produkt):

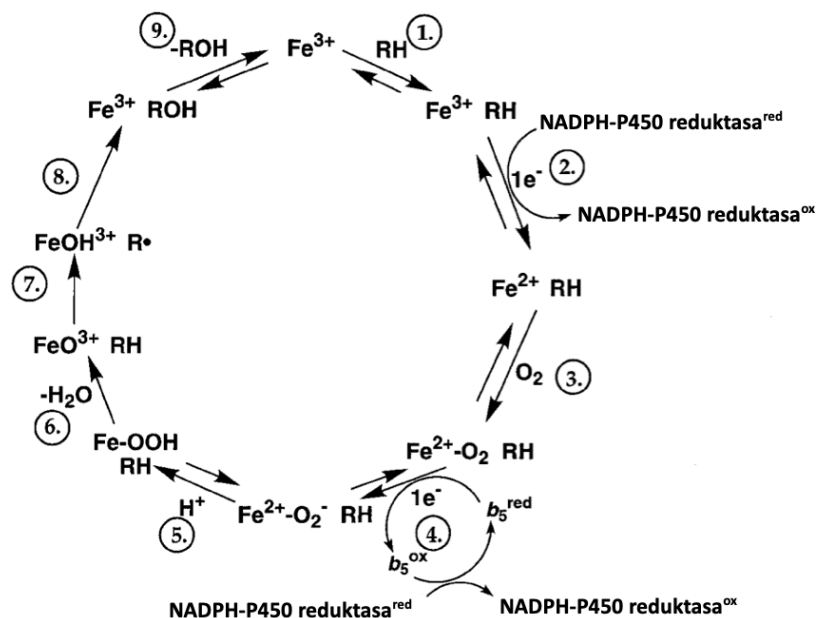


Tyto enzymy potřebují ke katalýze molekulární kyslík a přísun redukčních ekvivalentů z NADH nebo NADPH. V eukaryotních organismech je donorem elektronů NADPH, přičemž přenos elektronů v mitochondriích je katalyzován dvěma transportními proteiny – flavoproteinem a adrenodoxinem (protein typu ferredoxinu obsahující atom síry a železa). [39] V endoplasmatickém retikulu jsou hlavními složkami transportního systému cytochrom P450 a flavoprotein NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasa (CYPOR). [40] CYPOR se řadí do rodiny diflavinových reduktas a vystupuje jako přenašeč elektronů z NADPH na cytochromy P450, konečné akceptory elektronů. Součástí jeho struktury jsou prostetické skupiny flavinadenindinukleotid (FAD) a flavinmononukleotid (FMN), z nichž každá má specifickou funkci – FAD přijímá dva elektrony z NADPH a postupně je předává na FMN, ze kterého jsou poté po jednom přeneseny na cytochrom P450. [41] Dále se také může jako donor elektronů účastnit cytochrom b_5 a NADH:cytochrom b_5 oxidoreduktasa. [40]

Tyto enzymy katalyzují oxidativní atak neaktivovaných uhlovodíků za fyziologických teplot. Cytochrom P450 v „klidovém“ stavu má hemové železo v oxidačním stupni +3 a jako šestý ligand slouží molekuly vody. [35] V prvním kroku katalytického cyklu (Obr. 4, str. 24) dochází k vazbě substrátu a vytlačení molekuly rozpouštědla z aktivního centra, což indukuje posun absorpčního maxima, změnu redoxního potenciálu a přechod z nízkospinového stavu na vysokospinový – díky tomu může snáze dojít k redukci hemového železa z oxidačního stupně +3 na +2. Ve druhém kroku je oxidoreduktasou přenesen jeden elektron na cytochrom P450 a dochází k redukci. V dalším kroku dochází k vazbě molekulárního kyslíku na Fe^{2+} (Fe^{3+} jej neváže) a následně je oxidoreduktasou transportován druhý elektron. Pátým krokem je protonace komplexu $\text{Fe}^{2+}\text{-O}_2$ následovaná heterolytickým štěpením vazby O-O za vzniku FeO^{3+} a molekuly vody. Poté dochází k přesunu atomu vodíku a v osmém kroku ke vzniku produktu – ten je uvolněn v posledním kroku cyklu a zároveň dochází k regeneraci původního stavu enzymu, s nímž může začít nový cyklus. [31]

1. Literární přehled

Výše popsany katalytický cyklus je zjednodušený – je třeba brát v úvahu dynamičnost enzymového systému, díky které může docházet například k vazbě a uvolňování substrátu i na jiných místech cyklu, nebo k dismutaci oxidovaných intermediátů, které poté mohou generovat reaktivní formy kyslíku. [42]



Obr. 4: Základní schéma katalytického cyklu cytochromů P450 – substrát je označen RH, produkt ROH. Indexy „ox“ a „red“ znázorňují oxidovanou a redukovanou formu. Převzato a upraveno z [31].

1.2.5. Funkce cytochromů P450

Cytochromy P450 zastávají v organismu mnoho funkcí. Jednou z těch fyziologicky nejvýznamnějších je zapojení do drah biosyntézy a katabolismu endogenních látek, jako jsou hormony a steroidy. Pro jejich metabolismus jsou nejdůležitější cytochromy P450 podrodin 11, 17, 19 a 21, které jsou lokalizovány na membránách endoplasmatického retikula a mitochondrií. [32] Biosyntéza steroidních hormonů probíhá ze společného prekursoru, cholesterolu. Po splnění své fyziologické úlohy jsou steroidní hormony v těle degradovány opět pomocí cytochromů P450 – ty se zároveň podílí i na katabolismu cholesterolu, a to jeho konverzí na žlučové kyseliny v játrech. [39]

Tyto enzymy jsou dále zapojeny do biosyntézy a metabolismu některých prekurzorů lipidů. Mají významnou úlohu při syntéze a metabolismu eikosanoidů nebo při konverzi

vitaminu D3 na jeho biologicky aktivní formu, 1,25-dihydroxyvitamin D3. [39] Cytochromy P450, které jsou zapojeny do reakcí metabolismu prostaglandinů, prostacyklinů, tromboxanů, vitaminu D3, žlučových kyselin a cholesterolu, se řadí do podrodin 7, 8, 24, 27 a 51. [32]

Další neméně důležitou funkcí je degradace xenobiotik, konkrétně jejich přeměna na polárnější sloučeniny, aby mohly být z těla snáze vyloučeny a nedocházelo k jejich akumulaci. [32] S touto úlohou souvisí také metabolismus léčiv, ke kterému přispívají více než kterákoliv jiná skupina enzymů. Léčiva jsou obvykle opět přeměňována na polárnější molekuly pomocí hydroxylačných reakcí – tyto oxidace nejčastěji vedou k deaktivaci léčiva, ale v některých případech mohou vést i ke zvýšení jeho aktivity (aktivace pro-léčiva na jeho biologicky aktivní formu). [32] V metabolismu cizorodých látek jsou z řad jaterních cytochromů P450 nejvýznamnější isoformy P450 1A1, 2A6, 2D6, 2C, 2E1 a 3A4. V ostatních tkáních, jako jsou například plíce, ledviny, kůže, gastrointestinální trakt a močové cesty, hrají důležitou roli podrodiny 1A1, 2B6, 2E1 a 3A4. [32] Cytochromy P450 jsou také zapojeny do biosyntézy signálních molekul řídících vývoj organismu a homeostázu – sem se kromě již zmíněných steroidních hormonů řadí také vitaminy rozpustné v tucích či polynenasycené mastné kyseliny, které jsou konvertovány na jejich biologicky aktivní formy. [38] Jak již bylo zmíněno v kapitole 1.2.1., účastní se také aktivace protoxikantů na reaktivní elektrofilní formy, které způsobují biologické poškození (např. vazba na DNA a proteiny a modifikace jejich fyziologické funkce). [31] Na poškození buněk se dále podílí tvorbou aktivních forem kyslíku, tvorbou radikálů či peroxidací lipidů. [32]

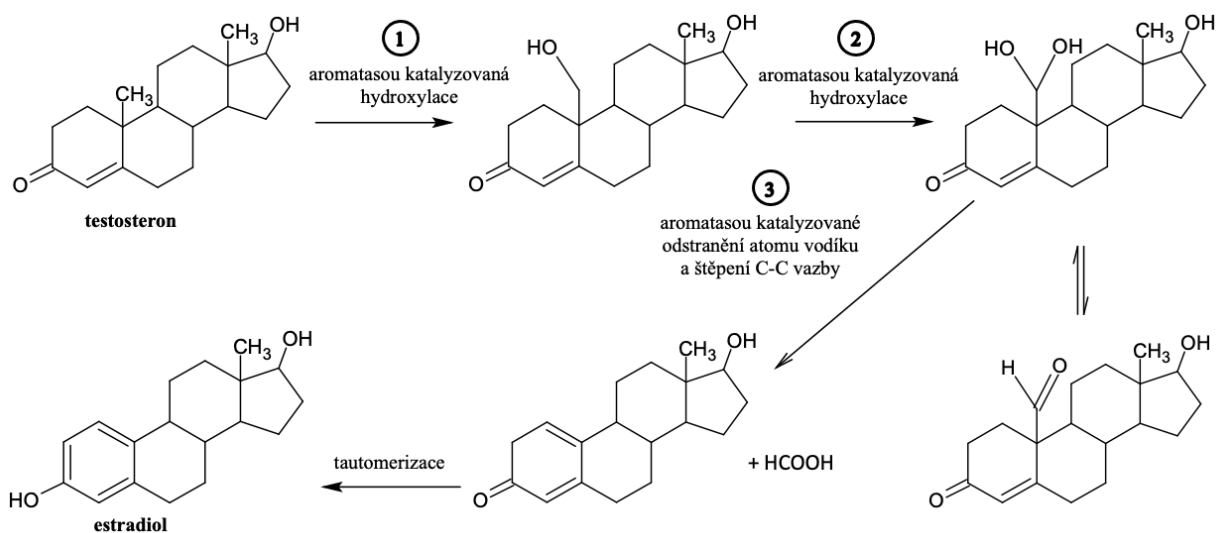
1.2.6. Cytochrom P450 19 – aromatasa

Cytochrom P450 19 (CYP19) neboli aromatasa je enzym zapojený do procesu biosyntézy steroidních hormonů – konkrétně katalyzuje jeho poslední krok, konverzi androgenů na estrogény. [43] Kapacitu exprimovat aromatasu má u člověka mnoho buněk, k nimž patří granulární buňky, placentární buňky, Sertoliho a Leydigovy buňky, preadipocyty a fibroblasty, neurony, osteoblasty a chondrocyty, nebo buňky hladkého svalstva. Díky tomu k produkci estrogenu nedochází pouze v pohlavních orgánech, ale i v dalších tkáních jako tuková tkáň, mozek, kůže, cévy, kosti a chrupavky. Hladina aromatasy

1. Literární přehled

v různých tkáních se v průběhu života mění – například u žen v reprodukčním věku jsou hlavním zdrojem estrogenů vaječníky, po menopauze jsou to periferní tkáně. [44]

Lidská aromatasa byla poprvé purifikována z placentálních mikrosomů v 80. letech 20. století. Je kódována genem *CYP19A1* lokalizovaným na chromosomu 15 (15q21). [44] Enzymový komplex je v buňce zabudován do endoplazmatického retikula a sestává jak ze samotného CYP19, který je zodpovědný za konverzi androgenů na estrogeny, tak z flavoproteinu CYPOR, jehož úlohou je přenos redukčních ekvivalentů z NADPH na aromatasu. Ke konverzi jednoho molu substrátu na jeden mol produktu je zapotřebí třech molů NADPH a třech molů molekulárního kyslíku. [45] Substrátem tohoto enzymu jsou C_{19} androgenní pohlavní hormony s nenasyceným kruhem A – testosteron a androstendion (preferovaný substrát), jejichž aromatizací vznikají C_{18} estrogeny s fenolovým kruhem A, estradiol a estron. [44] Prvním krokem reakce (Obr. 5) je vazba substrátu (C_{19} androgen) a poté dochází ke třem následným oxidačním reakcím. První dvě z nich jsou hydroxylace probíhající na C_{19} methylové skupině substrátu za vzniku dvou hydroxylových skupin. Dále dochází k dehydrataci a vzniku C_{19} aldehydu. [43] [45] Ve třetím oxidačním kroku dochází k aromatizaci kruhu A za současného odštěpení atomu C_{19} ve formě kyseliny mravenčí – vzniká C_{18} estrogen s fenolovým kruhem A. V posledním kroku tedy dochází k oxidačnímu štěpení vazby C_{10} - C_{19} , jeho přesný mechanismus však dosud nebyl objasněn. [45]



Obr. 5: Konverze testosteronu na estradiol katalyzovaná cytochromem P450 19, aromatasou – reakce probíhá ve třech následných oxidacích. Reakce 1 a 2 jsou hydroxylace na C_{19} (methylová skupina), poté vzniká dehydratací aldehyd. Posledním oxidačním krokem (3) je odštěpení C_{19} ve formě kyseliny mravenčí a současná aromatizace kruhu A, při které vzniká estradiol. Převzato a upraveno z [46].

Hlavním zdrojem estrogenů u mužů a žen po menopauze je tuková tkáň, přičemž exprese aromatasy s věkem roste. Obezita a s ní související zvýšená hladina estrogenů přímo koresponduje s rizikem výskytu rakoviny prsu, jelikož syntéza estrogenů v periferních tkáních se ukázala být důležitým faktorem v počátečních fázích vzniku tumoru. V tukových buňkách nacházejících se v blízkém okolí prsního tumoru byla prokázána vyšší exprese a aktivita aromatasy, než je tomu v normálních buňkách. To je jeden z hlavních důvodů, proč aromatasu stojí ve středu zájmu protinádorové léčby, kde se jako anti-estrogenní terapie využívají inhibitory aromatasy. [47]

Inhibitory aromatasy v protinádorové terapii

Jak již bylo zmíněno, biologické účinky estrogenu jsou zprostředkovány přes estrogenní receptor buňky, přičemž až 75% buněk prsního karcinomu exprimuje estrogenní receptor, progesteronový receptor, nebo oba tyto receptory. Právě stimulace receptorů estrogenem je významným faktorem při iniciaci a progresi prsního karcinomu. [47] [49] Výzkum na poli protinádorové terapie přinesl přibližně v 70. letech 20. století jedno z prvních klinicky využívaných léčiv, které cílilo na signální dráhu estrogenu v buňce, tedy ER – tamoxifen. [49] Tamoxifen je trifenylethylenový derivát klasifikovaný jako selektivní modulátor ER. Řadí se mezi nejčastěji vyžívaná chemoterapeutika pro pacienty s ER pozitivním karcinomem prsu (karcinom prsu s pozitivními estrogenními receptory), což činí asi 70% případů u tohoto typu karcinomu. Tamoxifen působí jako částečný antagonist, který soupeří s estrogenem o vazbu na ER. Tím dochází k utlumení funkce receptorů a v konečném důsledku jsou redukovány estrogenní efekty zodpovědné za buněčný růst a proliferaci. [48] K dalším benefitům tohoto léčiva patří také zlepšení lipidového profilu a snížení kostní demineralizace u žen po menopauze. Bohužel se s užíváním tamoxifenu pojí i negativní vedlejší účinky, jako například zvýšení rizika vzniku karcinomu endometria či tromboembolických onemocnění. U řady pacientů, kteří zpočátku na léčbu reagovali pozitivně, se také vyvinula tamoxifenová rezistence, případně došlo k relapsu rakoviny po několika letech od ukončení léčby. [47] [48]

Vzhledem k výše uvedeným nepříznivým efektům se výzkum zaměřil na alternativní přístup, který místo ER cílil na produkci samotného ligandu, estrogenu. Díky tomuto zkoumání vznikla léčiva, která byla v porovnání s tamoxifenem účinnější a zároveň

neměla závažné vedlejší účinky – inhibitory aromatasy. [50] Prvním nescifickým inhibítorem aromatasy bylo anti-epileptikum aminoglutethimid, které potlačuje syntézu některých steroidů v nadledvinách prostřednictvím inhibice specifických cytochromů P450. Jak se později ukázalo, klíčovým mechanismem působení aminoglutethimidu je inhibice aromatasy. Současně s aromatasou ale také dochází k inhibici CYP11 a při léčbě tedy bylo nutné suplementovat kortizol. Z tohoto důvodu se od používání aminoglutethimidu upustilo a došlo k rozvoji specifických inhibitorů aromatasy. [51]

Specifické inhibitory aromatasy jsou děleny na první, druhou a třetí generaci dle efektivity účinku a selektivity. [47] Do první generace se řadí již zmíněný aminoglutethimid. Inhibitory druhé generace jsou formestan (4-hydroxyandrostendion), fadrozol a vorozol, které byly vyvinuty na konci 70. let 20. století. [52] V současné době se využívají inhibitory třetí generace, které vznikly na počátku 90. let a řadí se mezi ně letrozol, anastrozol a exemestan. Tato skupina léčiv se vyznačuje nejvyšší účinností, selektivitou a zároveň nejnižší toxicitou. Jejich účinkem dochází až k 98-procentní inhibici aktivity aromatasy. [47] [53]

Selektivní inhibitory aromatasy jsou dále děleny na dva podtypy, a to steroidní a nesteroidní. Oba typy zasahují do posledního kroku biosyntézy estrogenu, ale činí tak odlišnými mechanismy. Steroidní inhibitory mají steroidní strukturu podobnou androgenům a patří mezi ně formestan a exemestan. Mechanismem působení je soutěžení s přirozeným substrátem aromatasy, androstendionem. [54] Poté, co jsou tyto inhibitory kovalentně navázány do katalytického místa aromatasy, dochází k nevratné blokaci enzymové aktivity až do té doby, než periferní tkáň syntetizují nový enzym – z tohoto důvodu jsou také označovány jako „sebevražedné inhibitory“. Oproti tomu, nesteroidní inhibitory aromatasy obsahují imidazolovou strukturu a jejich vazba na aromatasu je reversibilní – dochází tak k pouze dočasné inhibici. Do této skupiny se řadí inhibitor první generace aminoglutethimid a zástupci třetí generace, letrozol a anastrozol. [47] [54]

V klinické praxi jsou dnes využívány zejména letrozol a anastrozol, u kterých byla prokázána nejvyšší redukce velikosti karcinomu prsu v porovnání s terapií tamoxifenem. Dále se ukázalo, že neovlivňují endometriální proliferaci, což naznačuje, že by neměly zvyšovat riziko vzniku karcinomu endometria. V neposlední řadě jsou na léčbu inhibitory aromatasy citlivé i karcinomy, u kterých došlo k relapsu po léčbě tamoxifenem, a proto mohou být využívány jako sekundární terapie po léčbě tamoxifenem. [53] Díky jejich selektivnímu účinku také není třeba doplňková

suplementace kortikosteroidů či mineralokortikoidů, jako je tomu u nespecifického inhibitoru aminoglutethimidu. [47]

Inhibitory aromatasy zasahují pouze do produkce estrogenu v periferních tkáních, nikoliv do jeho produkce ve vaječnících. Z tohoto důvodu mohou z jejich účinků těžit ženy po menopauze, u kterých již nejsou vaječníky funkční a jediným zdrojem estrogenu jsou periferní tkáně. U žen před menopauzou naopak podání těchto inhibitorů vede ke zvýšení hladiny estrogenů v těle, pokud současně není tlumena funkce vaječníků. Ve vaječnících se totiž nachází vysoké množství substrátu aromatasy a její promotor je citlivý na gonadotropin. Při inhibici aromatasy zprvu dochází ke snížení produkce estrogenu, následkem toho je ale stimulace hypothalamu a hypofýzy vedoucí k sekreci gonadotropinu – ten poté stimuluje vaječníky ke zmíněnému zvýšení produkce estrogenu. Z tohoto důvodu se v současné době při léčbě karcinomu prsu u žen před menopauzou standardně podávají inhibitory aromatasy v kombinaci s analogy gonadoliberinu (gonadotropin uvolňující hormon), které v organismu zpětnou vazbou blokují tvorbu gonadotropinu. [51]

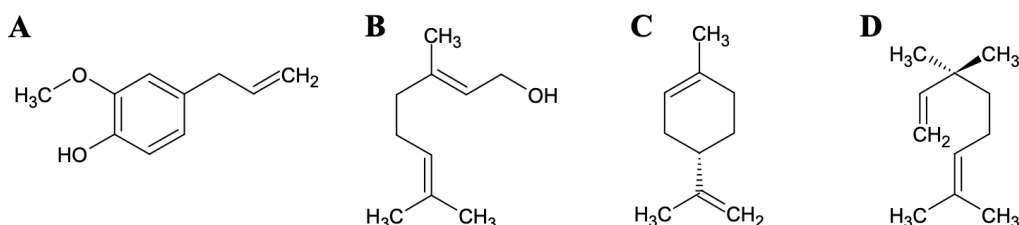
1.3. Vliv složek parfémů na cytochromy P450

Parfémy jsou aromatické tekutiny, jejichž základní složkou jsou esenciální oleje – vonné látky získané přímo ze zdrojového materiálu (nejčastěji rostliny) prostřednictvím lisování, extrakce či destilace. [55] Na základě koncentrace esenciálních olejů se parfémy dělí na několik kategorií – *parfum* (20–40% esenciálních olejů), *eau de parfum* (10–20%), *eau de toilette* (5–15%), *eau de cologne* (3–5%) a *eau de fraiche* (1–3%). [56] Další složkou je alkohol, který vystupuje jako rozpouštědlo pro ostatní složky. Parfémy také obsahují přírodní či syntetická fixativa, která snižují míru vypařování parfému a prodlužují tak jeho výdrž po aplikaci. Mezi přírodní fixativa se řadí pryskyřice (myrha, benzoe, labdanum) a látky živočišného původu (ambra, pižmo, kastoreum, cibet). Do skupiny syntetických fixativ patří například ambroxid, benzylsalicylát, triethylcitrát či benzylbenzoát. [55] V neposlední řadě je třeba zmínit přidávané konzervační látky, kterými jsou například parabeny a ftaláty. [56]

Esenciální oleje byly pro své biologické účinky známy již v dávných dobách a i dnes nacházejí široké uplatnění v mnoha odvětvích, včetně kosmetického a farmaceutického.

1. Literární přehled

Po chemické stránce jsou to komplexní směsi nízkomolekulárních látek, zejména alifatických a aromatických sloučenin, terpenů a terpenoidů. Běžně se vyskytujícími komponentami jsou eugenol, geraniol, limonen, linalool, kumarin, citral, citronellol, karveol či verbenon (Obr. 6). Ty jsou díky své chemické struktuře a lipofilní povaze schopny pronikat kůží do krevního oběhu, kde mimo jiné interagují s cytochromy P450 ve smyslu jejich inhibice či indukce. [57]



Obr. 6: strukturální vzorce komponent esenciálních olejů – eugenol (A), geraniol (B), L-limonen (C) a 3R-(-)-linalool (D).

Jako příklad látky s antikarcinogenními účinky lze uvést eugenol, který se vyskytuje v hřebíčkovém oleji, bazalce, skořici, nebo muškátovém oříšku. Běžně se využívá v medicíně a klinické stomatologii, jelikož v nižších koncentracích má protizánětlivé a anestetické účinky. Dále působí také jako antioxidant, antibakteriální a antivirové činidlo. [58] Cytochromy P450 jsou známy pro svou úlohu při aktivaci prokarcinogenů. Inhibice některých jejich isoform působením eugenolu tedy snižuje produkci toxických metabolitů. Konkrétně se jedná o cytochromy P450 1A1 a 1B1, které hrají důležitou roli například při biotransformaci karcinogenu 7,12-dimethylbenz[α]anthracenu (DMBA) na metabolity s vyšší karcinogenní aktivitou. Tyto účinky byly prokázány na buněčné linii lidského prsního karcinomu MCF-7, kde došlo k poklesu aktivity CYP1A1 a CYP1B1 po ošetření eugenolem. Dále také eugenol inhibuje aktivitu isoformy CYP2E1. [59]

Hojně se vyskytující složkou esenciálních olejů je také geraniol – acyklický isoprenoidní monoterpén, který je možné izolovat z kozlíku lékařského, skořice, lipie sladké či perily křovité. Kromě jeho protizánětlivých, antimikrobiálních, antioxidantních a protinádorových vlastností je ale také známým kožním alergenem. [60] Co se týče vlivu geraniolu na cytochromy P450, lze zmínit jeho inhibiční vliv na isoformu 2B6, jenž byla prokázána na lidských jaterních mikrosomech. Tato isoforma je důležitá pro metabolismus některých léčiv (bupropion, tamoxifen, sibutramin), zároveň však také aktivuje prokarcinogeny jako cyklofosfamid a aflatoxin B1. [61]

Další významnou komponentou esenciálních olejů je limonen. Ten je klasifikován jako cyklický terpen. Vyskytuje se v citrusových plodech (citron, pomeranč, mandarinka) a je jednou z nejpoužívanějších vonných látek využívaných v kosmetice. Je znám pro své protizánětlivé, protinádorové a antioxidační účinky, dále působí příznivě při léčbě *diabetes mellitus*, metabolického syndromu, onemocnění gastrointestinálního či dýchacího traktu. [62] Limonen inhibuje aktivitu cytochromu P450 2B1, tento účinek byl prokázán na potkaních jaterních mikrosomech ošetřených fenobarbitalem, který zvyšuje aktivitu této isoformy. [63] Dále také limonen inhibuje lidský CYP2B6; při zkoumání jeho vlivu na CYP3A4 již výsledky nebyly tak jednoznačné. Isoforma CYP3A4 mimo jiné hydroxyluje midazolam v pozicích 1' a 4, po ošetření lidských jaterních mikrosomů limonenem došlo ke stimulaci 1'-hydroxylace a naopak inhibici 4-hydroxylace – na tuto isoformu tedy může mít limonen jak inhibiční, tak stimulační účinky. [61] [64]

Mezi další látky obsažené v esenciálních olejích se řadí také linalool, který se na rozdíl od ostatních zástupců této skupiny vyznačuje vyšší mírou rozpustnosti ve vodě. Tento nenasycený terpenový alkohol je obsažen v rostlinách čeledi hluchavkovitých (máta, bazalka, levandule), listech vavřínu či citrusových plodech. Pro svou antimikrobiální aktivitu je možné jej využívat při léčbě infekčních onemocnění, neméně významné jsou také jeho antioxidační, protizánětlivé, protinádorové účinky nebo sedativní efekt na centrální nervovou soustavu. [65] Jeho vliv na cytochromy P450 byl zkoumán na potkaních jaterních mikrosomech. Došlo zde k indukci aktivity podrodiny CYP2A (konkrétně isoformem 2A1, 2A2, 2A3), která je zodpovědná například za metabolismus nikotinu či kumarinu. [66] Při testování na lidských jaterních mikrosomech byla také pozorována částečná inhibice CYP2B6. [61]

Z ostatních složek esenciálních olejů, které ovlivňují aktivitu cytochromů P450, lze jmenovat karveol, jehož účinkem dochází k inhibici aktivity CYP2B a CYP2C. Tento efekt byl prokázán na jaterních mikrosomech potkanů, kde působením karveolu došlo k poklesu metabolismu propofolu – látky, která je metabolizována právě zmíněnými isoformami cytochromů P450. [67] Na modulaci aktivity cytochromů P450 se podílí také kumarin (1,2-benzopyron) vyskytující se například v semenech silovoně obecného, svízeli vonném a divizně. [68] Studie provedené na myších modelech prokázaly indukci jaterních isoformem CYP1A2, CYP2B, CYP2E1, CYP2C11 a CYP3A. [69] [70]

Za zmínku stojí také biologická aktivita látek používaných v parfémeh jako stabilizátory, rozpouštědla a konzervanty. Některé bývají také součástí esenciálních olejů.

Jsou jimi benzylnbenzoát a benzylsalicylát, které lze izolovat například z jasmínu či ylang-ylang. [71] Obě tyto látky mají estrogenní aktivitu, která byla prokázána na buněčné linii prsního karcinomu MCF-7. Byla zde pozorována jejich vazba na estrogenní receptor, která vedla ke stimulaci genové exprese závislé na estrogenu a dále také ke zvýšení proliferace těchto buněk. [72] Další běžně se vyskytující sloučeninou je benzyl alkohol, který přispívá k poklesu aktivity isoforem CYP1A2, CYP2C9, CYP2E1 a CYP3A4. [73]

1.3.1. Estrogenita a antiestrogenita parfémových komponent

V posledních letech se objevuje stále více důkazů, že složky parfémů jsou endokrinními disruptory a různými mechanismy narušují hormonální homeostázu v organismu. [56] Některé komponenty esenciálních olejů mohou například ovlivňovat signalizaci estrogenních receptorů. Konkrétně jsou to citral, geraniol a nerol, jejichž estrogenní aktivita byla při vyšších koncentracích pozorována na buňkách kvasinek, které exprimují ER. Další z těchto komponent, eugenol, vykazoval při stejném testu slabou antiestrogenní aktivitu. [74] Estrogenní efekty byly dále prokázány u parabenů (konkrétně butylparaben, ethylparaben a propylparaben) a některých pižmových vůní (celesolid, galaxolid, cashmeran). [75] Dalším mechanismem působení těchto látek je modulace aktivity aromatasy. Inhibičním účinkem na tento enzym působí parabeny, ftaláty, některé polycyklické pižmové vůně a také jedna ze složek esenciálních olejů, kumarin. [76] [77] Navíc bylo zjištěno, že esenciální oleje získané ze semen bazalky a fenyklu zvyšují aktivitu aromatasy. [78]

Ačkoliv jsou jednotlivé komponenty v komerčně dostupných parfémech (a kosmetice obecně) označovány jako „bezpečné“, je třeba mít na paměti možné synergické působení, pokud jsou přítomny ve směsích. Tyto interakce stále nejsou zcela prozkoumány a jejich výsledkem mohou být efekty zcela rozdílné v porovnání se samostatnými komponentami. Některé obecně netoxické sloučeniny také mohou být metabolicky přeměněny na své toxičtější formy. Další nedostatečně prozkoumanou oblastí jsou kumulativní vlastnosti těchto látek, jelikož jsme jim vystaveni na každodenní bázi v průběhu let až desítek let. K bližšímu pochopení mechanismu působení těchto endokrinních disruptorů, ale i jejich kumulativních a synergických účinků je tedy do budoucna za potřebí dalšího výzkumu.

2. Cíl práce

Cílem předkládané diplomové práce bylo studium vlivu vybraných parfémů na aktivitu enzymu aromatasy.

Hlavní dílčí úkoly:

- Optimalizace HPLC metody pro stanovení 17β -estradiolu.
- Sledování vlivu vybraných parfémů na aktivitu enzymového komplexu CYP19+OR.
- Ozařování parfémů UV-C zářením v oblasti kolem 254 nm a následné určení jejich vlivu na aktivitu enzymového komplexu CYP19+OR.
- Stanovení aktivity NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasy v přítomnosti vybraného parfému.

3. Materiál a metody

3.1. Použité chemikálie

Corning® Gentest™, USA:

lidská CYP19+OR (supersomy, koncentrace: 1 nmol/ml)

Cypex, Velká Británie:

lidská NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasa (baktosomy, koncentrace: 10,4 nmol/ml)

Fluka® Analytical, Švýcarsko:

testosteron

Sigma-Aldrich, USA:

β-estradiol, 17α-ethinylestradiol, fenacetin

Roche Diagnostics GmbH, Německo:

NADPH (tetrasodná sůl, 98%)

Lach-Ner, Česká republika:

methanol, ethylacetát, kyselina mravenčí, NaH₂PO₄·2H₂O, KH₂PO₄

VWR Chemicals, Francie:

acetonitril (HPLC)

Složení parfémů:**Parfém č. 1 – Bvlgari[®], Man Wood Essence**

alkohol, parfém (vůně), voda, benzylsalicylát, kumarin, ethylhexylmethoxycinamát, benzylalkohol, limonen, linalool, alfa-isomethylionon, butylmethoxydibenzoylmethan, ethylhexylsalicylát, citronellol, geraniol, eugenol, citral, benzylbenzoát, CI 19140 (žlutá 5), BHT, CI 42090 (modrá 1), CI 60730 (fialová 2)

Parfém č. 2 – Dolce & Gabbana[®], Q

alkohol, parfém (vůně), voda, benzylsalicylát, limonen, hydroxycitronellal, butylmethoxydibenzoylmethan, ethylhexylsalicylát, linalool, citral, citronellol, hexylcinnamal, tris(tetramethylhydroxypiperidinol)citrát, kumarin, benzylalkohol, pentaerythrityltetrad-*t*-butylhydroxycinamát, eugenol, geraniol, CI 14700 (červená 4), CI 60730 (fialová 2), CI 19140 (žlutá 5)

Parfém č. 3 – Montale[®], Intense Roses Musk

alkohol, parfém (vůně), voda, citronellol, limonen, geraniol, citral, linalool

Parfém č. 4 – Narciso Rodriguez[®], Pure Musc For Her

alkohol, parfém (vůně), voda, benzylsalicylát, linalool, butylmethoxydibenzoylmethan, hexylcinnamal, hydroxycitronellal, cinnamylalkohol, benzylalkohol, limonen, BHT, isoeugenol, ethylhexylmethoxycinamát, benzylbenzoát, farnesol

Parfém č. 5 – Sisley[®], Soir d'Orient

alkohol, parfém (vůně), voda, tetrasodná sůl EDTA, citronellol, hexylcinnamal, limonen, alfa-isomethylionon, benzylsalicylát, geraniol, linalool, eugenol, citral, benzylbenzoát, benzylalkohol

Parfém č. 6 – Karl Lagerfeld[®], Her

alkohol, parfém (vůně), voda, ethylhexylmethoxycinamát, benzylsalicylát, limonen, hexylcinnamal, hydroxycitronellal, linalool, ethylhexylsalicylát, geraniol, BHT, citral,

α -isomethylionon, citronellool, benzylalkohol, isoeugenol, butylmethoxydibenzoylmethan CI 14700 (červená 4), CI 15985 (žlutá 6), CI 19140 (žlutá 5), CI 60730 (fialová 2)

Parfém č. 7 – Marc Jacobs[®], Daisy Eau So Intense

alkohol, parfém (vůně), voda, ethylhexylmethoxycinamát, butylmethoxydibenzoylmethan, alfa-isomethylionon, citronellool, linalool, oktokrylen, hydroxycitronellal, limonen, hexylcinnamal, geraniol, benzylbenzoát, methyl-2-oktynoát, BHT, CI 19140 (žlutá 5), CI 14700 (červená 4), CI 42090 (modrá 1)

Parfém č. 8 – Dior[®], Sauvage Elixir

alkohol, parfém (vůně), voda, linalool, limonen, kumarin, citronellool, eugenol, butylmethoxydibenzoylmethan, triethylcitrát, pentaerythrityltetradit-butylhydroxycinamát, geraniol, cinnamal, citral, extrakt z lišejníku *Evernia furfuracea*, farnesol, isoeugenol, CI 60730 (fialová 2), CI 19140 (žlutá 5), CI 42090 (modrá 1)

Parfém č. 9 – Kayali[®], Invite Only Amber 23

alkohol, parfém (vůně), voda, butylmethoxydibenzoylmethan, α -isomethylionon, benzylbenzoát, cinnamal, cinnamylalkohol, tris(tetramethylhydroxypiperidinol)citrát, kumarin, linalool, citral, citronellool, eugenol, farnesol, geraniol, limonen, benzylalkohol, CI 14700 (červená 4), CI 42090 (modrá 1), CI 60730 (fialová 2)

Parfém č. 10 – Mugler[®], Aura

alkohol, parfém (vůně), voda, α -isomethylionon, limonen, linalool, ethylhexylmethoxycinamát, benzylsalicylát, kumarin, butylmethoxydibenzoylmethan, ethylhexylsalicylát, hexylcinnamal, citronellool, geraniol, benzylbenzoát, pentaerythrityltetradit-butylhydroxycinamát, benzylcinnamát, citral, cinnamylalkohol, benzylalkohol, farnesol, BHT, CI 42090 (modrá 1), CI 19140 (žlutá 5)

3.2. Použité přístroje

HPLC:

HPLC systém: Agilent Technologies 1200 Series, Agilent Technologies, USA

Odplyňovač: G1322A Vacuum Degasser

Pumpa: G1311A Quaternary Pump

Detektor: G1315C Diode Array Detector SL

Autosampler: G1329A Automated Sample Injector ALS

Termobox pro kolonu: LCO 101, ECOM spol. s.r.o., Česká republika

Předkolona: Nucleosil 8x4 mm, 100–5, C₁₈, Macherey-Nagel, Německo

Kolona: Nucleosil 250x4 mm, 100–5, C₁₈ HD, Macherey-Nagel, Německo

Program: ChemStation Online 1

HPLC-MS:

HPLC: Agilent 1290 Infinity II s binární pumpou, Agilent Technologies, Německo

Hmotnostní spektrometr: maXis II Q-TOF s ESI ionizačním zdrojem, Bruker Daltonics, Německo

Centrifugační koncentrátor:

Acid-Resistant CentriVap Concentrator, Labconco, USA

Stolní centrifuga:

EBA 270, výkyvný rotor, Hettich Zentrifugen, Německo

Třepací vodní lázeň:

BS-11, Jeio Tech Co., Jižní Korea

UV-VIS spektrofotometr:

Cary 60, G6860A UV-VIS spektrofotometr, Agilent Technologies, USA

Fotolyzér:

Oriel 60100 (100W rtuťová výbojka s dichroickým zrcadlem poskytující UV záření v oblasti okolo 254 nm), Oriel Instruments, USA

Měřič UV záření:

Lutron YK-35UV, rozsah vlnových délek 290–390 nm, Lutron Electronic Enterprise, Taiwan

Vortex:

Maxi mix II, 37600 Mixer, Thermolyne Corporation, USA

pH metr:

HI 2211 pH/ORP Meter, Hanna Instruments, USA

Magnetická míchačka:

Magnetická míchačka bez ohřevu ESP, VELP Scientifica, Itálie

Předvážky:

KERN 440-35A, Německo

Analytické váhy:

Discovery DV215CD, Ohaus Corporation, USA

Automatické pipety:

Research plus, Eppendorf[®], Německo

Mikrostríkačky:

Hamilton, USA

3.3. Metabolismus testosteronu v přítomnosti parfémů

3.3.1. Použité roztoky a preparáty

Pufir 1: 0,1 M Na-fosfátový pufr, pH = 7,4
pH upraveno 2 M NaOH

Pufir 2: 0,3 M K-fosfátový pufr, pH = 7,5
pH upraveno 2 M KOH

Zásobní roztoky: 0,5 mM β -estradiol v methanolu
0,25 mM 17 α -ethinylestradiol (EE2) v methanolu
5 mM testosteron v methanolu
0,5 mM fenacetin v methanolu
10 mM NADPH v ultračisté vodě
0,5 mg/ml cytochrom c v pufiru 2
1,04 nmol/ml OR v pufiru 2

Enzymy: lidská CYP19+OR (supersomy, koncentrace: 1 nmol/ml)
lidská CYPOR (baktosomy, koncentrace: 10,4 nmol/ml)

Testované parfémy: zásobní roztoky v methanolu (ředění 3x)

Mobilní fáze (MF) pro HPLC a HPLC-MS:

MF A: 0,1% kyselina mravenčí v acetonitrilu

MF B: 0,1% kyselina mravenčí v ultračisté vodě

3.3.2. Vliv parfémů na aktivitu aromatasy

Reakční směsi o celkovém objemu 500 μ l byly dávkovány do silnostěnných skleněných zkumavek. Komponenty reakčních směsí a jejich výsledné koncentrace byly následující: 50 μ M testosteron, 30 nM CYP19+OR, 1 mM NADPH, vzorek parfému (celkové ředění 300x) nebo methanol (celkové ředění 100x) v pufru 1. Nejprve byly přidány všechny komponenty kromě NADPH. Reakční směsi byly preinkubovány po dobu 5 minut v třepací vodní lázni BS-11 (37 °C, 55 RPM). Následným krokem byla postupná iniciace reakcí přidavkem NADPH a promíchání po dobu 10s na Vortexu Maxi mix II. Reakce probíhaly za inkubace v třepací vodní lázni, po 30 minutách byl přidán vnitřní standard fenacetin (celková koncentrace v reakční směsi 5 μ M) nebo 17 α -ethinylestradiol (celková koncentrace 2,5 μ M) a reakce byly ukončeny přidavkem 2 ml ethylacetátu.

Komponenty reakce byly vířivou extrakcí na Vortexu převedeny do organické fáze a poté byla provedena centrifugace na stolní centrifuze EBA 270 (3000 RPM, 2 minuty). Organická fáze o objemu 1,5 ml byla přenesena do tenkostěnných zkumavek a vzorky následně odpařeny na centrifugačním koncentrátoru CentriVap (37 °C, 30 minut). Odparky byly poté pomocí mikrostríkačky smyty ze stěn zkumavky a opětovně odpařeny na centrifugačním koncentrátoru (37 °C, 5 minut). Poté byly vzorky rozpuštěny v 50% acetonitrilu s přidavkem 0,1% kyseliny mravenčí a dále analyzovány metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) na přístroji Agilent Technologies 1200 Series, či HPLC Agilent 1290 Infinity II ve spojení s hmotnostním spektrometrem maXis II Q-TOF.

Separace β -estradiolu pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie

Metabolit testosteronu β -estradiol, který vzniká reakcí katalyzovanou enzymem aromatasou, byl separován a následně kvantifikován metodou HPLC na přístroji Agilent Technologies 1200 Series s gradientovou elucí (Tab. 1, str. 41).

Separace byla provedena na chromatografické koloně Nucleosil 250x4 mm, 100–5, C₁₈ při konstantní průtokové rychlosti 0,5 ml/min a teplotě 45 °C po dobu 30 minut. Nástřikový objem vzorků byl 30 μ l. Metabolit β -estradiol byl detekován při vlnové délce 280 nm a kvantitativní vyhodnocení probíhalo vztažením plochy píku β -estradiolu k ploše píku vnitřního standardu fenacetinu.

Tab. 1: Gradientová eluce pro HPLC separaci β -estradiolu.

t [min]	MF A [%]	MF B [%]
00:00	50	50
10:00	50	50
12:00	90	10
18:00	90	10
20:00	50	50
30:00	50	50

Lineární gradient, konstantní průtoková rychlost 0,5 ml/min, MF A - 0,1% kyselina mravenčí v acetonitrilu, MF B - 0,1% kyselina mravenčí v ultračisté vodě.

HPLC separace β -estradiolu s následnou detekcí pomocí hmotnostní spektrometrie

Při této metodě byl opět separován metabolit β -estradiol, který byl následně kvantifikován vztahem plochy píku β -estradiolu k ploše píku vnitřního standardu 17α -ethinylestradiolu.

Chromatografická separace byla provedena na HPLC s gradientovou elucí (Tab. 2) ve spojení s hmotnostním spektrometrem (HPLC-MS) s elektrosprejovou ionizací. Měření spekter probíhalo v pozitivním módu v rozsahu m/z 60–1300 a ionty byly fragmentovány CID (kolizní energie 25 eV). Mezi jednotlivými vzorky byl nastříkovaný blank (0,1% kyselina mravenčí). Toto měření provedl RNDr. Tomáš Ječmen, Ph.D.

Tab. 2: Gradientová eluce pro HPLC-MS separaci β -estradiolu.

t [min]	MF A [%]	MF B [%]
00:00	50	50
02:00	50	50
08:00	90	10
10:00	90	10
11:00	50	50
15:00	50	50

Lineární gradient, konstantní průtoková rychlost 0,2 ml/min, MF A - 0,1% kyselina mravenčí v acetonitrilu, MF B - 0,1% kyselina mravenčí v ultračisté vodě.

Vliv parfémů exponovaných UV-C záření na aktivitu aromatasy

Nejprve byla měřičem slunečního záření Lutron změřena intenzita záření na přímém slunci ($3,7 \text{ mW/cm}^2$) a intenzita zdroje fotolyzéry Oriel 60100 ve vzdálenosti 3 m od zdroje (9 mW/cm^2). Pro dosažení srovnatelné expozice jako při 3 hodinovém ozáření sluncem bylo u fotolyzéry použito ozáření po dobu 10 s ve vzdálenosti 15 cm od zdroje.

Vybrané vzorky parfémů byly dávkovány do křemenné mikrokyvety (optická dráha 1 mm) a následně umístěny do fotolyzéry Oriel 60100 do vzdálenosti 15 cm od zdroje. Intenzita záření zdroje o vlnové délce kolem 254 nm dosahovala v této vzdálenosti hodnoty 3600 mW/cm^2 . Vzorky byly exponovány po dobu 10 a 60 sekund a poté testovány v reakčních směsích (viz. 3.3.2.). Analýza vzniklého β -estradiolu probíhala výše popsanou metodou HPLC-MS a výsledky byly kvantifikovány vztažením ploch píků β -estradiolu k vnitřnímu standardu 17α -ethinylestradiolu.

3.3.3. Aktivita NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasy v přítomnosti parfému

Experiment byl proveden dle Teplá a kol. [79] Aktivita enzymu NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasy (CYPOR) v přítomnosti vybraného vzorku parfému byla stanovena spektrofotometricky v UV-VIS spektrofotometru Cary 60.

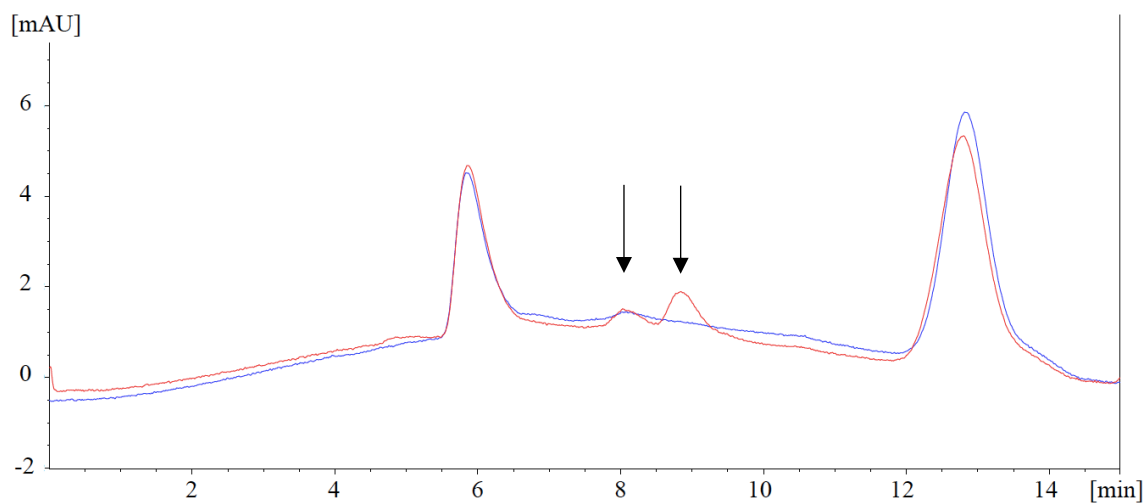
Reakční směsi o celkovém objemu $600 \mu\text{l}$ byly dávkovány do skleněné maskované semimikrokyvety s délkou optické dráhy 10 mm. Ve finálních koncentracích obsahovaly $4,3 \text{ pmol/ml}$ NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasu (CYPOR), $0,5 \text{ mg/ml}$ cytochrom c, vzorek parfému (celkové ředění 360x) nebo methanolu (celkové ředění 120x) v pufru 2. Nejprve byl spektrofotometr vynulován na směs CYPOR a cytochromu c, následně byl přidán parfém či methanol a reakce byla iniciována přidávkem $10 \mu\text{l}$ 10 mM NADPH. Ihned poté byla zaznamenána absorbance při 550 nm v časových intervalech 10 sekund po dobu 3 minut.

4. Výsledky

Předkládaná diplomová práce se zabývá vlivem vybraných vzorků parfémů na aktivitu enzymového komplexu CYP19+OR a s ní související produkcí β -estradiolu.

4.1. Metabolismus testovaných parfémů

Cílem experimentu bylo zjistit, zda aromatasa metabolicky přeměňuje složky parfémů na produkty detekovatelné technikou HPLC. Výsledné HPLC chromatogramy byly porovnány s chromatogramy směsí, které sestávaly pouze z daného parfému bez enzymového systému. Jediným parfémem, u kterého byla zaznamenána jistá změna, byl parfém 6 (Obr. 7). U ostatních testovaných parfémů metabolismus aromatasou žádné změny nevyvolal. Metabolity parfému 6 nebyly dále analyzovány.



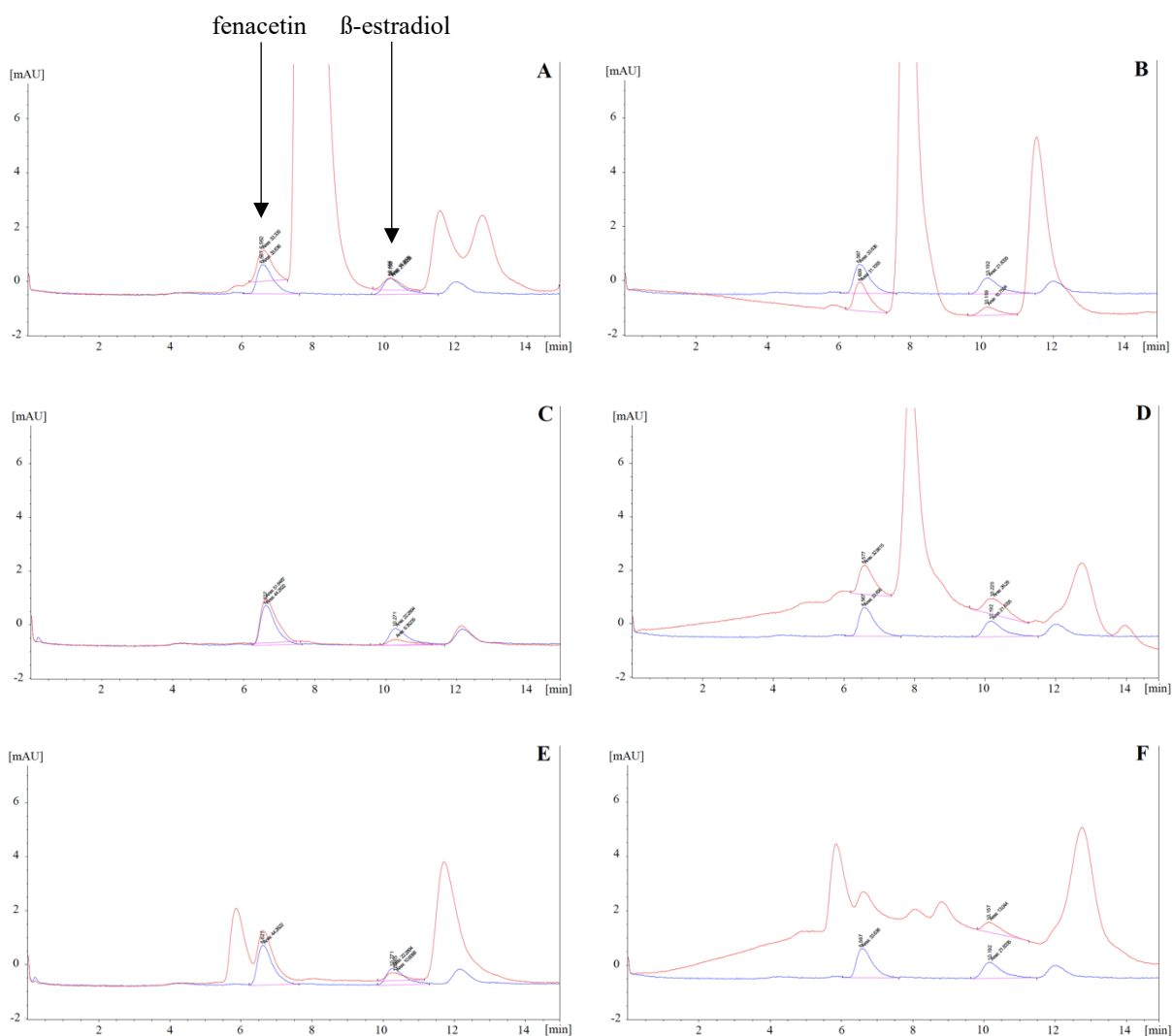
Obr. 7: HPLC chromatogram separace reakční směsi obsahující parfém 6. Separace proběhla na chromatografické koloně Nucleosil 250x4 mm, 100–5, C₁₈ s gradientovou elucí (viz. 3.3.2.), signál byl detekován při 280 nm. Modrá křivka označuje kontrolu (300x ředěný parfém 6 v pufru 1), červená křivka reakční směs s přidavkem parfému 6 (30 nM CYP19+OR, 1 mM NADPH, parfém 6 o celkovém ředění 300x). Šipky označují odlišnosti chromatogramů. Chromatogramy jsou přiblíženy.

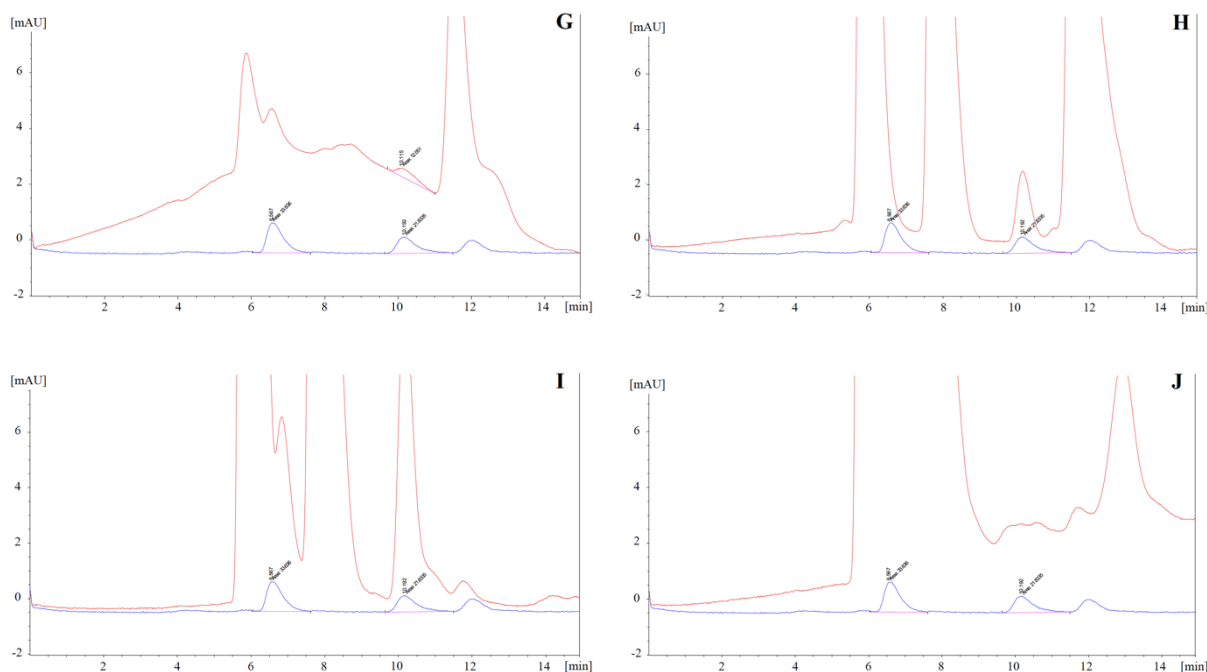
4.2. Vliv parfémů na aktivitu aromatasy

Vliv testovaných parfémů na aktivitu enzymu aromatasy byl vyhodnocen na základě množství β -estradiolu vzniklého metabolickou konverzí testosteronu, jenž probíhá za katalýzy tímto enzymem.

Cílem tohoto experimentu bylo zjištění vlivu testovaných parfémů na aktivitu aromatasy. Reakční směsi obsahovaly 50 μ M testosteron, 30 nM CYP19+OR, 1 mM NADPH, 5 μ M fenacetin a testovaný parfém. Metabolit β -estradiol byl nejprve separován pomocí HPLC a jeho množství poté kvantifikováno vztahením plochy jeho píku k ploše píku vnitřního standardu fenacetinu.

Porovnání elučních profilů separace reakčních směsí v přítomnosti a nepřítomnosti parfémů je prezentováno na Obr. 8 (str. 44 a 45) a výsledky jsou shrnuty v grafu na Obr. 11 (str. 47).



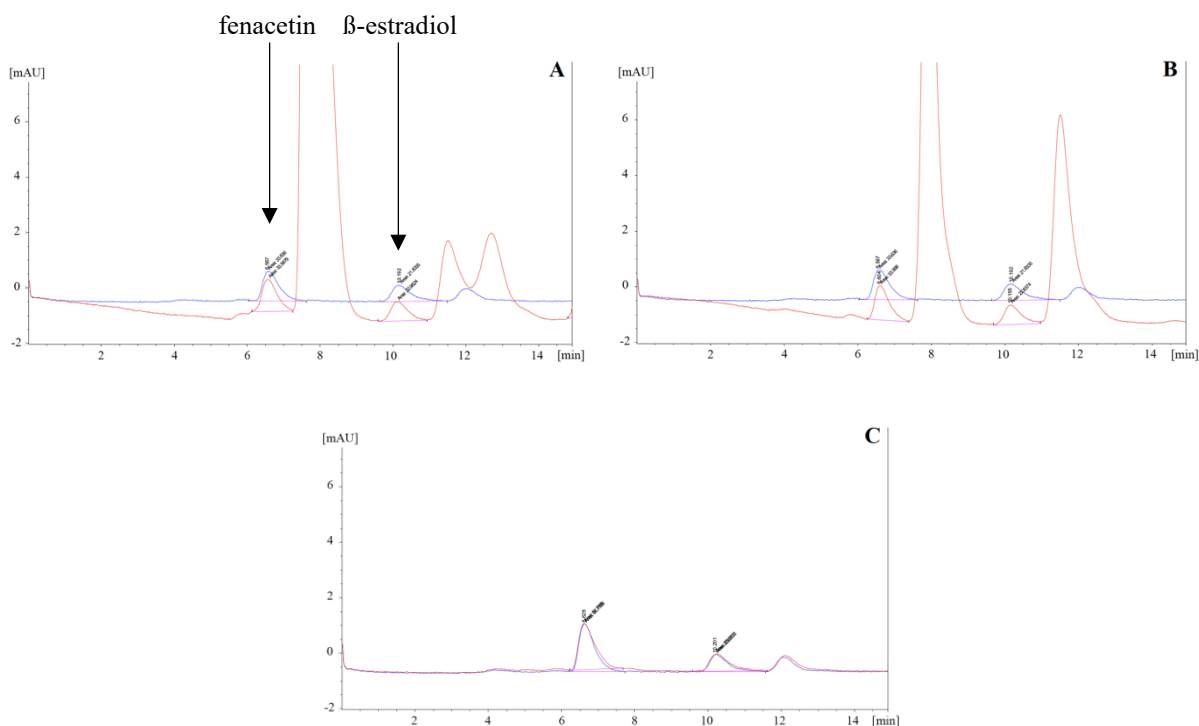


Obr. 8: Porovnání HPLC chromatogramů separace reakčních směsí. Separace proběhla na chromatografické koloně Nucleosil 250x4 mm, 100–5, C₁₈ s gradientovou elucí (viz. 3.3.2.), signál byl detekován při 280 nm. Modrá křivka označuje kontrolu (50 μM TST, 30 nM CYP19+OR, 1 mM NADPH, 5 μM fenacetin a 100x ředěný methanol v pufru 1), červená křivka reakční směs s přidavkem parfémů (50 μM TST, 30 nM CYP19+OR, 1 mM NADPH, 5 μM fenacetin a 300x ředěný parfém v pufru 1) – parfém 1 (**A**), 2 (**B**), 3 (**C**), 4 (**D**), 5 (**E**), 6 (**F**), 7 (**G**), 8 (**H**), 9 (**I**), 10 (**J**). Na chromatogramu A jsou šipkou vyznačeny píky fenacetinu a β-estradiolu. Chromatogramy jsou přiblíženy.

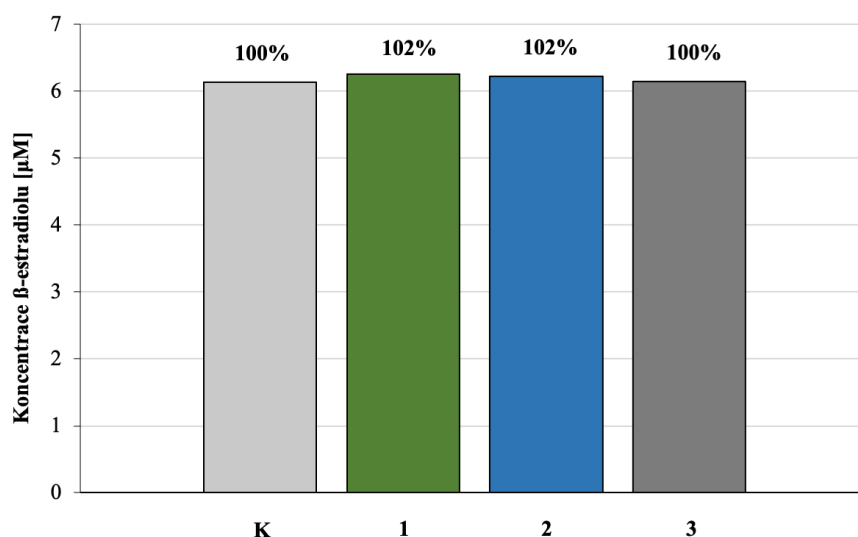
Z Obr. 8 je patrné, že komponenty některých parfémů (parfémy 4 až 10) interferují s píkem fenacetinu či β-estradiolu, díky čemuž nebylo možné přesně stanovit množství produkovaného β-estradiolu. V následujícím experimentu byly proto analyzovány pouze parfémy, u nichž nebyly pozorovány interakce mezi píky analytu a složkami parfému. Jednalo se o parfémy 1, 2 a 3.

Cílem tohoto experimentu bylo zjištění vlivu parfému přidaného těsně před ukončením reakce. Byl tedy v reakční směsi obsažen, ale nemohl ovlivnit probíhající reakci (Obr. 9, str. 46). Složení reakční směsi bylo analogické jako v předchozím experimentu. Výsledky jsou shrnuty v grafu na Obr. 10 (str. 46).

4. Výsledky

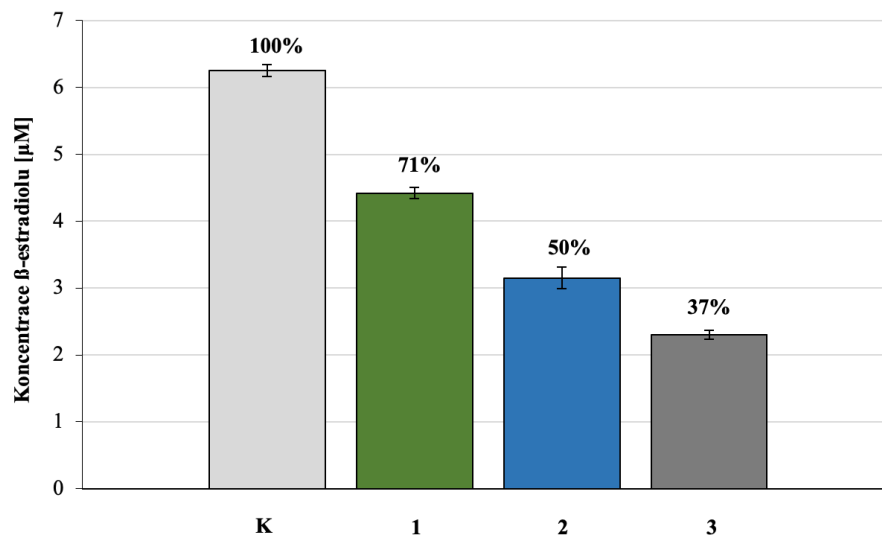


Obr. 9: HPLC chromatogram separace reakčních směsí obsahujících parfěmy. Separace proběhla na chromatografické koloně Nucleosil 250x4 mm, 100–5, C₁₈ s gradientovou elucí (viz. 3.3.2.), signál byl detekován při 280 nm. Modrá křivka označuje kontrolu (50 μM TST, 30 nM CYP19+OR, 1 mM NADPH, 5 μM fenacetin a 100x ředěný methanol v pufru 1), červená křivka reakční směs s přidavkem parfémů (50 μM TST, 30 nM CYP19+OR, 1 mM NADPH, 5 μM fenacetin a 300x ředěný parfém v pufru 1) – parfém 1 (**A**), 2 (**B**), 3 (**C**). Na chromatogramu A jsou šipkou vyznačeny píky fenacetinu a β-estradiolu. Parfěmy byly přidávány těsně před ukončením reakce. Chromatogramy jsou přiblíženy.



Obr. 10: Vliv vybraných parfémů na produkci β-estradiolu. **K** (kontrola): 50 μM TST, 30 nM CYP19+OR, 1 mM NADPH, 5 μM fenacetin a methanol (ředění 100x) v pufru 1; **1**: stejné složení reakční směsi jako u kontroly, místo methanolu přidán parfém 1 (ředění 300x); **2**: přidavek parfému 2 (ředění 300x); **3**: přidavek parfému 3 (ředění 300x). Vyobrazená data pochází z jednoho měření. Parfěmy byly přidávány těsně před ukončením reakce.

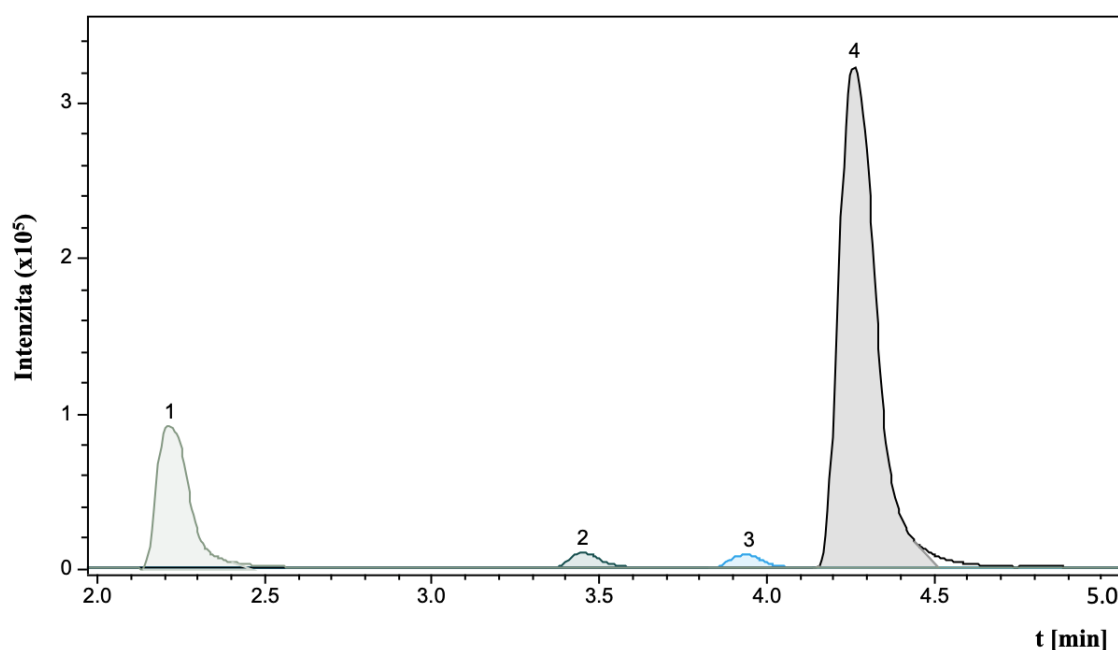
V následujícím grafu (Obr. 11) jsou prezentovány výsledky stanovení vlivu parfémů 1, 2 a 3 na metabolickou konverzi testosteronu na β -estradiol, kdy byla produkce tohoto metabolitu detekována metodou HPLC.



Obr. 11: Vliv parfémů na produkci β -estradiolu. **K** (kontrola): 50 μ M TST, 30 nM CYP19+OR, 1 mM NADPH, 5 μ M fenacetin a methanol (ředění 100x) v pufru 1; **1**: 50 μ M TST, 30 nM CYP19+OR, 1 mM NADPH, 5 μ M fenacetin, parfém 1 (ředění 300x) v pufru 1; **2**: přídavek parfému 2 (ředění 300x); **3**: přídavek parfému 3 (ředění 300x). Měření byla prováděna v triplicátech, vynesena data jsou tedy jejich průměrem a směrodatná odchylka je ze třech měření.

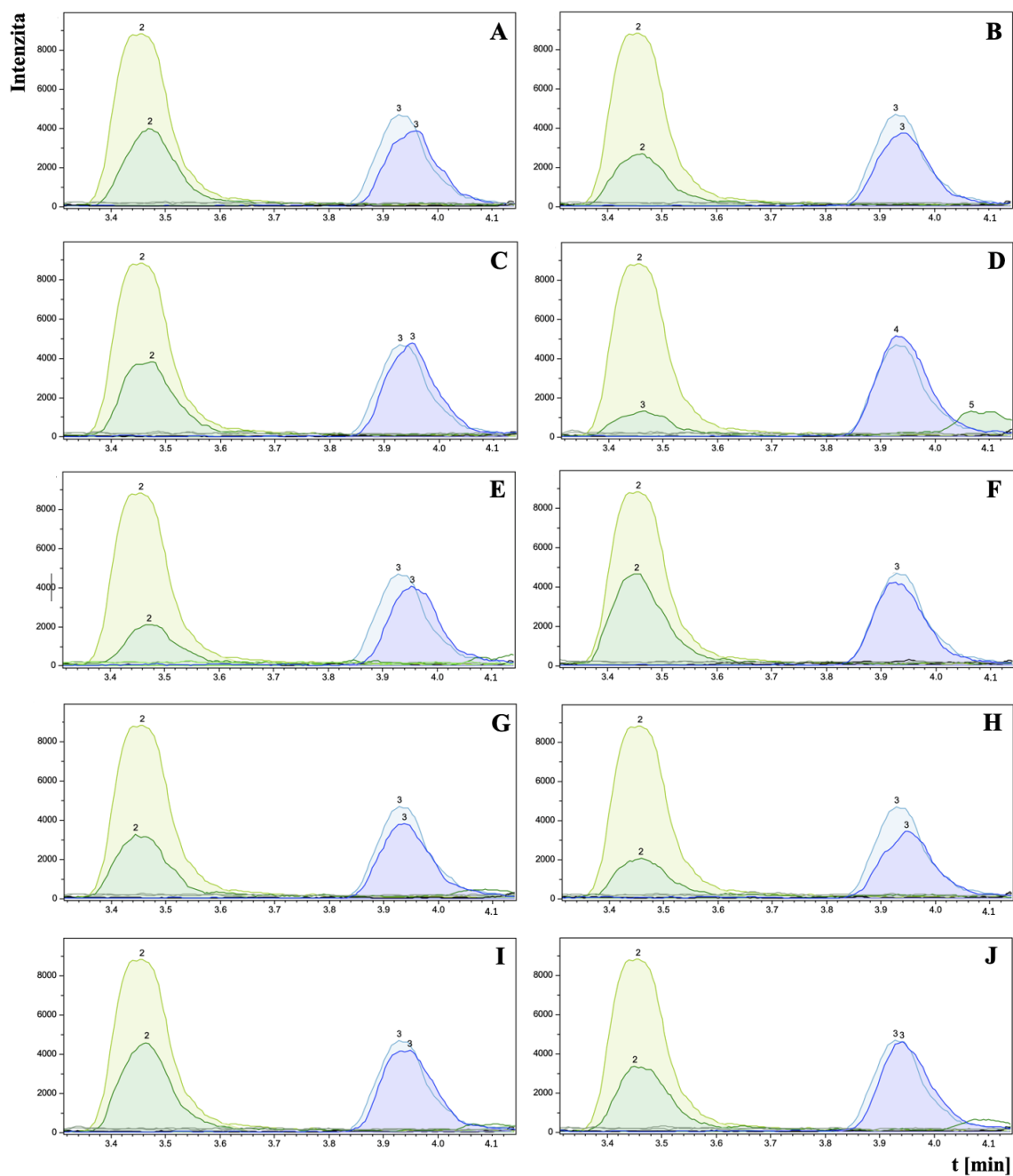
4.2.1. Stanovení β -estradiolu metodou hmotnostní spektrometrie

V těchto experimentech byl β -estradiol stanoven metodou HPLC-MS, kde byl jako vnitřní standard využíván 17α -ethinylestradiol (EE2) o finální koncentraci $2,5 \mu\text{M}$. Kontrolní reakce (Obr. 12) sestávala z $50 \mu\text{M}$ testosteronu, 30 nM CYP19+OR, 1 mM NADPH a methanolu (ředění 100x). V reakčních směsích ovlivněných parfémů (Obr. 13, str. 49) byl methanol nahrazen testovaným parfémem (300x ředěný). Kvantifikace β -estradiolu probíhala vztažením plochy jeho píku k ploše píku EE2. Výsledky jsou shrnuty v grafu na Obr. 14 (str. 50).



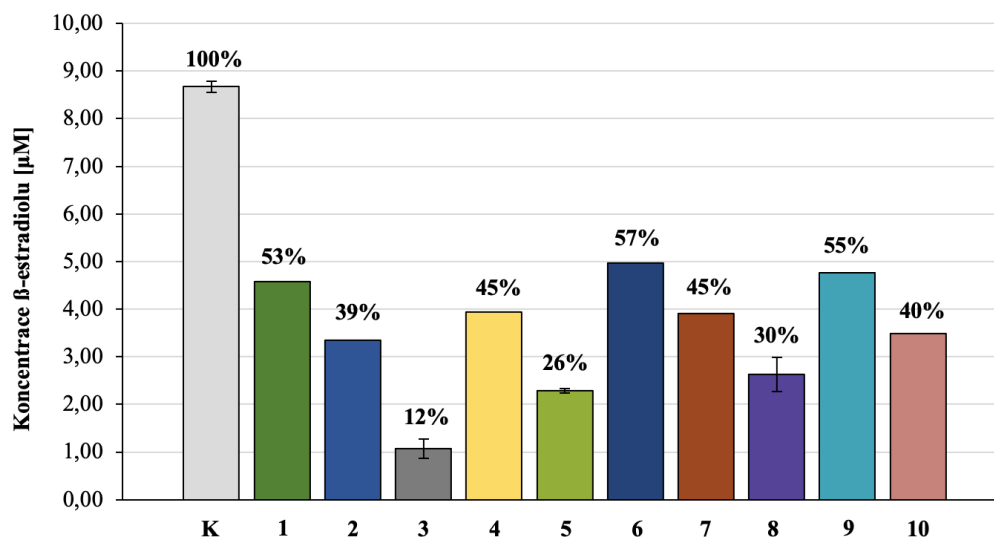
Obr. 12 – Eluční profil reakční směsi konverze testosteronu na β -estradiol. Analýza probíhala na HPLC-MS s elektrosprejovou ionizací. Spektra byla měřena v pozitivním módu v rozsahu m/z 60–1300, ionty byly fragmentovány CID (kolizní energie 25 eV). Reakční směs obsahovala $50 \mu\text{M}$ testosteron, 30 nM CYP19+OR, 1 mM NADPH, $2,5 \mu\text{M}$ EE2, $5 \mu\text{M}$ fenacetin, a methanol (ředění 100x). Jednotlivé píky znázorňují komponenty vzorku – fenacetin (1), β -estradiol (2), EE2 (3), testosteron (4). Chromatogram je přiblížen.

4.2. Vliv parfémů na aktivitu aromatasy



Obr. 13 – Eluční profily reakčních směsí obsahujících parfémy. Analýza probíhala na HPLC-MS s elektrosprejovou ionizací. Spektra byla měřena v pozitivním módu v rozsahu m/z 60–1300, ionty byly fragmentovány CID (kolizní energie 25 eV). Reakční směsi obsahovaly 50 μM testosteron, 30 nM CYP19+OR, 1 mM NADPH, 5 μM fenacetin, 2,5 μM EE2 a methanol (ředění 100x) nebo testované parfémy (ředění 300x). Pík 2 odpovídá β -estradiolu, pík 3 odpovídá EE2. Píky světlejší barvy označují kontrolu (reakční směs bez přidavku parfému, který byl nahrazen methanolem), píky tmavší barvy reakční směsi obsahující parfémy – parfém 1 (A), 2 (B), 3 (C), 4 (D), 5 (E), 6 (F), 7 (G), 8 (H), 9 (I), 10 (J).

4. Výsledky

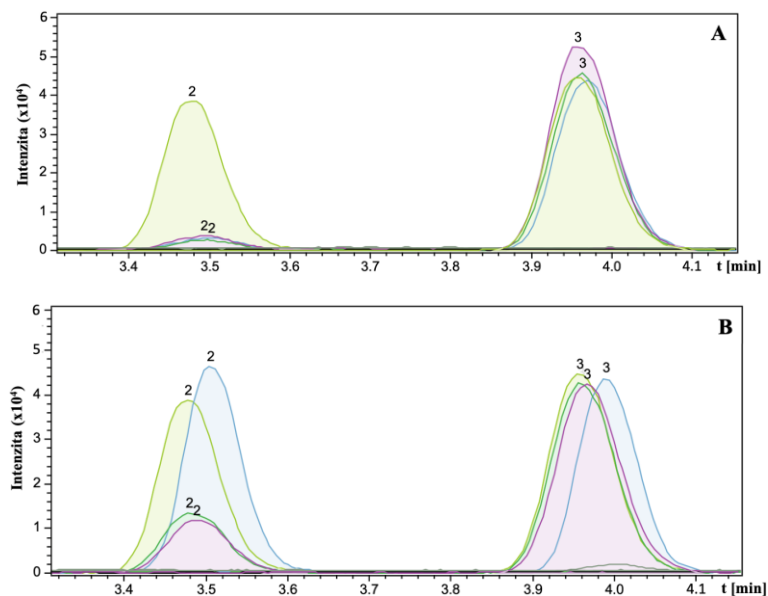


Obr. 14: Vliv parfémů na aktivitu aromatasy. **K** (kontrola): 50 μ M TST, 30 nM CYP19+OR, 1 mM NADPH, 2,5 μ M EE2, 5 μ M fenacetin a methanol (ředění 100x) v pufru 1. Sloupce 1 až 10 označují reakční směsi o stejném složení, kdy byly místo methanolu přidány testované parfémy (parfémy 1-10, celkové ředění v reakční směsi 300x). Kontrola a parfémy 3, 5 a 8 byly měřeny v triplicátech – data vynesena na grafu jsou průměrem těchto třech měření a směrodatná odchylka je také ze třech měření. Data pro ostatní parfémy pochází z jednoho měření.

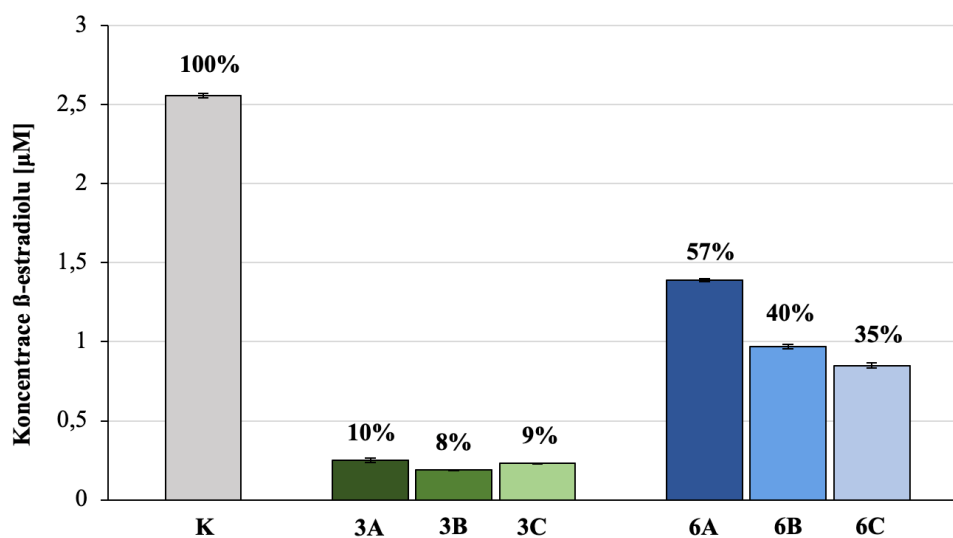
Vliv ozářených parfémů na aktivitu aromatasy

Na základě výsledků předchozích experimentů byly vybrány dva parfémy, které způsobily nejvyšší a nejnižší inhibici aktivity aromatasy – parfémy 3 a 6. U těchto parfémů bylo poté zjišťováno, zda jimi vyvolané efekty mohou být ovlivněny působením UV-C záření v oblasti kolem 254 nm. Reakční směsi obsahovaly 50 μ M testosteron, 30 nM CYP19+OR, 1 mM NADPH, testovaný parfém 3 nebo 6 (konečné ředění 300x) či methanol (ředění 100x). Dále byly těsně před ukončením reakce přidávány vnitřní standardy – 2,5 μ M EE2 a 5 μ M fenacetin. β -estradiol byl kvantifikován vztažením plochy jeho píku k ploše píku EE2, výsledky byly porovnány s kontrolou – reakcí bez přídavku parfému, jenž byl nahrazen methanolem (Obr. 15, str. 51).

V průběhu tohoto experimentu došlo k poškození vzorku s neozářeným parfémem 6 a z časových důvodů již nebylo možné experiment zopakovat. K vyhodnocení míry inhibice tohoto parfému byla proto využita data získaná z předchozího experimentu – eluční profil reakční směsi obsahující tento parfém (Obr. 15B, str. 51) a procentuální míra inhibice β -estradiolu vzhledem ke kontrole (Obr. 16, str. 51).



Obr. 15 – Eluční profily reakčních směsí ovlivněných ozářenými parfémy. Analýza probíhala na HPLC-MS s elektrosprejovou ionizací. Spektra byla měřena v pozitivním módu v rozsahu m/z 60–1300, ionty byly fragmentovány CID (kolizní energie 25 eV). Reakční směsi obsahovaly 50 μM testosteron, 30 nM CYP19+OR, 1 mM NADPH, 5 μM fenacetin, 2,5 μM EE2, testované parfémy 3 a 6 (ředění 300x) nebo methanol (ředění 100x). Píky 2 znázorňují β -estradiol, píky 3 EE2. Píky světle zelené barvy označují kontrolu, píky modré barvy náleží reakci ovlivněné neozařeným parfémem. Dále jsou znázorněny píky reakcí s přidavkem parfémů ozářených 10s (tmavě zelený pík) a 60s (fialový pík). Parfém 3 (obrázek A), parfém 6 (obrázek B).

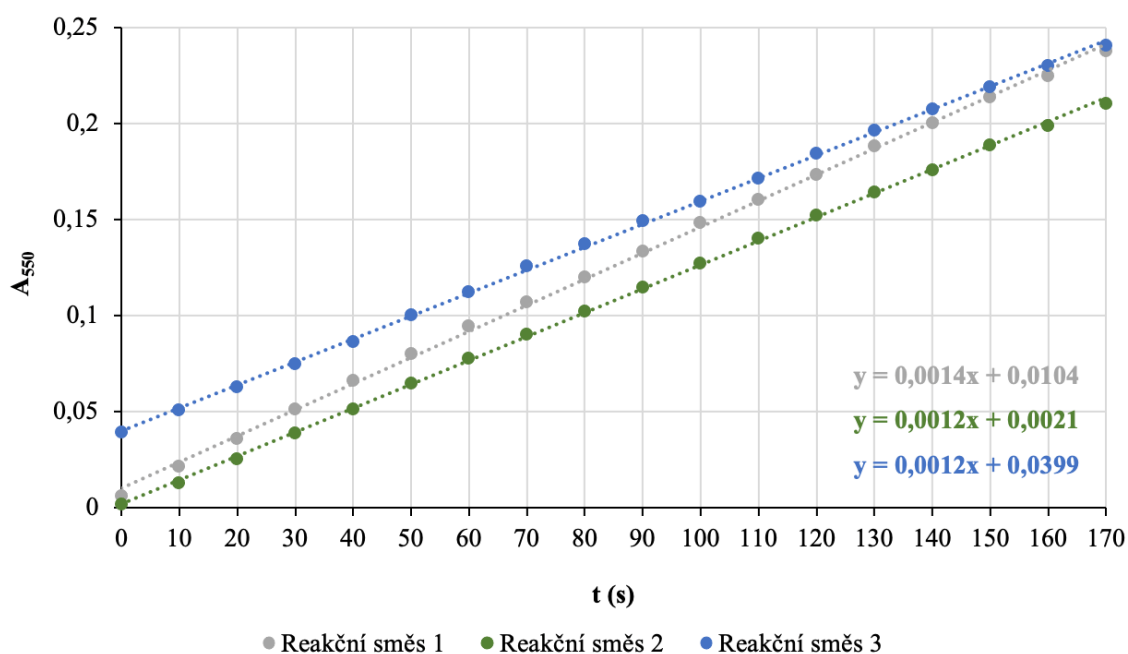


Obr. 16: Vliv ozářených parfémů na aktivitu aromatasy. **K** (kontrola): 50 μM TST, 30 nM CYP19+OR, 1 mM NADPH, 2,5 μM EE2, 5 μM fenacetin a methanol (ředění 100x) v pufru 1. Sloupce označují reakční směsi o stejném složení jako kontrola, ale s přidavkem parfému 3 nebo 6 (ředění 300x) po expozici UV záření 0 (A), 10 (B) či 60 sekund (C). Měření byla prováděna v triplicátech, vynesená data jsou tedy jejich průměrem a směrodatná odchylka je ze třech měření.

4.2.2. Aktivita NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasy v přítomnosti parfému

Cílem tohoto experimentu bylo zjistit, zda parfémové složky inhibují aromatasu či NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasu (CYPOR), která je rovněž součástí enzymového komplexu. Proto byl vliv parfémů na samotnou CYPOR sledován měřením redukce elektronového akceptoru cytochromu c.

Aktivita CYPOR byla stanovena spektrofotometricky jako časový průběh redukce cytochromu c. Reakční směsi obsahovaly 0,5 mg/ml cytochrom c, 4,3 pmol/ml CYPOR, 0,17 mM NADPH, parfém 3 (ředění 360x) či methanol (ředění 120x) v pufru 2. Naměřená data byla vynesena do grafu jako závislost absorbance při 550 nm na čase (Obr. 17).



Obr. 17: Vliv parfému na aktivitu NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasy – **reakční směs 1:** 0,5 mg/ml cytochrom c, 4,3 pmol/ml CYPOR a 0,17 mM NADPH v pufru 2; **reakční směs 2:** přidavek methanolu (ředění 120x); **reakční směs 3:** přidavek parfému 3 (celkové ředění 360x). Detekce absorbance probíhala při vlnové délce 550 nm po dobu 3 minuty (interval 10 sekund).

5. Diskuze

Pod vlivem moderního životního stylu jsme na každodenní bázi vystaveni působení hormonálně aktivních látek, které zasahují do funkce endokrinního systému a různými mechanismy ovlivňují signalizaci prostřednictvím endogenních hormonů. Z tohoto důvodu jsou tyto látky označovány jako endokrinní disruptory. [80] Některým z těchto látek můžeme být vystaveni nevědomě v životním prostředí, jsou to například pesticidy, fungicidy, sloučeniny obsažené ve změkčovadlech a plastech (bisfenol A), nebo průmyslově využívaná rozpouštědla a maziva (polychlorované bifenyly, dioxiny). Do kontaktu s nimi ale přicházíme i vědomě, a to při používání farmaceutických a kosmetických přípravků. [81]

Za uplynulých 30 let byla studiu endokrinních disruptorů věnována zvýšená pozornost, jelikož byly spojeny se vzrůstajícím počtem některých onemocnění v lidské populaci. Následkem jejich působení v organismu může dojít k ovlivnění reprodukčních funkcí, rozvoji *diabetes mellitus*, obezity a metabolického syndromu a v neposlední řadě také k rozvoji rakoviny prsu, prostaty či varlat. I přes intenzivní výzkum však endokrinní disruptory stále nejsou dostatečně prozkoumány. Chybí například jednotná definice těchto látek, detailně prozkoumaný není ani mechanismus jejich působení a dále je tu otázka jejich legislativní regulace ve spotřebních produktech. [82] Zkoumání nepříznivých účinků vyvolaných těmito látkami je taktéž velmi složité, jelikož tyto efekty se mohou u jednotlivce projevit až o desítky let později – může to ale být až u jeho potomstva či v rámci několika generací. [80]

Hormonálně aktivní látky jsou ve spotřebních produktech, jako je kosmetika, sice obsaženy v koncentracích, které jsou obecně považovány za bezpečné, stále ale chybí podrobnější výzkum jejich synergického působení ve směsích. [82] I „slabé“ hormonálně aktivní látky totiž mohou mezi sebou interagovat a důsledkem těchto interakcí pak může docházet ke zcela odlišným efektům. Obavy vyvolává také možná bioakumulace těchto sloučenin v organismech či životním prostředí. [82]

Endokrinní disruptory v organismu působí několika mechanismy. Jedním z nich je interakce s enzymy zapojenými do biosyntézy steroidních hormonů – cytochromy P450. Takovým enzymem je aromatasa, která v posledním kroku biosyntézy katalyzuje konverzi testosteronu na β -estradiol. [26] Aktivita aromatasy může být ovlivněna ve smyslu její inhibice či indukce, což vede k narušení homeostázy estrogenů v těle

a v konečném důsledku ke zvýšení rizika vzniku některých onemocnění, jako například osteoporózy, aterosklerózy, či karcinomu prsu a endometria. [2] [3] Jelikož je aromatasa ve velké míře exprimována v podkožní tukové tkáni, je v podstatě v přímém kontaktu s hormonálně aktivními látkami obsaženými v kosmetických prostředcích, které na kůži denně nanášíme.

Předkládaná diplomová práce se zabývala studiem vlivu komerčně dostupných parfémů na aktivitu aromatasy. Sledovaným parametrem bylo množství β -estradiolu vzniklého metabolickou konverzí testosteronu. Tento metabolit byl detekován pomocí HPLC a dále také HPLC-MS.

Nejprve bylo nutné optimalizovat složení reakční směsi a také metodu vhodnou pro detekci složek reakční směsi na HPLC. Jako vhodné finální koncentrace byly určeny 50 nmol/ml testosteron, 30 pmol/ml CYP19+OR a 1 μ mol/ml NADPH. Jako vnitřní standard pro HPLC byl využit fenacetin o finální koncentraci 5 nmol/ml. Optimální metodou pro HPLC separaci složek reakční směsi, tedy fenacetinu, estradiolu a testosteronu, byla metoda popsána v kapitole 3.3.2. (Tab. 1).

Ještě před testováním vlivu parfémů na aktivitu aromatasy bylo třeba zjistit eluční profily těchto parfémů. Také bylo třeba zjistit, zda při metabolismu složek parfémů aromatasou vznikají nové složky, které lze detekovat na HPLC. Jediným parfémem, u kterého byla patrná jistá změna, byla parfém 6. V porovnání s reakcí neovlivněnou parfémem lze u něj pozorovat vznik dvou nových píků v 8. a 9. minutě, které jsou vyznačeny na Obr. 7. Tyto vzniklé metabolity nebyly dále analyzovány. U ostatních vzorků parfémů nebyly při metabolismu aromatasou detekovány žádné změny. Zajímalo nás tedy, zda existuje korelace mezi metabolickou konverzí složek parfému a modulací aktivity aromatasy. Proto byly provedeny další experimenty zaměřené na zjištění vlivu testovaných parfémů na aktivitu tohoto enzymu.

Nejprve byl sledován vliv parfému, jenž byl do reakční směsi přidán před iniciací reakce – vyskytoval se zde tedy v jejím průběhu a mohl tak ovlivnit aktivitu aromatasy. Při porovnání naměřených dat s kontrolou (reakcí neovlivněnou parfémem) bylo zjištěno, že složky většiny studovaných parfémů interferují s píkem β -estradiolu či vnitřního standardu fenacetinu, a proto nebylo možné přesně stanovit jejich vliv na aktivitu aromatasy. Množství produkovaného β -estradiolu bylo možné určit pouze u parfémů 1, 2 a 3. Z grafu na Obr. 11 je patrné, že při přidavku těchto parfémů do reakční směsi došlo u všech testovaných vzorků k inhibici vzniku β -estradiolu v porovnání s kontrolou.

Nejvyšší míra inhibice byla pozorována u parfémů 3, kdy bylo množství vzniklého β -estradiolu sníženo na 37% oproti kontrole. Parfém 2 způsobil snížení množství sledovaného metabolitu na 50% a parfém 1 na 71% oproti kontrole.

Dále bylo třeba určit, jaké efekty mají parfémy, které se v reakční směsi vyskytují, ale nemohou ovlivnit její průběh. Sledováno bylo proto takové reakční uspořádání, kdy byly testované parfémy 1, 2 a 3 do reakční směsi přidány až po 30-minutové inkubaci, těsně před ukončením reakce. Jak je patrné z Obr. 9, píky estradiolu v reakcích ovlivněných parfémů mají téměř totožné plochy jako kontrolní reakce, kdy nebyl přidáván parfém. Z této skutečnosti lze soudit, že složky parfémů neovlivňují stanovení obou analytů a výsledky lze tedy interpretovat tak, že dochází k inhibici.

Jelikož metodou HPLC nebylo možné stanovit vliv všech testovaných parfémů na aktivitu aromatasy, pro další měření byla využívána vhodnější metoda, a to HPLC separace s detekcí pomocí hmotnostní spektrometrie. Jako vnitřní standard byl v těchto experimentech využíván 17α -ethinylestradiol o celkové koncentraci 5 nmol/ml. Nejprve byl s využitím HPLC-MS stanoven vliv všech testovaných parfémů na aktivitu enzymu aromatasy. Z Obr. 13 je patrné, že parfémy vykazovaly inhibiční vliv na produkci β -estradiolu v porovnání s kontrolou, čímž byly ověřeny výsledky získané při měření na HPLC. V grafu na Obr. 14 lze pozorovat, že všechny testované vzorky prokázaly inhibici vzniku β -estradiolu minimálně na 57% oproti kontrole, přičemž nejvyšší míra inhibice byla opět zaznamenána u parfému 3 (vznik 12% β -estradiolu v porovnání s kontrolou). Značná míra inhibice byla dále viditelná u parfémů 5 a 8. Naopak nejnižší míra inhibice produkce β -estradiolu oproti kontrole byla pozorována u parfému 6 (inhibice na 57% β -estradiolu) a dále také parfémů 9 a 1.

Pokud bychom porovnali data získaná metodou HPLC a HPLC-MS pro parfémy 1, 2 a 3, oběma metodami jsme došli k závěru, že nejvyšší inhibici vzniku β -estradiolu vykazoval parfém 3 a naopak nejnižší míra inhibice byla zaznamenána u parfému 1. Nicméně procentuální míra inhibice získaná oběma metodami se shodovala pouze u parfému 2, pro parfémy 1 a 3 již byly získané hodnoty do jisté míry rozdílné. Vzhledem k interferenci složek parfémů s vnitřním standardem fenacetinem a rovněž se stanovovaným β -estradiolem při měření metodou HPLC však lze za vhodnější a přesnější metodu jeho stanovení považovat HPLC-MS.

V dalším experimentu nás zajímala situace, kdy je parfém nanesen na kůži a vystaven působení slunečního záření. Proto bylo zjišťováno, zda mohou být parfémy a jimi

vyvolané efekty ovlivněny působením UV-C záření o vlnové délce kolem 254 nm. Pomocí měřiče intenzity slunečního záření Lutron byla intenzita záření na přímém slunci stanovena jako 3,7 mW/cm². Stejným přístrojem byla naměřena také intenzita zdroje fotolyzéry Oriol 60100 ve vzdálenosti 3 m, která dosahovala 9 mW/cm². Pokud jsme uvažovali 3 hodinové ozáření sluncem, bylo v případě fotolyzéry ve vzdálenosti 15 cm od zdroje možné použít dobu 10 s pro dosažení srovnatelné expozice UV záření. Pro tento experiment byly vybrány parfémy, které způsobily nejvyšší a nejnižší inhibici aktivity aromatasy – parfémy 3 a 6. Sledována byla jak reakce s přidavkem neozářeného parfému, tak s parfémem ozářeným po dobu 10 s a 60 s. Z grafu na Obr. 16 je patrné, že ozáření parfému 3 po dobu 10 i 60 sekund vedlo k velmi podobné inhibici vzniku β -estradiolu oproti kontrole. Míra této inhibice byla zároveň téměř totožná s inhibicí vyvolanou neovlivněným parfémem, z čehož můžeme usoudit, že ozáření tohoto parfému jeho vliv na aktivitu aromatasy neovlivnilo. Naopak při porovnání efektů způsobených neozářeným a ozářeným parfémem 6 lze pozorovat, že ozáření tohoto parfému vedlo ke zvýšené inhibici produkce β -estradiolu v porovnání s kontrolou. Neozářený parfém inhiboval vznik β -estradiolu na 54% oproti kontrole, již jeho ozáření po dobu 10 sekund vedlo ke zvýšení inhibice o téměř 20%. Míra inhibice způsobená parfémem ozářeným 60 sekund byla ještě o dalších 5% vyšší. Vzhledem k poškození vzorku s neozářeným parfémem 6 v experimentální sadě byl pro vyhodnocení míry inhibice využit identický vzorek z předchozího experimentu. (Obr. 14).

V předchozích experimentech bylo tedy prokázáno, že testované parfémy měly inhibiční vliv na aktivitu enzymového komplexu CYP19+OR. Následně bylo třeba vyloučit možnost, že se na pozorované inhibici tvorby β -estradiolu podílí inhibice NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasy (CYPOR), která v enzymovém komplexu CYP19+OR vystupuje jako přenašeč elektronů. Aktivita CYPOR v přítomnosti parfému byla stanovena spektrofotometricky jako časový průběh redukce potenciálního elektronového akceptoru, cytochromu c. Tento parametr byl stanoven pro parfém 3, který z testovaného souboru vykazoval nejvyšší míru inhibice vzniku β -estradiolu v porovnání s kontrolou. Sledována byla jak reakce bez přidavku parfému či methanolu, tak reakční směs s obsahující parfém 3 či methanol. Z grafu na Obr. 16 je patrné, že směrnice reakce bez přidavku parfému či methanolu je mírně odlišná od zbylých dvou reakcí. Směrnice reakční směsi s přidavkem parfému 3 a s přidavkem methanolu jsou ale téměř identické, z čehož vyplývá, že aktivita CYPOR nebyla přidavkem parfému ovlivněna. Z této

skutečnosti lze zároveň soudit, že vliv parfémů na aktivitu CYP19+OR pozorovaný v předchozích experimentech byl vyvolán působením parfémů na enzym aromatasa.

Pro zjištění, které komponenty parfémů způsobují inhibici aktivity aromatasy, bylo porovnáváno jejich složení. [83] Parfém 3, který vykazoval nejvyšší inhibici produkce β -estradiolu, obsahoval zároveň také nejméně dokumentovaných složek ze všech testovaných parfémů. Komponenty citronellol, limonen, geraniol, citral a linalool, obsažené v tomto parfému, by tedy mohly být odpovědné za výše popsané inhibiční účinky. Tyto látky se však zároveň vyskytují téměř ve všech parfémích z testovaného souboru, a to i u parfémů, u kterých byla prokázána nejnižší míra inhibice aromatasy – parfémy 1, 6 a 9. Výjimkou byl pouze parfém 4, který ve svém složení neobsahuje citronellol, geraniol a citral, a také parfém 7, ve kterém není obsažen citral. Oba tyto parfémy způsobily v porovnání s ostatními testovanými vzorky průměrnou inhibici vzniku β -estradiolu. Konkrétně to byla inhibice na 45% vzniklého β -estradiolu oproti kontrole. Na základě této dedukce by bylo možné předpokládat, že příspěvek citronellolu, geraniolu a citralu k pozorované inhibici aktivity aromatasy není tak vysoký, jako je tomu u limonenu a linaloolu. Dále bylo porovnáváno složení parfémů, které aromatasu inhibovaly nejméně - parfémy 1 a 9. Tyto parfémy obsahují kumarin, který se naopak nevyskytuje v parfémích vykazujících nejvyšší míru inhibice produkce β -estradiolu – parfémy 3 a 5. Z tohoto důvodu by bylo možné kumarinu také přisuzovat slabší inhibiční účinek. U ostatních komponent parfémů nebylo identifikováno žádné schéma, které by napovídalo o míře jejich příspěvku k inhibici aromatasy.

Je však třeba mít na paměti, že výše uvedené závěry jsou do určité míry spekulativní a pozorované efekty rovněž závisí na koncentraci parfémů, ne jen na jejich přítomnosti. Bylo by tedy třeba je potvrdit experimenty zaměřenými na studium jednotlivých složek parfémů. Například u kumarinu a jeho derivátů byly totiž dřívějšími studiemi odhaleny výrazně inhibiční účinky na aromatasu, které byly srovnatelné v účinky specifického inhibitoru aromatasy, exemestanu. [84] [85].

Výše zmíněné studie však byly zaměřeny pouze na zkoumání jednotlivých složek parfémů a nikoliv parfémů jako celku. Jelikož jsou parfémy poměrně komplexní směsí složek, bylo by také třeba prozkoumat synergické působení jednotlivých komponent. K detailnějšímu porozumění vlivu parfémů na aktivitu aromatasy by tedy bylo do budoucna třeba zaměřit se jednak na účinky jednotlivých parfémových komponent a zároveň také na jejich synergické působení ve směsích.

6. Shrnutí

V předkládané diplomové práci byl studován vliv vybraných komerčně dostupných parfémů na aktivitu cytochromu P450 19, aromatasu. Experimenty byly provedeny na enzymovém komplexu lidské mikrosomální CYP19+OR. Výsledky diplomové práce lze shrnout následovně:

- Byla vypracována vhodná metoda pro HPLC separaci β -estradiolu z reakční směsi obsahující testosteron a fenacetin jako vnitřní standard.
- Pomocí HPLC byl stanoven vliv parfémů 1, 2 a 3 na aktivitu aromatasu, jelikož u ostatních vzorků nebylo vzhledem k interferenci složek parfémů s analyty možno přesně vyhodnotit odpovídající plochy píků. Všechny tři parfémy měly na tento enzym inhibiční vliv. Nejvyšší míra inhibice byla zaznamenána u parfému 3.
- Vliv všech testovaných parfémů na aktivitu aromatasu byl také stanoven pomocí HPLC-MS. Všechny parfémy vykazovaly významný inhibiční vliv na aromatasu. Nejvyšší inhibice bylo dosaženo v reakční směsi obsahující parfém 3 (*Montale*[®], *Intense Roses Musk*), a dále u parfémů 5 a 8. Nejnižší inhibici aromatasu naopak způsobily parfémy 1 (*Bulgari*[®], *Man Wood Essence*), 6 a 9.
- Dále byl studován vliv UV-C záření v oblasti kolem 254 nm na efekty vyvolané parfémy 3 a 6 – vzorky, které vykazovaly nejvyšší a nejnižší inhibici aktivity aromatasu. U parfému 3 ozáření žádnou změnu v míře inhibice nevyvolalo, naopak u parfému 6 se míra inhibice zvyšovala s časem ozáření.
- Spektrofotometrickým stanovením aktivity NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasy pomocí redukce elektronového akceptoru cytochromu c bylo ověřeno, že přídavek parfému nemá na aktivitu tohoto enzymu vliv.

Seznam použité literatury

- [1] Cheskis, B. J.; Greger, J. G.; Nagpal, S.; Freedman, L. P.: Signaling by estrogens. *J Cell Physiol.* **213**, 610–617 (2007).
- [2] Ikeda, K.; Horie-Inoue, K.; Inoue, S.: Functions of estrogen and estrogen receptor signaling on skeletal muscle. *J Steroid Biochem Mol Biol.* **191**, 1–7 (2019).
- [3] Liang, J.; Shang, Y.: Estrogen and cancer. *Annu Rev Physiol.* **75**, 225–240 (2013).
- [4] Horng, H. C.; Chang, W. H.; Yeh, C. C.; Huang, B. S.; Chang, C. P.; Chen, Y. J.; Tsui, K. H.; Wang, P. H.: Estrogen Effects on Wound Healing. *Int J Mol Sci.* **18**, 1–14 (2017).
- [5] Casals-Casas, C.; Desvergne, B.: Endocrine disruptors: from endocrine to metabolic disruption. *Annu Rev Physiol.* **73**, 135–162 (2011).
- [6] Waring, R. H.; Harris, R. M.: Endocrine disruptors: a human risk? *Mol Cell Endocrinol.* **244**, 2–9 (2005).
- [7] Petrone, A. B.; Simpkins, J. W.; Barr, T. L.: 17 β -estradiol and inflammation: implications for ischemic stroke. *Aging Dis.* **5**, 340–345 (2014).
- [8] Nelson, L. R.; Bulun, S. E.: Estrogen production and action. *J Am Acad Dermatol.* **45**, 116–124 (2001).
- [9] Hariri, L.; Rehman, A.: *Estradiol*. StatPearls (2022). Dostupné z URL: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK549797/?report=reader>> [cit.18.3.2023]
- [10] Lucas, T. F.; Pimenta, M. T.; Pisolato, R.; Lazari, M. F.; Porto, C. S.: 17 β -estradiol signaling and regulation of Sertoli cell function. *Spermatogenesis.* **1**, 318–324 (2011).
- [11] Greaves, R. F.; Jevalikar, G.; Hewitt, J. K.; Zacharin, M. R.: A guide to understanding the steroid pathway: new insights and diagnostic implications. *Clin Biochem.* **47**, 5–15 (2014).
- [12] Schiffer, L.; Barnard, L.; Baranowski, E. S.; Gilligan, L. C.; Taylor, A. E.; Arlt, W.; Shackleton, C. H. L.; Storbeck, K. H.: Human steroid biosynthesis, metabolism and excretion are differentially reflected by serum and urine steroid metabolomes: A comprehensive review. *J Steroid Biochem Mol Biol.* **194**, 1–25 (2019).

- [13] Li, J.; Papadopoulos, V.; Vihma, V.: Steroid biosynthesis in adipose tissue. *Steroids*. **103**, 89–104 (2015).
- [14] Miller, W. L.: Steroid hormone synthesis in mitochondria. *Mol Cell Endocrinol*. **379**, 62–73 (2013).
- [15] Olson, S. H.; Bandera, E. V.; Orlow, I.: Variants in estrogen biosynthesis genes, sex steroid hormone levels, and endometrial cancer: a HuGE review. *Am J Epidemiol*. **165**, 235–245 (2007).
- [16] Dubey, R. K.; Jackson, E. K.: Cardiovascular protective effects of 17 β -estradiol metabolites. *J Appl Physiol (1985)*. **91**, 1868–1883 (2001).
- [17] Tsuchiya, Y.; Nakajima, M.; Yokoi, T.: Cytochrome P450-mediated metabolism of estrogens and its regulation in human. *Cancer Lett*. **227**, 115–124 (2005).
- [18] Tofovic, S. P.: Estrogens and development of pulmonary hypertension: interaction of estradiol metabolism and pulmonary vascular disease. *J Cardiovasc Pharmacol*. **56**, 696–708 (2010).
- [19] Mueck, A. O.; Seeger, H.; Lippert, T. H.: Estradiol metabolism and malignant disease. *Maturitas*. **43**, 1–10 (2002).
- [20] Lippert, T. H.; Seeger, H.; Mueck, A. O.: The impact of endogenous estradiol metabolites on carcinogenesis. *Steroids*. **65**, 357–369 (2000).
- [21] Sawicka, E.; Saczko, J.; Kulbacka, J.; Szydełko, M.; Szymańska, B.; Piwowar A.: The influence of interaction between cadmium with 17 β -estradiol, 2-methoxyestradiol and 16 α -hydroxyestrone on viability and p-glycoprotein in ovarian cancer cell line. *Int J Mol Sci*. **23**, 1–17 (2022).
- [22] Khan, W. A.; Khan, M. W. A.; Sherwani, S.; Siddiqui, W. A.: Depression enhanced the production of autoantibodies against 16 α -hydroxyestrone-estrogen receptor adduct in breast cancer. *Int Immunopharmacol*. **66**, 251–259 (2019).
- [23] McCarthy, M. M.: Estradiol and the developing brain. *Physiol Rev*. **88**, 91–124 (2008).
- [24] Marino, M.; Pellegrini, M.; La Rosa, P.; Acconcia, F.: Susceptibility of estrogen receptor rapid responses to xenoestrogens: physiological outcomes. *Steroids*. **77**, 910–917 (2012).

-
- [25] Kerdivel, G.; Habauzit, D.; Pakdel, F.: Assessment and molecular actions of endocrine-disrupting chemicals that interfere with estrogen receptor pathways. *Int J Endocrinol.* **2013**, 1–14 (2013).
- [26] Shanle, E. K.; Xu, W.: Endocrine disrupting chemicals targeting estrogen receptor signaling: identification and mechanisms of action. *Chem Res Toxicol.* **24**, 6–19 (2011).
- [27] Cauley, J. A.: Estrogen and bone health in men and women. *Steroids.* **99**, 11–15 (2015).
- [28] Patel, S.; Homaei, A.; Raju, A. B.; Meher, B. R.: Estrogen: The necessary evil for human health, and ways to tame it. *Biomed Pharmacother.* **102**, 403–411 (2018).
- [29] Jia, M.; Dahlman-Wright, K.; Gustafsson, J. Å.: Estrogen receptor alpha and beta in health and disease. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* **29**, 557–568 (2015).
- [30] Anzenbacher, P.; Anzenbacherová, A.: Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. *CMLS, Cell Mol Life Sci.* **58**, 737–747 (2001).
- [31] Guengerich, F. P.: *Enzyme systems that metabolize drugs and other xenobiotics: Cytochrome P450*. Chichester, West Sussex, John Wiley & Sons, 2002.
- [32] Stiborová, M.; Hudeček, J.; Hodek, P.; Frei, E.: Význam cytochromů P450 pro lidské zdraví. *Chem Listy.* **93**, 229–237 (1999).
- [33] Bak S.; Beisson, F.; Bishop, G.; Hamberger, B.; Höfer, R.; Paquette, S; Werck-Reichhart, D.: Cytochromes P450. In: *Arabidopsis Book*. American Society of Plant Biologists, 2011, p. 2–56. ISSN 1543-8120.
- [34] Coon, M. J.; Ding, X. X.; Pernecky, S. J.; Vaz, A. D.: Cytochrome P450: progress and predictions. *FASEB.* **6**, 669–673 (1992).
- [35] Werck-Reichhart, D.; Feyereisen, R.: Cytochromes P450: a success story. *Genome Biol.* **1**, 1–9, (2000).
- [36] Heuberger, E.; Redhammer, S.; Buchbauer, G.: Transdermal absorption of (-)-linalool induces autonomic deactivation but has no impact on ratings of well-being in humans. *Neuropsychopharmacology.* **29**, 1925–1932 (2004)
- [37] Schrödinger, L. & DeLano, W., 2020. PyMOL, Available at: <http://www.pymol.org/pymol>.

- [38] Denisov, I. G.; Makris, T. M.; Sligar, S. G.; Schlichting, I.: Structure and chemistry of cytochrome P450. *Chem Rev.* **105**, 2253–2277 (2005).
- [39] Omura, T.: Forty years of cytochrome P450. *Biochem Biophys Res Commun.* **266**, 690–698 (1999).
- [40] Backes, W. L.; Kelley, R. W.: Organization of multiple cytochrome P450s with NADPH-cytochrome P450 reductase in membranes. *Pharmacol Ther.* **98**, 221–233 (2003).
- [41] 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).
- [42] Guengerich, F.P.: Cytochrome p450 and chemical toxicology. *Chem Res Toxicol.* **21**, 70–83 (2008).
- [43] Lephart, E. D.: A review of brain aromatase cytochrome P450. *Brain Res Brain Res Rev.* **22**, 1–26 (1996).
- [44] Czajka-Oraniec, I.; Simpson, E. R.: Aromatase research and its clinical significance. *Endokrynol Pol.* **61**, 126–134 (2010).
- [45] Brueggmeier, R. W.; Hackett, J. C.; Diaz-Cruz, E. S.: Aromatase Inhibitors in the Treatment of Breast Cancer. *Endocr Rev.* **26**, 331–345 (2005).
- [46] Spiering, M. J.: On the trail of steroid aromatase: the work of Kenneth J. Ryan. *J Biol Chem.* **294**, 10734–10745 (2019).
- [47] Altundag, K.; Ibrahim, N. K.: Aromatase inhibitors in breast cancer: an overview. *Oncologist.* **11**, 553–562 (2006).
- [48] Chang, M.: Tamoxifen resistance in breast cancer. *Biomol Ther.* **20**, 256–267 (2012).
- [49] Jordan, V. C.: Tamoxifen (ICI46,474) as a targeted therapy to treat and prevent breast cancer. *Br J Pharmacol.* **147**, 269–276 (2006).
- [50] Chumsri, S.; Howes, T.; Bao, T.; Sabnis, G.; Brodie, A.: Aromatase, aromatase inhibitors, and breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol.* **125**, 13–22 (2011).
- [51] Chumsri, S.: Clinical utilities of aromatase inhibitors in breast cancer. *Int J Womens Health.* **7**, 493–499 (2015).

-
- [52] Cuzick, J.: Aromatase inhibitors for breast cancer prevention. *J Clin Oncol.* **23**, 1636–1643 (2005).
- [53] Hiscox, S.; Davies, E. L.; Barrett-Lee, P.: Aromatase inhibitors in breast cancer. *Maturitas.* **63**, 275–279 (2009).
- [54] Campos, S. M.: Aromatase inhibitors for breast cancer in postmenopausal women. *Oncologist.* **9**, 126–136 (2004).
- [55] Alhassan, M.; Lawal, A.; Nasiru, Y.; Suleiman, M.; Safiya, A. M.; Bello, N.: Extraction and formulation of perfume from locally available lemon grass leaves. *ChemSearch Journal.* **9**, 40–44 (2018).
- [56] Wan-Yu, L.; Wen-Cheng, L.; An-Chi, H.; Chi-Min, S.: Determination of the ambience duration of lavender essential oil with three perfume fixatives using the thermokinetics approach. *J Therm Anal Calorim.* **147**, 7551–7561 (2021).
- [57] Zehetner, P.; Höferl, M.; Buchbauer, G.: Essential oil components and cytochrome P450 enzymes: a review. *Flavour Fragr J.* **34**, 223–240 (2019).
- [58] Pramod, K.; Ansari, S. H.; Ali, J.: Eugenol: a natural compound with versatile pharmacological actions. *Nat Prod Commun.* **5**, 1999–2006 (2010).
- [59] Han, E. H.; Hwang, Y. P.; Jeong, T. C.; Lee, S. S.; Shin, J. G.; Jeong, H. G.: Eugenol inhibit 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced genotoxicity in MCF-7 cells: bifunctional effects on CYP1 and NAD(P)H:quinone oxidoreductase. *FEBS Lett.* **581**, 749–756 (2007).
- [60] Lei, Y.; Fu, P.; Jun, X.; Cheng, P.: Pharmacological properties of geraniol - a review. *Planta Med.* **85**, 48–55 (2019).
- [61] Seo, K. A.; Kim, H.; Ku, H. Y.; Ahn, H. J.; Park, S. J.; Bae, S. K.; Shin, J. G.; Liu, K. H.: The monoterpenoids citral and geraniol are moderate inhibitors of CYP2B6 hydroxylase activity. *Chem Biol Interact.* **174**, 141–146 (2008).
- [62] Vieira, A. J.; Beserra, F. P.; Souza, M. C.; Totti, B. M.; Rozza, A. L.: Limonene: aroma of innovation in health and disease. *Chem Biol Interact.* **283**, 97–106 (2018).
- [63] De-Oliveira, A. C.; Ribeiro-Pinto, L. F.; Paumgarten, J. R.: *In vitro* inhibition of CYP2B1 monooxygenase by beta-myrcene and other monoterpene compounds. *Toxicol Lett.* **92**, 39–46 (1997).

- [64] Zhang, W.; Lim, L. Y.: Effects of spice constituents on P-glycoprotein-mediated transport and CYP3A4-mediated metabolism *in vitro*. *Drug Metab Dispos.* **36**, 1283–1290 (2008).
- [65] Kamatou, G. P. P.; Viljoen, A. M.: Linalool - a review of a biologically active compound of commercial importance. *Nat Prod Commun.* **3**, 1183 – 1192 (2008).
- [66] Nosková, K.; Dovrtělová, G.; Zendulka, O.; Řemínek, R.; Juřica, J.: The effect of (-)-linalool on the metabolic activity of liver CYP enzymes in rats. *Physiol Res.* **65**, 499–504 (2016).
- [67] Lin, L. A.; Shangari, N.; Chan, T. S.; Ramirez, D.; O'Brien, P. J.: Herbal monoterpene alcohols inhibit propofol metabolism and prolong anesthesia time. *Life Sci.* **79**, 21–29 (2006).
- [68] Akkol, K. E.; Genç, Y.; Karpuz, B.; Sobarzo-Sánchez, E.; Capasso, R.: Coumarins and coumarin-related compounds in pharmacotherapy of cancer. *Cancers.* **12**, 1–25 (2020).
- [69] Shokoohinia, Y.; Bazargan, S.; Miraghaee, S.; Javadirad, E.; Farahani, F.; Hosseinzadeh, L.: Safety assesment od osthole isolated from *Prangos ferulacea*: acute and subchronic toxicities and modulation of cytochrome P450. *Nat Pharm Prod.* **12**, 1–9 (2017).
- [70] Kleiner, H. E.; Xia, X.; Sonoda, J.; Zhang, J.; Pontius, E.; Abey, J.; Evans, R. M.; Moore, D. D.; DiGiovanni, J.: Effects of naturally occurring coumarins on hepatic drug-metabolizing enzymes in mice. *Toxicol Appl Pharmacol.* **232**, 337–350 (2008).
- [71] Natsch, A.; Hostettler, L.; Haupt, T.; Laue, H.: A critical assessment of the estrogenic potency of benzyl salicylate. *Toxicol Rep.* **8**, 1002–1007 (2021).
- [72] Charles, A. K.; Darbre, P. D.: Oestrogenic activity of benzyl salicylate, benzyl benzoate and butylphenylmethylpropional (Lilial) in MCF7 human breast cancer cells *in vitro*. *J Appl Toxicol.* **29**, 422–434 (2009).
- [73] Barnes, K. J.; Rowland, A.; Polasek, T. M.; Miners, J. O.: Inhibition of human drug-metabolising cytochrome P450 and UDP-glucuronosyltransferase enzyme activities *in vitro* by uremic toxins. *Eur J Clin Pharmacol.* **70**, 1097–1106 (2014).

-
- [74] Howes, M. J.; Houghton, P. J.; Barlow, D. J.; Pocock, V. J.; Milligan, S. R.: Assessment of estrogenic activity in some common essential oil constituents. *J Pharm Pharmacol.* **54**, 1521–1528 (2002).
- [75] 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).
- [76] 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**, 372–282 (2008).
- [77] Ratre, P.; Kulkarni, S.; Das, S.; Liang, C.; Mishra, P. K.; Thareja, S.: Medicinal chemistry aspects and synthetic strategies of coumarin as aromatase inhibitors: an overview. *Med Oncol.* **40**, 1–17 (2022).
- [78] Yancu, D.; Sanderson, T.: Essential oils disrupt steroidogenesis in a fetoplacental co-culture model. *Reprod Toxicol.* **90**, 33–43 (2019).
- [79] 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).
- [80] Zhang, C.; Schilirò, T.; Gea, M.; Bianchi, S.; Spinello, A.; Magistrato, A.; Gilardi, G.; Di Nardo, G.: Molecular basis for endocrine disruption by pesticides targeting aromatase and estrogen receptor. *Int J Environ Res Public Health.* **17**, 1–18 (2020).
- [81] Kabir, E. R.; Rahman, M. S.; Rahman, I.: A review on endocrine disruptors and their possible impacts on human health. *Environ Toxicol Pharmacol.* **40**, 241–258 (2015).
- [82] Ripamonti, E.; Alliffranchini, E.; Todeschi, S.; Bocchietto, E.: Endocrine disruption by mixtures in topical consumer products. *Cosmetics*, **5**, 1–22 (2018).
- [83] Notino, s.r.o. [online]. © 2023. Dostupné z URL: <<https://www.notino.cz> [cit. 15.5.2023].

- [84] 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).
- [85] Adams, L. S.; Chen, S.: Phytochemicals for breast cancer prevention by targeting aromatase. *Front Biosci (Landmark Ed).* **14**, 3846–3863 (2009).